



T.C.

BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***İN VİTRO* VE *İN VİVO* ŞARTLARDA
YETİŞTİRİLEN BITTİM (*Pistacia khinjuk*
STOCKS.) TÜRÜNÜN ETANOL
EKSTRELERİNİN SİTOTOKSİK VE
ANTİHİPERTANSİF ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Hayri BATIBAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ocak-2020
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Hayri BATIBAY tarafından hazırlanan “*In Vitro* ve *In Vivo* Şartlarda Yetiştirilen Bıtım (*Pistacia khinjuk* Stocks) Türünün Etanol Ekstrelerinin Sitotoksik ve Antihipertansif Etkilerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 03/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Danışman

Doç. Dr. Emine AYAZ TILKAT

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Abdullah YILMAZ

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Prof. Dr. Şahnaz TIGREK
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Batman Üniversitesi tarafından .18.019 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Hayri BATIBAY

03.01.2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İN VİTRO VE İN VİVO ŞARTLARDA YETİŞTİRİLEN BİTTİM (*Pistacia khinjuk* STOCKS.) TÜRÜNÜN ETANOL EKSTRELERİNİN SİTOTOKSİK VE ANTİHIPERTANSİF ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Hayri BATIBAY

**Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Emine AYZAZ TILKAT

2020, 63 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Emine AYZAZ TILKAT

Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Abdullah YILMAZ

Bu tez kapsamında, tıbbi ve ekonomik öneme sahip değerli sekonder metabolitleri içeren *Pistacia khinjuk* Stocks. (Bıttım) bitkisinin *in vivo* erkek ve dişi genotipleri ile *in vitro* sürgün kültürlerinden elde edilen kök, gövde ve yaprak kısımlarından hazırlanan ekstrelerin karşılaştırmalı olarak sitotoksik, antihipertansif aktiviteleri ile kolinesteraz, üreaz, tirozinaz ve elastaz gibi enzim inhibisyonu aktiviteleri çalışılmıştır.

Bu bağlamda öncelikle *in vitro* sürgün kültürleri, bıttım ağacına ait olgun tohumların herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamında çimlendirilmesi ile başlatılmış ve elde edilen juvenil sürgünler 1 mg/L 6-Benzylaminopürin (BAP) destekli MS besi ortamında proliferasyonla elde edilmiştir. *In vitro* sürgünler ile *in vivo* erkek ve dişi genotiplere ait kök, gövde ve yapraklar oda sıcaklığında kurularak biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.

Sitotoksik aktivite bakımından çalışılan tüm örneklerin MCF-7 ve HT-29 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonuna örneklerin aktif, ancak asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu göstermedikleri belirlenmiştir. *In vitro* örneklerle ait hiç bir ekstrede antiüreaz aktivitesinin gözlenmediği ayrıca *in vivo* örneklerin *in vitro* örneklerle nazaran daha yüksek üreaz ve tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesine sahip oldukları, antielastaz aktivite bakımından ise sadece *in vitro* yaprak ekstreleri dışındaki tüm ekstrelerin aktif sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Yine *in vivo* örneklerin daha yüksek antihipertansif aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Genel anlamda *in vivo* dişi ve erkek genotiplerin *in vitro* ekstrelerle oranla daha yüksek biyolojik aktivite gösterirken, kök kısımlarından elde edilen ekstrelerin ise gövde ve yaprak kısımlarına oranla daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antihipertansif aktivite, enzim inhibisyonu, *in vitro*, *Pistacia khinjuk* Stocks., sitotoksik aktivite

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF CYTOTOXIC AND ANTIHYPERTENSIVE EFFECTS IN ETHANOL EXTRACTS OF BITTIM (*Pistacia khinjuk* STOCKS) SPECIES RAISED IN *IN VITRO* AND *IN VIVO* CONDITIONS

Hayri BATIBAY

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emine AYZAZ TILKAT

2020, 63 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Emine AYZAZ TILKAT

Assoc. Prof. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Assist. Prof. Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ

Within the scope of this thesis, cytotoxic, antihypertensive and enzyme inhibition activities such as cholinesterase, urease, tyrosinase and elastase were studied comparatively on the root, stem and leaf parts of male and female genotypes and *in vitro* shoot cultures of the *Pistacia khinjuk* Stocks (Bittim) which has medical and economic importance containing valuable secondary metabolites.

In this context, *in vitro* shoot cultures were started by germinating mature seeds of bittim tree in MS medium without any plant growth regulator and juvenile shoots were proliferated for stock culture in 1 mg/L 6-Benzylaminopurine (BAP) supplemented MS medium. The root, stem and leaf part of male and female genotypes of *in vivo* and *in vitro* shoots were dried at room temperature and used in biological activity studies.

In terms of cytotoxic activity, all samples were found to have cytotoxic effect against MCF-7 and HT-29 cell lines. It was determined that no extracts were responsive to butyrylcholinesterase enzyme inhibition, including galantamine, which was active but standardized to acetylcholinesterase enzyme inhibition. It was observed that *in vivo* samples had no urease activity but higher urease and tyrosinase enzyme inhibition activity compared to *in vitro* samples, whereas in terms of antielastase activity, all extracts, except oleanolic acid used as standard, yielded active results only *in vitro* leaf extracts. No antiurease activity was observed in any extract of *in vitro* samples, and *in vivo* samples had higher urease and tyrosinase enzyme inhibition activity than *in vitro* samples; in terms of antielastase activity, it was observed that all extracts including oleanolic acid used as standard, gave active results except *in vitro* leaves extracts. It was also found that *in vivo* samples showed higher antihypertensive activity. In general, it was found that *in vivo* female and male genotypes show higher biological activity than *in vitro* extracts, while extracts obtained from root parts have higher biological activity than stem and leaf parts.

Keywords: Antihypertensive activity, enzyme inhibition, *in vitro*, *Pistacia khinjuk* Stocks., cytotoxic activity

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim süresince, tezimin planlanması ve doku kültürü çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen, tezimin şekillenmesinde katkıları olan sayın hocam Doç. Dr. Emine AYZAZ TİLKAT'a, biyolojik aktivite çalışmalarımın her aşamasında hem laboratuvar, hem de bilgi ve desteğini her daim gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Abdülislam ERTAŞ'a ve analiz ve hesaplamalarda yardımlarını gördüğüm sayın hocalarım Mustafa Abdullah YILMAZ ve İsmail YENER'e, tanıdığım günden beri çalışma prensibi ve akademik duruşuyla örnek olan ve her türlü yardımlarını gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Engin TİLKAT'a yine bilgi ve birikimi ile beni yönlendiren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER'e, laboratuvar arkadaşlarım Ayşe HOŞER, Zelal YAĞABASAN ve Orhan YEL'e, ve son olarak çalışmama maddi yönden kaynak sağlayan Batman Üniversitesi Proje Ofisi Kurumu'na teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan beni büyüterek bugünlere getiren canım anneme ve desteklerini her daim hissettiğim tüm aile fertlerime sabır ve fedakârlıklarından ötürü çok teşekkür ederim.

Hayri BATIBAY
BATMAN-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. <i>P.khinjuk</i> Stocks. Türü Hakkında Genel Bilgiler	4
2.2.1. Anacardiaceae familyasının genel özellikleri	4
2.2.2. <i>Pistacia</i> L. cinsi	4
2.2.3. <i>P.khinjuk</i> Stocks.'un biyolojik özellikleri.....	5
2.2. Bitkilerde Doku Kültürü Teknikleri ve Avantajları.....	6
2.3. Bitki Sekonder Metabolitleri	8
2.4. Bitkilerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Önemli Analitik Teknikler.....	10
2.4.1. Sitotoksik etki	10
2.4.2. Hipertansiyon ve antihipertansif etki	12
2.4.4. Kolinesteraz enzimleri (AChE, BChE).....	13
2.4.5. Üre ve antiürez enzimi	14
2.4.6. Tirozin ve antitirozinaz enzimi	15
2.4.7. Elastin ve antielastaz enzimi.....	16
2.5. <i>P.khinjuk</i> Stocks. İle İlgili Yapılan Mikroçoğaltım ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24

3.1. Bitkisel Materyal.....	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Doku kültürü çalışmaları	24
3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları.....	27
3.2.3. İstatistiksel analiz.....	34
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Doku Kültürü Uygulamalarına Ait Sonuçlar ve Tartışma	34
4.1.1. Tohumların çimlendirilmesi ve proliferasyonu çalışmaları	34
4.1. Biyolojik Aktivite Uygulamalarına Ait Sonuçlar ve Tartışma	35
4.1.1. MTT testi ile sitotoksik aktivite sonuçları	35
4.1.2. Antihipertansif aktivite sonuçları.....	36
4.1.3. Enzim inhibisyonu aktivitelerine ait sonuçlar	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	44
5.1 Sonuçlar	44
5.2. Öneriler	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
rpm	: Devir/Dakika
s	: Saat
sn	: Saniye
U	: Enzim ünitesi
ACh	: Asetilkolin
ACE	: Anjiyotensin-dönüştürücü enzim
AChE	: Asetilkolinesteraz
AcI	: Asetiltiyokolin iyodür
AH	: Alzheimer Hastalığı
BAP	: 6- benzil adenin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
BCh	: Bütirilkolin
BChE	: Bütirilkolinesteraz
BcI	: Butiriltiyokolin iyodür
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
DTNB	: 5,5- ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
E.C.	: Enzim kod numarası
EtOH	: Etil alkol
HCl	: Hidroklorik asit
HT	: Hipertansiyon
HT-29	: Kolon kanseri serisi
HPLC-DAD	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IBA	: Indol bütirik asit
LDH	: Laktat dehidrojenaz
MCF-7	: Meme kanseri hücre serisi
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
MS	: Murashige ve Skoog
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
PDF	: Primary Dermal Fibroblasts serisi
XTT	: 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-
karboksianilid	
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde birçok bitkinin çok eski çağlardan beri tıbbi amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Tıbbi bitkiler ve onların kullanımları ile ilgili en eski bilgilerin Çin, Mısır ve Yunan tarihinden geldiği, Hitit'ler döneminde ise bazı drogların üretilip ihraç edildiği belirtilmiştir. Dünyada kullanılan bitki sayısının 20.000 civarında olduğu günümüzde, 4.000 drogun yaygın şekilde kullanıldığı ve yaklaşık olarak 400 kadarının ise ticaretinin yapıldığı rapor edilmiştir (Sarı ve ark., 2008). Tedavi amacıyla kullanılan birçok bitkinin içerdiği sekonder metabolitlerin saflaştırılması, bunların farmakolojik ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi sonucunda, doğal kaynaklı ilaç etken maddeleri bulunmuştur. Dünya genelinde hastalıkların bitkilerle tedavisi XIX. yüzyıla kadar sürmüştür, daha sonra kimya sanayisindeki gelişmeler ilaç sanayisini etkilemiş ve sentetik ilaçlar bitkilerin yerini almaya başlamıştır. Ancak sentez yoluyla elde edilen ilaçların yan etkilerinin fazla olması ve organizmaların antimikrobiyal sentetik ilaçlara karşı direnç oluşturmaları nedeniyle modern tıbbın hastalık tedavisinde yetersiz kaldığı noktalar gün yüzüne çıkmıştır.

Bitkilerin çoğu, tıbbi öneme sahip sekonder metabolitleri (terpenler, fenolik bileşikler, azot içeren sekonder metabolitler vb.) barındırarak bilimsel, teknolojik ve ticari uygulamalar için ham madde kaynağı oluşturur (Kılınçarslan, 2016). Bir zamanlar bu fitokimyasalların atık birer metabolizma ürünleri olduğu düşünülse de yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde ilaç hammaddesi olarak kullanılmasının yanı sıra gıda katkı maddesi, kozmetik, parfümeri ve zirai alanların da dahil olduğu oldukça geniş bir yelpazede aktif olarak kullanıldıkları rapor edilmiştir (Banerjee ve ark., 2011). Birçoğunun antibakteriyal özellikte, bitkinin savunma mekanizmasında önemli yere sahip bileşenler olduğu rapor edilmiştir. Bazı terpenlerin ve pigmentlerin bitkilerin tozlaşmasına yardımcı oldukları veya otobur hayvanlara karşı bir savunma mekanizmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Bazı sekonder metabolitlerin ise bitkileri aktif oksijen türleri ve UV ışınlarına karşı koruduğu bildirilmiştir (Raven ve ark., 2005).

Dünya üzerinde kozmopolit yayılış gösteren Anacardiaceae familyası, *Pistacia* cinsinin de dâhil olduğu yaklaşık 70 cins ve 600'ün üzerinde türü barındırmaktadır. *Pistacia* cinsine ait türler, her dem yeşil veya yaprak döken, reçine veren çalı ya da kserofit bitki şeklinde karakterize olabilen ve 8-10 m boyunda büyüyen ağaçlardır (Bozorgi ve ark., 2013). Cinsin tüm üyeleri dioik olup erkek ve dişi olmak üzere ayrı bireylerden oluşmaktadır (Sola-Campoy ve ark., 2015). Ancak *P. atlantica* için birkaç

monoik bireyler de rapor edilmiştir (Turkeli ve Kafkas, 2012). *Pistacia* L. cinsinin orjinini, Merkezi Asya (Kuzey Doğu Hindistan, Afganistan, Tacikistan ve Özbekistan) ve Anadolu, Yakın Doğu, Kafkasya, Dran ve Türkmenistan dağları oluşturmaktadır (Onay, 1996). *Pistacia* cinsine mensup ağaçların gövde ve dallarında bol miktarda reçine bulunur. Reçine, uçucu yağlarla birlikte sayısız bileşenden oluşan bir komplekstir. Fitokimyasal maddelerden oluşan ve bu uçucu yağlarla zenginleştirilmiş reçine, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, hipokoleserolemik, antiaterojenik, antikanser vb. gibi çeşitli farmakolojik özellikler taşımaktadır (Dimas ve ark., 2012; Paraschos ve ark., 2007). Triterpenoidleri uçucu yağın önemli bir bileşenini oluşturmaktadır ve reçineli yağın antikanser potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir (Bozorgi ve ark., 2013).

Pistacia türlerinin reçine, meyve ve gövdeleri dâhil olmak üzere çeşitli kısımları geleneksel tıpta çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin, *P. vera*'nın tohumu kalp, karın, karaciğer ve beyin tedavisi; *P. atlantica*, *P. khinjuk* ve *P. terebinthus*'un meyveleri afrodisyak aktivitelerinin yanında, karaciğer, böbrek, kalp ve solunum sistemi bozukluklarının tedavisinde; *P. lentiscus*, *P. atlantica* ve *P. khinjuk* yaralarının iyileştirilmesinde; *P. atlantica* ile *P. khinjuk*'un yapraklarının baskın bileşeni olan anazulenik seskiterpen alkol, beyin ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde uzun yıllar boyunca kullanılmıştır. Reçineleri ise mide rahatsızlığı, bulantı, kusma ve hareket hastalığı (araç tutması) için kullanılır. Myricetin-3-glucoside, myricetin-3-galactoside, vemyricetin-3-rutinosid, *P. khinjuk*'ta bulunan flavonoid glikozitlerdir. *P. khinjuk*'un yaprakları Spathulenol içerir. Yapraklarının kloroform, etil asetat, etil alkol ve dietil eter ekstraktları, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* (MİK=0.02-0,5 mg/mL) gibi bakteriler ve *Candida albicans* ile *Saccharomyces cerevisiae* (MİK =0,06–0,4 mg/mL) gibi mantarlara karşı aktivite gösterir. *P. khinjuk* 'un toprak üstü kısımlarından α -pinene, β -pinene, myrcene, beta-caryophyllene, Germacrene B, ve Spathulenol gibi bazı aktif bileşenleri antibakteriyal ve antifungal aktiviteye de sahiptir (Bozorgi ve ark., 2013). Antepfıstığının çoklu doymamış yağ asitlerinin antihipertansif etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu yağların total kolesterol seviyesinin düşürülmesinde, meme kanseri riskini azaltmada ve kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkları önlemede etkili oldukları rapor edilmiştir (Labdelli ve ark. 2019). Her ne kadar sentetik ilaç sanayinin gelişmesi ile bitkilerin tedavide kullanımı azalmışsa da, sentetik ilaçların tehlikeli yan etkilerinin bulunması ve bitkisel ilaçların çok yönlü etkiye sahip olmaları, bu bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif bileşikler üzerindeki çalışmaların artmasına

neden olmuştur. Bitkilerin tedavi edici etkilerinin hangi maddelerden ileri geldiğini belirlemek amacıyla yapılan araştırmalar dikkat çekici bir hızla devam etmektedir.

Bu bağlamda, tıbbi öneme sahip *P.khinjuk* Stocks'un hem tohumlarından *in vitro* şartlarda sürgün kültürleri yoluyla yetiştirilen kök, gövde ve yapraklarının hem de *in vivo* (doğal) koşullarda yetişen erkek ve dişi genotiplerine ait kök, gövde ve yapraklarının sitotoksik ve antihipertansif aktiviteleri ile asetilkolinesteraz (AChE), bütirikolinesteraz (BChE), üreaz, tirozinaz ve elastaz gibi enzim inhibisyon aktiviteleri incelenerek karşılaştırılmıştır. *In vitro* uygulamalara ait çalışmalar ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirilmiş olup aşağıda sunulmuştur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *P.khinjuk* Stocks. Türü Hakkında Genel Bilgiler

2.2.1. Anacardiaceae familyasının genel özellikleri

Çoğu ılıman bölgelerde yetişen, genellikle tüysüz, bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Genellikle kabukları reçineli ağaçlar veya çalılardır. Yapraklar alternat, basit, trifoliat veya pinnat, stipülsüz, çiçekler uçta veya yaprak koltuklarında panikula durumunda, erdişi veya tek eşeyli, çoğunlukla aktinomorf simetrik, sepallar 3-5, kaidede birleşmiş veya nadiren hiç yoktur. Petaller 3-5 adet, serbest veya kaidede birleşik veya nadiren hiç yok, stamenler petallerin iki katı kadar, nadiren daha çok veya az, iki halkada dizilmişlerdir. Pistil 1, ovaryum üst durumlu, genellikle bir lokuluslu ve 3 karpelli, nadiren 5 lokulus ve karpelli, ovüller her lokulusta tek, anatrop, plesantasyon parietal veya bazal görünüşlü, meyve drupa'dır (Seçmen ve ark., 2008).

2.2.2. *Pistacia L.* cinsi

2 evcikli (dioik), yaprak döken veya herdem yeşil ağaçlar veya çalılardır. Yapraklar pinnat, nadiren trifoliat veya basit yapıdadır. Kaliks 5 parçalı, apetal ve meyve bir tohumlu drupa'dır. Akdeniz ve Asya bölgesinde yayılış gösteren 20 kadar türü vardır.

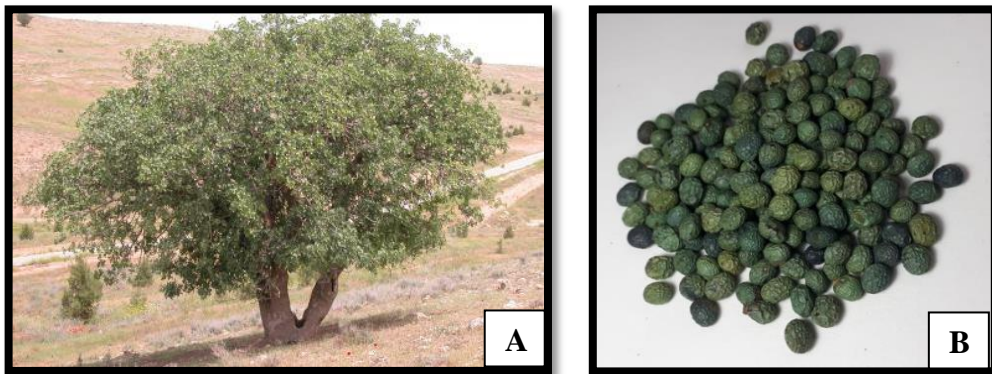
P.khinjuk Stocks.'un sistematikteki yeri

P. khinjuk'un sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir;

Alem	:	Plantae
Altalem	:	Tracheobionta
Bölüm	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Magnoliopsida
Altsınıf	:	Rosidae
Takım	:	Sapindales
Aile	:	Anacardiaceae
Cins	:	<i>Pistacia</i>
Tür	:	<i>P. khinjuk</i> Stocks

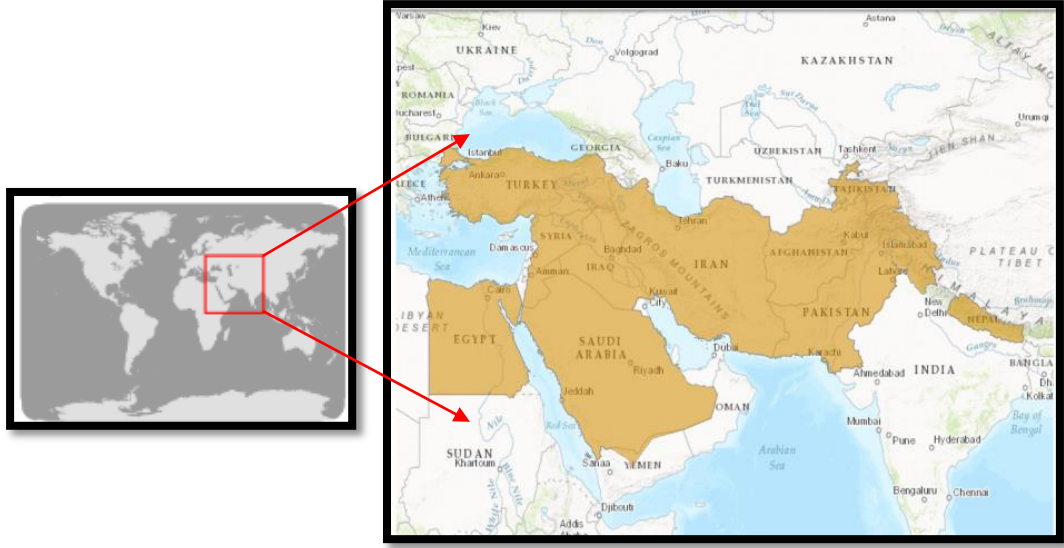
2.2.3. *P.khinjuk* Stocks.'un biyolojik özellikleri

P. khinjuk Stocks, genellikle çalı veya ağaççık formunda gelişen, 2–5(10) m'ye kadar boylanabilen, yaprak döken, dioik ve kserofit bir bitkidir (Şekil 2.1. A, B). (Yaltırık, 1967). Odunsu yapılarında dikey reçine kanalları içerirler. Yapraklar imparipinnat, yaprak sapı köşeli ya da yuvarlaktır. Yaprak eksenini kanatsız, yaprakçık sayısı 1–9 arasındadır. Yaprakçıklar karşılıklı, şekli ovattan geniş ovata kadar değişebilen, yaprakçık tepesi akuminat ve tüysüz ve uçta bulunan yaprakçık genellikle yanda bulunan yaprakçıklardan daha büyüktür. Stamenli çiçekler bileşik salkımlı, 9 cm uzunluğa kadar olabilen, zayıf dallanmış, brakteleri büyük ve beyaz tüylüdür. Çiçekleri koyu kırmızı renktedir. Pistilli çiçekler bileşik salkımlı, 16 cm uzunluğa kadar olabilen, tabandan dallanmış, toplu, tüysüz olabilecek kadar çok az tüylüdür. Meyveler drupa, koyu yeşil renkte, biraz basık küremsi şekillidir. Çiçeklenme Mart- Mayıs aylarında gerçekleşirken, meyve oluşumu Nisan- Ekim aylarında gerçekleşir (Al Saghir ve Porter, 2012; Onay ve ark., 2017).



Şekil 2.1. *P. khinjuk* Stocks. ağacının (A) ve tohumlarının genel görünümü (B)

Genellikle kayalık ve dik yamaç habitatlarında, ormanlarda veya sesil olarak bulunur (Ghaemmaghami ve ark., 2009). Kireçli taşlı topraklar başta olmak üzere, hemen her türlü toprakta yetişebilir. Deniz seviyesinden yüksekliği 400 m ile 2.400 m arasında olan bölgelerde yayılış gösterir (Al-Saghir ve Porter, 2012). Şekil 2.2'de görüldüğü üzere Afganistan; Mısır (Sina); Hindistan (Himachal Pradesh, Jammu-Keşmir); İran; Irak; Ürdün; Nepal; Pakistan; Suudi Arabistan; Suriye; Tacikistan ve Türkiye doğal yetişme alanları içerisindedir (Rhodes ve Maxted, 2016).



Şekil 2.2. *P. khinjuk* Stocks. 'un coğrafik dağılışı (Rhodes ve Maxted, 2016).

2.2. Bitkilerde Doku Kültürü Teknikleri ve Avantajları

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Bitkisel üretimde doku kültürü yöntemlerinin kullanım alanlarından biri de ticari amaçlı klonal üretim yani mikroçoğaltım'dır. Mikroçoğaltım: Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallu kallus vb) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesidir (Öncel, 2011).

Bitki hücre ve doku kültürleri aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar;

1-Organ Kültürleri

-Kök kültürleri

-Sürgün (apikal) kültürleri

-Anter ve polen kültürleri

2-Doku Kültürleri (Kallus)

3-Hücre Kültürleri (Protoplast ve hücre süspansiyonları)

4-Somatik Embriyogenezis

5-Mikroaşılama

Bitki doku kültürü teknikleri ile bitkilerin hücre, doku, organlarından kozmetik, farmasötik veya tarımsal açıdan önemli sekonder metabolitler de üretilebilmektedir. Bu amaçla üretimin daha verimli, daha ucuz ve ürünün daha çok miktarda olması için gün geçtikçe yeni yöntemler keşfedilmektedir. Moleküler biyolojik araştırmalarla ürün verimini artırma, bir materyalden birden çok ürün alma veya genetiği değiştirilmiş bitkilerden yeni ürünlerin kazanılması gibi metotlar geliştirilir.

Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolit üretimi daha güvenilir, basit ve tahmin edilebilirdir. Normalde ana bitkide bulunmayan bileşiklerin de üretilebilmesine olanak sağlar. Politik, coğrafik ve mevsimsel engellerden bağımsız üretim yapılabilir. Karmaşık bitki ekstraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında fitokimyasalların izolasyonu daha çabuk ve etkili yapılabilir. Hücre kültürleriyle bitkinin kendisinden elde edilen fitokimyasalların miktarı karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden çok daha fazla miktarda ürün elde edilebilir hatta üretim endüstriyel boyuta taşınabilir. Hücre kültüründe genetik uygulamalara yönelik işaretlemeler ve değişimler yapılabilir. Temel araştırmalara (örneğin metabolik ve biyokimyasal yolların anlaşılmasında) yol gösterici tاینler yapılabilir (Yağcı ve ark., 2008).

Öncelikle başarılı bir mikroçoğaltım için ise, sırasıyla şu aşamalar gerçekleştirilmelidir;

1. Hazırlık aşaması: Bu aşama esas olarak kontaminasyon problemlerinin en aza indirilmesi amacıyla, anaç bitkilerin hijyenik koşullar altında yetiştirilmesini kapsamaktadır.

2. Kültür başlangıç aşaması - Eksplant seçimi: Mikroçoğaltımda çoğunlukla eksplant olarak tohum, tepe ve koltuk altı tomurcuklar seçilmekle birlikte farklı organlarda eksplant olarak kullanılmaktadır.

-Sterilizasyon: Mikroçoğaltımda kullanılan eksplantlar aseptik koşullara konulmadan önce tam anlamıyla sterilize edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri bitkinin yetiştiği ortama ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi sterilizasyonun başarısını etkilemektedir. Ayrıca bitki dokularının zarar görmemesine dikkat edilmelidir.

- Başlangıç ortamları: Her bitki türü için kullanılan besin ortamları, inorganik maddeler (makro ve mikro besin elementleri), organik maddeler, bitki büyüme düzenleyicileri ve diğer (şeker, agar) maddeleri içermektedir. Kültür amacına ve bitki

özelliğine bağlı olarak ortam bileşimi ve konsantrasyonlarında değişiklik olabilmektedir.

- Çevresel faktörler: Kültür odasındaki ışık, sıcaklık ve nem bitki türlerinin isteğine göre sürekli kontrol altında tutulmalıdır.

3. Sürgün çoğaltım aşamaları

- Besin ortamları: Başlangıç için kullanılan ortamlar çoğaltım aşamasında da kullanılabilir ve bazı durumlarda değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır.

4. Sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması: Materyalin kültüre alınmasından sonra çoğaltımda kullanılan bitki tür ve çeşidinin çoğalabilme özelliğine bağlı olarak çeşitli sayıda yeni sürgün meydana gelmektedir. Bu sürgünler ayrılarak daha geniş kaplar içerisinde alt kültürlere alınır. Köklendirme aşamasına geçilene kadar alt kültüre devam edilir. Akabinde sürgünler köklendirme ortamında kültüre alınır.

5. Dış ortama alıştırma (aklimatizasyon) aşaması: Steril koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda yüksek nem içeren ve tüm besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda geliştirilen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip dış ortama aktarılması çok dikkatli ve aşamalı olarak yapılmalıdır. (Mansuroğlu ve Gürel, 2001; Öncel, 2011).

2.3. Bitki Sekonder Metabolitleri

Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilen ve bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, bitkide savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş mekanizmaların ürünleridir. Bu maddelerin bitkideki önemli görevleri şunlardır:

1) Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vs. gibi değişik çevre faktörlerinin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma,

2) Herbiyorlara (böcek, sürüngen vb.) karşı savunma,

3) Mikroorganizmalara (bakteri, mantar vb.) karşı savunma,

4) Bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevler (örneğin; tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbettirme gibi). sekonder metabolitlerin günlük hayattaki önemine gelince bu kimyasallar başta ilaç sanayisinin hammaddesi olup kozmetik, besin katkı maddesi, zirai ilaç sanayiinde ve birçok kimya sektöründe

kullanılmaktadır. sekonder metabolitlerin kullanım alanlarını başlıklar altında sıralayacak olursak;

1) İlaç hammaddesi olarak kullanılan sekonder metabolitler (örneğin, aspirinin hammaddesi söğüt ağacının kabuklarından elde edilen asetilsalisilik asittir),

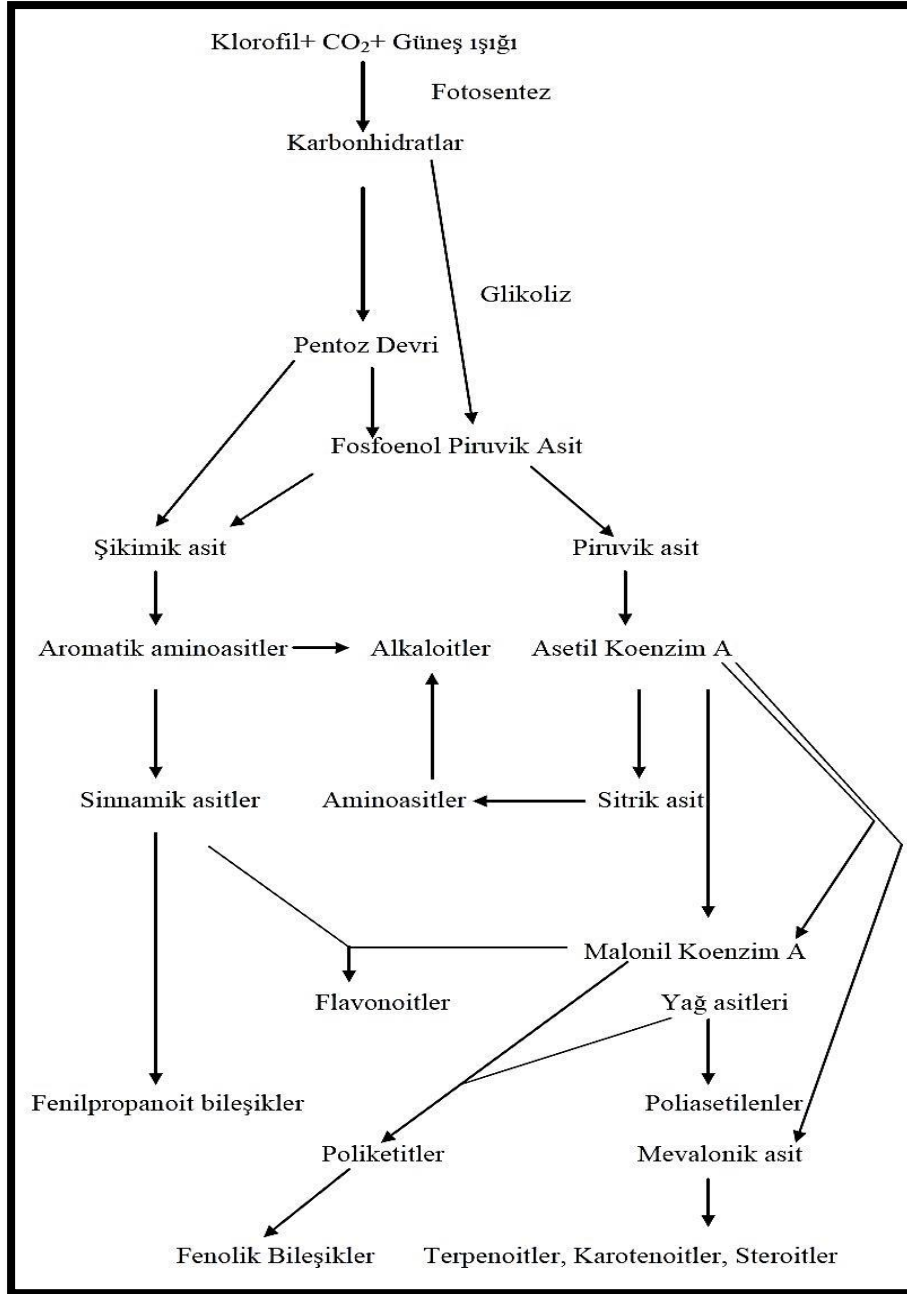
2) Besin katkı maddesi olarak kullanılan sekonder metabolitler. Besin endüstrisinde sekonder metabolitler tat ve koku verici maddeler olarak kullanılırlar.

3) Zirai ilaç olarak kullanılan sekonder metabolitler. Zirai mücadelede de sekonder metabolitlerin oldukça önemli yeri vardır. Bunun en önemli sebebine gelince sekonder metabolitler doğaldır. Diğer suni insektisitler (böcek öldürücü maddeler) gibi çevreye olumsuz etki yapmazlar.

4) Kozmetik sektöründe kullanılan sekonder metabolitler. Örneğin, bitkilerden elde edilen hoş kokulu bileşikler olan uçucu yağlar parfüm sanayinde kullanılır (Yılmaz, 2011).

Sekonder metabolitler, birincil metabolizma yollarının ana ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilmektedirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılmaktadır. Başlıca terpenler, fenolik bileşikler ve alkaloidler olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Bu gruplar kimyasal olarak birbirlerinden farklı olup, glikoliz, fotosentez ve krebs döngüsü süreci boyunca gerçekleşen metanolik yan basamaklardan üretilmektedir. Primer metabolizmanın ana yolları olan bu süreçlerin ara ürünleri olan asetil coA, şikimik asit, mevalonik asit ve aromatik aminoasitler üzerinden sekonder metabolitler sentezlenmektedir (**Şekil 2.3.**) Bitkiler âleminde primer metabolitlerden daha sınırlı bir dağılıma sahiptirler, yani genellikle yalnızca bir bitki türünde veya türlerin taksonomik olarak yakın gruplarında bulunmaktadır. Çoğunlukla bitkilerin belli organlarında bulunurlar ve bitkinin belli bir gelişim periyodu süresince üretilirler.

Sekonder metabolitlerin yüksek konsantrasyonları bitkinin daha dirençli olmasını sağlayabilmektedir (Kılınçarslan, 2016). Bu bağlamda, bitki doku kültürü yöntemleri ile daha dirençli bitkilerin oluşturulabileceği de görülmüştür. Örneğin *Catharanthus roseus* bitkisine ait sürgün kültürlerinin katarantin ve vindolin'i; *Atropa belladonna*'nın sürgün kültürlerinin ise tropan alkaloidlerini doğal olarak yetişen bitkilerine oranla daha yüksek seviyede sentezlediği rapor edilmiştir (Kartal, 2013).



Şekil 2.3. Sekonder metabolitlerin biosentezi (Yılmaz, 2011)

2.4. Bitkilerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Önemli Analitik Teknikler

2.4.1. Sitotoksik etki

2.4.1.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan ve genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan kompleks bir hastalıktır. Tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etkisini gösterebilir. Ölüm nedeni

olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir (Baykara, 2016). Kanser %90 çevresel, %10 oranında ise genetik faktörlere bağlı oluşmaktadır. Çevresel faktörler arasında da tütün, alkol, obezite, sağlıksız beslenme ve enfeksiyonlar ilk sıralarda yer almaktadır (Web 1.).

Dünyada yaklaşık her yıl 7 milyon insan kansere yakalanmakta ve 5 milyon insan kanser nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Türkiye'de ise her yıl 150 bin kişi kansere yakalanmakta ve yaklaşık 400 bin insan da kanserle yaşamaktadır. Dünyada ölüm nedenleri içinde ikinci sırada olan kanserin 2030 yılında hızla artarak ölüm nedenleri arasında birinci sıraya yükselmesi öngörülmektedir. Ülkemiz istatistiklerinde ise bu oran %38 kalp damar hastalıkları ve %29 kanser hastalıkları ile ölümler seyretmektedir. Kadınlarda en sık görülen kanser hastalıkları başta meme kanseri olmak üzere, akciğer, uterus ve kolon kanserleri takip etmektedir. Erkeklerde ise en sık görülen kanser türleri başta akciğer kanseri olmak üzere, prostat, mide ve kolon kanserleri takip etmektedir.

Günümüzde çoğu kanser çeşidinin kesin tedavisi sadece erken teşhis ile sağlanabilmektedir. Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, cerrahi, immünoterapi, hormon terapisi, hedeflenmiş terapiler ve gen terapi gibi biyolojik terapiler tek başına veya birlikte kullanılabilirler. Tüm dünyada bir yandan kanser ve benzeri hastalıkların artması, öte yandan insanların eğitim seviyesinin yükselmesi, internet ve medya sayesinde sağlıklı beslenme ve dolayısıyla antioksidan ve antikanser bileşikler ve fonksiyonel gıdalara (nutraceuticals) olan ilgi artmıştır. Bu nedenlerle hem koruyucu olarak, hem de hastalıklarla mücadele etmede ve/veya özellikle yaşlı nüfusun yaşam kalitesini arttırabilmek için kullanılacak olan gıda tamamlayıcısı veya hazır gıdalara konan gıda koruyucularının yanı sıra kanser ve yaşlanmayla ilgili rahatsızlıklarda kullanılacak olan ilaçlar için doğal ürünlere olan ilgi çok fazladır. Bu ilgi konuya uzak bilim adamlarının zannetiğinin aksine Amerika, Almanya, Japonya ve Kanada gibi gelişmiş ülkelerde çok daha fazladır. Dolayısıyla, dünyada bu konularla ilgili araştırmalar hızla sürmektedir (Akdeniz 2018; Baykara, 2016).

2.4.1.2. MTT ve Sitotoksik Aktivite

Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında özel olarak tasarlanmış kaplarda, ısı, nem, besin gibi ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyondan uzak bir şekilde yaşatılmasıdır. Hücre kültürünün sıkça tercih

edildiği alanlar kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi ve *in vitro* sitotoksosite çalışmalarıdır.

Sitotoksosite, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksosite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksosite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir. Sitotoksosite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler. Hücre bazlı sitotoksosite çalışmaları ile test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir. Deneysel olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır. Hücre canlılığının belirlenmesi için uygulanan çok sayıda test vardır. Yapılan sitotoksosite çalışmasının tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir.

Sitotoksosite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir. Kolorimetrik metodlarda, 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid (XTT), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır (Akdeniz, 2018).

2.4.2. Hipertansiyon ve antihipertansif etki

Hipertansiyon (HT), toplumların önemli bir halk sağlığı sorununu oluşturan kardiyovasküler hastalıkların en sık görülenidir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre; sistolik kan basıncının 140 mmHg, diyastolik kan basıncının da 90 mmHg veya üzerinde bulunması HT olarak tanımlanmaktadır.

HT, arter içi kan basıncının artması ile karakterize genetik ve metabolik bozuklukların birlikte rol oynadığı bir sendromdur. Yaşı ≥ 80 olanlarda, sistolik kan

basıncının 150 mm Hg'ye kadar kabul edilebilir olduğu bildirilmektedir (Özpancar, 2016). HT sıklığı yaşla birlikte artmakta; obezite, besin alımı, fiziksel aktivite ve diyabet gibi faktörlerle hipertansiyon gelişimi arasında ilişki olduğu bilinmektedir. Tedavi edilmediğinde kalp yetersizliği, böbrek yetersizliği, felç, görme kaybı gibi pek çok hastalığa neden olabilmektedir. Ayrıca bu hastalık bütün ölümlerin %20-50'sine sebep olan kardiyovasküler mortalitenin temel risk faktörlerindedir (Erci ve ark., 2018). Hastalığın tedavisinde genellikle anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, beta-blokörleri ve kalsiyum kanalı bloke edicileri gibi çeşitli antihipertansif ilaçlar kullanılmakla birlikte yan etkilerinin fazlalığı da rapor edilmiştir (Singh ve ark., 2015; Ho Jung ve ark., 2018).

2.4.4. Kolinesteraz enzimleri (AChE, BChE)

Alzheimer Hastalığı

Alman psikiyatrist Aloist Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmış olan Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılardaki primer dejeneratif demansın en sık görülen formudur. Demans, bilinci açık bir insanın günlük yaşamını etkileyecek derecede zihinsel ve sosyal uyum yeteneğinin azalması durumudur. Alzheimer merkezi sinir sisteminin bazı kısımlarında nöron ve sinaps kaybıyla ortaya çıkan; bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar gibi belirtiler gösteren progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı sinsiçe başlar ve ilerler. Alzheimer hastalığında en erken belirti, genellikle hafıza kaybının ilerlemesidir. Başlangıçta bu hafıza kaybını yaşlılığa bağlı unutkanlıktan ayırmak güç olabilir. Ancak unutkanlığı olanlar bu durumun farkındadır ve günlük yaşam aktiviteleri minimal düzeyde etkilenir. Yeni bilgilerin hemen unutulması, yakın geçmişi hatırlayamamak, buna karşılık uzak geçmişi çok iyi hatırlamak önemli bir özelliktir. Alzheimer hastalarında konuşma bozukluğu siktir, cümle kurmakta zorlanırlar. Hastalık ilerledikçe bellek problemleri artar. Zamanla kişisel bakımlarını yapamaz hale gelirler, psikiyatrik belirtiler başlar ve hasta yatağa bağımlı kalır.

Asetilkolin (ACh) beyinin bellek ile ilgili bölgelerinde önemli bir nörotransmitterdir Alzheimer hastalığında ACh azalması bellek bozukluğu ile ilişkilidir. Alzheimer hastalığında temel sorun kolinerjik sistemdeki azalma ve glutamat toksisite artışı sonucunda nöron kaybı oluşmasıdır. Alzheimer hastalığında meydana gelen kolinerjik kaybın, depresyon, ajitasyon, anksiyete, psikoz gibi çeşitli davranışsal ve

psikiyatrik belirtilerin hastalarda gözlenmesine neden olduğu belirtilmiştir (Akdeniz, 2018).

2.4.4.1. AChE ve BChE enzimlerinin inhibitörleri

Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirikolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferel sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır.

Kolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanımı ilk olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration, FDA) tarafından kanıtlanmıştır. Alzheimer hastalarındaki tedavi edici etkileri 6 ile 36 hafta arasındaki tedavi süresince incelenmiş ve bilişsel fonksiyonlarındaki artış gözlenmiştir. Kolinesterazların, hastalığı engelleyici ve nörolojik olarak koruyucu etkisinden dolayı, hastalığın ilk safhalarında da nörotoksisiteyi ve fonksiyonel komplikasyonları engellemesi Alzheimer hastalığının tedavisinde umut olmuştur (Akdeniz, 2018).

2.4.5. Üre ve antiürez enzimi

Ürez enzimi (Üre amidohidrolaz; E.C. 3.5.1.5.), hidrolaz kategorisine giren, üreyi karbon dioksit ve amonyuma normal reaksiyonlara göre 1014 kat daha hızlı kataliz eden bir enzimdir.

Ürez enzime özel ilgi gösterilmesinin üç nedeni vardır. İlk neden 1926 tarihinde Sumner tarafından kristal bir halde izole edilen ilk enzim olması, ikinci neden 1975’de Dixon ve arkadaşları tarafından metaloenzimler içerisinde nikel içeren ilk enzim olduğunun bulunması, üçüncüsü ise proteinlerdeki sülfhidril grupların varlığının 1951’de aynı araştırmacı tarafından ilk kez ürez için tanımlanabilmiş olmasıdır.

Ürez birçok bitki, lifli mantarlarda, alg, omurgasız ve bakterilerde bulunan bir enzimdir. Bilinen bütün ürezlerin amino asit dizilişleri yüksek derecede benzerlik gösteriyor olmasına rağmen bulunduğu kaynağa bağlı olarak ürez enziminin bir, iki veya üç polipeptit zincirinden oluşmuş olabileceğini göstermektedir. Biyokimyasallık baz alındığında en iyi karakterize edilen yeşil fasulye (*Canavalia ensiformis*) üreazıdır. Bitki ürezleri ile ilgili en iyi genetik veriler soya fasulyesi (*Glycine max*) üreazına aittir. Embriyo-spesifik ürez yeşil fasulye ve soya fasulyesi gibi tohumlarda bol bulunurken diğer tip ürezler birçok bitkinin vejetatif dokularında daha az oranlarda bulunmaktadır.

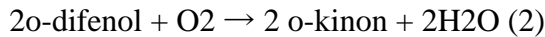
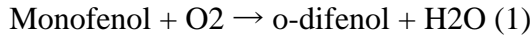
Üreazın işlevi *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda oluşan üreyi hidroliz etmek ve oluşan ürünleri azot kaynağı olarak organizmanın kullanımına sunmaktır. Bu ürünlerden biri olan amonyum iyonu bitkiler ve toprak mikroorganizmaları tarafından alıkonup kullanılır (Akdeniz, 2018).

2.4.6. Tirozin ve antitirozinaz enzimi

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, katekolaz, monofenol oksidaz veya fenolaz olarak da bilinmektedir. Tirozinaz ismi substrat olarak enzimin tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliği sebebiyle verilmiştir.

Tirozin; norepinefrin, dopamin, melanin, epinefrin ve tiroksinin ön maddesidir. Endojen olarak fenilalaninden sentez edilir. Proteinlerle de vücuda alınmaktadır.

Tirozinaz doğada çokça bulunur. Daha yaygın olarak bitkilerde bulunuyor olmasına rağmen, bazı hayvan organlarında ve mikroorganizmalarda genellikle mantarlarda bulunur (Parvez ve ark. 2007). Tirozin monofenolazla hidroksilasyona uğrar. 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) difenolazile oksidasyona uğrayarak o-dopakinon'a dönüşmektedir. O-dopakinon sulu çözeltilerinde stabil olmamakla birlikte hızlıca non-enzimatik reaksiyon verir.



Tirozinaz, melanositlerdeki melanini biyosentetik yolunda üç farklı reaksiyonla kataliz etmektedir. Birinci yol; L-DOPA'nın dopakinon'a oksidasyonu. İkinci yol; tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu. Bunlara ek olarak üçüncü yol ise, insanlarda siklizasyon, dopakinonun ve oksidatif polimerizasyonu da içeren bir seri kompleks reaksiyonla melaninine dönüşmesidir.

Anormal melanin pigmenti üretimi insanlarda çok ciddi bir estetik sorundur. Genel itibariyle orta ve ileriki yaşlarda sık bir şekilde rastlanır. Kozmetik olarak önemlidir ve özellikle yumuşak derinin iyi olduğunun bir işareti olarak değerlendirildiği kültürlerde veya fiziksel güzelliğe oldukça önem verilen kültürlerde hem hayat kalitesini hem de görünüşü düşürmektedir. Eksojen sebepler özellikle ultraviyole ışığa maruz kalma melasma, çil vesolar lentiginos gibi pigmental anormalliklerin yaygın sebebidir. Bazı

kimyasallara ve ilaçlara maruz kalmanın yanı sıra belirli hastalıkların varlığı da hiperpigmentasyonla sonuçlanmaktadır. Depigmente edici ajanlar genel itibariyle hiperpigmentasyon bozukluklarının giderilebilmesi için reçetelenmektedir (Akdeniz, 2018).

2.4.7. Elastin ve antielastaz enzimi

Elastazlar (EC 3.4.21.36), bağ dokunun önemli bir proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteaz enzimleridir. Elastazların romatoid artrit (kireçlenme), akciğer amfizemi ve kronik enflamatuvar gibi hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Elastin, bağ dokuya esneklik sağlayan bir ekstrasellüler matriks proteini olup; bu elastik lif formları cildin dermis ve cilt elastikiyetini etkilemektedir. Pankreatik elastaz, özellikle akut pankreatit ya da pankreas kanseri gibi pankreas hastalıklarının durumlarını yansıtırken; nötrofil elastaz, çeşitli enflamatuvar hastalık durumlarında artmaktadır (Bilgin Sökmen ve Sağkal, 2017).

2.5. *P.khinjuk* Stocks. İle İlgili Yapılan Mikroçoğaltım ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Onay (2000), olgun *P. vera* nodal tomurcuklardan aksenik eksplantlar elde ettikten sonra 2 mg/L benzil adenin (BA) içeren MS (Murashige ve Skoog 1962) besi ortamında sürgünleri çoğaltmış ve 4 mg/L indol bütirik asit (IBA) içeren MS besi ortamında köklendirdikten sonra elde edilen fidelerin başarılı bir şekilde sera koşullarına aktarıldığını rapor etmiştir.

Tilkat ve ark. (2005) *P. khinjuk* (Bıttım)'un *in vitro* çoğaltılması üzerine yaptıkları çalışmada aseptik olarak çimlendirilen tohumlardan başarılı bir sürgün kültürü tekniği geliştirmişlerdir. Buna göre tohumları 30 g/L sukroz, 100 mg/L askorbik asit, 1 mg/L BAP ve 7 g/L agar ve Gamborg vitaminleri içeren MS besi ortamında 28 günlük bir kültür sürecinde çimlendiklerini, eksplant başına 7.25 ± 0.95 sürgün elde ettiklerini ayrıca 0,5 mg/L IBA ile desteklenmiş MS ortamında verimli bir köklenme sağlandığını bildirmişlerdir.

Can ve ark. (2006), *P. khinjuk*, *P. terebinthus*, *P. atlantica*, ve *P. mutica* türlerine ait tohumları sırasıyla %70 etanolde 5 dk çalkalama + 1 kez steril saf sudan geçirme + %15'lik ticari NaOCl'de 15 dk çalkalama + 1 kez steril saf sudan geçirme + %70'lik etanolde 2 dk çalkalama + 3 kez steril saf sudan geçirerek steril ettiklerini ve 1

g/L aktif kömür, 5 mg/L benzil amino pürün (BAP), 250 mg/L malt ekstaktı, 250 mg/L kazein hidrolizat, ve 30 g/L sukroz destekli MS besi ortamında da başarılı bir şekilde çimlendirdiklerini rapor etmişlerdir.

Yıldırım (2012), *P. lentiscus* L., sürgün kültürlerini oluşturmak amacıyla aseptik şartlarda çimlendirdiği tohumlardan elde ettiği sürgünlerin gelişimi üzerine farklı BA konsantrasyonları, sitokin ve diğer büyüme düzenleyicileri, ortam ve antioksidanların etkisini araştırmış ve en yüksek proliferasyonu 1 mg l^{-1} BA ve 7 g l^{-1} agar içeren tam kuvvetteki MS ortamından, %92 ile en yüksek köklenme oranını da, 1 mg/L IBA içeren besi ortamında elde ettiğini bildirmiştir.

Bıbbı ve ark. (2012), *P. integerrima* ve fraksiyonlarından elde edilen ham ekstraktın, MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi ile bu bitkinin ham kök ekstresinin antitümör ve antifungal etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ham ekstrenin MCF-7 hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini [$10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 'de zayıf toksisite (%1,6) ile $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 'de orta derecede toksisite (%55,4)]; hesaplanan IC_{50} değerlerinin $90,9 \text{ } \mu\text{g/ml}$ olduğunu; $200 \text{ } \mu\text{g/ml}$ etil asetat ve kloroform fraksiyonlarının MCF-7 hücre hattına karşı %100 ile %97,4 inhibisyon gösterdiğini ayrıca ham metanol ekstresinin iyi bir antitümör (IC_{50} 125 ppm) aktivitesine fakat zayıf bir antifungal aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Uddin ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *P. integerrima* Stewart'ın çeşitli kısımlarının ekstraktlarının/fraksiyonlarının tuzlu su karidesleri (*Artemia salina*) yöntemi ile *in vitro* sitotoksik aktivitesini araştırmışlardır. Bitkinin farklı kısımlarına ait ekstrakt/ fraksiyonların, *Artemia salina* (Leach) karides larvalarına karşı oldukça fazla sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Mahernia ve ark. (2014), 15 tıbbi bitkiye ait metanol ekstrelerinin Berthelot metodu ile Jack bean üreaz enzimine karşı inhibisyon aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında. *Ginkgo biloba*, *Rhus coriaria* ve *Matricaria inodora* olmak üzere üç bitki ekstraktının IC_{50} değerleri sırasıyla 36,17, 80,29 ve $100,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$ seviyesinde, en etkili ekstraktlar olarak bulduklarını rapor etmişlerdir.

Sifia ve ark. (2015), Cezayir'de yetişen *P. atlantica* Desf. gallerinden elde edilen esansiyel yağın antimikobakteriyel, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. Antimikobakteriyel aktivite için üç mikobakteri türüne karşı broth mikrodilüsyon yöntemi, antioksidan aktivite için serbest radikal temizleyici analizleri ve sitotoksik etki için C3A ve Vero maymunu böbrek hücreleri üzerindeki MTT yöntemini kullandıkları çalışmada, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin, 0.16 ile

2,5 mg/mL arasında değiştiğini; antioksidan aktivitenin DP50 ve ABTS testi için sırasıyla IC₅₀ değerlerinin 417,61 -> 2000 µg/mL ile 495,6 -> 2000 µg/mL arasında olduğunu; sitotoksik etkinin, IC₅₀'nin Vero hücrelerine karşı 26,47 ila 93,64 µg/mL arasında ve C3A'ya karşı 74,29 ila 225,40 µg/mL arasında olduğunu belirterek *P. atlantica* gallerinden elde edilen uçucu yağların, hızlı büyüyen *M. smegmatis* ve *M. aurum*'a karşı düşük ve orta derecede sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Remila ve ark. (2015), Cezayir'de iltihaplanma, yanma ve mide-bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılan *P. lentiscus*'un yaprak ve meyve eksteleri ile bunlara ait fraksiyonların antioksidan, antienflamatuar, sitoprotektif ve antikanser aktivitelerini belirlemek için tasarladıkları çalışmada, ham ekstrelerin melanom (B16F10) ve meme (EMT6) hücre hatlarına karşı antikanser potansiyelini değerlendirmişler ve UPLC-MS cihazı ile analiz etmişlerdir. Ham yaprak ve meyve ekstrelerinin, ORAC testinde güçlü bir antioksidan aktivite sergilediğini; sırasıyla %108,25±1,73 ve %104,13±0,97 oranında yaşayan hücrelerde maksimum koruma ile önemli derecede sitoprotektif etki gösterdiğini; meyve ekstrelerinden elde edilen fraksiyonların herhangi bir aktivite göstermediğini; 100g/mL yaprak ekstresinin asetilsalisilik asit (ASA) ile kıyaslandığında önemli bir anti-enflamatuar aktivite gösterdiğini; dahası, yaprak ve meyve ekstrelerinin, B16F10 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini (sırasıyla IC₅₀=56,40 ve 58,04 g/mL) ve analiz sonucunda, altı flavonol glikozit ve beş fenolik asidin tanımlandığını bildirmişlerdir.

Mirian ve ark. (2015), yeni kan damarlarının oluşumu olan anjiyogenezin, kanser ve metastaz gibi bazı hastalıklarda önemli bir rol oynadığını bildirdikleri çalışmalarında *Rhus coriaria*, *P. vera* ve *P. khinjuk* sakız ekstrelerinin sitotoksik ve anjiyojenik etkilerini incelenmişlerdir. IC₅₀ değerleri için farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 20, 40, 80,100 µg/ml) bitki ekstrelerinin sitotoksik etkilerini, MTT testi kullanarak insan umbilikal ven endotelial hücre (HUVEC) ve Y79 hücre hatlarına karşı değerlendirmişler ve buna göre α-pinen ve β-pinenin, başlıca esansiyel yağ bileşenleri olduğunu; *R. coriaria* ekstresinin, *P. vera* ve *P. khinjuk* ekstrelerinden daha sitotoksik olduğunu (sırasıyla IC₅₀, 9,1±1,6 vs 9,8±2,1 ve 12,0±1,9) ayrıca *R. coriaria* reçine ekstresinin, diğer ekstrelerden daha fazla anjiyogenezi inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Spyridopoulou ve ark. (2015), *P. lentiscus* var. Chia'nın sakızından elde ettikleri yağ ekstrelerinin (terpenlerin) a) kolon kanseri hücre hatlarına karşı *in vitro* ve b) oral uygulamadan sonra farelerde kolon karsinoma tümör büyümesi üzerindeki *in*

vivo etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırdıkları çalışmalarında, *in vitro* verilen yağ ekstrelerinin kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını ana bileşenlerden daha fazla inhibe ettiğini; keza oral yoldan verildiğinde de farelerde tümörlerinin büyümesini inhibe ettiğini; Tümör dokularında Ki-67 ve survivinin azaldığı; özellikle, sadece %67,7 apinen ve %18,8'lik mymsen içeren yağ ekstrelerinin, farelerde istatistiki olarak anlamlı bir anti-tümör etkisine neden olduğunu da belirtmişlerdir.

Ronchi ve ark. (2015), Mango yapraklarının (*Mangifera indica* L.) *in vitro* ve *in vivo* analizler aracığ ile antihipertansif etkisini araştırmışlardır. Yaprak etanol ekstrelerini diklorometanik, n-bütül alkol ve sulu fraksiyonlara parçaladıkları çalışmada, diklorometanik fraksiyonun en yüksek flavonoid, toplam fenolik içerik ve yüksek antioksidan aktivite sergilediğini; ferulik asit ($48,3 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$) kafeik asit ($159,8 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$), gallik asit ($142,5 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$), apigenin ($11,0 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$) ve kersetin ($203,3 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$)'in LC-MS / MS analizinde gözlendiğini ve *M. indica* yapraklarından elde edilen diklorometanik fraksiyonunun, bir antihipertansif olarak potansiyel olabileceğini rapor etmişlerdir.

Bouriche ve ark., (2016), *P. lentiscus* yapraklarına ait metanol ve sulu ekstrelerinin, insan nötrofillerinin kemotaksisi ve elastaz aktivitesini *in vitro* olarak değerlendirdikleri çalışmalarında, 100 ug/mL metanolik ve sulu ekstrelerin, nötrofil kemataksisini sırasıyla %81 ve %71 oranında inhibe ettiğini, elastaz aktivitesini ise sırasıyla %82 ve %90 oranında önemli ölçüde azalttığını, dolayısıyla *P. lentiscus* yapraklarının potansiyel bir anti-enflamatuar ajan kaynağı olarak kullanılabileceğini de bildirmişlerdir.

Yemmen ve ark. (2017), Tunus'ta yetişen Sakız ağacının (*P. lentiscus*) zengin polifenol içeren yaprak, meyve ve köklerinden elde edilen ekstraktların proliferatif ve antioksidan aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, yaprak metanol ekstrelerinin en yüksek polifenol içeriğe sahip olduğunu ve antioksidan kapasitenin yaprak ekstraktlarında maksimum seviyede olduğunu; ayrıca MTT testi bakımından yine yaprak metanol ekstresinin en güçlü sitotoksik ve antiproliferatif aktivite sergilediğini ve RP-HPLC analizi sonucunda, *P. lentiscus* yaprak, meyve ve gövdesinde tanik asit, gallik asit, digalloil kinik asit türevi, kuersetin ve p-kumarik asidi içeren fenolik bileşiklerin varlığını rapor etmişlerdir.

Hashemi ve ark. (2017), *P. atlantica* L'nin antikanser ve fenolik bileşenleri üzerine yaptıkları çalışmada, *P. atlantica* L'nin etanol ekstrelerinin AGS ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksikite etkinliğini, uygulamadan 48 saat sonra MTT yöntemi ile

değerlendirmişlerdir. Ekstrenin antioksidan aktivitesi $4,6 \pm 0,66$ ug/ml iken, butillenmiş hidroksitolüen (BHT) için $25,41 \pm 1,89$ ug/ml olarak tespit edildiği; toplam fenol, flavonoid ve flavonol içeriklerinin sırasıyla 269 mg GAE/g, 40,7 mg RUT/g ve 88,12 mg RUT/g olduğu ve AGS, HeLa ve HDF hücrelerinin çoğalmasını sırasıyla 382,3 ug/m, 332,3 ug/ml ve 896,3 IC₅₀ değerleri ile inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Gezici (2018), pek çok biyoaktif fitokimyasal ihtiva etmesinden dolayı, alternatif tedavi yaklaşımlarında tercih edilen Sumak (*Rhus coriaria* L., Anacardiaceae), bitkisinin meyvelerinden elde edilen ekstrelerin antikanser potansiyellerini araştırmıştır. A549, H1299 ve H460 insan akciğer kanseri hücre hatlarına karşı antikanser ve antiproliferatif potansiyeller, lizozomal ve laktat dehidrojenaz inhibitör etkilerinin araştırıldığı çalışmada, sumak ekstrelerinin zamana ve doza bağımlı olarak güçlü antikanser ve sitotoksik aktivite gösterdiği; ekstreler arasında, sulu ve metanolik ekstrelerin, test edilen tüm insan akciğer kanseri hücrelerine karşı 5,08 - 6,49 µg / mL IC₅₀ değer aralığıyla yüksek derecede sitotoksik olduğu ve kanser hücre hatlarında, hücre büyümesinin ve hücre canlılığının sumak ekstreleri tarafından engellendiği bildirilmiştir.

Ashraf ve Rathinasamy (2018) cilt enfeksiyonları, ayak tabanlarında bulunan çatlaklar ve kanserli ülserler gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan Kaju fıstığı (*Anacardium occidentale* L.)'nin kabuğundan elde edilen sıvıyı (CNSL), antikanser, antibakteriyel ve yara iyileşme aktivitesini değerlendirmek amacıyla saflaştırdıkları çalışmalarında, CNSL'nin, LC-MS verilerine göre kardanol, anakardik asit ve metilcardol bileşiklerini içerdiğini, %0,004 (v/v)'nün IC₅₀ ile HeLa hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini; HeLa hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve L929 hücrelerinde yara kapanmasını hızlandırdığını ve %0,35 (v/v)'nin IC₅₀ ile *Bacillus subtilis*'in büyümesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Koyuncu (2018), antosiyanin, isoflavonlar, gallik asit, kateşin ve epikateşin gibi antikanser potansiyeline sahip, yüksek antioksidan etki gösteren bileşikler içerdiği tespit edilen Urfa Fıstığı (*P. vera* L.)'nin, çeşitli bitki kısımlarını kullanarak antikanser potansiyelini incelemiştir. Meyve sapı, kırmızı dış kabuk örtüsü ve reçinesinden elde edilen metanol ekstrelerinin insan prostat (PC3, DU-145), meme (MDA-MB-231, MCF-7) kanser hücreleri ve normal hücreler (PNT1-A ve CRL-4010) üzerindeki sitotoksik etkisi MTT metodu ile araştırdığı çalışma sonucunda, tüm bitki ekstrelerinin düşük dozlarda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini; normal hücreler üzerinde ise yüksek dozlarda etkili olduğunu ve en güçlü sitotoksik etkinin reçine

uygulamasının prostat kanseri (PC3) üzerinde gösterdiğini (IC₅₀: 6,092 µg/ml) rapor etmiştir.

Rahman (2018), *P. atlantica* subsp kurdica'da toplam polifenol ve flavonoid içeriği, serbest radikal temizleme aktivitesi ve mastik sakız reçinesinin antikanser etkilerini değerlendirmek üzerine yapmış olduğu çalışmada, 0,01-100 µM arasındaki konsantrasyonlarda sakız reçinesinin, doz ve zamana bağlı bir şekilde kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğunu; 72 saat uygulamadan sonra safra kanalı kanseri (kolanjiokarsinom) (KMBC), pankreas karsinomu (PANC), gastrik adenokarsinom (CRL-1739) ve kolonik adenokarsinom (COLO205) hücrelerinde IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 15,34±0,21, 11,52±0,18, 8,11±0,23 ve 5,2±0,8 µg/mL olduğunu ve insan kanser hücrelerinin çoğalmasını bastırdığını, normal insan kolonu fibroblast (CCD-18Co) hücrelerinin reçine uygulamasından etkilenmediğini ancak COLO205 hücre proliferasyonunu, hücre döngüsünün G2/M fazında önemli ölçüde azalttığını ve COLO205 hücrelerinde apoptotik morfolojik değişikliklere neden olduğunu belirtmiştir.

Ahmed ve ark. (2018), *P. atlantica*'nın yaprak ekstraktlarından LC parmak izi ile antidiyabetik ve antihipertansif bileşiklerin tanımlanması üzerine yaptıkları çalışmada biyolojik aktiviteleri modellemek için veri kümesi olarak kromatogramdan 13 pik seçmişlerdir. Örneklerin biyolojik aktivitesinden potansiyel olarak sorumlu olan bu pikleri, modellerin regresyon katsayılarını inceleyerek belirtmişlerdir. Bu bağlamda anti-amilaz bileşiklerine karşılık gelen yedi tepe noktası ile a-glukosidaz aktivitesini inhibe ettiği düşünülen 6 tepe noktası tespit etmişlerdir. Ayrıca, HT modelinin regresyon katsayılarının da, ACE-I aktivitesini inhibe eden sekiz pik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kirollos ve ark. (2018), 3 *Pistacia* türünün yaprak etanol ekstraktlarını kapsamlı bir sitotoksik karakterizasyon için kullanmışlardır. Bu amaçla yöntemin optimizasyonu sağlandıktan ve negatif iyonizasyon modunun kullanılmasından sonra, 22'si *P. chinensis* Bunge'de, 33'ü *P. khinjuk* Stocks'ta ve 25'i de *P. lentiscus* L. yapraklarında olmak üzere toplam 42 farklı bileşik tanımlamışlardır. Bu bileşiklerden üçünün daha önce *P. chinensis* Bunge, *P. khinjuk* Stocks ve *P. lentiscus* L.'de tespit edilmemiş bileşikler olduğu LC-ESI-MS/MS ile ortaya konarak insan PC3 prostat kanseri, A549 akciğer kanseri, MCF7 meme kanseri ve HepG2 karaciğer kanserine karşı sitotoksik aktiviteleri için test etmişlerdir. Genel olarak, tüm ekstraktların farklı IC₅₀ ile akciğer, meme ve prostat kanserine karşı orta seviyede bir sitotoksik aktiviteye

sahip olduğunu ancak sadece *P. lentiscus* L.'un karaciğer kanserine karşı aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Seifaddinipour ve ark. (2018), Antepfıstığı (*P. vera* L.) gövde (PVLH), ekstraktlarının anti-tümör ve anti-anjiyojenik potansiyellerini değerlendirmek için tasarladıkları çalışmada, insan kolon kanseri (HT-29 ve HCT-116), meme adenokarsinomu (MCF-7), akciğer adenokarsinomu (H23), karaciğer hepatosellüler karsinomu (HepG2), rahim ağzı kanseri (Ca Ski) ve normal fibroblast (BJ-5ta) hücreleri üzerine heksan, etil asetat, metanol ve sulu PVLH ekstraktlarının sitotoksik etkilerini MTT yöntemi ile değerlendirmişlerdir. PVLH etil asetat ekstrelerinin (PVLH-EAE), 72 saat uygulanması sonrasında MCF-7, HT-29 ve HCT-116'ya karşı IC₅₀ değeri 21 saat±21,35±1,35, 23,00±1,2 ve 25,15±1,85 µg/mL ile baskılayıcı bir etki gösterdiğini; yüksek konsantrasyondaki PVLH-EAE'nin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anjiyogenezi önemli seviyede inhibe ettiğini; ayrıca uygulama yapılan MCF-7 hücrelerinde Bax ifadesinin arttığını ve Bcl-2 ifadesinin ise azaldığını bu nedenle, PVLH-EAE'nin apoptoz indüksiyonu ve anjiyogenez potansiyeli nedeniyle insan kanserlerine özellikle meme kanserinde uygun bir çalışma kaynağı olabileceğini bildirmişlerdir.

Jaafari-Ashkvandi ve ark. (2019), *P. atlantica* meyve ekstraktlarının KB ve insan dişeti fibroblast hücre hatları (HGF) üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. KB ve HGF hücrelerini, çeşitli konsantrasyonlarda hazırladıkları *P. atlantica* meyve etanol ekstresi ve sisplatin ile muamele derek analiz etmişlerdir. 24 ve 48 saatlik uygulama sonunda IC₅₀ değerinin, KB hücre hattı için sırasıyla 2,6 ve 1 mg/mL, HGF hücresi için 1,5 ve 1,6 mg/mL olduğu; 48 saat boyunca uygulanan ekstrenin, zamana ve doza bağlı olarak, belirgin bir nekroz oluşumu gözlenmeden apoptozu indüklediği; KB hücrelerinde apoptozis indüksiyonun HGF'den anlamlı derecede yüksek olduğu ve 48 saat içinde normal fibroblast hücrelerinde daha az sitotoksik etki gözlemlendiği belirtilmiştir.

Lee ve ark. (2019), *P. weinmannifolia* kök ekstraktları (PWRE)'nin sigara dumanı (CS) ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen pulmoner inflamasyon üzerindeki koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında PWRE uygulamasının, nötrofil elastaz ve reaktif oksijen türleri dâhil olmak üzere, nötrofil miktarını, enflamatuvar ve toksik moleküllerin seviyelerini önemli ölçüde azalttığını rapor etmişlerdir. PWRE'nin, ayrıca akciğer dokularındaki enflamatuvar hücrelerin akışını zayıflattığını belirttikleri

çalışmalarında, PWRE'nin KOAH için değerli bir adjuvan tedavi olabileceğini ifade etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada, 2018 yılı, Temmuz-Eylül ayları arasında Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsü'nden tedarik edilen Bıttım (*P. khinjuk* Stocks.) tohumları ile *in vivo* şartlarda yetişen erkek ve dişi bıttım bireylerine ait kök, gövde ve yaprakları materyal kaynağı olarak kullanıldı. Tohumlar, *in vitro* şartlarda kültüre alınana kadar 4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Doku kültürü çalışmaları

Başarılı bir mikroçoğaltım tekniğinde, ilk basamağı çalışılan laboratuvar ile kullanılan tüm alet ve ekipmanların uygun bir şekilde steril edilmesi oluşturur. Tez kapsamında uygulanan sterilizasyon teknikleri aşağıda verildi.

3.2.1.1. Kullanılan alet, ekipman ve çalışma odasının sterilizasyonu

Tohumların sterilizasyonu ve kültüre alınması çalışmaları laminar hava akımlı steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan 1 gün önce steril kabinin iç ve dış kısmı %96'lık etil alkol (EtOH) ile, kapı, raf, taban vs. gibi yerler seyreltilmiş NaOCI ile silinmiş ve ardından kabin içerisinde bulunan UV lambası bir saat süre ile çalıştırıldı. Erlenmayer, cam şişe, mezür, balon joje, pipet vb. cam malzemeler sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımıyla temizlenmiş akabinde üç defa saf sudan geçirilerek 180°C'de etüvde 3 saat bekletilmek suretiyle steril edildi. Pens ve bisturiler %96'lık etil alkol ile temizlendikten sonra steril kabin içerisinde bulunan boncuklu sterilizatörde (Steri 350 swiss made) 1 dk süre ile 250°C'de; Magenta GA-7 kültür kapları, 121°C'de, 1 atm. basınç altında, 25 dakika süre ile otoklavda ve distile sular ise 121°C'de 15 psi basınç altında 3 saat boyunca etüvde bekletilerek sterilize edildi.

3.2.1.2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok çözeltilerinin hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan 6-Benzylaminopürin (BAP) için mg/ml konsantrasyonlarında stok çözelti hazırlandı. Çizelge 3.2'ye göre hazırlanan stok

çözelti buzdolabında +4°C’de saklandı. Kullanım yoğunluğuna bağlı olarak uygun periyotlarla taze olarak hazırlandı.

Çizelge 3.1. 6-Benzylaminopürin ana solüsyonunun hazırlanması

BAP Ana Solüsyonu (10⁻³)	
BAP	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml’ye tamamlanır.

3.2.1.3. Kullanılan besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Sterilizasyonu sağlanan tohumların çimlenmesinde temel MS besi ortamı modifiye edilerek kullanıldı. Ortamların hazırlanması sırasında kullanılan makro elementler, mikro elementler, aminoasitler ve vitaminler önceden stok çözeltiler halinde hazırlandı. Besin ortamları hazırlanırken önceden oluşturulan bu stok çözeltilerden 1 litre için gerekli miktarlar alınarak behere aktarıldı, sonra gerekli bitki büyüme düzenleyici miktarları ilave edildi. Ortama 30 g sükroz eklenip, hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Sükroz iyice eritildikten sonra ortamın pH’sı seyreltilmiş NaOH (sodyum hidroksit) veya HCl (hidrojen klorür) aracılığı ile 5,8’e ayarlandı. Besi ortamı 6,2 g/L agar ile desteklendikten sonra kültür kaplarına yaklaşık 20’şer ml olacak şekilde döküldü. Ağızları kapatılan kültür kapları, otoklavda 121°C’de 15 dk. otoklava bırakılarak sterilize edildi. Çalışmada kullanılan besi ortamlarına ait stok çözeltiler ve 1L MS temel besi ortamının hazırlanması ile ilgili bilgiler **Çizelge 3.2** ve **3.3**’te verildi.

Çizelge 3.2. MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar ve miktarları

MS Makro Elementler Ana Solüsyonu	
NH ₄ NO	16,5g
KNO ₃	19,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4 g
MS Mikro Elementler-1 Ana Solüsyonu	
H ₃ BO ₃	620 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	1695 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg
Steril saf su	1000 ml’ye tamamlanır.
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
Steril saf su	1000 ml’ye tamamlanır.

MS Mikro Elementler-2 Ana Solüsyonu	
CuSO ₄ .5H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ . 6H ₂ O	25 mg
Steril saf su	200 ml'ye tamamlanır.
Kompleks Kelatör Ana Solüsyonu	
FeSO ₄ .7H ₂ O	3,725 g
Na ₂ EDTA	2,785 g
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlanır.
Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu	
Nikotik Asit	50 mg
Glisin	200 mg
Piridoksin HCl	50 mg
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
B1 Vitamini Ana Solüsyonu	
Tiamin HCl	10 mg
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
Myo inositol	
Myo-inositol	100 mg
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlanır.

Çizelge 3.3. Standart MS besi ortam içeriği* (g/L)

Temel MS besi ortamının içeriği	
MS ana solüsyonu	100 ml
MS-1	10 ml
MS-2	1ml
Kompleks kelatör	10 ml
Vitamin karışımı	1 ml
myo-inositol	10 ml
B1 vitamini ana solüsyonu	1 ml
Agar	6,2 g
Sakkaroz	30 g
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlandı.

* Tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar Sigma Ltd.'den alındı.

3.2.1.5. Tohumların *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi ve aksenik sürgünlerin proliferasyonu

Tohumların yüzey sterilizasyonu, *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi ve elde edilen aksenik sürgünlerin proliferasyonu aşamalarında Tilkat ve ark., (2005)'in yapmış olduğu protokol modifiye edilerek gerçekleştirildi. Buna göre, tohumların

çimlendirilmesi için, tohumlar öncelikle ön sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve %70'lik etil alkol içerisinde 45-50 sn çalkalanmıştır. Daha sonra %20 sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi içerisinde 20 dk. bekletilerek olası mikrobiyal kontaminasyonlardan ve akabinde 7 kez 5'er dk olmak koşuluyla steril distile suda yıkanarak NaOCl bulaşığından arındırıldı. Çalkalama işlemlerinin tümü 150 rpm'de çalışan bir çalkalayıcı üzerinde, durulama ve sterilanttan arındırma işlemleri ise steril distile saf suda çalkalama yoluyla yapıldı. Sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar, 30 g/L sakkaroz, 5,7 g/L agar destekli ve herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besisi ortamına aktarılarak 25 ± 2 °C de 16/8 ışık/karanlık fotoperiyoda sahip kontrollü bir bitki büyütme odasında çimlendirildi. Çimlenen tohumlar 1 mg/L BAP, 30 g/L sakkaroz, 6,2 g/L agar destekli MS besisi ortamlarına 4 haftada bir alt kültürleme yoluyla aktarılarak stok kültürler oluşturuldu. *In vitro* şartlarda sürgün proliferasyonu yoluyla elde edilen kök, gövde ve yapraklar gölgede kurutularak 10'ar grama tamamlanmak suretiyle ekstraksiyon işlemleri için hazırlandı.

3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

3.2.2.1. Ekstrelerin hazırlanması

P. khinjak Stocks'a ait *in vivo* dişi ve erkek genotipler ile *in vitro* sürgün kültürlerine ait kök, gövde ve yapraklar ayrı ayrı bir öğütücü yardımıyla toz haline getirildikten sonra her bir kısımdan yeteri kadar tartılmış ve tartılan bitki miktarları not edildi. Daha sonra kuru bitki örneklerinin üzerlerine etanol (50 mL, 3x24 s.) ilave edilerek çalkalayıcı ile 260 rpm'de ekstrakte edildi. Süzme ve çözücü uçurma işlemlerinden sonra ham ekstreler elde edildi. Bu ekstreler, etanolde çözülerek 4000 mg/L derişiminde 10'ar mL çözeltiler hazırlandı. Akabinde bu çözeltilerden ise, 1000 mg/L derişiminde 5'şer mL'lik çözeltiler hazırlandı.



Şekil 3.1. *P. khinjuk* Stocks. ekstrelerin hazırlanması

3.2.2.2. MTT testi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Bu çalışmada insan kaynaklı kanserli hücre serileri ve Primary Dermal Fibroblasts serisi kullanıldı. Bu amaçla meme kanseri hücre serisi (MCF-7), kolon kanseri serisi (HT-29) ve Primary Dermal Fibroblasts serisi (PDF) ATCC' den temin edildi. Hücre serilerinin moleküler ve biyokimyasal analizleri yapabilecek yeterli sayıya ulaşabilmeleri ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla dondurulabilmeleri için kültürleri yapılmıştır. Hücre serileri %10' luk FBS, 2mM L-Glutamine ve 100 units/ml penicillin/streptomycin içeren tam medium DMEM içinde hücre kültürü ortamında çoğaltılmıştır. MCF-7 hücreleri için DMEM'e ayrıca 0,01 mg/ml insan rekombinant insülin ilave edildi. Hücre kültürleri, 37 °C, %5' lik CO₂' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle 371) tutulmuş ve MCF-7 ve HT-29 haftada üç kez, Primary Dermal Fibroblasts haftada 2 kez 130 g'de 7 dakika santrifüj edilerek hücreler steril kabin içerisinde 3x10⁶ hücre/ml miktarda seyreltilerek pasajları yapıldı.

Ayrıca, hücre serilerinin ileride yapılacak olası çalışmalar sebebiyle saklanması için 2x10⁶ hücre, %70 DMEM, %20 FBS ve %10 Dimetil sülfoksit' den (DMSO) (Sigma-Aldrich) oluşan soğutulmuş solüsyon içerisinde 1 gün -80 °C' bekletildikten sonra sıvı azotta muhafaza edilecektir.

3.2.2.2.1. Örneklerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması

In vivo ve *in vitro* *P. khinjuk* örneklerine ait ekstrelerin, kanser hücrelerinin (MCF-7 ve HT-29) ve sağlıklı hücre serisinin (PDF) proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT Hücre Proliferasyon Kiti (Sigma) kullanılarak ve firmanın kullanım talimatlarına

uyularak yapıldı. Kısaca, 1×10^4 hücre 96-well plate yerleştirildi ve 37°C , %5' lik CO_2 ' li nemli ortamda hücrelerin plate yapışması için 24 saat bekletildi. 24 saat sonra, hücreler örnekler ile çeşitli konsantrasyonlarda 48 saat muamele edildi. 48 saatlik muameleden sonra, hücreler $10 \mu\text{L}$ MTT solüsyonu ile 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında koyu mavi renkte formazan boyası oluştu. Hücreleri kitle birlikte gelen yıkama solüsyonu ile yıkayıp 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta beklettikten sonra formazan boyasının 570 nm de absorbansı plate reader (Thermo/ MultiscanGo) ile ölçüldü. MTT assay her bir konsantrasyon için üç paralel olarak gerçekleştirildi ve her bir MTT assay 3 defa tekrarlandı (Akdeniz, 2018).

3.2.2.3. Antihipertansif aktivitenin belirlenmesi (Anjiyotensin I-dönüştürücü Enzim, ACE, İnhibisyonu)

Kwon ve ark. (2006) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Elli mikrolitre örnek çözeltisi, 2 mU ACE içeren $200 \mu\text{L}$ NaCl-borat tampon çözeltisi ($0,3 \text{ M}$ NaCl, pH 8,3) ile 25°C 'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reaksiyon çözeltisine $100 \mu\text{L}$ $5,0 \text{ mM}$ substrat (hippüril-histidil-lösin) eklenmiş ve 37°C 'de 1 saat inkübe edildi. Boş örnek (enzim ve substrat yerine tampon çözelti içeren), kontrol (ekstre örneği yerine saf su içeren) ve boş deneme (ekstre örneği ve enzim yerine tampon çözelti içeren) ile de analiz yapıldı. Reaksiyon $150 \mu\text{L}$ $0,5 \text{ N}$ HCl eklenerek sonlandırılacak ve oluşan hippurik asidin tayini diyot dizili dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-DAD) ile 228 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

3.2.2.4. Antikolinesteraz aktivitenin belirlenmesi

0,1 M NaH_2PO_4 Çözeltisinin hazırlanması: $1,560 \text{ g}$ NaH_2PO_4 tartılıp 100 mL distile suda çözüldü.

0,1 M Na_2HPO_4 Çözeltisinin hazırlanması: $3,556 \text{ g}$ Na_2HPO_4 tartılıp 200 mL distile suda çözüldü.

0,1 M pH=8 Tampon çözeltisinin hazırlanması: $94,7 \text{ mL}$ Na_2HPO_4 ve $5,3 \text{ mL}$ NaH_2PO_4 çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

0,1 M pH=7 Tampon çözeltisinin hazırlanması: $3,9 \text{ mL}$ NaH_2PO_4 ve $6,1 \text{ mL}$ Na_2HPO_4 çözeltilerinden alınarak 10 mL distile su eklenerek hazırlandı.

5 mM DTNB Çözeltisinin hazırlanması: 16 mg 5,5-ditiyobis(2-nitro benzoik asit) (DTNB) 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde ve 7,5 mg NaHCO₃ 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlandı. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi. .

7,1 mM Asetiltiyokolin iyodür (AcI): 32,8 mg AcI alınarak, 8 mL distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

0,79 mM Butiriltiyokolin iyodür (BuI): 4 mg BuI alınarak, 8 mL distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz enziminin hazırlanması: 1,17 mg (498,3498 U) AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı. Her biri için 99,66996 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu ve 1 mL'lik stoklar da 125 µL'lik 8 eşit bölüme ayrıldı (0,09966996 U/µL). 125 µL'lik enzim çözeltisine 460 µL pH=8 tampon çözeltisi eklendi (0,021297 U/µL) . 585 µL çözelti 25 µL'ik 23 tane küçük eppendorf tüplere doldurularak daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 2150 µL'ye tamamlandı (2,476x10⁻⁴ U/µL).

Butirilkolinesteraz enziminin hazırlanması: 1 mg (11,4 U) BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü (2,28 U/mL). Bu çözeltiden 300 µL'lik stoklar oluşturulup küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi (0,00228 U/µL). Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1850 µL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir (3,1813x10⁻⁴ U/µL).

4000 µM standart Galantamin çözeltisinin hazırlanması: 2,3 mg galantamin 2 mL etanolde çözülerek galantamin çözeltisi hazırlanmış olur.

Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemi

Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir yöntem olan Ellman metodu, 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi (Ellman ve ark. 1961).

AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Sarı renkli 5-tiyo-2-

nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de mikrolaka reader ile ölçülmektedir. Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH=8), ekstrelerin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltilisinden 20 µL koyuldu. Bu çözelti 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve 20 µL substrat (AcI) ilave edildi. Standart olarak galantamin kullanıldı. Mikrolaka okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu. AChE aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

BChE aktivite testi

AChE aktivite testinde uygulanan yöntem kullanıldı. Farklı olarak butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanıldı. BChE aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

3.2.2.5. Antiürez ve antitirozinaz aktivitenin belirlenmesi

Antiürez ve antitirozinaz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 M NaH₂PO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 1,560 g NaH₂PO₄ tartılıp 100 mL distile suda çözüldü.

0,1 M Na₂HPO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 3,556 g Na₂HPO₄ tartılıp 200 mL distile suda çözüldü.

0,01 M NaH₂PO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 0,156 g NaH₂PO₄ tartılıp 100 mL distile suda çözüldü.

0,01 M Na₂HPO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 0,356 g Na₂HPO₄ tartılıp 200 mL distile suda çözüldü.

0,01 M pH=8,2 Tampon çözeltisinin hazırlanması: 96 mL Na₂HPO₄ ve 4 mL NaH₂PO₄ çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

0,05 M pH=6,8 Tampon çözeltisinin hazırlanması: 51 mL NaH_2PO_4 ve 49 mL Na_2HPO_4 çözeltilerinden alınarak 100 mL distile su eklenerek hazırlandı. Daha sonra çözelti yarı yarıya seyreltilerek pH kontrol edilir ve kullanılır.

Fenol reaktifinin hazırlanması: %1'lik Fenol reaktifi + %0,005'lik sodyumnitroprusside karışımını hazırlamak için 200 mg fenol 10 mL ultra saf suda ve 1 mg sodyumnitroprusside 10 mL ultra saf suda ayrı ayrı çözüldü ve daha sonra iki çözelti 1:1 oranında karıştırıldı.

Alkali reaktifinin hazırlanması: %0,5'lik NaOH + %0,1'lik NaOCl karışımını hazırlamak için 100 mg NaOH 10 mL ultra saf suda ve 0,1105-0,1658 mL NaOCl (%10-15) 10 mL ultra saf suda ayrı ayrı çözüldü ve daha sonra iki çözelti 1:1 oranında karıştırıldı.

0,1M Üre: 60 mg üre alınarak bir miktar distile suda çözüldü sonra pH=8,2 tamponu ile hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

8,5 mM L-DOPA çözeltisinin hazırlanması : 8,4 mg L-DOPA alınarak, 5 mL distile suda çözüldü.

Üreaz enziminin hazırlanması: 1 mg (21 U) Üreaz enzimi alınarak 1 mL pH=8,2 tampon çözeltisinde çözüldü ve 50 μL 'lik 20 eşit bölüme ayrıldı ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8,2 tampon çözeltisiyle 2000-3000 μL 'ye tamamlandı.

Tirozinaz enziminin hazırlanması: 1 mg Tirozinaz enzimi alınarak 0,25 mL pH=6,8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 50 μL 'lik 5 eşit bölüme ayrıldı ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=6,8 tampon çözeltisiyle 2000-3000 μL 'ye tamamlandı.

Tiyüre standart çözeltisinin hazırlanması: 1 mg tiyüre 1 mL etanolde çözümlenerek tiyüre çözeltisi hazırlandı.

Kojik asit standart çözeltisinin hazırlanması: 1 mg kojik asit 1 mL etanolde çözümlenerek kojik asit çözeltisi hazırlandı.

Antiüreaz aktivitenin belirlenmesi

Üreaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak üreaz enzimi, substrat olarak ise üre kullanılmaktadır (Hina ve ark. 2015). Mikroplakadaki kuyucuklara önce etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 μL ve enzim

çözeltisinden 25 µL konuldu daha sonra 50 µL substrat (üre) ilave edildi. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 630 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 15 dakika süre ile 30°C de inkübe edildi. 15 dakika sonra bu çözeltinin üzerine 45 µL fenol reaktifi ve 70 µL alkali reaktif konuldu. 20 dk inkübasyondan sonra 630 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu. Standart olarak tiyöüre kullanıldı. Üreaz aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Antitirozinaz aktivitenin belirlenmesi

Tirozinaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak tirozinaz enzimi, substrat olarak ise L-DOPA kullanılmaktadır (Hearing ve ark. 1987). Mikroplakadaki kuyucuklara 150 µL fosfat tamponu (pH =6,8), ekstrelerin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 3 dk karıştırıldı 475 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 10 dakika süre ile 37°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL substrat (L-DOPA) ilave edildi. Tekrar 10 dk 37°C'de inkübasyondan sonra 475 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu. Tirozinaz aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak kojik asit kullanıldı.

$$\% \text{İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

3.2.2.7. Antielastaz aktivitenin belirlenmesi

Elastaz inhibitörü etkisi spektrofotometrik olarak tayin edildi (Melzig ark., 2001). Örneklerin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 0,05'er mL alınarak üzerine elastaz enziminden 0,05 mL ilave edildi. Daha sonra 0,9 mL Tris-HCl tamponundan (pH: 7,8; 0,2 M) ilave edildi. Kontrol çözeltisi olarak 0,1 mL enzim çözeltisi ve üzerine 0,9 mL Tris-HCl karışımı ilave edildi. Hazırlanan bu karışım 15 dakika 37°C'de inkübe edilerek örnek tüpleri ve kontrol çözeltilerinin üzerine inkübasyondan sonra 0,05 mL, 5 mM N-süksinil-(Ala)3-nitroanilide çözeltisi ilave edilerek ve 30 dakika 37°C inkübe edildi. 410 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu.

3.2.3. İstatistiksel analiz

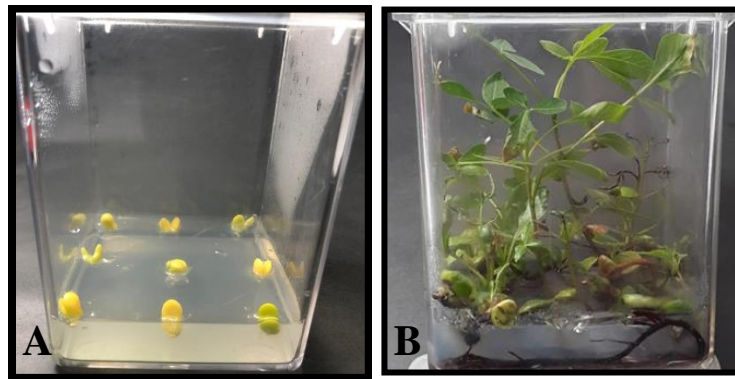
Tüm istatistiksel hesaplamalar Minitab 16.2.1. istatistiksel yazılım (MINITAB Inc, 2010) kullanılarak yapıldı. Çalışmada *P. khinjuk* Stocks. türünün kimyasal içeriklerinin sonuçları çoklu değişken analizi, temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) teknikleri kullanılarak yapıldı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Doku Kültürü Uygulamalarına Ait Sonuçlar ve Tartışma

4.1.1. Tohumların çimlendirilmesi ve proliferasyonu çalışmaları

Doku kültürü uygulamalarında, bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon protokolü bulunmadığından her bitki türü, hatta her bitki çeşidi için spesifik bir *in vitro* çoğaltım protokolünün oluşturulması gerekmektedir. Ancak bu tez kapsamında nihai amaç bittim tohumlarından itibaren yeni bir mikroçoğaltım tekniği oluşturmak olmadığından daha önce, Tilkat ve ark., (2005)'nin geliştirmiş oldukları protokoller, tohumdan itibaren *in vitro* sürgün kültürlerinin elde edilmesinde kullanılmıştır. Sırasıyla %70'lik etil alkol içerisinde 45-50 sn, akabinde %20 NaOCI çözeltisi içerisinde 20 dk. çalkalanan tohumlar, 7 kez 5' er dakika steril distile suda yıkayıp BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirilmiş (Şekil 4.1 A) ve aksenik sürgünler, 1 mg/L BAP, 30 g/L şeker ve 6,2 g/L agar destekli MS besi ortamında proliferere edilmiştir (Şekil 4.1 B). Prolifere edilen aksenik sürgünlerden de 4 haftada bir alt kültüre alma yoluyla yeterli sayıda stok kültürler elde edilmiştir.



Şekil 4.1. (A) BBD içermeyen MS besi ortamında *in vitro* çimlenmeye bırakılan *P. khinjuk* Stocks. tohumları (B) 1 mg/L BAP destekli MS besi ortamında proliferere edilen fideler Bar: 0.90 cm.

Bitki doku kültürleri 30000'den fazla kimyasal bağ içeren çok değerli fitokimyasalları sentezleme potansiyeline sahiptir. Fitokimyasallar doğal olarak tarımsal yöntemlerle de elde edilebilirler ancak, tarımsal üretim, pek çok bitki için mevsimsel olduğu gibi, coğrafi konuma, iklim ve büyüme koşullarına da bağlı olduğundan, biyoteknolojik üretimler genellikle tercih edilmektedir (Güven ve Gürsul, 2014).

4.1. Biyolojik Aktivite Uygulamalarına Ait Sonuçlar ve Tartışma

4.1.1. MTT testi ile sitotoksik aktivite sonuçları

P.khinjuk Stocks'a ait *in vivo* dişi ve erkek genotipler ile *in vitro* örneklerle ait hazırlanan ekstrelerin toksik etkileri sağlıklı hücre serisi (PDF), sitotoksik etkileri ise kanserli MCF-7 (meme kanseri) ve HT-29 (kolon kanseri) hücre serileri üzerinde MTT yöntemi ile tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. irdelendiğinde, tüm örneklerin MCF-7 ve HT-29 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdikleri, *in vivo* örneklerle ait ekstrelerin sitotoksik aktivite bakımından *in vitro* ekstrelerle oranla daha yüksek sonuçlar verdiği ve özellikle *in vivo* dişi kök kısımlarından elde edilen ekstrelerin MCF-7 hücre serileri üzerinde daha yüksek sitotoksik etkiye yol açtığı görülmüştür. Genel anlamda MCF-7 ve HT-29 hücre serileri üzerine hem erkek hem dişi genotiplere ait kök ekstrelerinin, gövde ve yaprak ekstrelerine oranla daha iyi sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *P. khinjuk* Stocks'a ait *in vivo* ve *in vitro* örneklerle ait toksik ve sitotoksik aktivite sonuçları

Örnekler		HT-29		MCF-7		PDF		
		(200 ppm) ^a	(IC ₅₀)	(200 ppm) ^a	(IC ₅₀)	(200 ppm) ^a	(IC ₅₀)	
<i>İn vitro</i>	K	67,51±1,12	125,45±2,39	69,11±1,70	129,58 ±0,37	95,72±1,82	≥200	
	G	74,17±2,02	132,34±1,69	54,06±2,67	114,47±2,61	92,81±0,49	≥200	
	Y	76,60±2,49	150,29±1,50	74,02 ±1,15	152,39±1,30	92,65±0,61	≥200	
<i>İn vivo</i>	K	33,17 ±1,29	59,60 ±0,69	29,63 ±0,54	31,86±1,40	93,51±1,95	≥200	
	Dişi	G	40,58±2,78	78,59±1,19	36,26±2,07	54,45±1,18	95,40±1,69	≥200
		Y	38,48±2,72	74,10±2,45	33,19 ±0,87	42,25±2,25	93,39±0,96	≥200
<i>İn vivo</i>	K	35,95 ±1,38	68,47±2,41	31,34 ±0,48	36,11±0,44	92,69±0,46	≥200	
	Erkek	G	41,15±0,59	81,65±2,39	34,18 ±1,37	44,25±1,54	92,27±0,20	≥200
		Y	37,65±0,49	72,36±2,26	32,80±0,20	41,64±0,64	97,19±1,42	≥200

a: 200 ppm konsantrasyondaki %canlılık değerleri

4.1.2. Antihipertansif aktivite sonuçları

P.khinjuk Stocks'a ait *in vivo* dişi ve erkek genotipler ile *in vitro* örneklere ait hazırlanan ekstrelerin antihipertansif aktiviteleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. irdelendiğinde, incelenen örnekler arasında, antihipertansif aktivite bakımından en yüksek aktivitenin *in vivo* dişi genotiplere ait kök ekstrelerinden elde edildiği tespit edilmiştir (**%95,88**). *In vivo* örnekler kendi içinde değerlendirildiğinde kök ve gövde kısımlarının yaprak kısımlarına oranla daha yüksek aktiviteye sahip oldukları, *in vivo* erkek genotiplere ait kök ekstrelerinin ise aktivite bakımından ikinci sırada yer aldıkları görülmüştür. *In vitro* örneklerin ise, sadece gövde ekstrelerinin aktif kısımlar olduğu (**%85,16**), kök ve yaprak kısımlarının ise aktif olmadıkları tespit edilmiştir. Genel anlamda *in vivo* ekstrelerin *in vitro* ekstrelerle oranla, antihipertansif aktivite bakımından daha kullanışlı oldukları söylenebilir.

Çizelge 4.2. *P. khinjuk* Stocks'a ait *in vivo* ve *in vitro* örneklere ait antihipertansif aktivite sonuçları

Örnekler		Antihipertansif (%İnhibisyon) ^a
<i>In vitro</i>	K	A.D.
	G	85,16
	Y	A.D.
<i>In vivo</i> Dişi	K	95,18
	G	95,88
	Y	41,11
<i>In vivo</i> Erkek	K	84,78
	G	77,05
	Y	33,15
Standart Madde		100,00

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (200 µg/mL). A.D.: Aktif değil.

4.1.3. Enzim inhibisyonu aktivitelerine ait sonuçlar

4.1.3.1. Antikolinesteraz aktivite sonuçları

P. khinjuk Stocks'a ait *in vivo* dişi ve erkek genotipler ile *in vitro* örneklere ait hazırlanan etanol ekstrelerinin antikolinesteraz aktiviteleri asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu yöntemlerine göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. irdelendiğinde, genel olarak *in vivo* dişi ve erkek genotipe ait örneklerin bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonuna karşı standart olarak kullanılan

galantamine yakın aktif sonuçlar verdiği ancak asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu yönteminde ise aktif olmadıkları gözlenmiştir. *İn vitro* örneklerden hazırlanan etanol ekstralarının, *in vivo* dişi ve erkek genotiplere ait örnekler nazaran ise daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Örnekler ait etanol ekstraları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, dişi genotipe ait yaprak ekstralarının butirikolinesteraz enzim inhibisyonuna karşı %75,20±1,50 ile erkek genotipe ait örneklerin kök ekstralarının ise %70,86±1,41 ile en yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, *in vitro* örneklerin toprak üstü, *in vivo* örneklerin ise toprak altı ekstralarının aktivite bakımından daha etkili oldukları söylenebilmektedir.

Çizelge 4.3. *P. khinjuk* Stocks'a ait *in vivo* ve *in vitro* örnekler ait hazırlanan etanol ekstralarının antikolinesteraz aktivite sonuçları

Örnekler		AChE (%İnhibisyon) ^a	BChE (%İnhibisyon) ^a
<i>İn vitro</i>	K	AD	23,44±0,46
	G	AD	37,65±0,75
	Y	AD	38,10±0,76
<i>İn vivo</i> Dişi	K	AD	71,76±1,43
	G	AD	33,85±0,67
	Y	AD	75,20±1,50
<i>İn vivo</i> Erkek	K	AD	70,86±1,41
	G	AD	38,73±0,77
	Y	AD	46,70±0,93
Galantamin^b		85,32±0,72	78,28±0,26

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (200 µg/mL).
b: Standart madde, A.D.: Aktif değil.

4.1.3.2. Antiürez ve antitirozinaz aktivite sonuçları

P. khinjuk Stocks'a ait *in vivo* dişi ve erkek genotipler ile *in vitro* örnekler ait hazırlanan etanol ekstralarının antiürez ve antitirozinaz aktivitelerine ait sonuçlar Çizelge 4.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4.'te görüldüğü üzere, *in vivo* örneklerin *in vitro* örnekler nazaran daha yüksek ürez ve tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesine sahip oldukları, ayrıca *in vitro* örnekler ait hiç bir ekstrede antiürez aktivitesi gözlenmediği belirlenmiştir. Örnekler içerisinde, *in vivo* dişi genotiplere ait kök ekstralarının %54,81±1,09 ile en yüksek antitirozinaz aktivite, *in vivo* erkek genotiplere ait kök ekstralarının ise

%56,31±1,12 ile en yüksek antiürez aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ekstreleri, toprak üstü ve toprak altı bakımından değerlendirecek olursak, hem *in vivo* hem de *in vitro* örneklere ait kök ekstrelerinin gövde ve yaprak kısımlarından daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Enzim inhibisyon yüzdelere ait maksimum sonuçların, standart olarak kojik asit (%81,54±0,63) ve tiyoüre (%98,85±0,54)'den elde edildiği çalışmada *in vitro* örneklere ait sadece kök ekstrelerinde antitirozinaz aktiviteye rastlanması da dikkat çekicidir.

Çizelge 4.4. *P. khinjuk* Stocks'a ait *in vivo* ve *in vitro* örneklere ait hazırlanan etanol ekstrelerinin antiürez ve antitirozinaz aktivite sonuçları

Örnekler	Üreaz (%İnhibisyon) ^a	Tirozinaz (%İnhibisyon) ^a	
<i>In vitro</i>	K	AD	6,88±0,13
	G	AD	AD
	Y	AD	AD
<i>In vivo</i> Dişi	K	43,66±0,87	54,81±1,09
	G	AD	23,42±0,46
	Y	29,86±0,59	17,44±0,38
<i>In vivo</i> Erkek	K	56,31±1,12	50,89±1,01
	G	11,08±0,22	26,82±0,53
	Y	26,03±0,52	15,82±0,31
Kojik asit ^b	-	81,54±0,63	
Tiyoüre ^b	98,85±0,54	-	

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (200 µg/mL).
b: Standart madde, A.D.: Aktif değil.

4.1.3.3. Antielastaz aktivite sonuçları

Çizelge 4.5.'te *P. khinjuk* Stocks'a ait *in vivo* dişi ve erkek genotipler ile *in vitro* örneklere ait hazırlanan etanol ekstrelerinin elastaz enzim inhibisyonu sonuçları verilmiştir

Çizelge 4.5. irdelendiğinde *in vitro* kökenli yaprak ekstrelerine ait örneklerin antielastaz aktivite göstermediği ancak bunların dışındaki tüm ekstrelerin aktif sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Önceki enzim inhibisyon sonuçlarında da tespit edildiği üzere, antielastaz aktivite sonuçları bakımından *in vivo* dişi ve erkek genotiplerden elde edilen ekstrelerin *in vitro* örneklere kıyasla daha yüksek aktivite sonuçları verdiği görülmüştür. Nitekim *in vivo* örneklere ait etanol ekstreleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde, yine

dişi (%58,72±1,17) ve erkek (%57,54±1,15) kök ekstralarının yaprak ve gövde ekstralarına göre daha yüksek antielastaz aktiviteye sahip oldukları bunun yanısıra *in vitro* kök ekstralarının 6,65±0,13 ile sonuçlar arasında en düşük değere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, *in vivo* örneklerin toprak altı ekstralarının aktivite bakımından standart olarak kullanılan oleanolik asitten daha etkili oldukları görülmektedir.

Çizelge 4.5. *P. khinjuk* Stocks'a ait *in vivo* ve *in vitro* örneklere ait hazırlanan etanol ekstralarının antielastaz aktivite sonuçları

Örnekler		Elastaz (%İnhibisyon) ^a
<i>In vitro</i>	K	6,65±0,13
	G	37,37±0,74
	Y	AD
<i>In vivo</i> Dişi	K	58,72±1,17
	G	22,36±0,44
	Y	58,25±1,16
<i>In vivo</i> Erkek	K	57,54±1,15
	G	22,83±0,45
	Y	46,52±0,93
Oleanolik asit^b		39,46±0,52

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (200µg/mL).
b: Standart madde, A.D.: Aktif değil.

Kanserli hastaların yaşam sürelerini uzatmak ve yaşam kalitesini yükseltmek amacıyla: Kemoterapi, Radyoterapi, Cerrahi, Immünoterapi gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Cerrahi ve radyoterapi hastalığın lokalize olduğu durumlarda etkilidir (Köşgeroğlu ve ark., 2000). Kemoterapi ise, kanseri ilaçla tedavi ederek metastaz oluşumunu önlemek, tümörün boyutlarını küçültmek amacıyla uygulanmaktadır. Kanser ilaçları değişik mekanizmalarla kanserli hücreleri etkiler. Bu etki, sıklıkla hücre ölümüne yol açmaktadır (sitotoksikite), daha seyrek olarak hücreyi öldürmeksizin büyümesini engellemektir (sitostatik etki). En az görülen etki ise, kanserli hücrede diferansiyasyonunun indüklenmesidir. Günümüzde kanser tedavisinde yaşanan en önemli sorunlardan biri ilaç direncidir. Kemoterapi ajanlarına karşı gelişen direnç, ilaçların etki mekanizmaları ile yakından ilişkilidir. (Web 2).

Günümüze kadar, *Pistacia* türlerinden elde edilen ekstrakt ve bileşiklerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmış ve çoğunun sitotoksik

aktivite gösterdikleri ortaya konulmuştur. *P. integerrima* kök metanol ekstralarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde doza bağlı bir şekilde sitotoksik aktivite gösterdiği IC₅₀ değerlerinin 90,9 µg/ml olduğunu ve MCF-7 hücre hattına karşı %100 ile %97,4 inhibisyon gösterdiği (Bıbı ve ark., 2012), Uddin ve ark., (2013) tarafından aynı türe ait ekstraktlarının *Artemia salina* (Leach) karides larvalarına karşı oldukça fazla sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. *P. atlantica* gallerinden elde edilen esansiyel yağın C3A ve Vero maymunu böbrek hücreleri üzerindeki MTT testi sonucunda, mikobakterilere karşı düşük ve orta derecede sitotoksik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Sifia ve ark. 2015), aynı türün meyve ekstralarının ise insan epidermoid karsinom (KB) ve insan dişeti fibroblast hücre hatları (HGF) üzerindeki sitotoksik etkilerinin zamana ve doza bağlı olarak, belirgin bir nekroz oluşumu gözlenmeden apoptozu indüklediği ve sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Jaafari-Ashkvandi ve ark. 2019). *P. vera* gövde ekstraktlarının insan kolon kanseri (HT-29) ve meme adenokarsinomu (MCF-7) üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT yöntemi ile test ettikleri çalışma sonucunda, yüksek konsantrasyonların anjiyogenezi önemli seviyede inhibe ettiği (Seifaddinipour ve ark. 2018), meyve sapı, kırmızı dış kabuk örtüsü ve reçinesinden elde edilen metanol ekstralarının ise insan prostat (PC3, DU-145), meme (MDA-MB-231, MCF-7) kanser hücreleri üzerinde düşük dozlarda dahi sitotoksik etki gösterdiği; normal hücreler (PNT1-A ve CRL-4010) üzerinde ise yüksek dozlarda etkili olduğu bildirilmiştir (Koyuncu, 2018). Yine *P. lentiscus* yaprak, meyve ve köklerinden elde edilen ekstraları arasında yaprak metanol ekstresinin en güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu (Yemmen ve ark. 2017), *Pistacia* cinsine ait diğer türler ile birlikte *P. khinjuk*'un da aralarında bulunduğu ve sakız ekstralarının insan umbilikal ven endotelial hücre (HUVEC) ve Y79 hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *P. khinjuk* ekstralarının anjiyogenezi inhibe ettiği (Mirian ve ark. 2015); yine aynı türün yaprak etanol ekstraktları kullanılarak yapıldığı başka bir çalışmada ise insan PC3 prostat kanseri, A549 akciğer kanseri, MCF7 meme kanseri ve HepG2 karaciğer kanserine karşı orta seviyede bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Kirolos ve ark. 2018). Çalışma bulgularımız yukarıda ifade edilen araştırmalar ile uyumluluk göstermekte olup, *in vitro* şartlarda yetiştirilen *P. khinjuk* ekstraları ilk defa bu tez kapsamında değerlendirmeye alınmıştır. Gerek *in vivo* erkek ve dişi genotiplerin gerekse de *in vitro* örneklerin kök, gövde ve yapraklarına ait etanol ekstralarının sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu tespit ettiğimiz çalışmamızda, *in vivo* örneklerin özellikle kök kısımlarının daha başarılı aktivite gösterdiğini gözlemledik.

Sitotoksik aktiviteden sorumlu madde/veya maddelerin hangisi olduğuna yönelik herhangi bir çalışma yapılmamış olup tezin akabinde çalışılması planlanmaktadır.

Ülkemizde özellikle erişkin nüfusun önemli bir bölümünü etkileyen yaşın artmasıyla birlikte görülme sıklığı giderek artan hipertansiyon prevalansına paralel olarak insanların tamamlayıcı ve alternatif tedaviye olan ilgisi de artmaktadır. Türk Kardiyoloji Derneği Ulusal Hipertansiyon Tedavi ve Takip Kılavuzu'na göre tek bir ilaç (monoterapi) ile hipertansiyon tedavisi uygulamasında %30-50 arasında başarısız sonuçlar alınmaktadır. Bu durumda hekim için yapılacak üç seçenek vardır a) Kullanılan ilaç dozunu arttırmak, b) Başka bir ilaç grubuna geçmek, c) Kombinasyon tedavisi uygulamak. Hastalığın tedavisinde ACE inhibitörleri, beta-blokörleri ve kalsiyum kanalı bloke edicileri gibi çeşitli antihipertansif ilaçlar kullanılmaktadır (Web 3). Ancak hangi ilaç grubu olursa olsun, alışlagelen dozun üzerine çıkılması, genellikle başarıya yol açmadığı gibi kardiyak, solunum sistemi, merkezi sinir sistemi karbonhidrat ve lipit metabolizması v.b. üzerine yan etkileri de beraberinde getirdiğinden, hastalık semptomları ve ilaçların yan etkilerini azaltmak, fiziksel ve psikolojik destek sağlamak amacıyla yeni terapötiklerin araştırılması da önem arz etmektedir. Nitekim Ahmed ve ark. (2018), tarafından *P. atlantica*'nın yaprak ekstraktlarında ACE-I aktivitesini inhibe eden sekiz adet pik gözlemlendiği rapor edilmiştir. Yine, Anacardiaceae familyasına mensup Mango yapraklarının (*Mangifera indica* L.), *in vitro* ve *in vivo* analizler aracılığı ile antihipertansif etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, diklorometanik fraksiyonunun bir antihipertansif olarak potansiyel olabileceği bildirilmiştir (Ronchi ve ark., 2015). Çalışmamız diğer *Pistacia* türleri ile paralel sonuçları barındırmakta olup, *in vivo* dışı genotiplere ait kök ekstraktlarının incelenen örnekler arasında %95,88 ile standarda en yakın örnekler olduğu, *in vivo* ekstraktların *in vitro* ekstraktlara oranla daha yararlı aktiviteye sahip oldukları ve yüksek oranda antihipertansif aktivite içerdiklerinden *in vivo* gövde ve kök kısımlarının farmakolojik çalışmalarda değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara asetilkolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri klinik olarak, başta Alzheimer hastalığı olmak üzere myastenia gravis ve glokom gibi hastalıklarda kullanılmaktadırlar. İleri dönem AH'nda beyin AChE aktivitesinde %55-67 oranında azalma kaydedilmiştir. Günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan strateji kolinesteraz enzim inhibitörlerinin kullanılmasıdır. AH tedavisinde

son zamanlarda kullanıma giren galantamin ise, bir nergis türü olan *Galanthus nivalis* L. adlı bitkiden izole edilen bir fenantren alkaloidi olup, reversibl bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. AH'nın semptomatik tedavisinde başarı oranının elde edildiği tek mekanizma asetilkolinesteraz inhibisyonu olup, tedavide kullanılan ilaçlar donepezil, rivastigmin ve galantamindir. Bunların dışında tedavide etkili olabilecek antikolinergikler üzerine yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir. Devam eden çalışmalar bitkisel kökenli yeni antikolinesterazların araştırılmasına yönelik olup, düşük seviyelerde toksisite ve yan etkilere sahip terapötik ajanların keşfidir (Şener ve ark., 2018). Bu amaçla *Pistacia* türleri üzerine yaptığımız literatür taramalarında kolinesteraz enzim inhibisyonu üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında incelenen *P. khinjuk* ekstrelerinin asetilkolinesteraz enzim inhibisyonuna yanıt oluşturmadığı, ancak *in vivo* dişi genotipe ait yaprak ekstrelerinin butirilkolinesteraz enzim inhibisyonuna standart olarak kullanılan galantamine en yakın sonucu verdiği görülmüştür. Bu bağlamda, *in vitro* örneklerin toprak üstü, *in vivo* örneklerin ise toprak altı ekstrelerinin antibütirikolinesteraz enzim aktivitesine sahip olmaları dolayısıyla tedavi amaçlı kullanılabileceği öne sürülebilir.

Üreaz, böbrek taşları ve enfeksiyonların oluşması yanısıra hepatik komaya neden olan bir enzimdir. Bu tür hastalıkların tedavisinde üreaz enzimini inhibe edebilecek üreaz inhibitörleri üzerinde çalışılmaktadır. Son yıllard, bu amaç için çeşitli bitki ekstrelerinin üreaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri ile ilgili çalışmalar ağırlık kazanmıştır (Bilgin Sökmen ve ark., 2016). Güney Amerika'da yetişen ve Anacardiaceae familyasına ait bir tür olan *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.,'in *Helicobacter pylori* üzerine güçlü bir antiüreaz aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Salinas Ibáñez ve ark., 2017). Keza, aynı familyaya mensup *Rhus coriaria* (Sumak)'nın metanol ekstrelerinin de Jack bean üreaz enzimi üzerine yüksek derecede inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Mahernia ve ark., 2014). Çalışmamızda *in vivo* örneklerin hemen hepsinin yukarıdaki çalışma bulguları ile parallik gösterdiği, özellikle *in vivo* erkek genotiplere ait kök ekstrelerinin standart olarak kullanılan tiyoüreye en yakın sonucu vererek, örnekler içerisinde en yüksek antiürez aktivite gösterdiği görülmüştür.

Polifenoller enzim inhibitörleri arasında en yaygın olanlarıdır. Özellikle flavanoidler (stilbenler, kalkonlar, izoflavonoidler, izoflavonlar), uzun zincirli lipitler ve steroidler bilinen inhibitörlerdir. Kojik asit, tirozinazın en çok çalışılmış inhibitörüdür,

aynı zamanda kozmetik alanında cilt beyazlatıcı ve gıda endüstrisinde enzimatik kararmayı önleyici gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Birçok bitkinin yaprak, tohum çiçek ve kabuklarında yaygın olarak buldukları için tirozinaz enzim aktivitesinin incelenmesi oldukça önemlidir (Şener ve ark., 2018). Tirozinaz enzim inhibisyonu bakımından *Pistacia* türleri ile ilgili literatür taramalarında yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup, sözkonusu bulgulara bakıldığında *in vivo* dişi genotiplere ait kök ekstrelerinin, standart olarak kullanılan kojik asit'e en yakın antitirozinaz aktivite gösterdiği görülmüş ve *P. khinjuk*'un tirozinaz inhibitör aktivitelerinin hem yeni farmasotiklerin geliştirilmesinde hem de endüstriyel uygulamalar için kullanışlı olabileceği düşünülmüştür.

Elastin, bağ dokusunun ana elemanlarından olup, elastaz enzimi ile parçalanması sonucu cilt yaşlanmasına eşlik eden kırışıklıklar meydana getirmektedir. Elastaz aktivitesi yaş arttıkça artar ve bu durum yaşlanma ile cildin elastik özelliklerinin azalmasına ve cilt sarkmalarına neden olur. Bu enziminin inhibisyonu hem cilt yaşlanmasının önlenmesinde hem de bağ dokusu hastalıkları üzerinde olumlu etkileri olması nedeniyle klinik ve kozmetik endüstrileri açısından gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız örneklerin büyük çoğunluğunun antielastaz aktivite gösterdiği, özellikle *in vivo* dişi genotipe ait kök ekstrelerinin en yüksek antielastaz aktiviteye sahip olması yönündeki bulgularımız ile paralellik gösteren diğer türler üzerinde denenmiş araştırmalar mevcuttur. Bouriche ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. lentiscus* yapraklarının metanol ve sulu ekstrelerinin, insan nötrofilleri üzerine kemotaksis ve elastaz enzim inhibisyonunu incelenmiş, sonuç olarak uygulanan ekstrelerin elastaz aktivitesini ise sırasıyla %82 ve %90 oranında belirgin seviyede azalttığı bildirilmiştir. *P. weinmannifolia* kök ekstreleri'nin sigara dumanı ve lipopolisakkarit ile indüklenen pulmoner inflamasyon üzerindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise nötrofil elastaz seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Anacardiaceae familyasının önemli bir üyesi olan *P. khinjuk* Stocks. herdem yeşil ve kuraklığa dayanıklı bir bitki olup tıbbi öneme sahip birçok sekonder metaboliti bünyesinde barındırır. Biyoteknolojik yöntemler, sekonder metabolitlerin, elisitör ve öncül bileşiklerin kullanılmasıyla artırılmasını ve buna bağlı olarak iş gücü ve maliyeti azaltabilmektedir. Farklı iklim ve toprak özelliklerine sahip ülkemizde birçok tıbbi bitkinin doğal olarak bulunması ve bu bitkilerin kültüre alınmaları ile artan tıbbi ve ticari öneminin yeri kuşkusuzdur. Bu bağlamda kültüre alma çalışmaları sırasında özellikle türlerin sekonder madde içeriği, genetiği ve kalıtımı ile ilgili araştırma sonuçları dikkate alınarak sağlanırsa birim alandan alınacak yüksek verim ile daha saf ve standartlara uygun dolayısıyla getirisi yüksek droglar elde edilebilecektir. Bu bağlamda *P. khinjuk* Stocks'un biyolojik aktivitelerinin gerek *in vivo*, gerekse de biyoteknolojik yöntemler kullanılarak karşılaştırılması önem arz etmektedir.

Yapılan literatür taramalarında bittim ağacının *in vitro* şartlarda biyolojik aktivitelerine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verimiştir:

- Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu %20 lik NaOCl içerisinde 20 dakika boyunca bekletilerek ve akabinde 7 kez 5' er dakika steril distile suda çalkalanarak yapılmıştır.

- Olgun tohumlar BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirilerek *in vitro* sürgün kültürleri başlatılmıştır.

- Aksenik sürgünler, 1mg/L BAP, 30 g şeker ve 6,2 gr agar destekli MS besi ortamında prolifer edilecek stok kültürler oluşturulmuştur.

- MMT testi ile yapılan sitotoksik aktivite sonuçları bakımından, **31,86 ±1,40 IC₅₀** değeri ile *in vivo* dişi genotipe ait kök kısımlarından elde edilen ekstrelerin MCF-7 ve **59,60 ±0,69 IC₅₀** değeri ile HT-29 hücre serileri üzerinde daha iyi sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir. Keza, aynı şekilde *in vivo* erkek genotip ile *in vitro* kök ekstrelerinin bu sıralamayı takip etmesi dolayısıyla, sitotoksik aktivite bakımından kök kısımlarının daha aktif ve kullanışlı olduğu sonucuna varılmıştır.

- in vivo dişi genotipe ait gövde ekstrelerinin antihipertansif aktivite bakımından en aktif ekstreler olduğu (%**95,88**), *in vitro* örneklerin sadece gövde kısımlarının aktif oldukları ve *in vivo* örneklerin farmakolojik olarak *in vitro* örneklere kıyasla daha yararışlı oldukları kanaatine varılmıştır.

- Antikolinesteraz aktivite bakımından, in vivo dişi genotipe ait yaprak ekstrelerinin butirilkinesteraz enzim inhibisyonuna karşı, standart olarak kullanılan galantamine (%**78,28±0,26**) en yakın %**75,20±1,50** değeri ile örnekler arasında en yüksek aktiviteye sahip ekstre olduğu belirlenmiştir. Buna mukabil, asetilkolinesteraz enzim inhibisyonuna karşı ekstrelerin aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

- Antiürez ve antitirozinaz aktivite bakımından *in vivo* örneklere ait ekstrelerin belirgin şekilde daha yüksek bir aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Her iki aktivite bakımından da sonuçların standartlara orta seviyede yakın olması özellikle *in vivo* örneklerin kök ekstrelerinin daha yüksek seviyede olması sözkonusu aktivite bakımından *in vivo* kök kısımlarının sağlık ve sanayi potansiyelinin olduğu kanaatini desteklemektedir.

- Anti-elastaz aktivite bakımından özellikle *in vivo* dişi genotiplere ait örneklerin daha yüksek bir aktivite gösterdikleri, *in vivo* örneklerin elastaz enzim inhibisyonu sonuçlarına göre kök> yaprak> gövde şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir. %**58,72±1,17** ile *in vivo* dişi genotiplere ait kök ekstrelerinin aktivite bakımından ilk sırada yer aldığı yine aynı genotipe ait yaprak ekstrelerinin %**58,25±1,16** şeklinde çok küçük bir farkla ikinci sırada bulunduğu dikkate alındığında, *in vivo* dişi genotiplerin sözkonusu enzim inhibisyonu bakımından daha faydalı olduklarını ortaya koymaktadır. Bu yöntemde standart olarak kullanılan oleanoik asidin (%**39,46±0,52**) aktivitesi göz önünde bulundurulduğunda özellikle *in vivo* kök örneklerinin ciddi bir antiaging potansiyelinin olduğu söylenebilir.

Genel olarak türün antihipertansif potansiyelinde olduğu görülmektedir. Özellikle *in vivo* dişi kök ve gövde ekstrelerinin çok yüksek bir antihipertansif potansiyeli olduğu tespit edilmiştir.

- Tez kapsamında incelenen parametreler açısından genel anlamda yüksek aktivitelerin daha çok *in vivo* örneklere ait ekstrelerden elde edildiği görülmüştür. Keza kök kısımlarının da gövde ve yaprak kısımlarına nazaran daha aktif bir sonuç sergilediği dikkate alındığında içerdiği sekonder metabolitler bakımından *in vivo* kök kısımlarının biyolojik aktivite bakımından daha elverişli olduğu sonucuna varılmaktadır.

5.2. Öneriler

20. yüzyılın başlarında tıbbi ve aromatik bitkilerin üretim ve kullanımındaki gelişmeler incelendiğinde, özellikle sosyal ve politik değişimlerden dolayı bitkilerin ilaç olarak kullanımında hızlı bir azalma gözlenmiştir. Ancak günümüze gelindiğinde, özellikle 21. yüzyılın başlarında gelişen teknoloji ile kimyasal ve biyolojik yöntemler sayesinde bitkisel ilaçlarda etkinliğin ve güvenilirliğin kanıtlanması ile farmakolojik etki mekanizmalarının aydınlatılmaya başlanması fitoterapinin “Tamamlayıcı ya da Alternatif Tıp” adı altında kabul gören 15 yöntemden biri olarak tıp sektöründe konvansiyonel tedavi yöntemlerine ilave edilmiştir.

Bu gelişime önayak olan farklı iklim ve toprak özelliklerine sahip ülkemizde birçok tıbbi bitkinin doğal olarak bulunması ve bu bitkilerin kültüre alınmaları ile artan tıbbi ve ticari öneminin yeri kuşkusuzdur. Bu bağlamda, kültüre alma çalışmaları sırasında özellikle türlerin sekonder madde içeriği, ve genetiği ile ilgili araştırma sonuçları dikkate alınarak birim alandan yüksek verim ile daha saf, daha temiz ve standartlara uygun ayrıca getirisi de yüksek droglar elde edilebilmektedir. Gelişmiş ülkelerde bitkisel ilaç pazarı yıllık yaklaşık %10 büyüme hızına sahiptir. Özellikle sanayileşmiş ülkelerin tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımında gelişmiş biyoteknolojik ve tarım tekniklerini kullanmaktadır.

Türün *in vivo* örneklerinin çok yüksek biyolojik aktivite potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Özellikle türün *in vivo* kök örneklerinin antitirozinaz ve anti elastaz aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda bu ekstraktların antiaging katkı maddesi olma potansiyellerinin olduğu söylenebilir.

Bu tez kapsamında ele alınan, tıbbi ve ekonomik öneme sahip *P. khinjuk* Stocks. ‘un barındırdığı sekonder metabolitlerin hücre metabolizması düzeyinde araştırılması, saflaştırma işlemlerinin yapılarak geliştirilmesi ve geniş ölçekli biyoreaktörlerde üretim işlemlerinin başlatılması ile kalitesi daha yüksek ürünlerin elde edileceği ve bunların daha düşük maliyetle üretebileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Ahmed, Z.B., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Heyden, Y.V., 2018, Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from *Pistacia atlantica* leaf extracts by LC fingerprinting. *J Pharm Biomed Anal.* 5;149:547.
- Akdeniz M. 2018, Türkiyenin Çeşitli Bölgelerinde Yetişen Hypericum Türlerine Özgü Bileşikler Açısından Kimyasal İçeriğinin Lc-Ms/Ms ile Miktar Tayini ve Metot Validasyonu; Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması ve Kemometrik Değerlendirilmesi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Diyarbakır.
- Al-Saghir, M.G., Porter, D.M., 2012, Taxonomic Revision of the Genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae), *American Journal of Plant Sciences*, 3;12-32.
- Ashraf ,S.M., and Rathinasamy, K., 2018, Antibacterial and anticancer activity of the purified cashew nut shell liquid: implications in cancer chemotherapy and wound healing, *Natural Product Research*, 32:23, 2856-2860,
- Banerjee, S.K., Bonde, C.G., 2011, Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5;817- 822.
- Baykara, O., 2016, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3); 154-165.
- Bıbbı, Y., Nisa, S., Zia, M., Waheed, A., Ahmed, S., Chaudhary, M.F., 2012, The Study of Anticancer and Antifungal Activities of *Pistacia integerrima* Extract *in vitro*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74(4),375–379.
- Bilgin Sökmen, B., Aydın, S., Şahin, Y., Akyurt, İ., 2016, Üreaz ve Elastaz Aktivitelerine Giresun'dan Toplanan *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Deniz Yosununun İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 6(14), 124-131.
- Bilgin Sökmen, B., Sağkal, Y., 2017, Elastaz Aktivitesine Giresun Yöresindeki Bazı Yenilebilir Bitkilerin Farklı Çözücülerdeki Ekstrelerinin İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* ,7(2), 10-18.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M.H.S., Shams-Ardekani, M.R. Rahimi, R., 2013, Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk* and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology, *The Scientific World Journal*, 219815, 1- 33.

- Bouriche , H., Saidi, A., Ferradji, A., Belambri, S.A., Senator, A., 2016 Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of *Pistacia lentiscus* extracts, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 6 (7);140-146
- Can, C., Özaslan, M., Töremen, H., Sarpkaya, K., İskender, E., 2006, In vitro micrografting of pistachio, *pistacia vera L.* var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5: 25-31.
- Calay, Ö., 2010, Tirozinaz Enziminin Bazı Tibbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Dimas, K., Hatziantoniou, S., Wyche, J.H., Pantazis, P., 2009, A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In Vivo*. 23(1):63–68.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Erci, B., Elibol, M. Aktürk, Ü., 2018, Hipertansiyon hastalarının tedaviye uyumunu ve yaşam kalitesini etkileyen faktörlerin incelenmesi. *FNJN*, 26(2), 79-92.
- Gezici, S., 2018, Anticancer, Antiproliferative, Lysosomal and Lactate Dehydrogenase Inhibitory Effects of Fruit Extracts from Sumac (*Rhus coriaria L.*) on Human Lung Cancer Cells, *Acta Oncologica Turcica*.
- Ghaemmaghami, L., Attar, F., Ghahreman, A., Rahiminejad, M.R., 2009, Geographical, morphological and taxonomic status of *Pistacia khinjuk* Stocks ex Stocks in Iran. *Iranian Journal of Science & Technology* 33(A1).
- Güven, A., Gürsul, I., 2014, Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi, *GIDA* 39 (5): 299-306.
- Hashemi, L., Samani, M.A., Taghi Moradi, M., and Alidadi, S., 2017, Anticancer Activity and Phenolic Compounds of *Pistacia atlantica* Extract *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research (eIJPPR)* Page 26-31.
- Hearing, VJ., Jiménez, M., 1987. Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *International Journal of Biochemistry*, 19, 1141-7.
- Hina, Z., Ghazala, H.R., Arfa, K., Huma, S., Sabiha, T., Ajmal, K., 2015. Anti-urease Activity of *Mimusops elengi* Linn (Sapotaceae), *European Journal of Medicinal Plants*, 6, 223-230.

- Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H., Nakamura, M., 2000, Purification and properties of urease from leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry*, 53:325-330.
- Jaafari-Ashkvandi, Z., Shirazi, S.Y., Rezaeifard, S., Hamedi, A., and Erfani, N., 2019, Cytotoxic Effects of *Pistacia atlantica* (Baneh) Fruit Extract on Human KB Cancer Cell Line, *Acta Medica (Hradec Králové)*, 62(1): 30–34.
- Jung, I. H., Kim, S.E., Lee, Y.G., Kim, D.H., Kim, H., Kim, G.S., ... Lee, D.Y., 2018, Antihypertensive Effect of Ethanolic Extract from *Acanthopanax sessiliflorus* Fruits and Quality Control of Active Compounds. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 5158243. doi:10.1155/2018/5158243.
- Kartal, N. 2013, Bitkisel Kökenli Biyoteknolojik Ürünler, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bitirme Tezi, Kayseri.
- Kılıç, T., Değirmenci, T., Gören, A.C., 2007, Fatty acid composition of seeds of same species of *Nepeta* L., *Natural Product Research*, 21:5,465-468.
- Kılınçarslan, Ö., 2016, *Erysimum Kotschyianum*' un ağır metal içeriği ile ekstraktlarının bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Denizli.
- Kirollos, F. N., Elhawary, S. S., Salama, O. M., and Elkhawas, Y. A., 2018, LC-ESI-MS/MS and cytotoxic activity of three *Pistacia* species, *Natural Product Research*. 33:12, 1747-1750, Doi: 10.1080/14786419.2018.1428601.
- Koyuncu, İ., 2018, Urfa fıstığından (*Pistacia vera* L.) elde edilen çeşitli ekstraktların antikanser özelliklerinin incelenmesi, *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 15(2):72-75.
- Köşgeroğlu, N., Dönmez, N., Deniz Sayiner, F., Özerdoğan, N., Serhan, N., 2008, Mesleki Maruziyet Nedeniyle Hemşirelerde Sitotoksik İlaçların Kısa Dönem Yan Etkilerinin Görülme Sıklığı ve Hemogloblin, Lökosit Düzeylerinin Belirlenmesi, *C.Ü.Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 12(3):27-35.
- Labdelli, A., Zemour, K., Simon, V., Cerny, M., Adda, A., Merah, O., 2019, *Pistacia atlantica* Desf., a Source of Healthy Vegetable Oil. *Appl. Sci*, 9, 2552;
- Lee, J., Ryu, H.W., Lee, S.U., Kim, M., Kwon, O., Kim, M.O. ... Oh, S., 2019, *Pistacia weinmannifolia* ameliorates cigarette smoke and lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting interleukin-8 production and NF-κB activation, *International Journal of Molecular Medicine*, 44, 949-959.

- Mahernia, S., Bagherzadeh, K., Mojab, F., Amanlou, M., 2015, Urease Inhibitory Activities of some Commonly Consumed Herbal Medicines. *Iran J Pharm Res.* 14(3):943–947.
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E., ve Özcan, S., (edt.) 374s., 262- 281.
- Melzig, M.F., Löser, B., Ciesielski, S., 2011, Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie.* Dec;56(12):967-70.
- Mirian, M., Behrooeian, M., Ghanadian, M., Dana, N., and Sadeghi-Aliabadi, H., 2015, Cytotoxicity and antiangiogenic effects of *Rhus coriaria*, *Pistacia vera* and *Pistacia khinjuk* oleoresin methanol extracts, *Research in Pharmaceutical Sciences*,10(3): 233-240
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3), 473-497
- Onay, A., 1996, In vitro organogenesis and embriyogenesis of Pistachio, *Pistacia vera* L. PhD. Thesis, University of Edinburgh, UK.
- Onay, A., 2000. Micropropagation of Pistachio from mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 159–162.
- Onay A., Ersalı, Y., Tilkat, E., Özen, H.Ç., 2017, Olgun Dişi Bittim (*Pistacia khinjuk* Stocks) Ağaçlarından *in vitro* Kültürlerin Başlatılması, *Batman University Journal of Life Sciences* 7,(1/2): 1-8
- Öncel, Z., 2011, Jojoba'nın (*Simmondsia chinensis*) *in vitro* Hızlı Çoğaltımı ve Moleküler İşaretleyicilerle Erkek ve Dişi Bitkilerin Belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Örnek Acar, D., 2009, Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Özpancar, N., 2016, Hipertansiyonda Kanıta Dayalı Bakım Uygulamaları, *Turkish Journal of Cardiovascular Nursing Evidence*, 7(sup 1):2-11.
- Paraschos, S., Magiatis, P., Mitakou, S., Petraki, K. and Kalliaropoulos, A., 2007, In vitro and in vivo activities of Chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*, *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 551–559.
- Rahman, H.S., 2018, Phytochemical analysis and antioxidant and anticancer activities of mastic gum resin from *Pistacia atlantica* subspecies *kurdica*, *OncoTargets and Therapy*,(11); 4559-4572.

- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2005, "Biology of Plants", 7th ed.; W. H. Freeman and Company: New York.
- Remila, S., Kilani, D.A., Delemasure, S., and Atmani, D., 2015, Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts, *European Journal of Integrative Medicine* 7(3).
- Rhodes, L., and Maxted, N., 2016, *Pistacia lentiscus*, The IUCN Red List of Threatened Species: e.T202960A47600695. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN>.
- Salinas Ibáñez, A.G., Arismendi Sosa, A.C., Ferramola, F.F., Paredes, J., Wendel, G., Maria, A.O., and Vega, A.E., 2017, Inhibition of *Helicobacter pylori* and Its Associated Urease by Two Regional Plants of San Luis Argentina. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 6(9): 2097-2106.
- Sarı, A.O., Oğuz, B., Bilgiç, A., Tort, N., Güvensen, A., Şenol, S.G., 2008, Batı Anadolu'da halk ilacı olarak kullanılan Asteraceae türleri. *Anadolu, JAARI*, 18(1): 1-15.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Leblebici, E., ve Bekat, L., 2008, Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Yayınları, 446s., İzmir.
- Seifaddini-pour, M., Farghadani, R., Namvar, F., Mohamad, J., and Abdul Kadir, H., 2018, Cytotoxic Effects and Anti-Angiogenesis Potential of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls against MCF-7 Human Breast Cancer Cells, *Molecules*, 23, 110.
- Sifia, I., Dzoyem, J.P., Ouinten, M., Yousfi, M., McGaw, L.J., and Eloff, J.N., 2015, Antimycobacterial, Antioxidant And Cytotoxic Activities Of Essential Oil Of Gall Of *Pistacia atlantica* Desf. From Algeria, *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 12(3):150-155.
- Singh, M., Singh, A.K., Singh, S., Pandey, P., Chandra, S., Gambhir, I.S., 2016, Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism increases the susceptibility to hypertension and additive diseases: a study on north Indian patients. *Clin Exp Hypertens*, 38(3):305–311.
- Şener, S.Ö., Korkmaz, N., Akkaya, Ş., Badem, M., Aliyazıcıoğlu, R., Özgen, U., Alpay Karaoğlu, Ş., 2018, Investigation of Phenolic Compounds by RP-HPLC and Antioxidant, Antimicrobial, Tyrosinase Inhibitor Activities of *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* Extract, *GÜFBED/GUSTIJ*, 8 (2): 230-238.
- Ronchi, S.N., Brasil, G.A., Marques do Nascimento, A., Miranda de Lima, E., Scherer, R., Helber B., Romão, C., W., Boëchat, G.A.P., Lenz, D., Fronza, M., Bissoli,

- N.S., Endringer D.C., and Uggere de Andrade, T., 2015, Phytochemical and *in vitro* and *in vivo* biological investigation on the antihypertensive activity of mango leaves (*Mangifera indica* L.), *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 9(5) 244–256.
- Sola-Campoy, P.J., Robles, F., Schwarzacher, T., Ruiz Rejón C, de la Herrán R., Navajas-Pérez, R., 2015, The Molecular Cytogenetic Characterization of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Suggests the Arrest of Recombination in the Largest Heteropycnotic PairHC1. *Plos One* 10(12): e0143861. doi:10.1371.
- Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Lampri, E., Fitsiou, E., Vasileiadis, V., Vamvakias, M., Bardouki, H., Goussia, A., Malamou- Mitsi, V., Panayiotidis, M.I., Galanis, A., Pappa, A., and Chlichlia, K., 2017, Dietary mastic oil extracted from *Pistacia lentiscus* var. *chia* suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Sci Rep.*, 19;7(1):3782.
- Tilkat, E., Işıkalan, Ç., and Onay, A., 2005, *In Vitro* Propagation Of Khinjuk Pistachio (*Pistacia khinjuk* Stocks) Through Seedling Apical Shoot Tip Culture, *Propagation of Ornamental Plants*, 5 (3), 2005: 1-5.
- Turkeli, Y., Kafkas, S., 2013, First genetic linkage map in pistachio constructed using an interspecific cross between *Pistacia vera* L. and monoecious *Pistacia atlantica* Desf. *Sci Hortic.*, 151:30–37.
- Uddin, G., Rauf, A., Siddiqui, B.S., and Khan, H., 2013, Cytotoxic Activity of Extracts/Fractions of Various Parts of *Pistacia Integerrima* Stewart., *Transl Med* 3: 118.
- Web1: https://www.iccpportal.org/system/files/plans/Ulusal_Kanser_Kontrol_Plani_2013_2018.pdf
- Web2: <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=67052>
- Web3: https://www.tkd.org.tr/kilavuz/k03/4_2c93c.htm?wbnum=1107
- Yağcı, C., ve Toker, T., 2008, *Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler*, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1 (1): 47-58.
- Yaltirik, F., 1967, Anacardiaceae, In: P. H. Davis, Ed., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 2; 544-548.
- Yemmen, M., Landolsi, A., Ben Hamida, J., Mégraud, F., and Trabelsi Ayadi, M., 2017, Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia, *Cell Mol Biol.*, 30;63(9):87-95.

- Yıldırım, H., 2012. Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants. *Scientia Horticulturae*, 137: 29–35.
- Yılmaz, A., 2011, *Nepeta sorgerae* ve *Nepeta obtusicrena* Bitkilerinin Antioksidan ve Anti-Alzheimer Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Belirlenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hayri BATIBAY
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : DİYARBAKIR / 1989
e-mail : hayribatibay51@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı	Bitirme Yılı
Lise	: Yunus Emre Lisesi	2006
Üniversite	: Anadolu Üniversitesi	2013
Üniversite	: Dicle Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi	2020

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2016-2017	Adnan Menderes Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğrt.
2016-2017	70. Yıl Anadolu Sağlık Meslek Lisesi	Biyoloji Öğrt.
2017-2018	Yunus Emre Anadolu İmam Hatip Lisesi	Biyoloji Öğrt.
2018-2019	Şehit Polis Salih Eroğlu ilk-Orta Okulu	Matematik Öğrt.
2018-2019	Kırklar Dağı ilk-Orta Okulu	Fen Bilimleri Öğrt.

YABANCI DİLLER

İngilizce

BİLDİRİLER

Sığıncı-Çetin, Y., Yılmaz, M.A., Ertuş, A., Süzerer, V., Tilkat, E., Ayaz-Tilkat, E., **Batıbay, H.**, and Onay, A., 2018. *In Vitro* Ortamda Çoğaltılmış Juvenil Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Eksplantlarında Triterpenoid Miktarlarının Bazı Elisitasyon Uygulamaları Yoluyla Arttırılması. 3. Uluslararası Katılımlı Bitki Fizyoloji Kongresi, -23-23, Çanakkale, Türkiye.