VITEX AGNUS-CASTUS L. (Hayıt) BİTKİSİNİN FARMAKOGNOZİK VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Tuğba TUNCEL

Eskişehir 2025

VITEX AGNUS-CASTUS L. (Hayıt) BİTKİSİNİN FARMAKOGNOZİK VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Tuğba TUNCEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Programı

Danışman: Prof. Dr. Betül Demirci

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi)

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Haziran 2025

Eskişehir

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından TYL-2023-1843 proje numarası ile desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Tuğba Tuncel'in "*Vitex agnus-castus* L. (Hayıt) Bitkisinin Farmakognozik Ve Biyolojik Aktiviteleri Açısından Araştırılması " başlıklı tezi 30/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Ana Bilim dalında Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul dilmiştir.

		Ünvanı Adı Soyadı	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	**:**	**Prof. Dr. Betül DEMİRCİ**	**.....**
Üye	**:**	**Prof Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU**	**.....**
Üye	**:**	**Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ**	**.....**

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

VITEX AGNUS-CASTUS L. (Hayıt) BİTKİSİNİN FARMAKOGNOZİK VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Tuğba TUNCEL
Farmakognozi Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Programı
Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2025
Danışman: Prof. Dr. Betül Demirci
(İkinci Danışman: Prof. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi)

Vitex agnus-castus L. (Hayıt) (Lamiaceae) halk arasında idrar arttırıcı, sindirim sistemiyle ilgili ve sakinleştirici kullanımları olup yaygın tıbbi kullanımı premenstrüel sendrom tedavisidir. Genel olarak meyveleri kullanılır. Biyolojik aktiviteleriyle ilgili çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Bileşenlerindenlerinden kastisinin antiinflamatuvar, sitotoksik etkinlikleriyle ilgili literatürde bazı çalışmalar yer almaktadır. Bu tez kapsamında, üç farklı lokaliteden çiçekli ve meyveli dönemde toplanan *Vitex agnus-castus* toprak üstü kısımlarının Avrupa Farmakopesine göre yabancı madde, total kül miktar, nem miktar tayinleri, makroskobik ve mikroskopik incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Toprak üstü kısımlarının uçucu yağı su distilasyonuyla; ekstreleri %70'lik etanolde maserasyonla elde edilmiştir. Uçucu yağların ve ekstrelerin kimyasal profilleri ince tabaka kromatografi (İTK) ile belirlenip; uçucu yağların içeriği gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) ile analiz edilmiştir. Kolon kromatografi ile kastisin izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında kastisin varlığı sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK/KS-KS) ile belirlenmiştir. Uçucu yağların ve ekstrelerin mikrodilüsyonla antimikrobiyal; 5-LOX deneyi ile antiinflamatuvar; hücre kültür çalışmalarıyla HTERT-HPNE ve PANC-1 hücre hattı üzerinde antikanser etkileri araştırılmıştır. PANC-1 hücreleri üzerinde CD-46 reseptör üzerine etkilerinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Vitex agnus-castus*, Uçucu yağ, 5-LOX, PANC-1, CD46.

ABSTRACT

INVESTIGATION of PHARMACOGNOSTIC and BIOLOGICAL ACTIVITIES of *VITEX AGNUS-CASTUS* L. (CHASTE TREE)

Tuğba TUNCEL
Department of
PHARMACOGNOSY
Programme in MASTER
Graduate School of Anadolu University, June 2025
Supervisor: Prof. Dr. Betül DEMİRCİ
(Co-Supervisor: Prof. Dr. Gülşen Akalın ÇİFTÇİ)

Vitex agnus-castus L. (Chaste tree) (Lamiaceae) is used among the public as a stimulant, digestive and calming agent, and its common medical use is the treatment of premenstrual syndrome. Generally, its fruits are used. There are various studies on its biological activities. There are some studies in the literature on the anti-inflammatory and cytotoxic activities of its component, casticisin. Within the scope of this thesis, determination of foreign matter, total ash content, moisture content, macroscopic and microscopic examinations of nutritional *Vitex agnus-castus* aerial parts in flowering and fruiting periods from three different localities were carried out according to the European pharmacopoeia. In the aboveground parts, the essential oil was obtained by water distillation; the extracts were obtained by maceration in 70% ethanol. The chemical profiles of essential oils and extracts were determined by thin layer chromatography (TLC); the content of essential oils was analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Casticin isolation studies were performed by column chromatography. After isolation, the presence of casticin was determined by liquid chromatography/mass spectrometry-mass spectrometry (LC/MS-MS). The antimicrobial effects of essential oils and extracts were investigated with microdilution; anti-inflammatory effects with 5-LOX assay; and cell culture studies on HTERT-HPNE and PANC-1 cell lines. Efficacy evaluation for adenovirus was performed by determining CD46 receptor expression in PANC-1 with the Human CD46 Elisa Kit.

Keywords: *Vitex agnus-castus*, Essential oil, PANC-1, CD46, ELISA Kit.

30/06/2025

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

(İmza)

Tuğba TUNCEL

30/06/2025

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis/dissertation is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with "Scientific Plagiarism Detection Program" used by Anadolu University, and that "it does not have any plagiarism" whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

.....

(Signature)

Tuğba Tuncel

ÖN SÖZ /TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca bana rehberlik edip yol gösteren, her türlü yardımı ve kolaylığı benden esirgemeyen, desteğini her daim hissettiğim, kendisinden çok şey öğrendiğim Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye

Tez sürecim boyunca bana rehberlik edip yol gösteren, her türlü yardımı ve kolaylığı benden esirgemeyen, desteğini her daim hissettiğim, kendisinden çok şey öğrendiğim Sayın İkinci Danışman Hocam Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye,

Tez deneysel süreçlerimde yardımları ve desteği için Dr. Öğr. Üyesi Gözde ÖZTÜRK'e

Tez laboratuvar çalışmalarımda, deneysel süreçlerimde bilgisi, desteği, çabası ile her zaman yardımcı olan Araştırma görevlisi Bilge Nur MUTLU'ya, Araştırma görevlisi Şevval Karaca ARPA'ya ve Dr. Bio. İpek ERTORUN'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında sorularım olduğunda ve laboratuvar araç-gereç ihtiyacımda her zaman destek olan Araştırma görevlisi Burak TEMİZ'e

Deneysel çalışmalarım sırasında sorularım olduğunda bilgisini ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Gökalp İŞCAN hocam'a

Her daim motivasyonumun yüksek olmasında önemli katkısı olan manevi desteğini her zaman hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU'na

Beni destekleyen, bilgisi ve manevi desteği ile beni yalnız bırakmayan kıymetli arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Nagehan SALTAN'a

Kastisin temini sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Hasan KIRMIZIBEKMEZ'e

Tez çalışmamı maddi yönden destekleyen Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

Geç saatlere kadar süren tez çalışmalarım dolayısı ile istemeyerek ihmal ettiğim, her an bana destek olan, yoğun iş tempomu anlayışla karşılayan, sonsuz sevgisi ile yanımda olan, motivasyonum düştüğünde her an beni yeniden yüreklendiren canım eşim Bülent Raşit TUNCEL'e, kızıma ve oğluma; tüm eğitim-öğretim sürecimde her an beni destekleyen canım anneme ve babama; tüm desteklerinden dolayı tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin; bilim ışığında ilerlemeyi hedef edindiğim, motivasyonumu bilimden ve öğrencilerimden aldığım öğretmenlik mesleğimde yol gösterici olabilmesi ve nice nesiller yetiştirmeye, bilimle başarmaya vesile olabilmesi dileğiyle.

30/06/2025

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ

"Bu tez çalışmasının hazırlanmasında, yürütülmesinde, verilerin analizinde Etik Kurul İzni'ne gerek yoktur."

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tezi hazırlarken ChatGPT, Gemini, DALL-E vb. üretken yapay zekâ programlarından destek almadığımı beyan ederim. Tezin hazırlığı aşamasında üretken yapay zekâ programlarından çeviri, bilimsel makale ve kaynaklara ulaşım desteği aldım. Üretken yapay zekâ programlarından aldığım bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi bildiririm. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

(İmza)

Tuğba TUNCEL

30/06/2025

DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE

I declare that I did not receive support from generative artificial intelligence programs such as ChatGPT, Gemini, DALL-E, etc. while preparing this thesis. During the preparation of these thesis, I received translation, scientific article and resource access support from generative artificial intelligence programs. I declare that I have checked the accuracy of the information I received from generative artificial intelligence programs. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

.....

(Signature)

Tuğba TUNCEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI ..... **i**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ..... **iii**

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ ..... **v**

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES ..... **vi**

ÖN SÖZ /TEŞEKKÜR ..... **vii**

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ ..... **viii**

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI ..... **ix**

DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE ..... **x**

İÇİNDEKİLER ..... **xi**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xvii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xix**

GÖRSELLER DİZİNİ ..... **xx**

SİMGELER DİZİNİ ..... **xxiii**

KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xxiv**

1 GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2 GENEL BİLGİLER **3**

2.1 Lamiaceae (Ballıbabagiller) **3**

2.2 *Vitex* L. **4**

2.4 *Vitex agnus-castus* Kimyasal Bileşenleri **6**

2.4.1 Bisiklik diterpenler **7**

2.4.2 Flavonoitler **7**

2.4.3 İridoit glikozitleri **8**

2.4.4 Polifenoller **8**

2.4.5 Uçucu yağlar **8**

2.4.6 Yağ asitleri **9**

2.5 *Vitex agnus-castus* Etnobotanik ve Tıbbi Kullanımı **9**

2.6 *Vitex agnus-castus* Biyolojik Aktiviteleri **10**

2.6.1 Hormonal etki **10**

2.6.2 Antiinflamatuar aktivite-Lipoksijenaz inhibitör potansiyeli **11**

2.6.3 Antioksidan aktivite **12**

2.6.4 Antimikrobiyal aktivite **12**

2.6.5 Antifungal aktivite **13**

2.6.6 Repellent aktivite **13**

2.6.7 Antineoplastik-antitümör aktivite **13**

2.6.8 Antimutajenik aktivite **14**

2.6.9 Antiviral aktivite **14**

3 GEREÇLER **17**

4 MATERYAL-METOT **20**

4.1 Materyal **20**

4.1.1 Mikrobiyal suşlar **20**

4.1.2 Bitkinin temini ve teşhisi **20**

4.2.1 Avrupa Farmakopesi'ne göre bitkinin incelenmesi **23**

4.2.1.1 Makroskopik inceleme **23**

4.2.1.2 Mikroskopik inceleme **23**

4.2.1.3 Yabancı madde miktar tayini **23**

4.2.1.4 Total kül miktar tayini **23**

4.2.1.5 Nem miktar tayini **24**

4.2.2 *Vitex agnus-castus* çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan toprak üstü kısımlarından uçucu yağ eldesi 24

4.2.3 *Vitex agnus-castus* çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan toprak üstü kısımlarından etanol ekstraksiyonu 25

4.2.4 Kimyasal analizler 27

4.2.4.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK) 27

4.2.4.2 Uçucu yağın gaz kromotografisi (GK) ve gaz kromotografisi/kütle spektrometresi (GK/KS) analizleri 27

4.2.4.3 Kolon kromatografisi ile kastisin izolasyonu 28

4.2.4.4 Sıvı kromotografisi/kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK/KS-KS) analizleri 29

4.2.5 Biyoaktivite çalışmaları 30

4.2.5.1 Antimikrobiyal aktivite çalışması 30

4.2.5.2 Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyonu 31

4.2.5.3 Hücre kültürü yöntemi ile in vitro antikanser etki çalışmaları 32

4.2.5.3.1 Test örneklerinin HTERT ve PANC-1 üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT ile ölçümü 32

4.2.5.3.2 PANC-1 hücrelerinde Annexin V FITC: Erken faz apoptozun belirlenmesi 33

4.2.5.3.3 PANC-1 hücrrelerinde Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri ile belirlenmesi 34

4.2.5.3.4 Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması) 34

4.2.5.3.5 CD46 ölçümü: Human CD46 Elisa kit deneyi 35

5 BULGULAR 39

5.1 Avrupa Farmakopesi'ne Göre Bitkinin İncelenmesi Bulguları 39

5.1.1 Makroskopik inceleme bulguları 39

5.1.2 Mikroskopik inceleme bulguları 39

5.1.3 Yabancı madde miktar tayini bulguları 41

5.1.4 Total kül miktar tayini bulguları 41

5.1.5 Nem miktar tayini bulguları 41

5.2 Uçucu Yağ Eldesi Bulguları 41

5.3 Çiçekli ve Meyveli Toprak Üstü Kısımlarının Etanol Ekstraksiyonu Bulguları 42

5.4 Kimyasal Analiz Bulguları 42

5.4.1 İnce tabaka kromotografisi (İTK) bulguları 42

5.4.2 Uçucu yağın gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) analizlari bulguları 45

5.4.3 Kolon kromotografisi ile kastisin izolasyon bulguları 48

5.4.4 Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK/KS-KS) analiz bulguları 49

5.4.5 Biyoaktivite bulguları 51

5.4.5.1 Antimikrobiyal aktivite çalışması bulguları 51

5.4.5.2 Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyonu bulguları 54

5.4.5.3 Hücre kültürü yöntemi ile in vitro antikanser etki çalışmaları bulguları 54

5.4.5.3.1. MTT ölçümü bulguları 54

5.4.5.3.2 Annexin V FITC: Apoptozun belirlenmesi bulguları 55

5.4.5.3.3 Annexin V FITC: Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri ile belirlenmesi bulguları 57

5.4.5.3.4. Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması) bulguları 60

5.4.5.3.5. CD46 ölçümü: Human CD46 Elisa kit deneyi bulguları 63

6 SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER 67

6.1 Sonuç 67

6.1.1 Makroskobik inceleme sonuçları 67

6.1.2 Mikroskobik inceleme sonuçları 67

6.1.3 Yabancı madde miktar tayin sonuçları 67

6.1.4 Total kül miktar tayin sonuçları 67

6.1.5 Nem miktar tayin sonuçları 67

6.1.6 Uçucu yağ eldesi sonuçları 67

6.1.7 Çiçeklenme ve meyveli dönemde toplanan toprak üstü kısımlarının etanol ekstraksiyonu sonuçları 68

6.1.8 İnce tabaka kromatografisi sonuçları 68

6.1.9 Uçucu yağın gaz kromotografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) analiz sonuçları 68

6.1.10 Kolon kromatografi ile kastisin izolasyon sonuçları 69

6.1.11 Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK/KS-KS) analiz sonuçları 69

6.1.12 Antimikrobiyal aktivite çalışması sonuçları 69

6.1.13 Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon sonuçları 70

6.1.14 Hücre kültürü yöntemi ile in vitro antikanser etki çalışmaları sonuçları 70

6.1.14.1 MTT sonuçları 70

6.1.14.2 Annexin V FITC: Apoptozun belirlenmesi sonuçları 71

6.1.14.3 Annexin V FITC: Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometrisi ile belirlenmesi sonuçları 72

6.1.14.4 Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması) sonuçları 72

6.1.14.5 CD46 ölçümü: Human CD46 Elisa kit deney sonuçları 73

6.2 Tartışma 73

6.3 Öneriler 76

KAYNAKÇA 78

ÖZ GEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan cihazlar ve gereçler…….17

Tablo 3.2 Deneylerde kullanılan kimyasallar ve sarflar…….….19

Tablo 4.1 Bitki temini……..……20

Tablo 4.2 GK/KS koşulları……..……28

Tablo 4.3 SK analiz koşulları…….…….30

Tablo 5.1 Kül miktar tayin bulguları……..…..….41

Tablo 5.2 Nem miktar tayin bulguları…….41

Tablo 5.3 Uçucu yağ eldesi bulguları…….……..…42

Tablo 5.4 Ekstre eldesi bulguları……...…….……..…42

Tablo 5.5 Uçucu yağların GK ve GK/KS analiz bulguları…….....…….…45

Tablo 5.6 Uçucu yağların antimikrobiyal aktivite bulguları…….....…….…53

Tablo 5.7 Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite bulguları…….....……53

Tablo 5.8 Hayıt uçucu yağlarının ve ekstrelerinin 5-LOX aktivite bulguları…….....…54

Tablo 5.9 Hayıt uçucu yağlarının ve ekstrelerinin MTT-IC_{50} bulguları.....54

Tablo 5.10 Uçucu yağlar ve sisplatinle muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin Annexin V FITC/Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analizinin apoptoz yüzdeleri……..57

Tablo 5.11 Ekstreler ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin Annexin V FITC/Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analizinin apoptoz yüzdeleri..57

Tablo 5.12 Uçucu yağlar ve sisplatinle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin Kaspaz-3 pozitif ve negatif hücrelerinin yüzdeleri …….…...……...……..60

Tablo 5.13 Ekstreler ve sisplatinle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin Kaspaz-3 pozitif ve negatif hücrelerinin yüzdeleri …….…...……...……..60

Tablo 5.14 Ekstrelerin, uçucu yağların ve sisplatinin IC_{50} konsantrasyonlarının PANC-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin azaltılması……....63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kastisin kimyasal yapısı…….....8

Şekil 2.2 Adenovirüs yapısı……...…..…...16

Şekil 5.1 24. Fraksiyon SK/KS-KS kromotogram……...…….....…..…...50

Şekil 5.2 24. Fraksiyon SK/KS-KS molekül ağırlıklarına ait spektrum….....50

Şekil 5.3 *Vitex agnus-castus* toprak üstü kısımlarından elde eilen ekstre ve uçucu yağların Annexin V FITC: Apoptoz bulguları…..…….....55

Şekil 5.4 *Vitex agnus-castus* toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstreler, uçucu yağları ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin Kaspaz 3/Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analiz bulguları…….....…..…...58

Şekil 5.5 *Vitex agnus-castus* toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstreler, uçucu yağlar ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin JC-1 ile boyanması için Annexin V FITC /Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analiz bulguları……...61

Şekil 5.6 Uçucu yağlar uygulanmış PANC-1 hücrelerinde CD46 konsantrasyonu-optik dansite grafikleri…..…..…..64

Şekil 5.7 Ekstre uygulanmış PANC-1 hücrelerinde CD46 konsantrasyonu-optik dansite grafikleri …….....…..…..65

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1 *Vitex agnus-castus* dağılımının olduğu bölümler …….……..6

Görsel 2.2 *Vitex agnus-castus* dağılımının olduğu iller.……..…….……...…….6

Görsel 4.1 *Vitex agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/Karabörtlen-İkizkuyu Sokak lokalitesinden örnek genel görünüş……..…….……...…..……..……21

Görsel 4.2 *Vitex agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/D400 Karayolu üzeri lokalitesinden örnek genel görünüş ……..…….……..…….……..…….…...….21

Görsel 4.3 *Vitex agnus-castus* Antalya-Hacılarköyü köy yolu lokalitesinden çiçeklenme dönemde toplanan örnek genel görünüş ……..…….……..…….….…….21

Görsel 4.4 *Vitex agnus-castus* toplanan bitkilerin kurutulması ……...22

Görsel 4.5 *Vitex agnus-castus* Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryum örnekleri ……..22

Görsel 4.6 Total kül miktar tayini ….....……23

Görsel 4.7 Nem miktar tayini ….....……24

Görsel 4.8 *Vitex agnus-castus* hidrodistilasyonu ile uçucu yağ eldesi….....……25

Görsel 4.9 *Vitex agnus-castus* çiçeklenme döneminde toplanan drogtan maserasyon yöntemi ile ekstre eldesi.....26

Görsel 4.10 *Vitex agnus-castus* meyveli döneminde toplanan drogtan maserasyon yöntemi ile ekstre eldesi.....26

Görsel 4.11 *Vitex agnus-castus* çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan drogtan elde edilen ekstrelerin evoporasyon ile çözücülerinin uzaklaştırılması.....26

Görsel 4.12 3EM örneğinden kolon kromatografi ile kastisin izolasyonu ……29

Görsel 4.13 Mikrodilüsyon deneyi.....31

Görsel 4.14 5-Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyonu deneyi…….....…….32

Görsel 4.15 HTERT-HPNE ve PANC-1 hücresi……..…….....……33

Görsel 4.16 Test örneklerinin HTERT ve PANC-1 üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT ile ölçümü deneyi…….33

Görsel 4.17 PANC-1 hücrelerinde erken faz apoptozun, Kaspaz-3 aktivitesinin ve mitokondrial membran bütünlüğünün akım sitometri ile belirlenmesi…….....…..…35

Görsel 4.18 CD46 deneyi için hücrelerin ekimi ve test örnekleri ile inkübasyon……..…36

Görsel 4.19 CD46 deneyi için hücre lizatları hazırlama…….....…36

Görsel 4.20 CD46 deneyi……..…38

Görsel 5.1 Makroskopik inceleme bulguları ……..…...…….39

Görsel 5.2 Mikroskopik inceleme bulguları …...…….....…….40

Görsel 5.3 Ekstrelerin İTK görüntüsü ……...…….....……..43

Görsel 5.4 Uçucu yağların İTK görüntüsü……..44

Görsel 5.5 Ekstrelerin İTK görüntüsü ……....44

Görsel 5.6 20-27 fraksiyonların ve 3EM'ün İTK görüntüsü…….....48

Görsel 5.7 20-27 fraksiyonların ve 3EM(4)'ün İTK görüntüsü …….…….49

Görsel 5.8 24. Fraksiyon preparatif İTK görüntüsü (görünür ışık)……...…….....…49

Görsel 5.9 Hayıt uçucu yağlarının *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri……...……51

Görsel 5.10 Hayıt uçucu yağlarının *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri ……...……52

Görsel 5.11 Hayıt uçucu yağlarının *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri .....……..……...……..52

Görsel 5.12 Hayıt uçucu yağlarının *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri .....……..……...……..53

Görsel 5.13 *Vitex agnus-castus* toprak üstü kısımlarının uçucu yağ ve ekstrelerine ait CD46 Elisa Kit deney bulguları…….…….…….……63

SİMGELER DİZİNİ

μg : Mikrogram

mL : Mililitre

M+ : Moleküler iyon

m/z : Kütle/yük oranı

μL : Mikrolitre

g : gram

dk : Dakika

°C : Santigrat derece

KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC : American Type Culture Collection (Amerikan tip kültür koleksiyonu)

COLO 201 : Kolon karsinomu

DMEM. : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

ER-α : Östrojen reseptörü alfa

ER-β : Östrojen reseptörü beta

ESCOP : Avrupa Fitoterapi Bilimsel Kooperatifi

GK : Gaz kromotografi

MCP/CD46 : Membran Kofaktör Protein/Tamamlayıcı düzenleyici protein

HCF : İnsan rahim ağzı kanalı fibroblastı

IC_{50} : Hücrelerin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon

İTK : İnce tabaka kromatografisi

KATO-III : Mide yüzük taşı karsinomu

KH_2PO_4 : Potasyum dihidrojen fosfat

KS : Kütle Spektrometresi

LOX : Lipoksijenaz

Lu- 134-A-H : Akciğer küçük hücreli karsinomuna

MCF-7 : Meme karsinomu

MHA : Mueller Hinton Agar

MHB : Mueller Hinton Broth

MİK : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

NDGA : Nordihidroguyaretik asit

NP-PEG : Naturalproducts-polyethylenglycol reagent

NRRL : Northern Regional Research Laboratory

PANC-1 : Pankreas kanseri

PMS : Premenstrüel Sendrom

Rf : Alıkonma Faktörü

RT : Retention Time

SK : Sıvı Kromatografisi

SKG- 3a : Rahim ağzı karsinomu

SKOV-3 : Yumurtalık kanseri

TÜBİVES : Türkiye Bitkileri Veri Servisi

UV : Ultraviyole

VAC : *Vitex agnus-castus*

WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Vitex agnus-castus L. (Hayıt) ile ilgili literatürde var olan fitokimyasal çalışmalar; bitkide flavonoitlerin (Belic vd., 1961; Gomaa vd., 1978; Hadju vd., 2007; Hirobe vd., 1997; Hoberg vd., 1999; Strait vd.,1962; Wollenweber ve Mann, 1983), iridoitlerin (Kuruüzüm vd., 2003; Strait vd.,1962; Ramazanov, 2004), diterpenoitlerin (Hoberg vd.,1999; Li vd., 2002), uçucu-sabit yağların (Cengiz vd., 2003; Senatore vd., 2003; Sørensen ve Katsiotis, 2000), steroit ve glikozidik bileşenlerin (Ramazanov, 2004) varlığını ortaya koymaktadır. Hayıt uçucu yağı ve bileşenleri ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Fakir vd., 2014; Sargın Güzel, 2002).

Hayıt'ın fitoterapötik açıdan değerlendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Gülsoy, 2011). *V. agnus-castus* premenstrüel sendrom tedavinde kullanılmaktadır. Bitkinin; antioksidan (Balpınar vd., 2019; Maltaş vd., 2010), kemopreventif (Li vd., 2013), immünomodülatör (Mesaik vd., 2009), sitotoksisite (Ohyama, 2005), tümörisidal (Mazzio, 2009), antimutajenik (Saraca, 2015), antimikrobiyal (Balpınar vd., 2019; Maltaş vd., 2010), antifungal (Marongiu, 2010), böcek kovucu (Mehlhorn, 2005), larvasidal (Çetin vd., 2011), kırık iyileşmesi (Öztürk, 2008), östeojenik (Jarry vd., 2003) ve antiinflamatuar (Choudhary vd., 2009) etkileri bildirilmiştir. *Vitex* türleri ile daha önce yapılan çalışmalarda; *V. agnus-castus* meyvelerinden elde edilen etanol ve metanol ekstrelerinin farklı insan ve hayvan kanser hücre hatları üzerinde *in vitro* sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Hirobe vd., 1994; Hirobe 1997; Hirobe ve Kunio, 2000; Ohyama vd., 2005). Li ve Shen 2016'da yaptıkları çalışmada hayıt bileşenlerinden kastisinin romatoit etkilerini azaltıcı olduğunu ve sitotoksik olmadığını bulmuşlardır. Hayıtın lipoksijenaz enzimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır (Boujbiha, vd., 2023; Choudhary vd., 2009). Yapılan literatür taramalarında hayıt bitkisinin PANC-1 (pankreas kanser hücreleri) hücreleri üzerinde antikanser aktivitesi açısından ve bu aktivitelerinin etki mekanizmaları açısından da yeterli çalışma bulunmadığı görülmüştür. Bu tez kapsamında söz konusu bitkinin farmakognozik açıdan incelenmesi, bitkiden elde edilen uçucu yağların ve etanol ekstrelerinin fitokimyasal ve biyolojik aktiviteleri yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hayıt toprak üstü kısımlarının uçucu yağ ve ekstrelerinin; seçilen bakteriler üzerinde antibakteriyel, 5-lipoksijenaz inhibisyonu, HTERT-HPNE (İnsan Pankreas Hücresi) ve PANC-1 (Pankreas Kanser Hücresi) üzerinde sitotoksik açılardan araştırılması hedeflenmiştir. *V. agnus-*

castus ile antiviral etkinlik çalışmaları çok sınırlıdır. Literatür taramalarında PANC-1 hücrelerinin CD46 reseptör ekspresyonu gerçekleştirdiği saptanmıştır (Ma vd., 2015; Lei vd., 2018; Ryosuke vd., 2023). Adenovirüs CD46 reseptöre bağlanarak hücreye giriş gerçekleştirir. Hayıt uçucu yağ ve ekstrelerinin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda adenovirüs üzerindeki olası etkisi antikor kaplı Human CD46 ELİSA Kit kullanılarak, dolaylı yolla ölçülmesi hedeflenmiştir. CD46 reseptör miktarını antikora bağlanan CD46 reseptörleri üzerinden ölçen kitte antikorun hayıt uçucu yağ ve ekstrelerinin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda uygulanması ve antikorların inhibe edilmesi, ölçülen CD46 reseptör miktarının kontrol grupları ile karşılaştırılması ile çıkarım yapılması amaçlanmıştır. Bu analizlerden elde edilecek bulguların ve sonuçların CD46 reseptör kullanarak konağını enfekte eden adenovirüsler açısından bitkinin etkinliğinin değerlendirilmesi düşünülmüştür. Üç farklı lokaliteden toplanan *V. agnus-castus* bitkisinden elde edilen hayıt uçucu yağ ve ekstrelerinin adenovirüslerle mücadelede kullanım potansiyellerinin incelenmesi ileride yapılacak *in vivo* ve pre-klinik araştırmalara katkı sağlaması beklenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

Vitex agnus castus L. Türkiye Florasında Verbenaceae familyasında yer almaktadır ve *Vitex* L. cinsine ait bir türdür. (Towsend, 1982). Güncel olarak moleküler verilere göre bitki *Vitex* L. cinsi olarak Lamiaceae familyasına aktarılmıştır (Royal Botanic Gardens, Kew, 2025).

2.1 Lamiaceae (Ballıbabagiller)

Ağaçlar, çalılar, yarı çalılar, çok yıllık veya yıllık otlar, nadiren tırmanıcılar, aromatik veya aromatik olmayan bitkiler olarak bilinmektedirler. Kökleri nadiren yumruludur. Gövdeler genellikle dörtgen, dik veya yatay, bazen stolonlar, büyük veya ince rizomlar oluşturur. Yapraklar karşılıklı, sıklıkla çapraz, bazen halkasal, çok nadiren alternat dizilişli, basit, tam dişli veya loblu, bazen bileşik parmaksı veya pinnat, saplı veya sapsız, nadiren bir taban rozeti oluşturur. Çiçek salkımı sıklıkla brakteat, brakteler bazen belirgin, kalıcı veya yaprak döken, nadiren (*Lavandula* ve *Scutellaria*) spiral olarak düzenlenmiş, brakteolat veya değil ve genellikle terminal, gevşek veya sıkışık düzenlenmiştir. Taç yapraklar (4-)5(-16) bitişik, aktinomorfik-daha sıklıkla hafifçe veya kuvvetlice zigomorfik, sıklıkla 2 dudaklı, nadiren 1 dudaklı, loblar (2-)4-5(-16), eşit veya eşit değil, düz veya açık, bir veya diğer dudak sıklıkla içbükey veya kanatlı, taç tüpü kısa veya uzun, nadiren mahmuzlu, sıklıkla içinde kıl halkası veya uzantıları olan, nadiren taç yaprakları resupinat olup gynoecium 2-karpelli, genellikle 4-ovüllü, tam veya loblu, terminal stile sahip veya daha sıklıkla derin 4-loblu, ginobazik tanımlanır. Meyveleri nariden etli genellikle kuru veya sert şekilde olup 4 adet nuksa ayrılmaktadır (Harley vd., 2004).

Lamiaceae 230'dan fazla cins ve 7000'den fazla tür içeren altıncı en büyük angiosperm ailesi olup Lamiales takımının da en büyük ailesidir. Genellikle nane ailesi olarak bilinmekle birlikte aromatik yağları ile tanınır ve ekonomik, tıbbi açıdan önemli birçok türü içerir. Aromatik yağları mutfak, tıbbi ve bahçecilik açısından yıllardır kullanılmaktadır. Bu ailede yedi alt familya yer almaktadır. Türkiye'de bu alt familyalardan beşi bulunmaktadır: Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Scutellarioideae ve Viticoideae (Harley vd., 2004; Li vd., 2016; Celep ve Dirmenci, 2017; Li ve Olmstead, 2017; Selvi, 2022). Alt ailelerinin içerdiği en büyük cinsler *Salvia* L. (945 tür), *Scutellaria* L. (360 tür), *Stachys* L. (300 tür), Plectranthus L'Hér. (300 tür), Hyptis Jacq. (280 tür), *Teucrium* (250 tür), *Vitex* L. (250 tür), *Thymus* L. (220 tür) ve *Nepeta* L.'dir (200 tür) (Harley vd., 2004). Ayrıca Türkiye'de *Dorystaechas* ve

Pentapleura Hand.-Mazz olmak üzere iki monotipik cins bulunmaktadır (Celep ve Dirmenci, 2017; Dirmenci, 2012; http-1).

2.2 *Vitex* L.

Başlangıçta etli meyveleri olan ağaçlar oldukları için Verbenaceae'ye yerleştirilmiş *Vitex* Lamiaceae'ye aktarılmıştır. Lamiaceae ve Verbenaceae familyaları morfolojik olarak birbirlerine çok benzemekte olsalar da aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar özellikle sahip oldukları meyve ve ovaryum yapıları ile dikkat çekmektedir. *Vitex'*in Lamiaceae familyasındaki çoğu bitki cinsinden farklı olarak etli meyveye sahip olmasından dolayı başlangıçta, Verbenaceae familyasına yerleştirilmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak ilerleyen zamanlarda özellikle moleküler filogenetik alanında yapılan çalışmalarla birlikte iki familya arasındaki farklılıklar daha da belirgin olarak ortaya konulduğundan *Vitex* cinsinin Lamiaceae familyasında yer alması gerektiğine karar verilmiştir (Souto, 2020; Zhao, 2021).

Vitex, toplam 217 türden oluşan Verbenaceae familyasının en büyük cinslerinden biridir. En iyi bilinen türlerinden bazıları *Vitex negundo* L., *Vitex agnus- castus* L., *Vitex trifolia* L, *Vitex rotundifolia* L. f., *Vitex cymosa* Bertero ex Spreng ve *Vitex peduncularis* Wall'dır (Altunay & Taştan, 2023; Catalogue of Life, 2019). 3-5 m yüksekliğe kadar ulaşabilen odunsu, çok dallı çalı veya ağaççıklar halindedir. Yapraklar karşılıklı, 3-7 yapraklı, digitat parçalanmıştır. Çiçek durumu yoğun, sık, genellikle sapsız, bazen saplıdır. Kaliks çan şeklinde ve 5 parçalıdır. Korolla huni şeklinde, korolla tüpü genellikle kısa 5 parçalı, çoğunlukla zigomorf ve hemen hemen iki dudaklı, ön lob diğerlerine göre daha büyüktür. Stamenler serbest, korollayı aşar. Ovaryum 4 gözlüdür ve her gözde bir ovül bulunur. Stilus tepede ve küçüktür. Meyve etli drupa şeklinde ve genellikle kaliks içinde kalıcıdır. Endokarp 4 gözlü ve oldukça serttir (Towsend, 1982). Türkiye Florasında *Vitex* cinsine ait iki tür bulunmaktadır. Güncel olarak *Vitex pseudo-negundo* (Hausskn.) Hand.-Mazz, *Vitex agnus-castus* ile synonym olduğu bilinmektedir (Dirmenci, 2012; http 2).

Korollanın alt dudağı tüysüz veya tabanda seyrek tüylü, kaliksin iç yüzeyi üst kısmının 1/3'üne doğru birleşen damarlar halinde 1. *Vitex agnus-castus*

2.3 *Vitex agnus-castus* Botanik Özellikleri

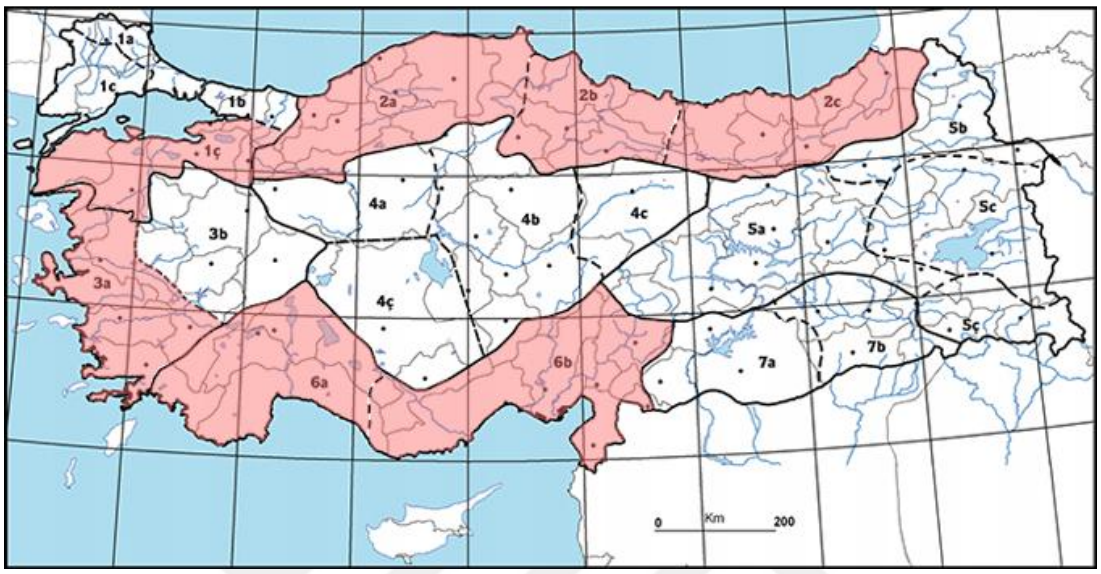
"Agnus castus" ismi Latince kökenlidir ve "castitas" (iffet) ve "agnus" (kuzu) kelimelerinden türemiştir. Bu bitki aynı zamanda iffet ağacı, iffet meyvesi veya keşiş biberi, hayıt, acı ayıt, ayıd, hayıd, beşparmak otu olarak da bilinir (Köngül, 2019 s. 139).

V. agnus-castus, ortalama 1,5-2 m boyunda büyüyebilen, yapraklarını döken büyük bir çalı veya küçük bir ağaçtır. Yaprakların çapı 7,6-10 cm'dir ve yapraklar parmak şeklinde olup 5-7 adet yaprakçık içermektedir. Üstte gri-yeşil renkte ve altta daha açık renkte aromatiktirler (Niroumand vd., 2018; Rani ve Sharma, 2013). Çiçekleri salkım halindedir, menekşeden maviye sonrasında koyu mora dönüşmektedir, kokuludur, yazdan erken sonbahara kadar çiçek açmakta ve meyveleri karabibere benzeyen dört tohum taşımaktadır (Mancho ve Edwards, 2005; Niroumand vd., 2018; Rani ve Sharma, 2013).

Tıbbi özelliklere sahip olan ve akdeniz fitocoğrafik bölgesinde yetişen *V. agnus-castus*, tropikal ve ılıman bölge (Akdeniz bölgesi, Orta Asya ve Güney Avrupa) bitkisidir (Kırmızıbekmez ve Demir, 2016; Niroumand vd., 2018; Ono vd., 2011; Pal vd., 2013). Anadolu'da oldukça yaygındır (Baytop, 1999). Türkiye'de Trakya, Batı ve Güney Anadolu'da, çoğunlukla Çanakkale (Kavak, Erenköy), Bursa, Zonguldak, Amasya (Yeşilırmak kenarları), Samsun, Giresun, Trabzon, Muğla (Bodrum, Datça), Antalya, Mersin, Adana ve Hatay yörelerinde doğal olarak yetişir (Görsel 2.1; Görsel 2.2) (Towsend, 1982; http-1ve http-2).

Görsel 2.1

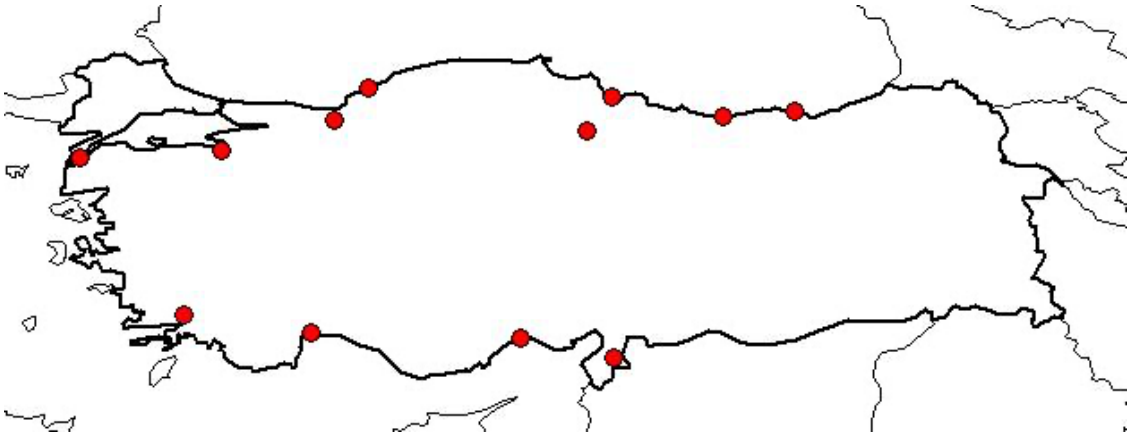
Vitex agnus-castus dağılımının olduğu bölümler: ***(1ç)*** *Güney Marmara Bölümü,* ***(2a)*** *Batı Karadeniz Bölümü,* ***(2b)*** *Orta Karadeniz Bölümü,* ***(2c)*** *Doğu Karadeniz Bölümü,* ***(3a)*** *Asıl Ege Bölümü,* ***(6a)*** *Antalya Bölümü,* ***(6b)*** *Adana Bölümü*



Kaynak: http-1

Görsel 2.2

Vitex agnus-castus dağılımının olduğu iller (Düzce, Zonguldak, Amasya, Antalya, Bursa, Çanakkale, Giresun, Hatay, İçel, Muğla, Samsun, Trabzon)



Kaynak: http-2

2.4 *Vitex agnus-castus* Kimyasal Bileşenleri

V. agnus-castus flavonoitler (izoviteksin, izoorientin, kastisin, krisoplenol, penduletin, orientin) terpenoitler, iridoit glikozitler (agnusit ve aukubin), diterpenler (labdan tipi: 6β,7β-diasetoksi-13-hidroksi-labda-8,14-dien, rotundifuran, viteksilakton, viteksilaktam A, vitetrifolin B ve C), diterpenoit alkaloitler, polifenoller, uçucu yağlar ve sabit yağlar

içerir (Antolić ve Maleś, 1997; Berlic vd., 1961; Blumenthal vd., 1998; ESCOP, 2003; Gomaa vd., 1978; Gulsoy vd., 2011; Gulsoy vd., 2015; Hadju vd. 2007; Hoberg, 1999; Hoberg vd., 1999; Li vd., 2002; Wollenweber ve Mann, 1983). Kuruüzüm-Uz vd., 2003 yılındaki çalışmalarında Türkiye'de yetişen bitkinin çiçekli gövdelerinden 6'-O–foliamentoilmussaenosidik asit (agnukastosit A), 6'-O–(6,7-dihidrofoliamentoil) mussaenosidik asit (agnukastosit B) ve 7-O–trans-p-kumar-oil-6'-O-trans-kafeoil-8-epiloganik asit (agnukastosit C) olmak üzere üç yeni iridoit izole ettiklerini bildirmişlerdir.

2.4.1 Bisiklik diterpenler

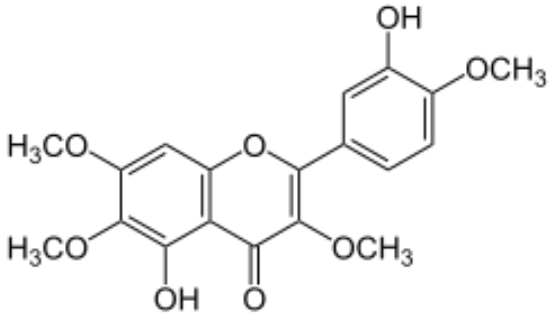
Labdan iskeleti taşıyan diterpenler (rotundifuran, viteksilabdin, viteksilakton, viteksilaktam) ve klerodan iskeleti taşıyan diterpenler (kleroda-x, 14-dien-13-ol, kleroda-x,y, 14-trien-13-ol) içerir. Bu bitkinin terapötik etkileri özellikle dopaminerjik aktiviteye sahip diterpenoitleri ile ilişkilidir (Berger vd., 2000; Hoberg vd., 1999).

2.4.2 Flavonoitler

Kastisin (3′,5-dihidroksi-3,4′,6,7-tetrametoksiflavon) ($C_{19}H_{18}O_8$; M_A: 374,4) (Şekil 2.1) (http-2) ana flavanoittir. Polimetilflavon olarak, B halkasında bir ortokatekol kısmı, bir C-2-C-3 çift bağı, C-3′ ve C-5'te iki hidroksil grubu ve C-3, C-4′, C-6 ve C-7'de dört metoksil grubu bulunan üç halkaya (A, B ve C) sahiptir. Diğer lipofilik flavonoitler olarak penduletin ve krizofenol-D; hidrofilik yapıda flavonoitler olarak O veya C-glikozit tipinde orientin, izoviteksin, homoorientin, luteolin- 7- glukozit bulunur (Belic vd., 1961; Chen vd., 2011, Cossuta, vd., 2008; Gomaa vd., 1978; Jarry vd., 2003; Mesaik vd., 2009). Hirobe vd.,'nın 1997'deki çalışmalarında *V.agnus-castus* köklerinden izole ettikleri dört sitotoksik flavonoit bileşiği luteolin 6-C-(4-metil-6-O-trans-kafeoilglikozit), luteolin-6-C-(2-O-trans-kafeoilglikozit), luteolin 6-C-(2-O-trans-kafeoilglikozit), luteolin 7-O- (6-p- benzoilglikozit)'tir.

Şekil 2.1

Kastisin kimyasal yapısı



Kaynak: http-3

2.4.3 İridoit glikozitleri

V. agnus-castus % 0.6 agnusit (p-hidroksibenzoilaukubin) ve % 0.3 aukubin içermektedir (Görler vd., 1985; Rimpler, 1972). Kuruüzüm ve ark. 2003 yılındaki çalışmalarında çiçekli dalların metanollü ekstresinden 6'-O-foliamentoilmussaenozidik asit (agnukastozit A), 6'-O-(6,7-dihidrofoliamentoilmussaenozidik asit (agnukastozit B) ve 7-O-trans-p-kumaroil-6'-O-trans-kafeoil-8-epiloganik asit (agnukastozit C) iridoit glikozitlerini izole etmişlerdir.

2.4.4 Polifenoller

V. agnus-castus, %0.24-1.6 tanen içermektedir. Antolic ve Males, 1997'deki çalışmalarında bitki parçaları arasında toplam polifenol içeriğinin çeşitliliğini göstermişlerdir (yapraklar %7.36-13.20, çiçekler %9.00-10.64 ve meyveler %6.92-13.24). En yüksek tanen içeriğini yapraklarda bulmuşlar (%0.68-3.00), ancak çiçekler ve meyvelerde de benzer sonuçlar elde etmişlerdir (%0.24-2.00, sırasıyla %0.24-1.60). Total polifenol oranı ise %6.92-13.24 olarak belirlemişlerdir.

2.4.5 Uçucu yağlar

Uçucu yağlar; bitkisel droglardan genellikle su veya buhar distilasyonuyla elde edilen, oda sıcaklığında sıvı sekonder metabolitlerdir (Baytop, 1999). Genellikle terpenik hidrokarbonlar ve oksijenli hidrokarbon türevlerinden meydana gelmişlerdir. $(C_5H_8)_n$ formülüne uyarlar. İzopren molekülünün kondensasyonuyla meydana gelirler. *V. agnus-castus*, % 0.8-1.8 oranında uçucu yağ içermektedir ve yapılan çalışmalarda ana bileşenleri 1,8-sineol, sabinen, α-pinen, β-fellandren, α-terpinil asetat, trans-β-farnesen ve bisiklogermakren olarak gösterilmiştir (Marongiu, 2010, Sørensen, ve Katsiotis, 1999,

Zoghbi vd., 1999). Novak vd., 2005 yılındaki çalışmalarında hayıt uçucu yağının α-pinen ve α-terpinilasetat olarak iki farklı kemotipi olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, yapılan çeşitli çalışmalar hayıt uçucu yağının monoterpenler (α–pinen, sabinen, β-fellandren, 4-terpineol) ve seskiterpenlerden (β-karyofillen, allo-aromadendren, germakren B, spatulenol, τ-kadinol) içerdiğini belirtmiştir (Sørensen, ve Katsiotis, 1999; Zoghbi vd., 1999; Zwaving ve Bos, 1996). Sarikurkcu vd. 2009'te yaptıkları çalışmada Manisa'dan toplanan *V. agnus-castus* meyvelerinin uçucu yağ bileşiminde 1,8 sineol (%24,98), sabinen (%13,45) ve α-pinen (%10,6) maddelerinin varlığını göstermişlerdir (Sarikurkcu vd., 2009). Gulsoy, 2011 ve Gulsoy Toplan vd. 2015'teki çalışmalarında hayıt meyve uçucu yağındaki ana bileşenleri sabinen, 1,8-sineol, β-karyofilen, (Z)-β-farnesen ve α-pinen olarak bulmuşlardır ve bisiklogermakreni, analiz edilen tüm numunelerde ana bileşen olarak karakterize etmişlerdir (Gulsoy, 2011; Gulsoy vd., 2015). Aynı bitkiden elde edilen uçucu yağlar bitkinin yetişme koşullarına veya elde edildiği distilasyon tekniklerine göre bazı farklılıklar gösterebilmektedir (Baytop, 1999). Ekundayo vd., 1990 yılındaki çalışmalarında (%94,8) otuz bir bileşen tanımlamışlar; bunların başlıcaları 1,8-sineol (%50,9), sabinen (%10,8), α-pinen (%9,0), terpinen-4-ol (%4,8), p-simen (%4,2), limonen (%2,5) ve α-terpineol (%2,3) olarak bildirilmiştir.

2.4.6 Yağ asitleri

Yağ asitleri; oleik, stearik, palmitik, α-linolenik ve linoleik asitler içermektedir (ESCOP, 2003)

2.5. *Vitex agnus-castus* Etnobotanik ve Tıbbi Kullanımı

V. agnus-castus (VAC)'un meyveleri Türkiye'de yüzyıllardır halk ilacı olarak özellikle idrar söktürücü, sindirimi kolaylaştırıcı, mantar önleyici rahatsızlıklar ve ayrıca erken doğum ve mide ağrısına karşı kullanılmıştır (Baytop, 1999). Ayrıca halk arasında esans, haşerelere karşı, sepet, kelter ve sapan yapımında, besin amaçlı kullanımı da bulunmaktadır (Kolancı, 2017). Tıbbi kısmı meyveleridir (Girman vd., 2003; Mari vd., 2015) ve kurutulmuş yaprakları da tıbbi aromatik bitkiler arasında yer almaktır (Mancho ve Edwards, 2005; Gruenwald vd., 2007). Meyveleri, hormon benzeri etkisi nedeniyle Avrupa'da premenstrüel sendrom (PMS) ve menopozun semptomatik tedavisinde, emzirme bozukluklarının giderilmesinde bitkisel ilaç olarak kullanılır (Choudhary vd., 2009; Hajdu vd., 2007; Kuruüzüm-Uz vd., 2003; Li vd., 2002; Liu vd., 2004; Stojković

vd., 2011). VAC, Alman Komisyonu E tarafından fitofarmasötik ürünlerde adet ritmi anomalisi, mastodini ve adet öncesi rahatsızlıklarda kullanılmak üzere onaylanmıştır (Daniele vd., 2005; Lauritzen vd., 1997). Komisyon E Monograflarında, ESCOP Monograflarında ve WHO Monograflarında yer almaktadır. Ayrıca Amerikan Tibbi Bitki Farmakopesinde, 2007 Avrupa Farmakopesinde, İsviçre Farmakopesinde ve Hint Farmakopesinde kayıtlıdır. Dahilen günlük 20-40 mg kurutulmuş meyve, ezilen meyvelerden hazırlanan standardize edilmiş sulu alkollü ekstre (1,6-4,2 mg, kuru ekstre) içeren preparatlar kullanılır. Preparatların günde 1 doz, sabahları kahvaltıdan önce alınması gerekmektedir (Berger vd., 2000; Blumenthal vd., 1998).

Gerhard Madaus (1890-1942), çalışmalarıyla bitkinin en çok meyvelerinin jinekolojik hastalıklarda etkili olduğunu ispatlamış, kurutulmuş meyvelerden hazırladığı ekstreyle geliştirdiği ilacın patentini almış ve ilaç 'Agnolyt' adıyla tescillenmiştir. Agnolyt'in hem kapsül hem de çözelti şeklinde formları bulunmaktadır. Agnolyt kapsül etken madde olarak *V. agnus-castus*'un meyvelerinin kurutulmuş ekstresini (3,5-4,2 mg) içerir. Agnolyt'in sıvı dozaj formu bitkinin meyvelerinden hazırlanmıştır ve kullanımı kapsülün kullanımıyla aynıdır. Preparatın 100 gramlık çözeltisi *V. agnus-castus*'un meyvelerinden hazırlanan tentürün (1:5) 9 gramını içermektedir. Türkiye'de ve diğer bir çok ülkede Sağlık Bakanlığından onaylı bir diğer tablet Agnucaston, *V. agnus-castus*'un 3.2-4.8 mg doğal kuru ekstresini (40 mg droga karşılık) içerir (Gülsoy, 2011).

2.6 *Vitex agnus-castus* Biyolojik Aktiviteleri

V. agnus-castus'un başlıca aktivitesi, hormonal etkilerine dayanan premenstrüel sendrom, adet bozuklukları ve menopoz sorunlarının tedavisi ile ilgilidir. Diğer aktiviteleri arasında antimutajenik, antimikrobiyal, antioksidan, kemopreventif, sitotoksik, immünomodülatör, antiepileptik, antiinflamatuar, antinosiseptif, antifungal, böcek kovucu, larvisidal, kırık iyileşmesi, osteopenik, opioiderjik, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı ve oksidatif stresi önleme aktiviteler yer almaktadır. (Chan vd., 2018; Eryigit, 2015; Heskes vd., 2018; Kavaz vd., 2022; Niroumand vd. 2018; Zahid vd., 2016).

2.6.1 Hormonal etki

Meyvelerin metanol ekstresi, Ishikawa endometrial kanser hücre hattında ER-α ve ER-β'ye bağlanma ve uyarılmada önemli etkiler göstermiştir ve bu aktivitelerden sorumlu ana bileşen linoleik asit olduğu tespit edilmiştir (Liu, 2001; Liu vd, 2004). Aynı sonuç, *V. agnus-castus* meyvelerinin %68 etanol ekstresinden izole edilen apigenin, vitexin ve

penduletin gibi flavonoitlerin ER-α veya ER-β'ye bağlanma üzerindeki etkisini araştırmak için yürütülen bir ligand bağlama deneyinde de elde edilmiştir. Apigeninin bitkideki en aktif ER-β seçici fitoöstrojen olduğu bulunmuştur (Jarry vd., 2003). Meyvelerin etanolik ekstresinin östrojenik aktivitesinin normal ve yumurtalıkları alınmış dişi sıçanlarda araştırıldığı bir çalışmada yumurtalıkları alınmış sıçanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, rahim ağırlığında, plazma progesteronunda ve toplam östrojen seviyelerinde belirgin artış ve luteinize edici ve plazma prolaktin hormonlarında azalma tespit edilmiştir (Ibrahim vd., 2008). 24 yumurtalığı alınmış dişi sıçanla yapılan bir *in vivo* çalışmada, *V. agnus-castus* ve estradiol grupları yumurtalığı alınmış sıçanlarda öğrenme ve hafızayı kontrol grubuna göre artırdığı bulunmuştur (Allahtavakoli vd., 2015). Meyveden elde edilen ekstrelerin *in vitro* ve *in vivo* dopamin agonisti olarak etki ettiği gösterilmiştir (Roemheld-Hamm, 2005). Hayıt meyve etanol ekstresinin prolaktin salgılama engelleyici aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Sliutz vd., 1993). İki kontrolsüz klinik çalışma ve bir gözlemsel rapor, meyve ekstrelerinin hormon dengesizliğinden kaynaklanan akne üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Aknesi olan 118 kişi meyve özütü ile tedavi edilmiş (4-6 hafta boyunca günde iki kez 20 damla, ardından 1-2 yıl boyunca günde iki kez 15 damla) ve sonuçlar akne için geleneksel tedavilerle karşılaştırılmış, meyve ekstresi ile tedavi edilen hastalarda 6 hafta sonra daha hızlı bir iyileşme oranı ve 3 aylık tedaviden sonra meyve ekstresi ile tedavi edilen hastaların %70'inin tamamen iyileştiği bildirilmiştir (Amann, 1975; Bleier, 1959).

2.6.2 Antiinflamatuar aktivite-Lipoksijenaz inhibitör potansiyeli

Lipoksijenazlar, hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunan dioksijenaz ailesini oluşturur. Memeli hücrelerinde, hidroksieikosatetraenoik asitler (HETE'ler), lökotrienler, lipoksinler ve hepoksilinler (Land, 1985) gibi çeşitli biyodüzenleyici bileşiklerin biyosentezini içeren anahtar enzimlerdir. Lipoksijenaz ürünleri, bronşiyal astım, inflamasyon (Steinhilber, 1999), otoimmün hastalıklar ve tümör anjiyogenezisi (Nie ve Honn, 2002) gibi çeşitli bozukluklarda önemli bir rol oynar. Bu nedenle lipoksijenazlar, ilaç tasarımı için potansiyel hedeflerdir (Choudhary vd., 2009). *V. agnus-castus* bileşenlerinin antiinflamatuar etkinlikleri ile ilgili literatürde bazı çalışmalar bulunmaktadır (Boujbiha, vd., 2023; Choudhary vd., 2009; Lee vd., 2015). *V. agnus-castus*'un toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinden izole edilen birkaç sekonder

metabolitin lipoksijenaz inhibisyonunun analiz edildiği bir deneyde artemetin ve kastisin güçlü lipoksijenaz inhibitör potansiyeli göstermiştir (Choudhary vd., 2009).

2.6.3 Antioksidan aktivite

V. agnus-castus meyvesinin hekzan, aseton ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktivite gösterdiği ve aktif bileşiğinin kastisin olduğu Ono ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı çalışmada bildirilmiştir (Ono vd. 2011). Meyvelerin ham ekstresi ve bütanol fraksiyonu, sıçanlarda yapılan bir *in vivo* denemede alkolsüz yağlı karaciğer hastalığını ve oksidatif stresi önlediği, ekstreyle tedavi edilen hayvanlarda bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yeniden başladığını ve mitokondriyal hidrojen peroksit üretiminin azaldığını göstermiştir (Moreno vd., 2015). Meyvelerin etil asetat ekstresinden elde edilen kastisin'in *in vitro* 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)-serbest radikal deneyinde lipit peroksidasyon inhibisyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir (Hadju vd., 2007). Meyve uçucu yağı, meyvenin su, hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol ekstresi; DPPH, beta-karoten, linoleik asit ve indirgeyici güç deneylerinde antioksidan aktivite göstermiştir. Su özütü, belirtilen diğer özütlerle karşılaştırıldığında en yüksek aktivite potansiyeline sahip bulunmuştur. *V. agnus-castus* yapraklarının metanol ekstresi; ferrik şelat oluşturma, hidrojen peroksit temizleme aktivitesi ve bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi dahil olmak üzere farklı antioksidan testlerinde yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. H_2O_2 üzerindeki süpürücü aktivitesini 0,5 mg/mL konsantrasyonunda (%93,5±0,8) > kersetin (%89,4±0,5) > rutin (86,1±0,7) olarak bulmuşlardır (Maltaş vd., 2010). Bitkinin bu etkileri flavonoitleri ile ilişkilendirilmiştir (Sarikurkcu vd., 2009).

2.6.4 Antimikrobiyal aktivite

Hayıt uçucu yağının *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı orta düzeyde antibakteriyel aktivite gösterdiği bulunmuştur (Ekundayo vd., 1990). Tohum uçucu yağlarının *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkilerinin disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada etkili bulunmuştur (Ghannadi vd., 2012). Disk difüzyon yöntemi kullanılarak meyve uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada ise incelenen mikroorganizmalarda etkili, ancak ampisilin ve ofloksasin ile karşılaştırıldığında daha az etkili ve en duyarlı *Enterococcus faecalis* olarak bildirilmiştir (Eryiğit, 2015).

2.6.5 Antifungal aktivite

Vitex agnus-castus yapraklarından, meyvelerinden ve çiçeklerinden elde edilen uçucu yağların *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* ve *Epidermophyton floccosum*'a karşı antifungal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada yapraktan elde edilen uçucu yağların en yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Marongiu vd., 2010). *V. agnus-castus* yaprakları metanol özütünün *Candida albicans'*a karşı belirgin bir antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Maltaş vd., 2010). Üç farklı hayıt yaprak ekstresinin (etanol, metanol ve su) üç *Candida* türüne (*Candida tropicalis*, *Candida albicans* ve *Candida ciferrii*) karşı antikandidal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada tüm hayıt ekstresinin (etanol, metanol ve su) test edilen *Candida* türlerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Ababutain & Alghamdi, 2021).

2.6.6 Repellent aktivite

V. agnus-castus repellan etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada bitkinin karbondioksit ekstresi, özellikle *Ixodes ricinus* ve *Rhipicephalus sanguineus* kenelerine karşı, ayrıca sivrisinek, ısıran sinekler ve pirelerde en az 6 saat boyunca böcek kovucu aktiviteye sahip bulunmuştur (Mehlhorn vd., 2005). *V. agnus-castus* tohumlarının ekstresi ve paramentan-3,8-diol içeren bir önleyici sprey olan Licatack®'in çocukların saçındaki bitler üzerinde kovucu olduğu belirlenmiştir (Semmler vd., 2010). Yaprakların uçucu yağı, larvisital aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Tandon vd., 2008). Yaprakların etanolik ekstresi, *Musca domestica*'nın üçüncü aşama larvalarına karşı toksisite göstermiştir (Selem & El-Sheikh, 2015).

2.6.7 Antineoplastik-antitümör aktivite

Vitex türlerinin antineoplastik potansiyeli ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Duymuş, 2014; Nigam vd., 2018). *V. agnus-castus* olgun meyve ekstresinin sitotoksik etkisi V-79 hücreleri (Çin hamster akciğer karsinomu hücreleri) hattında bildirilmiştir (Hirobe vd., 1997). Kurutulmuş *V. agnus-castus* olgun meyvelerinden hazırlanan etanol ekstresinin yumurtalık kanserine (SKOV-3), insan rahim ağzı kanalı fibroblastına (HCF), rahim ağzı karsinomuna (SKG- 3a), mide yüzük taşı karsinomuna (KATO-III), meme karsinomuna (MCF-7), akciğer küçük hücreli karsinomuna (Lu- 134-A-H) ve kolon karsinomuna (COLO 201) karşı doza bağlı (10-70 µg/mL) sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu durum DNA merdivenlemesi ve kaspaz aktivasyonu ile kanıtlanmıştır (Ohyama vd.,

2003). *V. agnus-castus* tohumlarının (300-1) ham ekstrelerinin de konsantrasyona bağlı apoptotik hücre morfolojisi ve DNA hasarı ile belirginleşen güçlü antioksidan, sitotoksik ve apoptotik aktiviteye sahip olduğu analiz edilmiştir (Aslantürk & Çelik, 2013). *Vitex* meyvelerinin ekstresinin herhangi bir toksisite belirtisi olmadan apoptozis indüksiyonuyla prostat kanserini (IC_{50}=6,90 µg/mL, IC_{90}=14,40 µg/mL) iyileştirebileceği ve ayrıca iyi huylu prostat hiperplazisinde önleyici bir ajan olarak kullanıldığında prostat kanserine yönelik göreceli riski azaltabileceği öne sürülmüştür (Ibrahim vd., 2017). *V. agnus-castus*'un bir flavonoiti olan Vitexin 6'nın, *in vitro* 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür deneyinde 14 farklı tümör hücre hattına karşı sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir (Zhou vd., 2013).

Pankreas kanseri, kanserden kaynaklı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir (Ono vd., 2023; Siegel vd., 2020). Tüm evreler için 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık %10 ve cerrahi olarak çıkarılan hastalar için %15-20'dir (Cress vd., 2006; Latenstein vd., 2020; Kardosh, 2018; Mizrahi vd., 2020). Pankreas kanseri genellikle agresif bir malignitedir. Belirgin semptomlar göstermediğinden, birçok hasta tanı sırasında rezeke edilemeyen hastalık veya uzak metastazlarla gelir. Rezeke edilemeyen hastalığı olan hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %5'ten azdır. Dahası, tespit edilemeyen uzak metastazlar cerrahi rezeksiyona giren hastaların düşük 5 yıllık sağ kalım oranına önemli katkıda bulunur (Chadha vd., 2016).

Hayıt bileşiği olan kastisin ile ilgili araştırmalarda kastisinin çeşitli kanser hücre hatlarının büyümesini engellediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Chan vd., 2018). Kastisinin G2/M fazında pankreas kanseri hücre döngüsünün durdurulması üzerinde büyümeyi engelleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Ding vd. 2012).

2.6.8 Antimutajenik aktivite

Ayrıca yaprak uçucu yağı ve tohum etanol ekstresi, mikrozom mutajenite testlerinde *Salmonella typhimurium* üzerinde antimutajenik etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Saraca vd., 2015).

2.6.9 Antiviral aktivite

Vitex agnus castus ile antiviral çalışmalar sınırlıdır. CVB3 (Coxsackievirus B3) ile enfekte edilmiş HEp-2 (human laryncarcinoma cell line) hücrelerinin, *V. agnus-castus* meyvelerinden elde edilen değişen sitotoksik olmayan metanol ekstresi

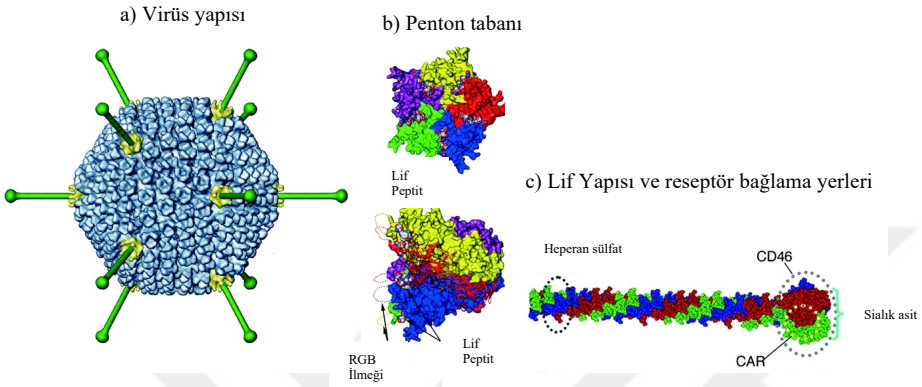
konsantrasyonlarıyla tedavi edildiği bir çalışma literatürde yer almaktadır (Mejri vd., 2024). *Vitex* türünün, özellikle *V. polygama* Cham.'ın yaprak ve meyvelerinden elde edilen etil asetat ekstrelerinin antiviral etkilerini belgeleyen bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma, yapraklardan elde edilen etil asetat ekstresinin, meyvelerden elde edilen ekstreye kıyasla *Herpes simpleks* virüsü Tip 1'e (HSV-1) karşı üstün antiviral aktivite gösterdiğini bulmuştur (Goncalves, 2001).

İnfluenza enfeksiyonunda akciğer gibi çeşitli dokularda reaktif oksijen türleri (ROS) ve lipit peroksitler üretilir. Daidzeinin (izoflavon) ROS ve lipit peroksit oluşumlarını azaltmak için antioksidan kapasitesi ile antiviral aktivite gösterdiği ve daidzein tarafından indüklenen 5-lipoksijenaz ürünleri aracılığıyla sinyal iletimi yoluyla influenza virüsü replikasyonunu düzenleyerek gerçekleştiği bildirilmiştir (Horio vd., 2020). Ayrıca, daidzeinin yapısal modifikasyonlarına dayalı sentezlenen yeni daidzein analog bileşiklerinin, *in vitro* H1N1 TR influenza virüslerine karşı seçici antiviral ajan olduğu gösterilmiştir (Chung vd., 2015). Bağışıklık tepkilerinin ve antioksidan aktivitenin düzenlenmesindeki rolleri nedeniyle, daidzein COVID-19 ve ilgili bağışıklık işlev bozuklukları gibi ortaya çıkan hastalıklara karşı vücut bağışıklığını artırmak için uygulanabileceği literatürde belirtilmiştir (Khalil & Tazeddinova, 2020).

Adenovirüs (Ad), zarfsız, çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Viral DNA ve ilişkili çekirdek proteinleri, büyük ölçüde ana kapsid proteini heksondan oluşan 20 üçgen yüze sahip bir ikosahedral kapsid ile kaplanmıştır (Şekil 2.2a) (Rux & Burnett, 2004). 12 beş katlı kapsid köşesinin her birinden uzunlamasına bir lif çıkıntı yapar. Lif, proksimal ucunda pentamerik bir yapıya, penton tabanına bağlıdır; distal ucunda lif küresel bir "topuz" alanı oluşturur (Şekil 2.2b). Genel olarak, lif topuzu hücresel reseptörler için ana bağlanma yeri olarak işlev görürken, penton tabanı virüsün hücreye girmesi için gereken ikincil etkileşimlerde yer alır (Şekil 2.2c). Heksonun (Roberts vd., 1986), lifin (Van Raaij vd., 1999, Van Raaij, 1999) ve penton bazının (Zubieta vd., 2005) ayrıntılı yapıları kristalografik yöntemlerle belirlenmiştir; genel virion yapısı (Stewart vd., 1993), biraz daha düşük çözünürlükte, kriyoelektron mikroskobu ve görüntü yeniden yapılandırmasıyla belirlenmiştir (Zhang & Bergelson, 2005).

Şekil 2.2

Adenovirüs yapısı: *a) 17-Å çözünürlükte virion yapısı. Kapsidin 20 üçgen yüzünün her biri hekson trimerinin (mavi) 12 kopyasından oluşur. Her beş katlı tepe noktasında, pentamerik penton tabanından (sarı) bir lif (yeşil) çıkar. b) Penton tabanı. Yüzeyden çıkıntı yapan esnek RGD halkalarını gösteren yan ve üst görünümler. Lif için ekleme yerleri de gösterilmiştir. c) Lif yapısı ve reseptör bağlanma yerleri. Lif, monomerleri kırmızı, mavi ve yeşil renkle gösterilen bir trimerdir; şaft sıkıca sarılmış üçlü bir spiraldir; topuz daha şişkin bir yoncadır.*



Kaynak: Zhang & Bergelson, 2005

Virüsün-konak hücre etkileşimi fiberleri aracılığıyla; hücrelere bağlanması yüzey reseptörleri ile olur. Serotipine göre değişmekle birlikte hücrelere tutunmak için CD46, Coxackive ve adenovirüs reseptörü (CAR), sialik asit, laktoferrin, koagülasyon faktör IX, dipalmitoil fosfotidilkolin kullanılırlar (Johansson vd., 2007). A, C, E, F türleri CAR ile etkileşir. Çoğu B türünün CD46 reseptörüne, serotip 3 ve 7'nin CD80 veya CD86 reseptörüne bağlandığı bulunmuştur (Marttila vd., 2005). Keratokonjonktivit nedeni serotip 8, 19 ve 37 gibi D türü üyeleri sialik asit reseptörlerine bağlanır. Kapsiddeki penton bazıyla hücre yüzeyindeki integrinler hücreye tutunma aracılarıdır. Yüzeye tutunma sonrası virüs DNA'sı hücreye klatrin kaplı veziküllerle alınır ve mikrotübül transport mekanizmasıyla nükleusa taşınır, hücrenin transkripsiyon mekanizmasını kullanır, replike olur (Aydamırov vd., 2020). İnsan adenovirüslerinin yaklaşık yarısının hastalık yapma potansiyeli bilinmektedir. Dünya genelinde yıl boyunca enfeksiyonlara yol açar. İmmünyetmezliği olan kişilerde fırsatçı ve daha dirençli enfeksiyonlar görülebilmektedir. Çocukluk çağında daha sık olan enfeksiyonların kendini sınırladığı ve serotipe özgü immüniteye neden olduğu bilinmektedir. Enfeksiyon spektrumu geniş olmakla birlikte farklı serotipler farklı doku afiniteleri gösterir. Virüsün epitel hücrelerine ve lenfoid dokulara eğilimi nedeniyle göz, solunum sistemi, gastrointestinal ve genitoüriner sistem enfeksiyonları sıktır (Aydamırov vd., 2020).

3 GEREÇLER

Deneylerde kullanılan cihazlar ve gereçler Tablo 3.1'de, kimyasallar ve sarflar Tablo 3.2'de verildiği gibidir.

Tablo 3.1

Deneylerde kullanılan cihazlar ve gereçler

Gereçler	Kullanım amacı
Clevenger Apareyi, İldam	Uçucu yağ eldesi
Gaz kromatografisi, Shimadzu (GK) ve Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi (GK/KS), Shimadzu 2000	Uçucu yağ analizi
Shimadzu LCMS-IT-TOF (Kyoto, Japonya) sistemi	Kimyasal içerik tayini
Liyofilizatör	Liyofilizasyon
McFarland densitometre, DEN-1B, Biosan	
Akış sitometri cihazı, Beckman Coulter CytoFLEX, Amerika Birleşik Devletleri	Apoptoz belirleme
Akış sitometrisi tüpleri, Corning Science, Amerika Birleşik Devletleri	Apoptoz belirleme
Dondurucu (-80°C), Nuaire, Amerika Birleşik Devletleri	Enzim-hücre saklama
Hassas elektronik terazi, Precisa, İsviçre	Örnek tartımı
Analitik terazi (Radwag AS 310.R2)	Örnek tartımı
Inverted mikroskop, Leica, Almanya	Örnek inceleme
Manyetik tabanlı ısıtıcı karıştırıcı, Heidolph, MR 3003, Almanya	Örnek ısıtma-karıştırma
Otoklav, ALP, Japonya	Sterilizasyon
Otoklav, Hirayama HV50L	Sterilizasyon
Pastör fırını (Ecocell)	Kurutma
Mikroplaka okuma cihazı (ELISA Reader), BioTek, Amerika Birleşik Devletleri	Mikroplak okuma
Santrifüj, Heal Force, Çin	Santrifüjleme
Steril CO_2 inkübatörü Panasonic, Japonya	İnkübasyon
Steril Kabin, Heal Force	Sterilizasyon
Telstar Bio II Advance Steril Biyolojik Güvenlik Kabini, Telstar, İspanya	Antimikrobiyal deneyler gerçekleştirme
Ultraviyole lambası, Camag, Cabinet, İsviçre	Antimikrobiyal deneyler gerçekleştirme
Bioprep-24 Homogenizer	Homojenizasyon
Vorteks, Jeio Tech, Kore	Karıştırma-Homojenizasyon
Sıvı azot tankı, Taylor Wharton, Amerika Birleşik Devletleri	Örnek saklama
Otomatik mikropipetler (10, 200, 1000 µl), Eppendorf, Germany	İçerik trasfer

Tablo 3.1 (Devam)

Deneylerde kullanılan cihazlar ve gereçler

Gereçler	Kullanım amacı
Pipet gun, DLab Levo Plus, Çin	**İçerik trasfer**
Pipetleme rezervuarı, MP Biomedicals, Fransa	İçerik trasfer
Vial ve kapakları N9 - 1,5 mL - 11,6 x 32 mm	Uçucu yağ eldesi
Balon, İldam	Ekstraksiyon
Mezür, İldam	Ekstraksiyon
Beher 250 mL, İldam	Ekstraksiyon
Huni, İldam	Ekstraksiyon
Buchi Rotavopor, İldam	Çözücü uzaklaştırma
Buharlaşma balonu, İldam	Çözücü uzaklaştırma
İTK silikajel GF 254	Kromotografi
İTK Tankı	Kromotografi
Kolon	Kromotografi
Flakonlar	Kromotografi
Cam pastör pipeti 230 mm	Uçucu yağ eldesi
Bulanıklık ölçer (Biosan)	Bulanıklık ölçme
6 ve 96 kuyucuklu düz dipli hücre kültürü plakaları, Nest, Çin	Hücre kültür
Eppendorf Research Plus Pipeter	Hücre kültür
10, 200, 1000 µL'lik mikro pipet uçları, Axygen	Hücre kültür
15 ve 50 mL hacimli falkon tüpleri, Isolab	Hücre kültür
2 mL hacimli mikrosantrifüj tüpleri, Nest, Çin	Hücre kültür
25 ve 75 cm^2'lik steril polisteren filtre kapaklı hücre kültürü flaskları, Sarstedt, Almanya	Hücre kültür

Tablo 3.2

Deneylerde kullanılan kimyasallar ve sarflar

Kimyasal madde ve sarflar	Kullanım amacı
Silikajel GF 254 plak	İTK
2,2′-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonikasit) diamonyum, Sigma-Aldrich	LOX deneyi
Lipoksijenaz (Lipoxidase from Glycine max (soybean), Fluka-BioChemika	LOX deneyi
Metanol	Ekstraksiyon
Mueller Hilton Agar, Merck	Besi yeri hazırlama
Mueller Hilton Broth, Merck	Besi yeri hazırlama
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), yüksek glikoz	Hücre besi yeri
Tripsin-EDTA çözeltisi**,** Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre yüzetinden ayırma
Resazurin sodyum tuzu	Hücre boyama
Nordihidroguyaretik asit (NDGA)	LOX inhibitör
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	LOX Tampon
Tiazolil mavi tetrazolium bromür tuzu %98, Alfa Aesar, Almanya	MTT hücre boyama
Dimetil sülfoksit (DMSO), Carlo Erba Reagents, İtalya	Örnek seyreltme
Etil alkol, Deva, İstanbul	Ekstraksiyon, çözücü
Hekzan, Merck	Kromotografi/Mobil faz
Metanol, Merck	Kromotografi/Mobil faz
Etil asetat, Merck	Çözücü/Mobil faz
Aseton, Merck	Çözücü/Mobil faz
Kloroform, Merck	Ekstraksiyon/Çözücü/Mobil faz
Formik asit, Merck	UV Görüntüleme
Formaldehit, Merck	Çözücü/Mobil faz
NP-PEG (naturalproducts-polyethylenglycol reagent)	UV Görüntüleme
Annexin V-FITC/PI Apoptoz Tespit Kiti 1, BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri	Apoptoz belirleme
FITC Active Caspase-3 Tayin Kiti, BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri	Apoptoz belirleme
Mitoscreen (JC-1) Mitokondriyal Membran Potansitali Tespit Kiti, BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri	Apoptoz belirleme
Human MCP/CD46 (Membran Cofactor Protein) ELISA Kit, Reed Biotech	CD46 miktar belirleme

4 MATERYAL-METOT

4.1 Materyal

4.1.1 Mikrobiyal suşlar

PANC-1 CRL-1469 ™, hTERT-HPNE CRL-4023 ™, *Escherichia coli* NRRL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378, *Serratia marcescens* NRRL B-2544

4.1.2 Bitkinin temini ve teşhisi

V. agnus-castus T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden gerekli izinlerin alınması sonrasında iki farklı vejetasyon döneminde, üç farklı lokaliteden ve kuru ağırlıkları 300-400 g'a denk gelecek miktarda toprak üstü kısımları olarak toplanmıştır (Tablo 4.1) (Görsel 4.1a-c; Görsel 4.2a-c; Görsel 4.3a-c).

Tablo 4.1

Bitki temini

Bitki kodu	Lokalite	Vejetasyon	Toplanma Tarihi	ESSE
1Ms	Muğla/Köyceğiz-Karabörtlen İkizkuyu sokak	Çiçeklenme dönemi	27.06.2023	15906
1M	Muğla/Köyceğiz-Karabörtlen İkizkuyu sokak	Meyveli dönem	27.08.2023	15851
2Ms	Muğla/Köyceğiz-Döğüşbelen mevkii-D400 karayolu	Çiçeklenme dönemi	27.06.2023	15907
2M	Muğla/Köyceğiz-Döğüşbelen mevkii-D400 karayolu	Meyveli dönem	27.08.2023	15848
3Ms	Antalya/Manavgat-Hacılar köyü-köy yolu	Çiçeklenme dönemi	01.07.2023	15905
3M	Antalya/Manavgat-Hacılar köyü-köy yolu	Meyveli dönem	28.08.2023	15917

Görsel 4.1

Vitex agnus-castus Muğla/Köyceğiz/Karabörtlen-İkizkuyu Sokak lokalitesinden ***a)*** *çiçeklenme döneminde toplanan örnek genel görünüş;* ***b)*** *çiçeklenme döneminde toplanan örnek yakın görünüş* ***c)*** *meyveli dönemde toplanan örnek genel görünüş*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 4.2

Vitex agnus-castus Muğla/Köyceğiz/D400 Karayolu üzeri lokalitesinden ***a)*** *çiçeklenme döneminde toplanan örnek genel görünüş;* ***b)*** *çiçeklenme döneminde toplanan örnek yakın görünüş* ***c)*** *meyveli dönemde toplanan örnek genel görünüş*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 4.3

a) *Vitex agnus-castus Antalya-Hacılar köyü köy yolu lokalitesinden çiçeklenme döneminde toplanan örnek genel görünüş;* ***b)*** *yakın görünüş* ***c)*** *meyve*

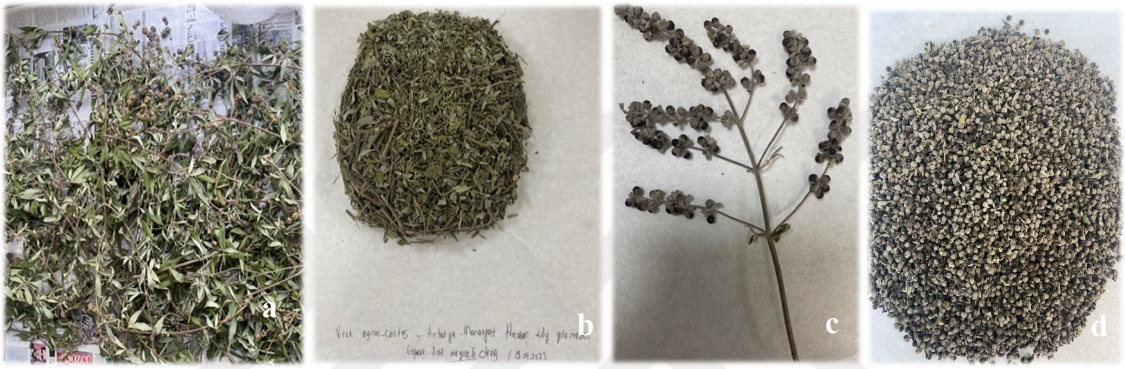


Fotoğraf: T. Tuncel

Bitkiler gölgede kurutulmuştur (Görsel 4.4a-d). Bitkilerin teşhisi, Türkiye Florasına göre (Towsend, 1982) Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik ABD'dan Dr. Nagehan Saltan ile gerçekleştirilmiştir ve *Vitex agnus-castus* L. (Hayıt) olarak teşhis edilmiştir. Herbaryum örneği hazırlanıp ESSE numaraları verilerek Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik ABD Herbaryumuna eklenmiştir (Görsel 4.5a-c).

Görsel 4.4

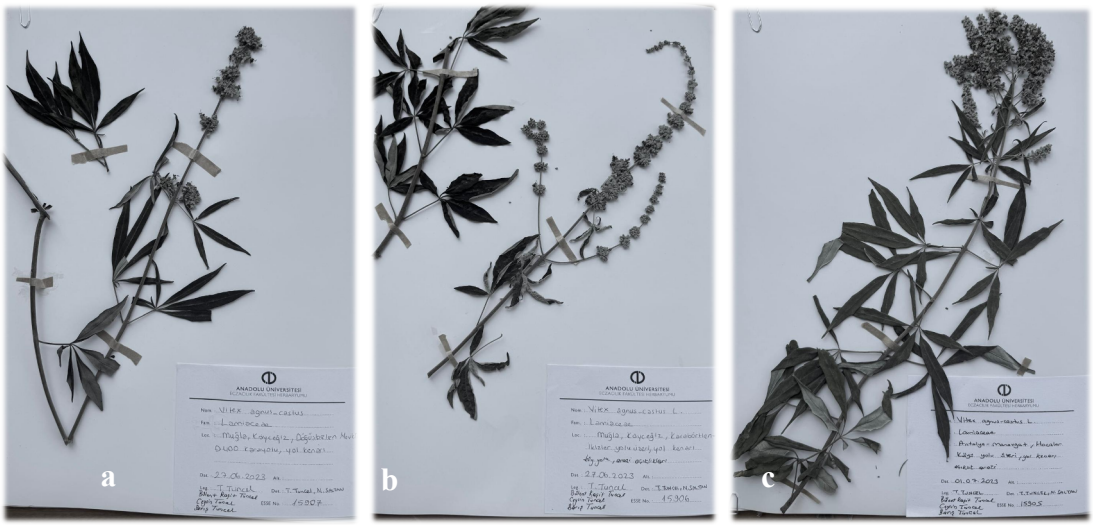
a) *Vitex agnus-castus kurutulması* ***b)*** *kurutulmuş toprak üstü drog* ***c)*** *kurutulmuş meyveli dönemde bitki* ***d)*** *kuru meyve*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 4.5

a) *Muğla/Köyceğiz/D400 Karayolu üzeri* ***b)*** *Muğla/Köyceğiz/Karabörtlen-İkizkuyu Sokak* ***c)*** *Antalya-Hacılarköyü köy yolu lokalitelerinden toplanan Vitex agnus-castus Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryum örnekleri*



Fotoğraf: T. Tuncel

4.2 Metot

4.2.1 Avrupa Farmakopesi'ne göre bitkinin incelenmesi

4.2.1.1 Makroskopik inceleme

Üç ayrı lokaliteden çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan 6 bitki drogu (1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M) drogları makroskopik açıdan incelenmiştir.

4.2.1.2 Mikroskopik inceleme

Üç lokaliteden çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan 6 bitki drogu (1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M) drogları Kloralhidrat R çözeltisi kullanılarak mikroskop altında incelenmiştir (European Pharmacopoeia 9.0., 2016, s. 295).

4.2.1.3 Yabancı madde miktar tayini

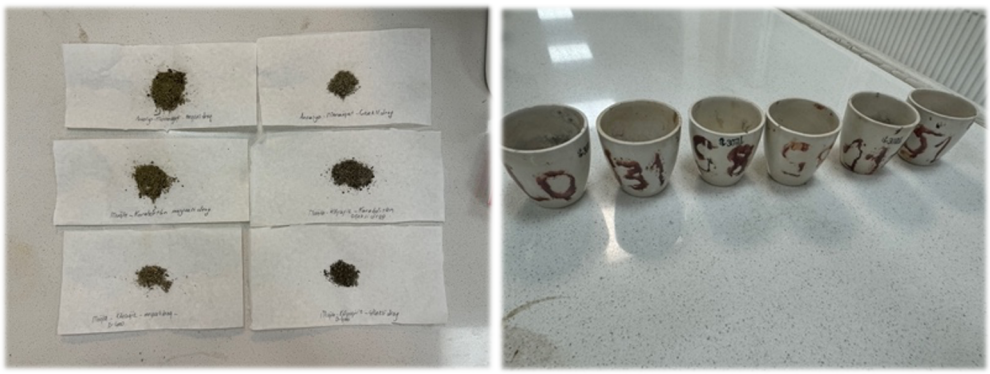
Üç lokaliteden çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan 6 bitki drogu (1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M) 100 g olacak şekilde tartılmıştır ve ince bir tabaka halinde yayılarak yabancı madde olup olmadığı incelenmiştir (European Pharmacopoeia 9.0., 2016, s. 283).

4.2.1.4 Total kül miktar tayini

Üç lokaliteden çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan 6 bitki drogu (1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M) 1'er g tartılarak ayrı ayrı porselen krozede (Görsel 4.6) 10-15 dakika boyunca bek alevinde tüm karbon atomları uzaklaşana kadar ısıtılmıştır ve 600°C ± 25°C'de kül fırınında sabit kütleye kadar tutulmuştur (European Pharmacopoeia 9.0., 2016, s. 137).

Görsel 4.6

Total kül miktar tayini



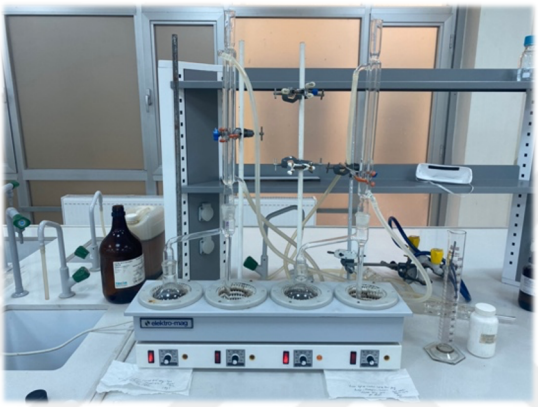
Fotoğraf: T. Tuncel

4.2.1.5 Nem miktar tayini

Avrupa Farmakopesi 9.0'da belirtilen distilasyonla volumetrik olarak su miktarı tayin edilmiştir. 6 bitki drogları (1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M) 10 'ar g tartılıp ayrı ayrı 100 mL ksilen ile distile edilmiştir, su miktarları hacim olarak ölçülüp % cinsinden su miktarları hesaplanmıştır (EP, 2016) (Görsel 4.7).

Görsel 4.7

Nem miktar tayini



Fotoğraf: T. Tuncel

4.2.2 *Vitex agnus-castus* çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan toprak üstü kısımlarından uçucu yağ eldesi

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü droglarından 100 g tartılarak ayrı ayrı Clevenger apareyinde 3 saat hidrodistilasyonu ile uçucu yağ eldesi gerçekleştirilmiştir (Görsel 4.8). *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/Karabörtlen-İkizkuyu Sokak lokalitesine ait meyvesiz bitkiden elde edilen uçucu yağ 1UYMs; *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/Karabörtlen-İkizkuyu Sokak lokalitesine ait meyveli bitkiden elde edilen uçucu yağ 1UYM; *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/D400 Karayolu üzeri lokalitesine ait meyvesiz bitkiden elde edilen uçucu yağ 2UYMs; *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/D400 Karayolu üzeri lokalitesine ait meyveli bitkiden elde edilen uçucu yağ 2UYM; *V. agnus-castus* Antalya-Hacılarköyü köy yolu lokalitesine ait meyvesiz bitkiden elde edilen uçucu yağ 3UYMs; *V. agnus-castus* Antalya-Hacılarköyü köy yolu lokalitesine ait meyveli bitkiden elde edilen uçucu yağ 3UYM olarak adlandırılıp kuru drog üzerinden verim hesapları yapılmıştır.

Görsel 4.8

Vitex agnus-castus hidrodistilasyonu ile uçucu yağ eldesi



Fotoğraf: T. Tuncel

4.2.3 *Vitex agnus-castus* çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan toprak üstü kısımlarından etanol ekstraksiyonu

Üç lokaliteye ait kurutulmuş 50'şer g *V. agnus-castus* çiçekli (1Ms, 2Ms, 3Ms) (Görsel 4.9) ve meyveli (1M, 2M, 3M) (Görsel 4.10) toprak üstü kısımları toz haline getirilip 40°C'de %70'lik etanol ile 3 kez ekstre edilmiştir. Süzme işleminden sonra, birleştirilen süzüntüler vakum altında evaporasyonla yoğunlaştırılmıştır (Görsel 4.11). Kalan suyun uzaklaştırılması işlemi liyofilizasyon ile gerçekleştirilmiştir. Susuz kuru ekstreler elde edilmiştir. (Küçükboyacı ve Şener, 2010). *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/Karabörtlen-İkizkuyu Sokak lokalitesine ait meyvesiz bitkiden elde edilen ekstre 1EMs; *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/Karabörtlen-İkizkuyu Sokak lokalitesine ait meyveli bitkiden elde edilen ekstre 1EM; *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/D400 Karayolu üzeri lokalitesine ait meyvesiz elde edilen ekstre 2EMs; *V. agnus-castus* Muğla/Köyceğiz/D400 Karayolu üzeri lokalitesine ait meyveli bitkiden elde edilen ekstre 2EM; *V. agnus-castus* Antalya-Hacılarköyü köy yolu lokalitesine ait meyvesiz bitkiden elde edilen ekstre 3EMs; *V. agnus-castus* Antalya-Hacılarköyü köy yolu lokalitesine ait meyveli bitkiden elde edilen ekstre 3EM kuru drog üzerinden verimleri yüzde değer olarak hesaplanmıştır.

Görsel 4.9

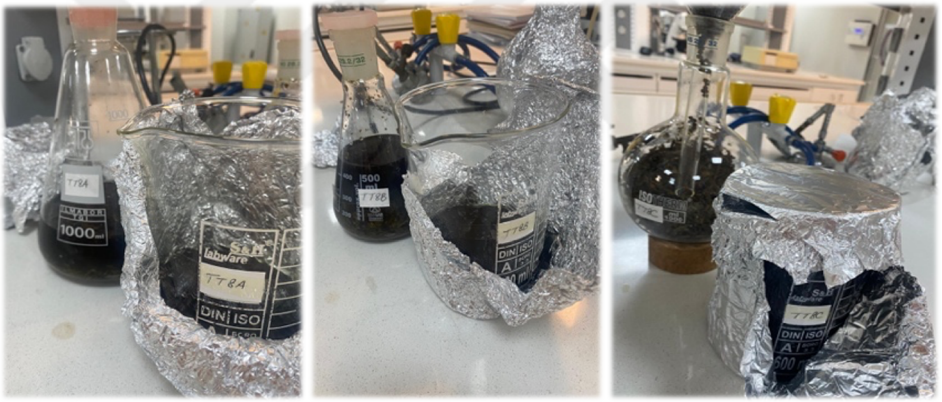
Vitex agnus-castus çiçeklenme döneminde toplanan drogtan maserasyon yöntemi ile ekstre eldesi



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 4.10

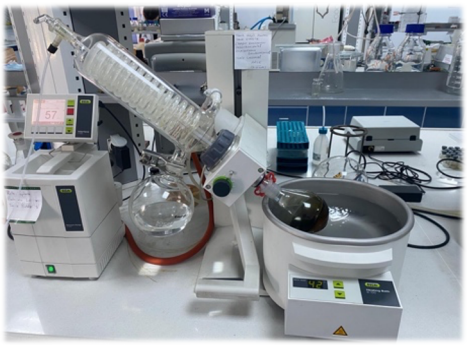
Vitex agnus-castus meyveli dönemde toplanan drogtan maserasyon yöntemi ile ekstre eldesi



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 4.11

Vitex agnus-castus çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde toplanan drog ekstrelerin evoporasyon ile çözücülerinin uzaklaştırılması



Fotoğraf: T. Tuncel

4.2.4 Kimyasal analizler

4.2.4.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Elde edilen uçucu yağların ve ekstrelerin kimyasal profilini belirlemek için ince tabaka kromatografisinden (İTK) yararlanılmıştır. 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs ve 3UYM; hekzan:etil asetat:formik asit (15:5:1) çözücü sisteminde silikajel GF 254 plakta develope işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında 254 ve 366 nm UV dalga boyunda formik asit püskürtüp görüntüleme yapılmıştır.

0,5 g 1EMs, 1EM, 2EMs, 2EM, 3EMs ve 3EM test örnekleri 5 mL metanolde çözülmüştür. 60°C'de 10 dk. tutulmuştur, soğutulmuştur ve süzülmüştür. Ekstreler ve kastisin standart madde 10µL silikajel GF 254 plak'a uygulanmıştır. su:metanol:etil asetat (2:4:19) ve kloroform:aseton:formaldehit (18.75:4.125:2.125) mobil faz sistemlerinde ayrı ayrı develope işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında 254 ve 366 nm UV dalga boyunda su:metanol:etil asetat çözücü sistem için formik asit; kloroform:aseton:formaldehit için NP-PEG (naturalproducts-polyethylenglycol reagent) püskürtülüp görüntüleme yapılmıştır.

4.2.4.2 Uçucu yağın gaz kromotografisi (GK) ve gaz kromotografisi/kütle spektrometresi (GK/KS) analizleri

Uçucu yağlar Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS)'nde analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.2). Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi", Wiley ve MassFinder 4.0 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak, ayrıca tutunma indeksleri karşılaştırılarak yapılmıştır (McLafferty ve Stauffer, 1989; Hochmuth, 2008).

Tablo 4.2

GK analiz koşulları

Sistem	**: Agilent 6890N**
Kolon	: HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı gaz	: Helyum (0.8 mL dk^{-1})
Sıcaklıklar	
Enjeksiyon	: 250ºC
Kolon	: 60ºC'de 10 dk, 4ºC dk artışla 220ºC'ye, 220ºC'de 10 dk, 1ºC dk artışla 240ºC'ye
Dedektör	: 300ºC, FID
GK/KS Analiz Koşulları	
Sistem	**:** Agilent 5975 GC-MSD
Kolon	: HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı gaz	: Helyum (0.8 mL dk^{-1})
Sıcaklıklar	
Enjeksiyon	: 250ºC
Kolon	: 60ºC'de 10 dk, 4ºC dk artışla 220ºC'ye, 220ºC'de 10 dk, 1ºC dk artışla 240ºC'ye
Split oranı	: 50:1
Elektron enerjisi	: 70 eV
Kütle aralığı	: 35-450 *m/z*

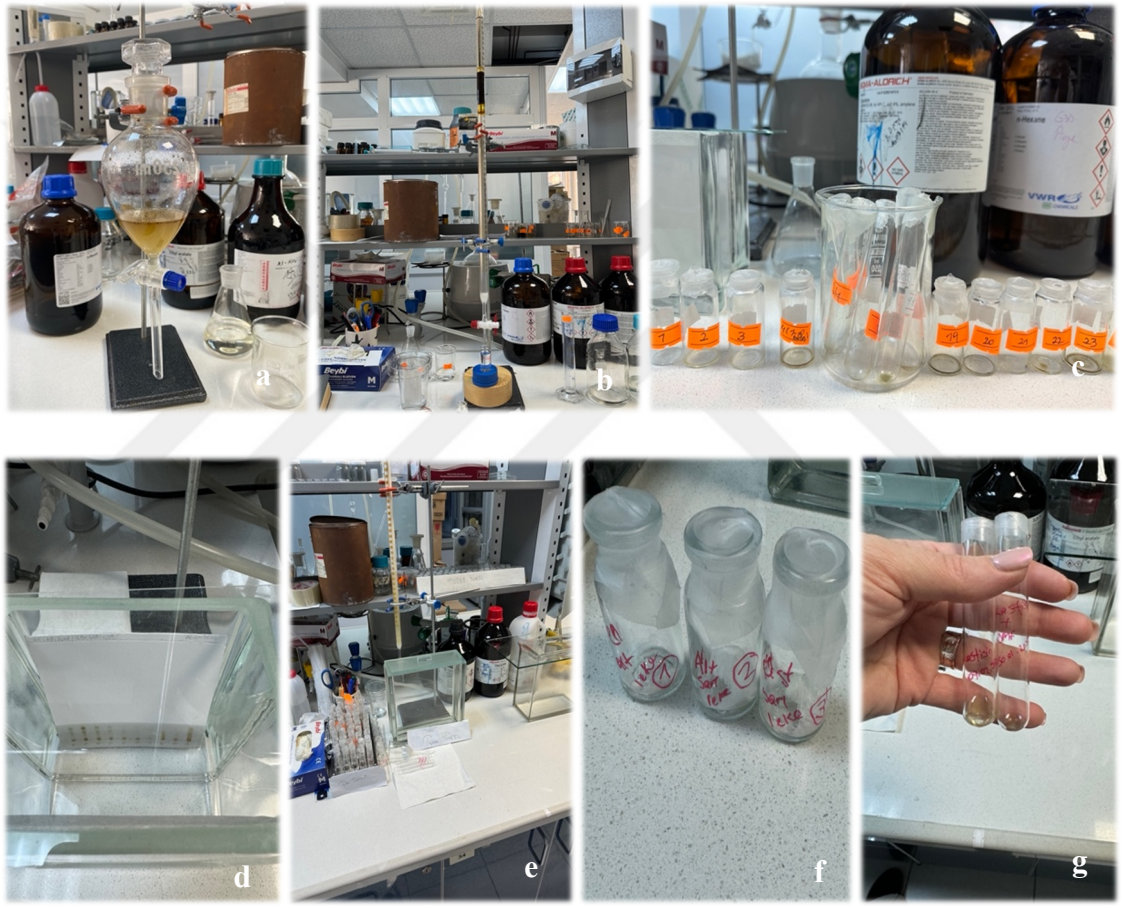
4.2.4.3 Kolon kromatografisi ile kastisin izolasyonu

Kastisin izolasyonunda kolon kromatografi kullanılmıştır. Kastisin izolasyon çalışmaları İTK'daki değerlendirmeler neticesinde daha net ayırım görüldüğünden 3EM örneğinden gerçekleştirilmiştir. 3EM örneğinden 4 g tartılıp 400 mL hekzan ile ekstre edilmiştir. Üstte toplanan hekzan fazı ayrılmıştır. Geri kalan kloroform ile ekstre edilmiştir. Kloroformda çözünür kısım kuruyana kadar buharlaştırıldıktan sonra 2.01g kloroform ekstre elde edilmiştir (Görsel 4.12a). 1. 37 g'ı etüvde bekletilmiş silikajel (70-230 mesh) üzerinde ıslak doldurma yöntemine göre kolon kromatografisi işlemine tabi tutulmuştur (Görsel 4.12b). (Küçükboyacı ve Şener, 2010; Shakir & Awad, 2017). Kolon kromatografi için 100 mL'lik büret kullanılmıştır. Önce 50 mL hekzan, sonra 80 mL kloroform fraksiyonları toplanmıştır. Daha sonra $CHCl_3$:CH_3OH karışımlarının artan polariteleri ile elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Görsel 4.12c). Fraksiyonlar, UV spektrumlarına ve İTK analizine göre birleştirilmiştir (Görsel 4.12d; Görsel 4.12e). $CHCI_3$:CH_3OH (98:2) karışımı ile yıkanan ana fraksiyonda 24. fraksiyon preparatif

İTK'ya uygulanmıştır. İTK' de tespit edilen 3 bant ayrı ayrı toplanıp (Görsel 4.12f) İTK ile değerlendirildikten sonra kastisin Rf değeri ile kıyaslanarak kastisin olduğu düşünülen bant silakadan dimetilformamid (DMF, $(CH_3)_2NC(O)H$) ile arındırılmıştır (Görsel 4.12g).

Görsel 4.12

3EM örneğinden kolon kromatografi ile kastisin izolasyon deneyi ***a)*** *Kloroform ekstresi eldesi* ***b)*** *Kolon kromotografide elüsyon işlemi* ***c)*** *Fraksiyonların toplanması* ***d)*** *Fraksiyonların devolope edilmesi* ***e)*** *Fraksiyonlar ve İTK* ***f- g)*** *preparatif İTK ile kastisin eldesi*



Fotoğraf: T. Tuncel

4.2.4.4 Sıvı kromotografisi/kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK/KS-KS) analizleri

İTK bulguları değerlendirildiğinde 24. fraksiyonda bulunan, kastisin içerdiği düşünülen içerik SK/KS-KS ile analiz edilmiştir (Tablo 4.3). 280 nm'de elde edilen kromatogramdaki pikler, tutunma zamanları (Rt) ve kütle spektrumları literatürle karşılaştırılıp değerlendirilmiştir.

Tablo 4.3

SK Analiz Koşulları

Cihaz	: Shimadzu LCMS-IT-TOF
Dedektör	: Ion Trap- Time of flight (IT-TOF)
Kolon	: Shim-pack FC-ODS (3um, 2.0 x 150mm) - Shimadzu
Kolon Sıcaklığı	: 40 °C max:80 °C
Akış hızı	: 0.5000 mL/dk
KS-KS Analiz Koşulları	: Toplam zaman: 30.00 dk CDL sıcaklık: 200 °C Nebülize Edici Gaz Akışı : 1.5 L/dk : Isı Bloğu: 200 °C
Yöntem	**:** Karışık standart bileşiklerin SK-KS analizi
Polarite	: pozitif mod: ESI
Kütle aralığı	: 100.000-750.000 *m/z*
Mobil faz gradient akışı	:A hat: %0,1 formik asit+MEOH B hat: %0,1 formik asit+ ACN B hat: %70 A hat %30

4.2.5 Biyoaktivite çalışmaları

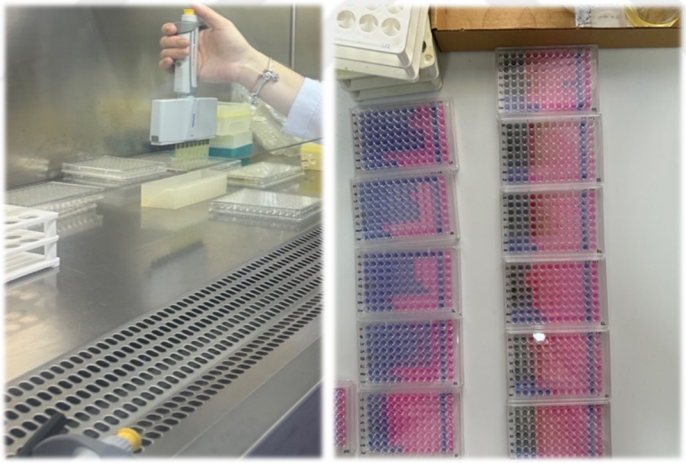
4.2.5.1 Antimikrobiyal aktivite çalışması

Uçucu yağlar ve ekstrelerin; *Escherichia coli* NRRL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378, *Serratia marcescens* NRRL B-2544, test mikroorganizmaları üzerindeki etkinlikleri mikrodilüsyon deneyi ile araştırılmıştır. Deneyde kullanılacak bakteriler -85^{o} C'de %50'lik steril gliserol solüsyonu içerisinde muhafaza edilen suşlardır. Mikrodilüsyon deneyi "Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü"nün yayımladığı CLSI (NCCLS) M7-A7 protokollüne göre kısmen modifiye edilmiş olarak gerçekleştirilmiştir (Görsel 4.13). Test mikroorganizmaları bir gün

önceden Mueller Hinton Agar (MHA) plaklarında canlandırılıp McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre 10^6 KOB/mL olacak şekilde bulanıklık ölçer (BIOSAN) kullanılarak ayarlanmıştır. Test örnekleri 16 mg tartılmış, 1 mL steril DMSO (%100)'da çözünmesi sağlanarak kullanılmıştır. Steril U tabanlı, 96 kuyucuklu (well) mikroplakler'e MHB besiyeri 100'er µl eklenmiştir. Test örnekleri sırasıyla kuyucuklara 100 µL eklenerek soldan sağa doğru dilüe edilmiştir. Daha önceden McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri multikanal otomotik pipet yardımıyla her bir sütuna 20'şer µL olacak şekilde pipetlenmiştir ve 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda resazurin ile boyanarak minimum inhibitor konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. DMSO çözücü kontrolü, besiyerinin sterilite kontrolü ve kloramfenikol (Sigma) pozitif kontrol olarak test edilmiştir (CLSI (NCCLS) M7-A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Seventh Edition, 2006.)

Görsel 4.13

Mikrodilüsyon deneyi



Fotoğraf: T. Tuncel

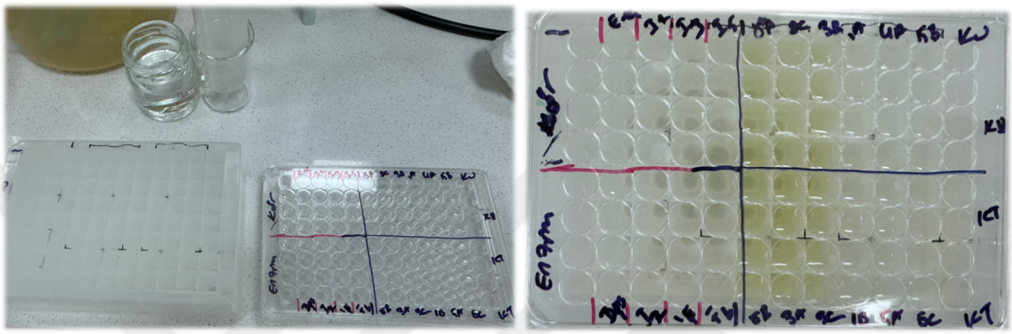
4.2.5.2 Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyonu

Antiinflamatuvar etkinliğin belirlenmesi için *in vitro* test olan 5-Lipoksijenaz (LOX) enzim aktivitesi 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM, 1EMs, 1EM, 2EMs, 2EM, 3EMs ve 3EM test örnekleri için gerçekleştirilmiştir. Lipoksijenaz (1.13.11.12, Tip I-B, 7 Unite/mg) enzim aktivitesi inhibisyon düzeylerinin belirlenmesi 96 kuyucuklu kuartz plakada spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir (Baylac ve Racine, 2003). 1.94 mL potasyum fosfat tamponu (100 mM; pH: 8.80), 40 µL 10 mg/mL

konsantrasyonda test maddeleri ve 20 µL lipoksijenaz enzimi karıştırılarak 25 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu karışımın 300 µL'si her kuyucuğa eklenmiştir. Ardından 7.5 µL substrat (linoleik asit) ilave edilerek 30 sn çalkalanmıştır. 10 dakikadaki absorbans değişimi 234 nm'de ölçülmüştür. Denemeler 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve Nordihidroguaiaretik asit (NDGA) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Görsel 4.14).

Görsel 4.14

5-LOX deneyi



Fotoğraf: T. Tuncel

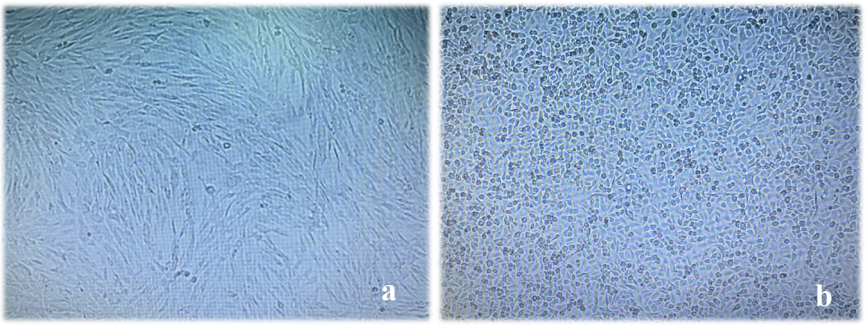
4.2.5.3 Hücre kültürü yöntemi ile in vitro antikanser etki çalışmaları

4.2.5.3.1 Test örneklerinin HTERT ve PANC-1 üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT ile ölçümü

1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM, 1EMs, 1EM, 2EMs, 2EM, 3EMs ve 3EM test örneklerinin HTERT (Görsel 4.15a) ve PANC-1 (Görsel 4.15b) hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir (Mosmann, 1983). İlk önce HTERT ve PANC-1 hücreleri DMEM ile %10 Fetal sığır serumu (FBS) içeren besi ortamında, 37°C'de, %5 CO_2 içeren CO_2 inkübatöründe kültüre edilmiştir. Deney için yeterli sayıya ulaşan hücreler Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10^3 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. Test örnekleri 3.91-500 µM konsantrasyonlarında eklenerek 37ºC' de inkübe edilmiştir (Görsel 4.16) 24 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5 mg/mL) ilave edilerek, hücreler 37 ºC' de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitince hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µL DMSO eklenip 10 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir. Test örnekleri ile muamele edilmeyen kontrol HTERT hücre canlılığı %100 kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak belirlenmiştir.

Görsel 4.15

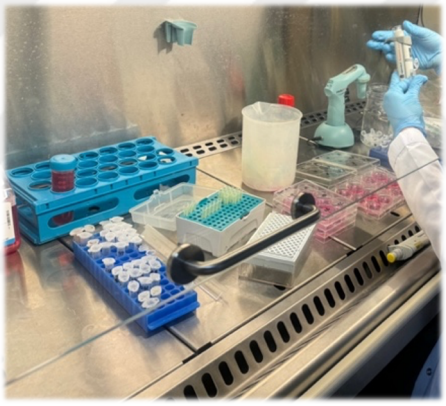
a) *HTERT-HEPNE hücresi* ***b)*** *PANC-1 hücresi*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 4.16

Test örneklerinin HTERT ve PANC-1 üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT ile ölçümü deneyi



Fotoğraf: T. Tuncel

4.2.5.3.2 PANC-1 hücrelerinde Annexin V FITC: Erken faz apoptozun belirlenmesi

IC_{50} konsantrasyonlarına göre etkili bulunan 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM, 1EMs, 1EM, 2EM test örneklerinin PANC-1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri flow sitometride BD, Pharmingen Flow sitometri kiti ile ölçülmüştür. Öncelikli olarak test örnekleri ile inkübe edilen hücreler etiketlenip tüplerde 400 g'da 5 dakika santrifüj edilmiştir, ardından 1xPBS ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonrasında hücreler $1x10^6$ hücre/mL olacak şekilde 1xAnnexin-V bağlanma solüsyonunda süspande edilip bu hücre solüsyonundan 100 µL alınarak tüplere aktarılmıştır ve kitin içerisinde bulunan 5 µL AnnexinV FITC ve 5 µL PI (Propidyum Iyodür) boyaları hücreler ile muamele edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dakika bekletilip boyanın bağlanması sağlanmıştır. 400 µL 1×Annexin-V bağlanma hücre çözeltisi akım sitometri

tüplerine aktarıldıktan bir saat içerisinde akım sitometre (Beckman coulter, Cytoflex) ile analiz edilerek erken ve geç apoptotik hücre miktarı pozitif kontrole göre hesaplanmıştır (Görsel 4.17).

4.2.5.3.3 PANC-1 hücrrelerinde Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri ile belirlenmesi

IC_{50} konsantrasyonlarına göre etkili bulunan 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM, 1EMs, 1EM, 2EM test örneklerinin PANC-1 hücreleri üzerindeki Kaspase-3 etkileri flow sitometride BD, Pharmingen Flow sitometri kiti ile ölçülmüştür. PANC-1 hücreleri belirlenen doz ve zamanda 6 kuyucuklu plakalara test örnekleriyle inkübe edilmiştir. Soğuk 1 X PBS ile iki kez hücreler yıkanmıştır. Daha sonra bu hücreler BD Cytofix/Cytoperm solusyonuyla süspande edilerek ($1x10^6$ hücre/0.5 mL olacak şekilde) 20 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. Santrifüj edildikten sonra hücreler, BD Cytofix/Cytoperm solüsyonu atılıp hücreler iki kez BD Perm/Wash™ buffer ile (1x10 6 hücre/ 0.5 mL) yıkanmıştır. Daha sonra hücreler yeniden BD Perm/Wash™ buffer ve antikor ile süspanse edilip 30 dk. oda ısısında bekletilmiştir. Her bir test için 1 mL BD Perm/Wash™ buffer içinde yıkanarak 0.5 mL BD Perm/Wash™ buffer içinde süspande edilip akım sitometreyle analiz edilmiştir (Görsel 4.17). Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır ve sonuçlar pozitif kontrole göre kıyaslanmıştır.

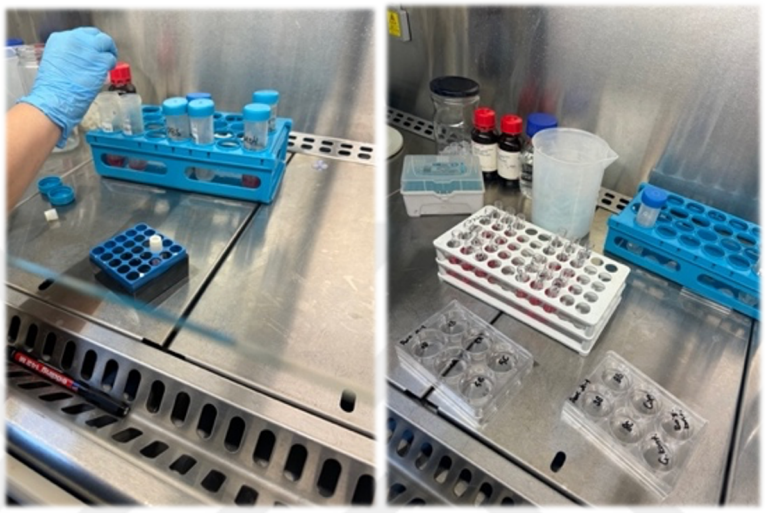
4.2.5.3.4 Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması)

IC_{50} konsantrasyonlarına göre etkili bulunan 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM, 1EMs, 1EM, 2EM test örneklerinin PANC-1 hücreleri üzerindeki JC-1 mitokondriyal potansiyel etkileri flow sitometride BD, Pharmingen Flow sitometri kiti ile ölçülmüştür. Bu amaçla hücreler optimal bir yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ($1x10^6$/mL hücreyi geçmeyecek şekilde). Sonra hücreler test örnekleri ile uygun konsantrasyon ve zamanda inkübe edilmiştir. Muameleden sonra her bir hücre süspansiyonu 15 mL lik polistiren santrifüj tüpüne alıp hücreler 400 g'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. 0.5 mL taze hazırlanmış çalışma solüsyonu her bir pellete ilave edilip vortekslenmiştir. 37 ºC'de hücreleri 10-15 dk. JC-1 çalışma solüsyonunda bekletilip hücreler iki kez yıkanmıştır. 1. yıkamada 2 mL 1X assay buffer eklenerek hassas bir şekilde hücreler süspande edilmiştir. Daha sonra 400 g'de hücreler 5 dk. santrifüjlenip dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır. 2. yıkamada 1 mL 1X assay buffer ilave edilip vortekslenmiştir. 400 g'de 5 dk. hücreler

santrifüj edildikten sonra her bir hücre pelleti 0,5 mL lik 1X Assay buffer'da süspande edilip vortekslenmiştir (Görsel 4.17). Son olarak da hücre akım sitometre ile analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılarak sonuçlar kıyaslanmıştır.

Görsel 4.17

PANC-1 hücrelerinde erken faz apoptozun, Kaspaz-3 aktivitesinin ve mitokondrial membran bütünlüğünün akım sitometri ile belirlenmesi



Fotoğraf: T. Tuncel

4.2.5.3.5 CD46 ölçümü: Human CD46 Elisa kit deneyi

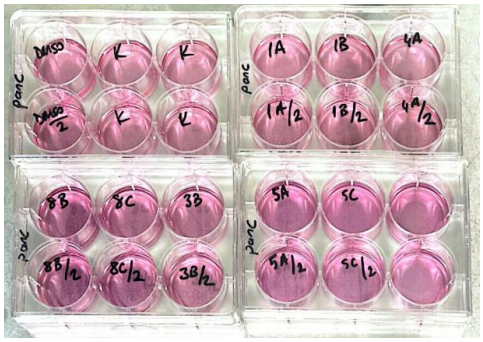
IC_{50} konsantrasyonlarına göre etkili bulunan 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM, 1EMs, 1EM, 2EM test örneklerinin PANC-1 hücrelerinde CD46 reseptör ekspresyonuna etkisi Human CD46 Elisa Kit ile belirlenmiştir.

Hücre ekimi

PANC-1 hücreleri optimal bir yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ($1x10^6$/mL). Daha sonra hücreler test örnekleri ile uygun konsantrasyon ve zamanda inkübe edilmiştir (Görsel 4.18).

Görsel 4.18

CD46 Deneyi için hücrelerin ekimi ve test örnekleri ile inkübasyon



Fotoğraf: T. Tuncel

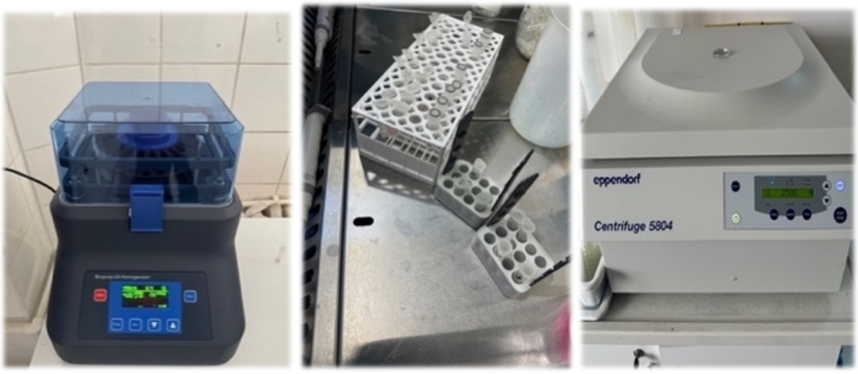
CD46 reseptör inhibisyonunu tespit etmek amacıyla hücre lizatları, süpernanatları ve direkt uygulama olarak 3 ayrı uygulama şekli belirlenmiştir. Bunun için inkübasyon sonrası hücre lizatları, süpernatant ve uygulanacak dozda test örnekleri hazırlanmıştır.

Hücre lizatları hazırlama

PANC-1 hücreleri orta miktarda önceden soğutulmuş PBS ile nazikçe yıkanmıştır ve hücreler tripsin kullanarak ortamdan ayrılmıştır. Hücre süspansiyonu bir santrifüj tüpüne toplanmıştır ve 1000×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ortamı atılıp hücreleri önceden soğutulmuş PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Her 1×10^6 hücre için hücreleri süspanse etmek için 150-250 µL önceden soğutulmuş PBS eklenmiştir. Ultrasonik hücre parçalayıcı olan homojenleştiricide hücreler tamamen liziz edilmiştir. Sonrasında 2-8°C'de 1500×g'de 10 dakika santrifüj edilip hücre parçaları çıkarılıp deney için üst sıvı toplanmıştır (Görsel 4.19).

Görsel 4.19

CD46 Deneyi için hücre lizatları hazırlama



Fotoğraf: T. Tuncel

Süpernatant ayırma

Örnekler 2-8°C'de 1000×g'de 20 dakika santrifüjlenip deney için üst sıvıyı toplanmıştır.

Direkt uygulama

Test örnekleri direkt antikor kaplı mikroplak üzerine uygulanmıştır.

Lizatlar IC_{50} ve IC_{50} /2, süpernatant ve direkt uygulama IC_{50} dozlarda deney grupları; Lizat PANC-1, Supernatant PANC-1, Direkt PANC-1, DMSO kontrol grupları, Standart ve Blank grupları oluşturulmuştur.

Reaktif hazırlama

Yıkama tamponu

750 mL Yıkama Tamponu hazırlamak için 30 mL Konsantre Yıkama Tamponunu 720 mL deiyonize suyla seyreltilmiştir.

Standart çalışma solüsyonu

Standard 10.000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Referans Standardı ve Numune Seyreltici eklenip, 1-2 dakika bekletilmiştir, ardından düşük hızda bir vorteks cihazı ile iyice karıştırılmıştır. Vorteks sırasında oluşan kabarcıklar düşük hızda santrifüjleme ile giderilmiştir. Daha sonra seri seyreltmeler yapılmıştır. 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,82 pg/mL.

Seyreltme yöntemi

Yedi ependorf tüpün her birine 250 µL Referans Standardı ve Numune Seyreltici eklenmiştir. 500 pg/mL çalışma solüsyonundan 250 µL ilk tüpe pipetlenmiştir ve 250 pg/mL'lik bir çalışma solüsyonu elde edene kadar karıştırılmıştır. Bu adıma göre, önceki tüpteki solüsyondan 250 µL ikinci tüpe pipetlenmiştir. Son tüp boş olarak kabul edilmiş, önceki tüpten içine solüsyon pipetleme yapılmamıştır.

Biyotinlenmiş tespit Ab çalışma solüsyonu

Konsantre Biyotinlenmiş Tespit Ab 1 dakika boyunca 800 × g'de santrifüjlenmiştir, ardından 100 × Konsantre Biyotinillenmiş Tespit Ab Biyotinillenmiş Tespit Ab Seyreltici ile 1 × çalışma solüsyonuna seyreltilmiştir (Konsantre Biyotinillenmiş Tespit Ab: Biyotinillenmiş Tespit Ab Seyreltici = 1: 99).

HRP konjugat çalışma solüsyonu

Konsantre HRP Konjugatı 800×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir, ardından 100× Konsantre HRP Konjugatı HRP Konjugat Seyreltici ile 1× çalışma solüsyonuna seyreltilmiştir (Konsantre HRP Konjugatı: HRP Konjugat Seyreltici = 1: 99)

CD46 deney prosedürü

Seyreltilmiş standart, blank, kontrol ve test örnekleri için kuyucuklar belirlenmiştir. Deney iki tekrarlı olarak planlanmıştır. Standart, blank ve test örneklerinin her seyreltiminden 100 µL uygun kuyucuklara eklenmiştir Plaka örtülerek 37°C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. Plaka 3 kez aspire edilmiştir ve yıkanmıştır. Ardından her kuyucuğa 100 µL Biyotinlenmiş Ab çalışma solüsyonu eklenmiştir. Plaka örtülerek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Her kuyudan solüsyon boşaltılıp, her kuyuya 300 µL yıkama tamponu eklenmiştir. 0,5 dakika bekletilip solüsyon her kuyudan boşaltılmıştır ve temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurulanmıştır. Bu yıkama 3 kez tekrarlanmıştır. Her kuyuya 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklenmiştir. Plaka örtülerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Her kuyudan solüsyonu boşaltılıp, yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Her kuyuya 100 µL Substrat Reaktifi eklenmiştir. Plaka örtülerek 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edilmiştir. Her bir kuyuya 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. 450 nm'de mikro plaka okuyucu ile optik okuma gerçekleştirilmiştir (Görsel 4.20). Standart için 4 parametreli lojistik eğri grafiği denklemi hesaplanarak çizimi yapılmıştır. Örnekler için Optik dansite-CD46 konsantrasyon grafikleri graphpad'te çizilmiştir. Garphpadte Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'ne göre anlamlılık ölçülmüştür.

Görsel 4.20

CD46 Deneyi



Fotoğraf: T. Tuncel

5 BULGULAR

5.1 Avrupa Farmakopesi'ne Göre Bitkinin İncelenmesi Bulguları

5.1.1 Makroskopik inceleme bulguları

1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü droglarının makroskobik incelemelerinde oval meyve, meyvede kalıcı kaliks gözlemlenmiştir (Görsel 5.1).

Görsel 5.1

Makroskopik inceleme bulguları ***a)*** *Antalya/Manavgat-Hacılar köyü-köy yolu meyve dönemi herba drog* ***b)*** *meyve*



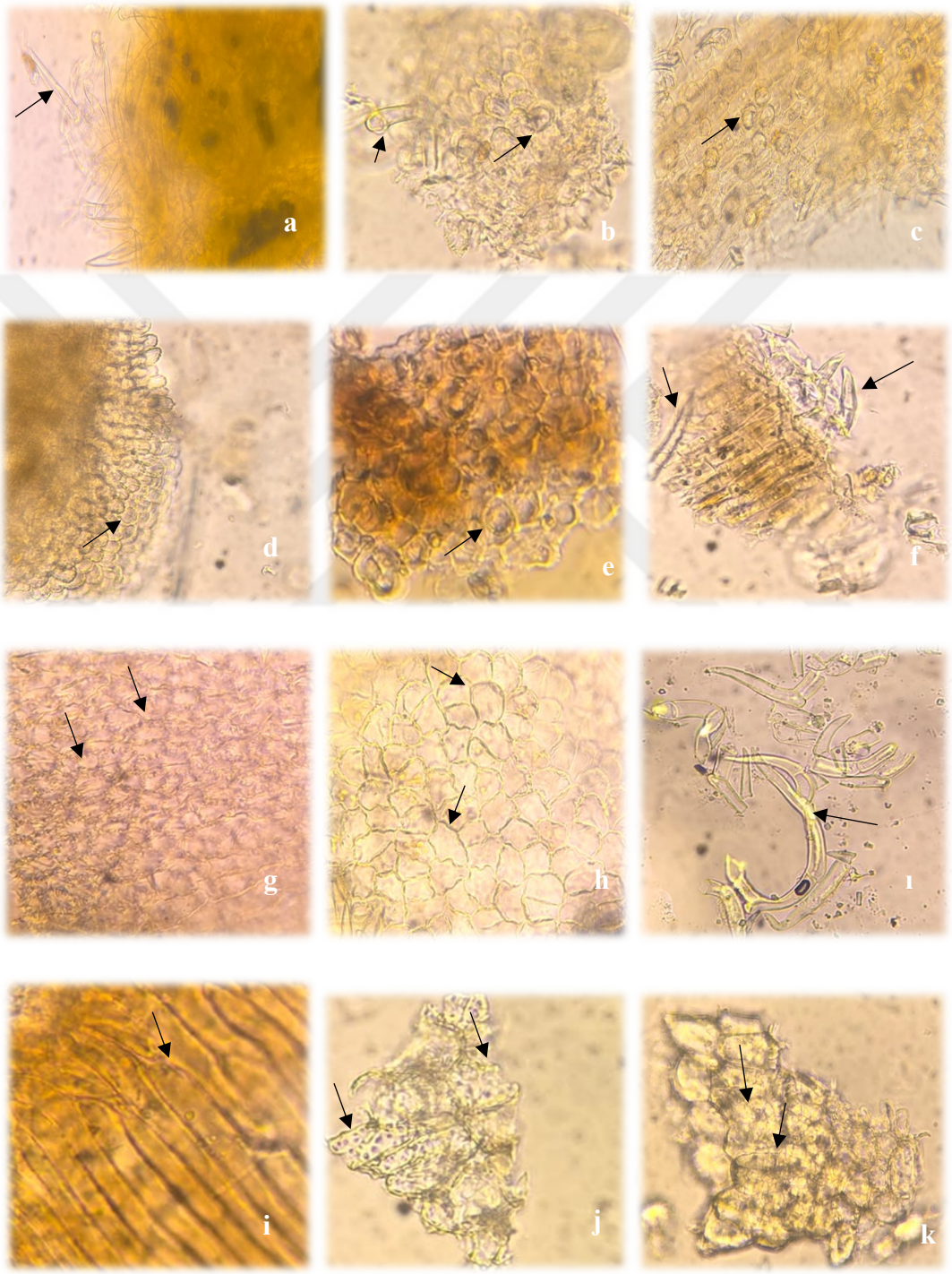
Fotoğraf: T. Tuncel

5.1.2 Mikroskopik inceleme bulguları

1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü droglarının mikroskobik incelemelerinde örtü tüyleri (Görsel 5.2a,f), salgı tüyleri (Görsel 5.2a,b,c,e), papilsi çıkıntılar (Görsel 5.2d) mezokarp hücreleri (Görsel 5.2g,h), örtü tüyleri (Görsel 5.2ı), parenkima hücreleri (Görsel 5.2i), epikarp hücreleri (Görsel 5.2j), kalın duvarlı taş hücreleri (Görsel 5.2k) görülmüştür.

Görsel 5.2

Mikroskopik inceleme bulguları **a)** *1M meyveli drog örtü tüyü* ***b, c ve e)*** *2M meyveli drog salgı tüyleri* ***d)*** *papilsi çıkıntılar* ***f)*** *2M meyveli drog örtü tüyleri* ***g)*** *2M meyveli drog mezokarp hücreleri* ***h)*** *3M meyveli drog mezokarp hücreleri* ***ı)*** *3M meyveli drog örtü tüyleri* ***i)*** *1M meyveli drog parenkima hücreleri* ***j)*** *2M meyveli drog epikarp hücreleri* ***k)*** *1M meyveli drog endokarpta taş hücreleri*



Fotoğraf: T. Tuncel

5.1.3 Yabancı madde miktar tayini bulguları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımları toplandıktan ve kurutulduktan sonra incelemiş, yabancı maddeye rastlanmamıştır.

5.1.4 Total kül miktar tayini bulguları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımlarına ait 1'er gram örneklerle belirlenen kül miktar ve yüzdeleri Tablo 5.1'de verildiği gibi bulunmuştur.

Tablo 5.1

Kül miktar tayini bulguları

Drog kodu	Kül miktarı (g)	% Kül
1Ms	0.04	4
1M	0.05	5
2Ms	0.05	5
2M	0.04	4
3Ms	0.05	5
3M	0.05	5

5.1.5 Nem miktar tayini bulguları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımlarına ait 10'ar gram örneklerle gerçekleştirilen volumetrik nem miktar tayininde tespit edilen nem miktar ve yüzdeleri Tablo 5.2' de verildiği gibi bulunmuştur.

Tablo 5.2

Nem miktar tayini bulguları

Drog kodu	Nem miktarı (mL)	% Nem
1Ms	-	-
1M	0.8	8
2Ms	-	-
2M	0.9	9
3Ms	0.4	4
3M	0.4	4

5.2 Uçucu Yağ Eldesi Bulguları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımlarına ait uçucu yağ eldesinde kullanılan bitki miktarları, elde edilen uçucu yağ miktarları ve verimleri Tablo 5.3' de verildiği gibi bulunmuştur.

Tablo 5.3

Uçucu yağ elde bulguları

Uçucu yağ kodu	Kullanılan bitki miktarı (g)	Elde edilen uçucu yağ miktarı (mL)	%Kuru drog verim
1UYMs	400	1.5	0.30
1UYM	400	1.3	0.32
2UYMs	300	1.6	0.50
2UYM	500	3.0	0.66
3UYMs	400	1.0	0.21
3UYM	400	1.2	0.31

5.3 Çiçekli ve Meyveli Toprak Üstü Kısımlarının Etanol Ekstraksiyonu Bulguları

Vitex agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımlarının 50'er gramlarının %70 etanol ekstraksiyonu ile elde edilen ekstre miktarları ve verimleri Tablo 5.4' de verildiği gibi bulunmuştur.

Tablo 5.4

Ekstre eldesi bulguları

Ekstre kodu	Ekstre miktarı (g)	%Verim
1EMs	12.9	25.9
1EM	11.2	22.5
2EMs	14.9	29.9
2EM	13.2	26.5
3EMs	14.0	28.1
3EM	9.2	18.4

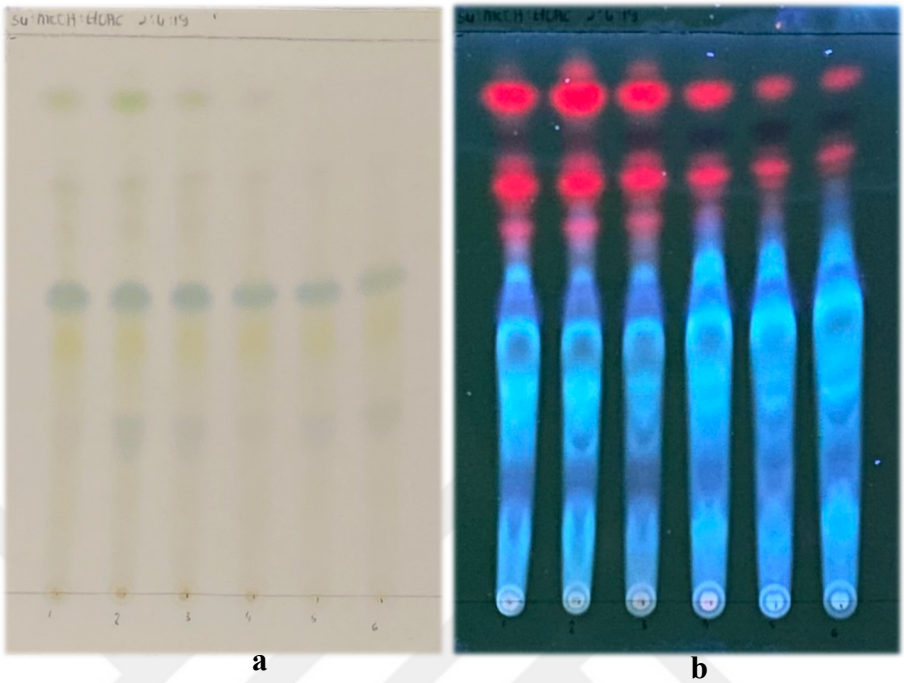
5.4 Kimyasal Analiz Bulguları

5.4.1 İnce tabaka kromotografisi (İTK) bulguları

V. agnus-castus 1EMs, 1EM, 2EMs, 2EM, 3EMs ve 3EM ekstrelerinin su:metanol:etilasetat (2:4:19) çözücü sisteminde yürütülmesi ile elde edilen İTK bulguları Görsel 5.3.'de a) görünür ışıkta; b) UV 366 nm) görüldüğü gibidir (sırasıyla: 3EMs; 1EMs; 2EMs; 3EM; 1EM; 2EM).

Görsel 5.3

Ekstrelerin İTK görüntüsü ***a)*** *Görünür ışık İTK görüntüsü* ***b)*** *UV 366nm'de İTK görüntüsü*



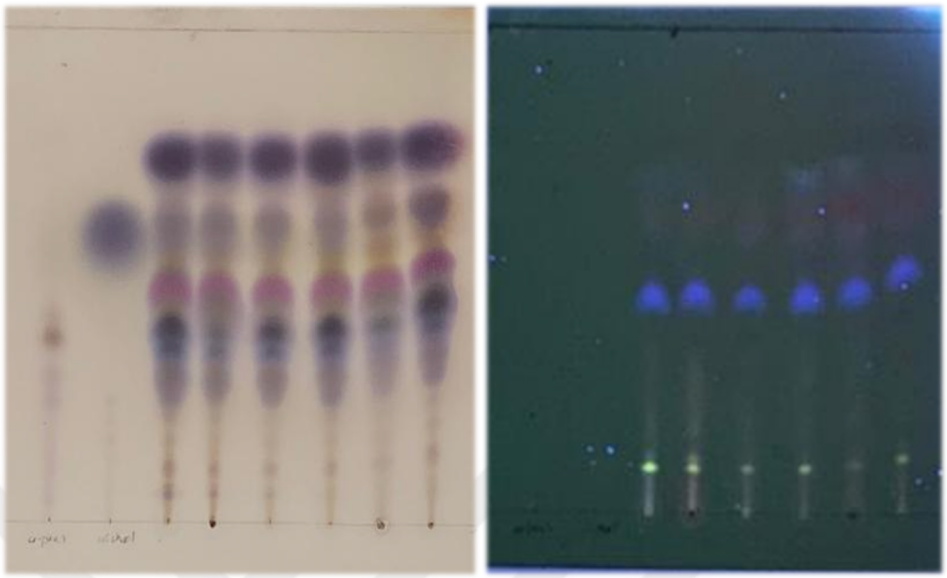
a **b**

Fotoğraf: T. Tuncel

V. agnus-castus 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs ve 3UYM ekstrelerinin hekzan:etilasetat:formik asit (15:5:1) çözücü sisteminde yürütülmesi ile elde edilen İTK bulguları Görsel 5.4'de a) görünür ışıkta; b) UV 366 nm görüldüğü gibidir (sırasıyla: α-pinen;1,8-sineol; 3UYMs; 1UYMs; 2UYMs; 3UYM; 1UYM; 2UYM).

Görsel 5.4

Uçucu yağların İTK görüntüsü ***a)*** *görünür ışık* ***b)*** *UV 366 nm'de İTK görüntüsü*



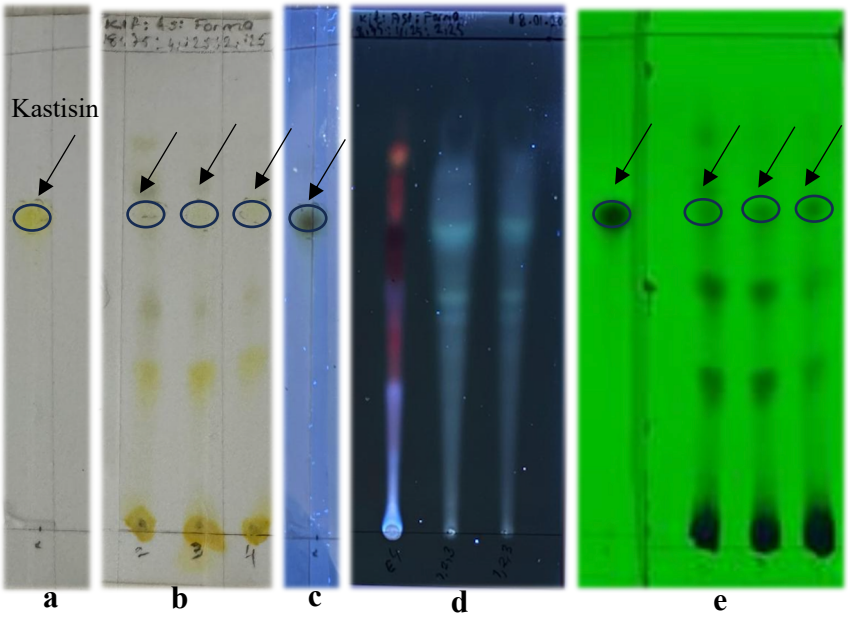
a **b**

Fotoğraf: T. Tuncel

Kastisin (a), 1EMs; 2EMs; 3EM (b) kloroform:aseton:formik asit (18.75:4.125:2.125) çözücü sisteminde yürütülmesi ile elde edilen İTK bulguları Görsel 5.5'de (a ve b görünür ışıkta; c ve d UV 366 nm; e 254 nm) görüldüğü gibidir.

Görsel 5.5

(a)Kastisin, (b)2EMs; 3EMs; 4EM İTK görüntüleri ***a-b)*** *görünür ışık* ***c-d)*** *UV 366 nm;* ***e)*** *254 nm*



Fotoğraf: T. Tuncel

5.4.2 Uçucu yağın gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) analizleri bulguları

Vitex agnus-castus 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs ve 3UYM örneklerinin GK ve GK/KS analiz bulguları Tablo 5.5'te verilmiştir.

Tablo 5.5

V. agnus-castus toprak üstü kısımları uçucu yağlarının GK ve GK/KS analiz bulguları

No	RT	Bileşik	1UYMs	1UYM	2UYMs	2UYM	3UYMs	3UYM
1	9.51	**α-pinen**	0.3	0.9	0.3	0.3	**5.8**	**7.7**
2	9.66	α-tuyen	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3
3	13.23	β-pinen	0.1	0.4	0.5	0.4	0.3	0.6
4	13.98	**sabinen**	2.5	**10.3**	**16.4**	**12.6**	3.4	4.4
5	15.87	mirsen	0.2	0.5	1.1	0.8	0.9	1.1
6	15.96	α-fellandren	e	-	-	-	0.5	0.5
7	16.63	α-terpinen	e	0.5	0.6	0.6	0.1	0.3
8	17.52	limonen	0.1	0.8	0.5	0.4	3.7	3.7
9	17.89	**1,8-sineol**	8.7	5.6	**11.0**	8.7	5.4	6.6
10	17.92	β-fellandren	-	-	-	-	3.2	2.7
11	19.14	(Z)- β-osimen	-	-	0.1	0.1	-	-
12	19.65	γ-terpinen	0.2	1.1	1.3	1.2	0.3	0.5
13	19.92	(E)- β-osimen	0.1	e	1.0	0.4	0.2	0.2
14	20.79	*p*-simen	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.4
15	21.29	terpinolen	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2
16	28.19	bisikloelemen	-	-	0.4	0.2	-	e
17	30.62	α-gurjinen	-	-	0.3	0.5	0.4	0.4
18	30.87	linalol	0.9	-	0.2	e	0.4	0.2
19	30.91	linalil asetat	-	-	-	-	0.1	-
20	31.03	cis-sabinenhidrat	0.4	-	0.3	e	-	-
21	31.57	trans-*p*-ment-2-en-1ol	1.2	-	0.3	0.2	-	-
22	32.36	trans-α--bergamoten	-	-	-	0.3	-	0.2
23	32.42	trans-β-bergamoten	-	0.2	0.2	-	0.6	1.1
24	32.90	**β-karyofillen**	-	**16.0**	**10.0**	**8.0**	**10.0**	**8.0**
25	32.98	**terpinen-4-ol**	**24.4**	-	7.9	7.1	-	-
26	33.61	cis-*p*-ment-2-en-1ol	1.3	-	0.2	-	-	-

Tablo 5.5 (Devam)

V. agnus-castus toprak üstü kısımları uçucu yağlarının GK ve GK/KS analiz bulguları

No	RT	Bileşik	1UYMs	1UYM	2UYMs	2UYM	3UYMs	3UYM
27	34.23	sesquisabinen	-	0.7	0.6	0.5	1.5	2.7
28	34.44	alloaromadendren	-	0.7	1.2	1.5	1.4	1.4
29	34.56	sitronellil asetat	-	-	0.1	-	1.2	e
30	34.76	**(Z)-β-farnasen**	e	**8.6**	**7.3**	**10.0**	**5.9**	**8.2**
31	34.93	β-terpineol	-	-	0.5	-	-	-
32	34.97	δ-terpineol	2.1	-	-	0.7	0.6	0.4
33	35.11	α-humulen	-	1.0	0.7	0.7	0.1	0.4
34	35.21	trans-piperitol	0.6	-	-	-	-	-
35	35.72	**α-terpineol**	**8.1**	0.8	2.9	1.7	2.2	1.6
36	35.85	α-terpinilasetat	3.1	2.4	1.8	2.6	1.2	0.8
37	36.68	β-bisabolen	-	-	-	-	-	0.4
38	37.02	sitronellol	e	-	-	-	e	-
39	37.05	**bisiklogermakren**	-	1.7	**6.6**	**5.8**	**6.4**	**5.6**
40	37.11	cis-piperitol	1.1	-	-	-	-	-
41	37.18	sesquisineol	-	-	-	-	0.2	0.8
42	37.77	γ-kadinen	-	0.3	-	-	-	-
43	37.95	β-sesquifellandren	-	-	-	-	**e**	0.7
44	41.14	Nonadekan	-	-	-	-	-	0.2
45	41.0	geroniol	e	-	e	-	e	-
46	42.34	pallustrol	-	-	0.4	0.4	0.5	0.3
47	43.59	trans-sesquisabinenhidrat	e	-	0.2	-	0.4	0.4
48	43.93	karyofillen oksit	1.1	2.5	0.9	1.6	0.7	0.7
49	44.75	(E)-nerolidol	0.3	0.2	0.1	-	-	0.1
50	44.91	ledol	1.1	0.6	1.4	1.4	1.7	1.1
51	45.17	germakren-D-4-ol	-	-	0.1	-	-	-

Tablo 5.5 (Devam)

V. agnus-castus toprak üstü kısımları uçucu yağlarının GK ve GK/KS analiz bulguları

No	RT	Bileşik	1UYMs	1UYM	2UYMs	2UYM	3UYMs	3UYM
52	45.36	humulen epoksit- II	-	0.5	-	-	-	-
53	45.45	bilinmeyen (M^+286, bp151)	-	-	1.1	2.0	2.0	2.2
54	45.92	cis-sesquisabinenhidrat	-	-	-	-	-	0.8
55	45.95	gulobulol	0.8	-	0.5	0.5	-	-
56	46.12	viridifloral	-	-	0.3	-	0.4	-
57	47.04	spatulenol	2.5	1.5	1.9	3.4	2.3	2.4
58	47.78	dimirsen-II-a	-	-	-	-	-	0.6
59	47.91	cis-*p*-ment-3-en-1,2 diol	0.7	-	-	-	-	-
60	48.08	**T-kadinol**	**11.8**	**8.5**	0.7	0.7	0.9	1.0
61	48.45	T-murolol	-	-	0.1	-	-	-
62	49.05	α-bisabolol	1.3	-	0.4	0.2	1.0	1.4
63	49.35	trans-α-bergamotol	1.1	-	0.6	0.6	0.8	0.5
64	49.52	α-kadinol	0.6	-	0.3	0.2	0.3	-
65	49.92	dimirsen-II-b	-	1.6	-	-	1.8	3.4
66	50.23	bilinmeyen (M^+272, bp134)	-	1.8	0.9	0.6	1.6	1.9
67	50.97	bilinmeyen (M^+286, bp 131145)	-	2.5	1.0	1.7	1.6	1.9
68	50.97	karyofilladienol- I	1.0	-	-	-	-	-
69	51.08	karyofilladienol-II	1.8	1.2	0.2	0.3	-	e
70	54.98	bilinmeyen (M^+272, bp 191)	-	-	0.8	0.7	4.0	1.0
71	55.01	bilinmeyen (bp 191)	-	2.0	-	-	-	-
72	57.53	bilinmeyen (M^+288 bp 191)	-	8.8	5.1	7.6	**10.2**	7.00
73	57.54	bilinmeyen (M^+270, bp 191)	7.7	-	-	-	-	-
74	57.93	bilinmeyen (M^+272, bp 204)	-	2.1	1.0	1.4	1.6	0.9
75	57.95	bilinmeyen (M^+272, bp 191)	1.9	-	-	-	-	-

Tablo 5.5 (Devam)

Vitex agnus-castus toprak üstü kısımları uçucu yağlarının GK ve GK/KS analiz bulguları

No	RT	Bileşik	1UYMs	1UYM	2UYMs	2UYM	3UYMs	3UYM
76	58.05	bilinmeyen (M^+286, bp 187)	2.6	2.2	0.7	1.4	1.6	1.5
77	63.19	manool	-	-	0.3	-	-	0.4
78	64.65	bilinmeyen (M^+**272/290**, bp 95107)	3.7	3.5	2.4	3.5	5.4	3.2
79	67.57	bilinmeyen (M^+272, bp 95)	2.8	2.1	1.1	1.9	2.0	1.3
		Tanımlanan toplam	**79.9**	**69.9**	**83.1**	**75.4**	**69.3**	**74.8**
		Tanımlanamayan toplam	**18.7**	**25.0**	**14.1**	**20.8**	**30.0**	**20.9**
		Toplam	**98.6**	**94.9**	**97.2**	**96.2**	**99.3**	**95.7**

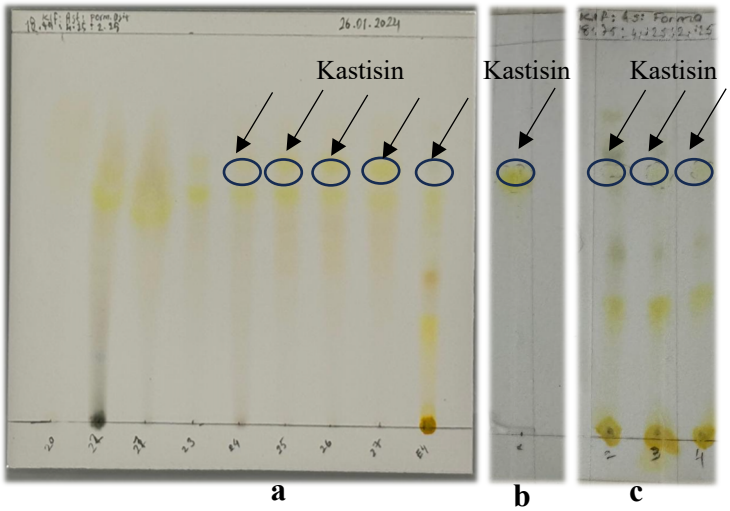
e: < 0.01

5.4.3 Kolon kromotografisi ile kastisin izolasyon bulguları

20-27 fraksiyonları İTK bulguları Görsel 5.6'da (görünür ışık), Görsel 5.7'de (UV 366 nm) verilmiştir. 24-27 arası kastisin standart ile karşılaştırılmış ve 24-27 arası kastisin bantı tespit edilmiştir. 24. fraksiyon için preparif İTK'da elde edilen ve kastisin olduğu bulunan bant (Rf: 0.64 olarak hesaplanmıştır) ve Görsel 5.8'de verilmiştir.

Görsel 5.6

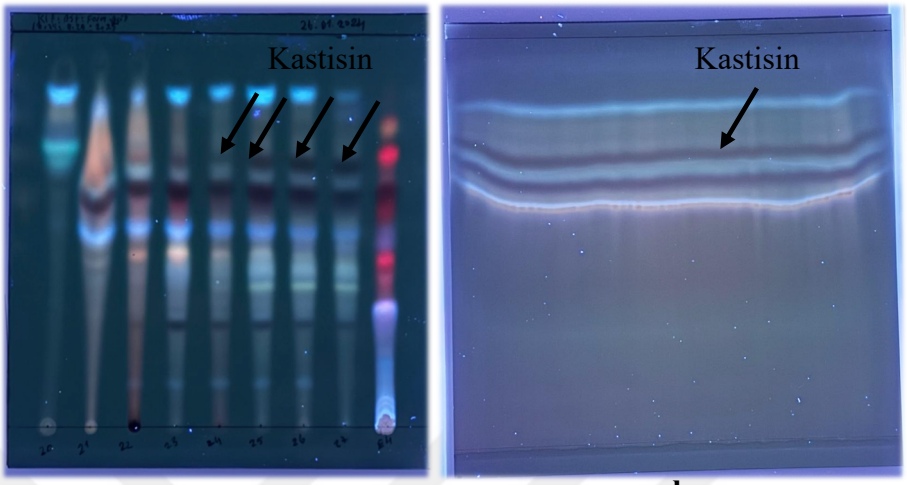
a) *20-27 fraksiyonların ve 3EM'ün* ***b)*** *kastisin'in* ***c)*** *1EMs, 2EMs, 3EM'ün İTK*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 5.7

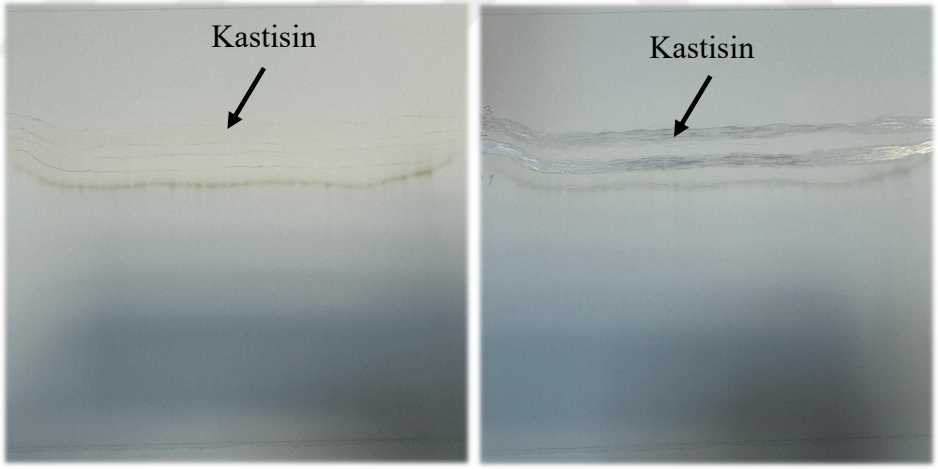
a) *20-27 fraksiyonların ve 3EM(4)'ün İTK görüntüsü (UV 366 nm) ve* ***b)*** *24. Fraksiyon preparatif İTK görüntüsü (UV 366 nm)*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 5.8

24. Fraksiyon preparatif İTK görüntüsü (görünür ışık)



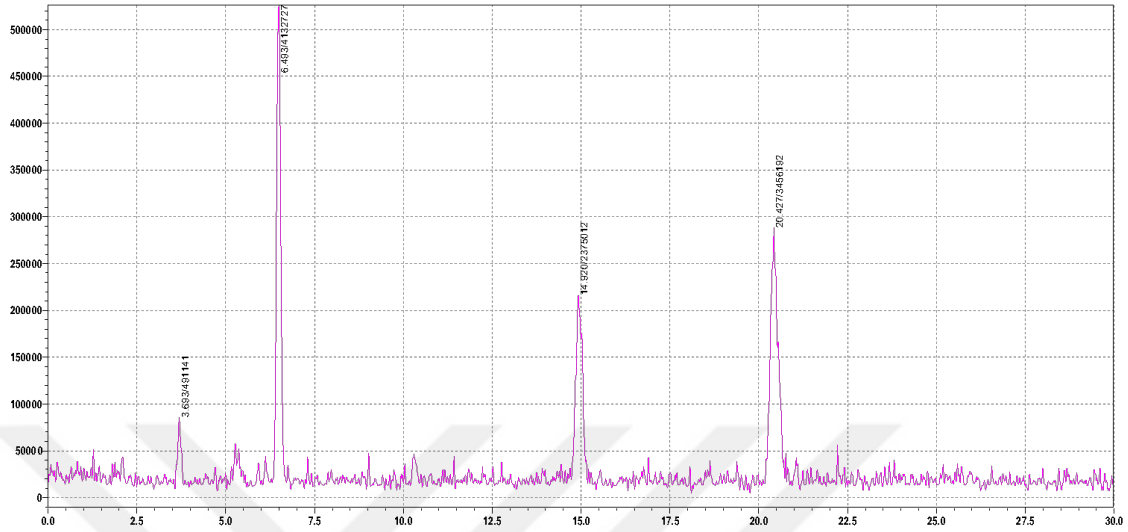
Fotoğraf: T. Tuncel

5.4.4 Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK/KS-KS) analiz bulguları

24. fraksiyona ait sıvı kromatografisi (SK) Şekil 5.1'de verilmiştir. Şekil 5.2a'da ve Şekil 5.2b'de kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK-SK) bulgularına ait kromatogram görülmektedir.

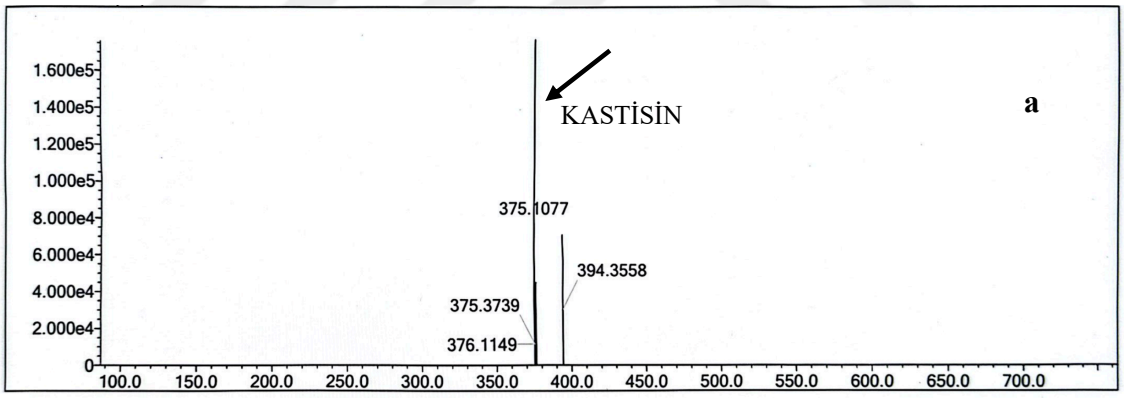
Şekil 5.1

24. Fraksiyon SK/KS-KS kromatogram

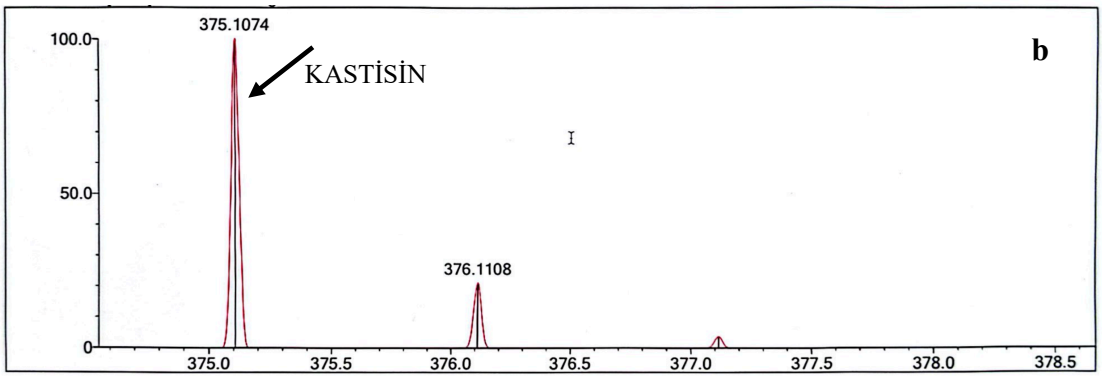


Şekil 5.2

a-b) *24. Fraksiyon SK/KS-KS molekül ağırlıklarına ait spektrum*



$C_{19}H_{18}O_8$ (M+H+) Seçilen 375.1074 m/z bölge için



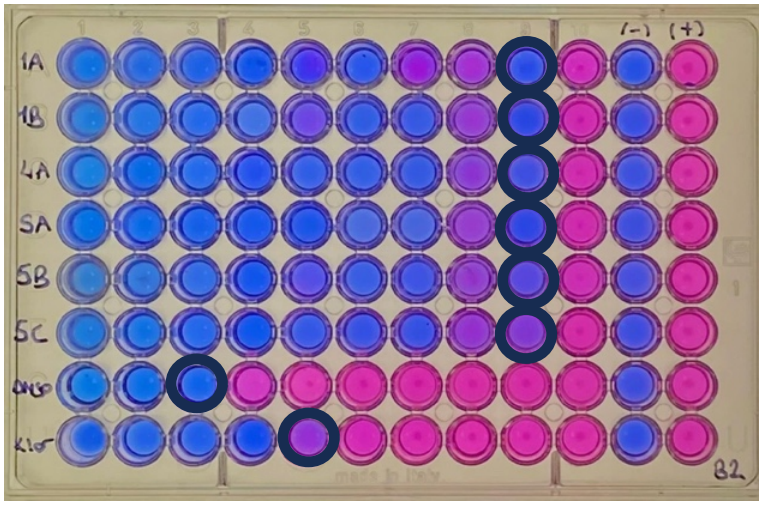
5.4.5 Biyoaktivite bulguları

5.4.5.1 Antimikrobiyal aktivite çalışması bulguları

Vitex agnus-castus 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs ve 3UYM test örnekleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 *Bacillus cereus* NRRL B-3711 ve *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde çalışılan konsantrasyonlarda etkili bulunmuştur (Tablo 5.5). Etkili uçucu yağlara ait mikroplak görüntüleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 için Görsel 5.9'da; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 için Görsel 5.10'da; *Bacillus cereus* NRRL B-3711 için Görsel 5.11'de; *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 için Görsel 5.12'de yer almaktadır. *V. agnus-castus* test örneklerinin tümü *Escherichia coli* NRRL B-3008 ve *Serratia marcescens* NRRL B-2544 üzerinde araştırılan konsantrasyonlarda etkisiz bulunmuştur. 1EMs, 2EMs, 2EM, 3EMs ve 3EM test örnekleri tüm test organizmaları üzerinde araştırılan konsantrasyonlarda etkisiz bulunmuştur. 1EM örneği *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 dışında diğer test mikroorganizmaları üzerinde araştırılan konsantrasyonlarda etkisiz bulunmuştur (Tablo 5.6).

Görsel 5.9

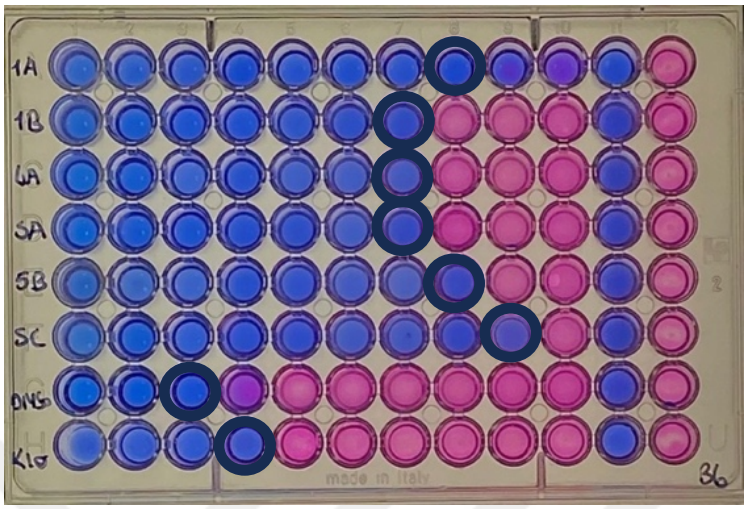
Hayıt uçucu yağlarının Staphylococcus aureus ATCC 6538 *üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 5.10

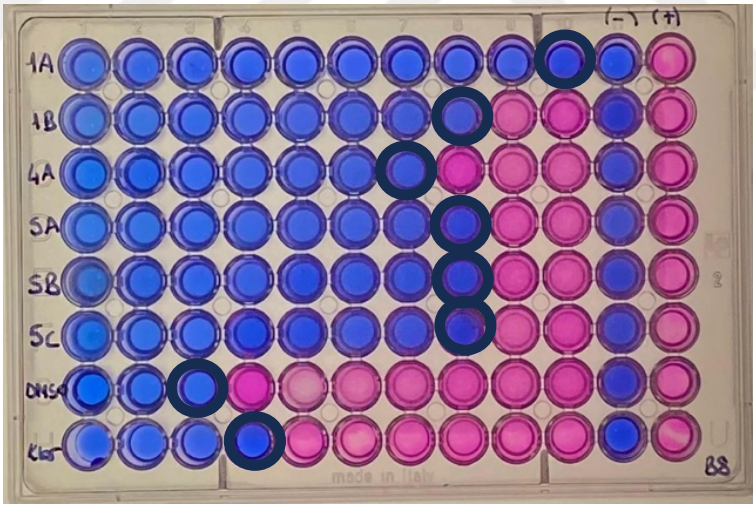
Hayıt uçucu yağlarının Salmonella typhimurium ATCC 13311 üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 5.11

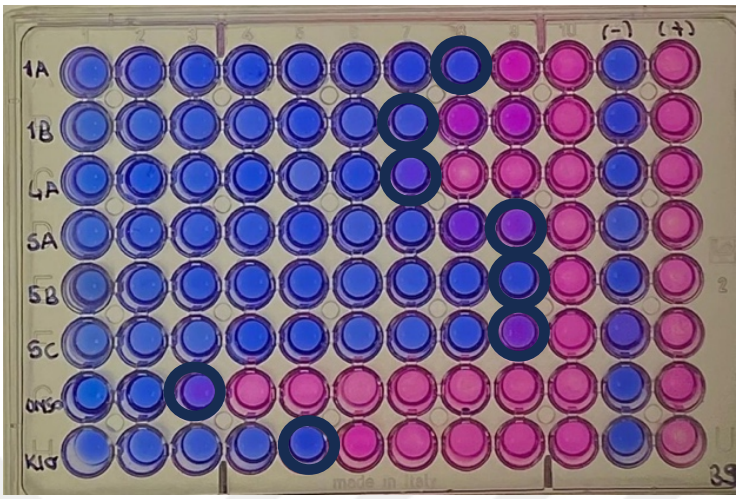
Hayıt uçucu yağlarının Bacillus cereus NRRL B-3711 *üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri*



Fotoğraf: T. Tuncel

Görsel 5.12

Hayıt uçucu yağlarının Bacillus subtilis NRRL B-4378 *üzerindeki etkisine ait mikroplak görüntüleri*



Fotoğraf: T. Tuncel

Tablo 5.6

Uçucu yağların antimikrobiyal aktivite bulguları

Test örnekleri (MIC, µg/mL)	1UYMs	1UYM	2UYMs	2UYM	3UYMs	3UYM	Klrf.
Escherichia coli NRRL B-3008	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	4
Staphylococcus aureus ATCC 6538	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	8
Salmonella typhimurium ATCC 13311	125	62,5	125	31,25	62,5	125	8
Bacillus cereus NRRL B-3711	62,5	62,5	125	62,5	15,625	62,5	8
Bacillus subtilis NRRL B-4378	125	31,25	125	31,25	62,5	31,25	4
Serratia marcescens NRRL B-2544	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	8

Tablo 5.7

Ekstrelerinin antimikrobiyal aktivite bulguları

Test örnekleri (MIC, µg/mL)	1EMs	1EM	2EMs	2EM	3EMs	3EM	Klrf.
Escherichia coli NRRL B-3008	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	4
Staphylococcus aureus ATCC 6538	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	8
Salmonella typhimurium ATCC 13311	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	8
Bacillus cereus NRRL B-3711	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	8
Bacillus subtilis NRRL B-4378	>2000	1000	>2000	>2000	>2000	>2000	4
Serratia marcescens NRRL B-2544	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	8

5.4.5.2 Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyonu bulguları

5-LOX deneyi bulguları Tablo 5.8'de yüzde inhibisyon olarak verilmiştir.

Tablo 5.8

LOX deneyi bulguları

Uçucu yağ örnekleri (10 mg/ml)	**% inhibisyon**	**Ekstre örnekleri** (10 mg/ml)	**% inhibisyon**
1UYMs	65.350±10.011	1EMs	82.116±5.269
1UYM	74.863±2.539	1EM	85.05±9.009
2UYMs	66.517±3.406	2EMs	87.257±2.213
2UYM	73.671±1.777	2EM	83.755±0.632
3UYMs	74.515±3.043	3EMs	82.861±2.529
3UYM	76.602±0.596	3EM	87.55±0.105
NDGA (0.6 mg/mL)	98.435±0.526		

5.4.5.3 Hücre kültürü yöntemi ile in vitro antikanser etki çalışmaları bulguları

5.4.5.3.1. MTT ölçümü bulguları

Vitex agnus-castus 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM ve 1EMs, 1EM, 2EMs, 2EM, 3EMs, 3EM test örnekleri IC_{50} değerleri Tablo 5.9'da görüldüğü gibidir. 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM ve 1EMs, 1EM test örnekleri PANC-1 hücre hattı üzerinde Htert-HEPNE hücrelerine zarar vermeyecek dozlarda etkili bulunmuştur. 2EMs test örneğinin çalışılan dozlarda IC_{50} değeri bulunmamaktadır. 2EM test örneği PANC-1 hücre hattı üzerinde, Htert-HEPNE IC_{50} değeri üzerindeki dozda etkili bulunmuştur.

Tablo 5.9

Vitex agnus-castus toprak üstü kısımları uçucu yağlarının ve ekstrelerinin IC_{50} *bulguları (24 saatlik)*

Uçucu yağ örnekleri (IC_{50}, µg/mL)	PANC-1	Htert-HEPNE	Ekstre Örnekleri (IC_{50}, µg/mL)	PANC-1	Htert-HEPNE
1UYMs	10.17±0.60	77.19±1.02	1EMs	35.22±17.07	>500
1UYM	30.74±4.44	45.91±4.25	1EM	72.10±20.60	>500
2UYMs	9.11±1.48	79.85±3.89	2EMs	>500	>500
2UYM	27.96±1.98	60.59±3.77	2EM	67.63±19.01	57.35±8.09
3UYMs	15.43±3.55	57.35±8.09	3EMs	>500	>500
3UYM	8.13±0.49	85.09±3.56	3EM	>500	>500
Sisplatin	27.78±3.39	belirlenmedi	Sisplatin	27.78±3.39	belirlenmedi

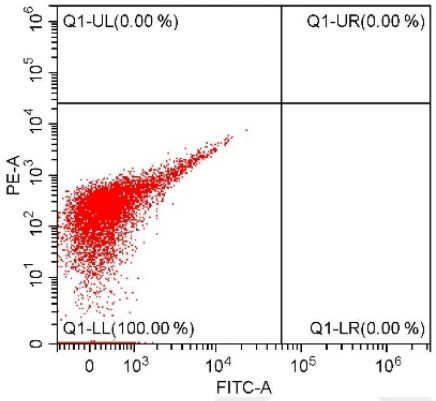
5.4.5.3.2 Annexin V FITC: Apoptozun belirlenmesi bulguları

PANC-1 hücrelerinin 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM ve 1EMs, 1EM, 2EM, test örnekleri ve sisplatin ile muamele edilmiş Annexin V FITC/Propidyum İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analizleri Şekil 5.3'te ve bu analizlerin yüzdelerine ait bulgular Tablo 5.10'da ve Tablo 5.11'de yer almaktadır.

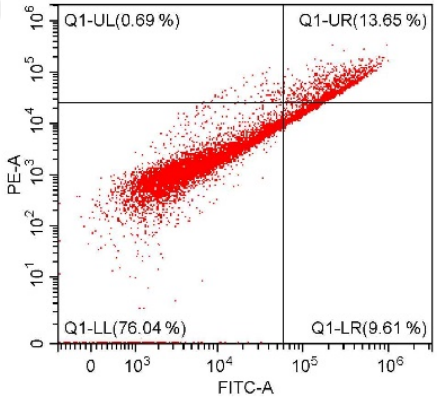
Şekil 5.3

a-e) *V. agnus-castus toprak üstü kısımlarının Annexin V FITC: Apoptoz bulguları*

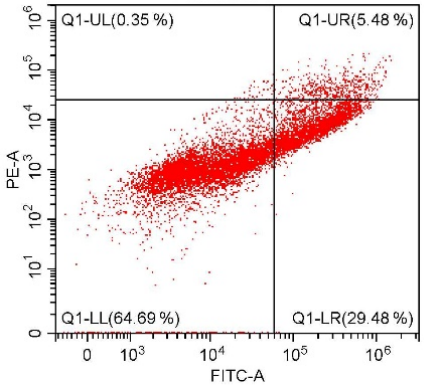
a) PANC-1 kontrol:P1



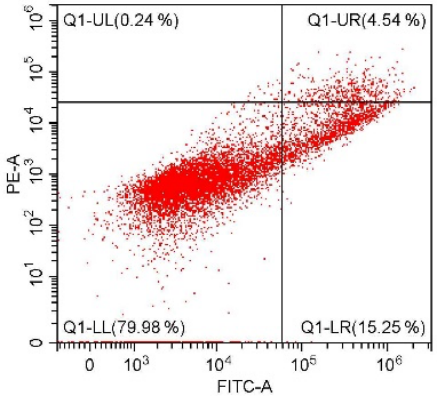
b) PANC-1-1UYMs:P1



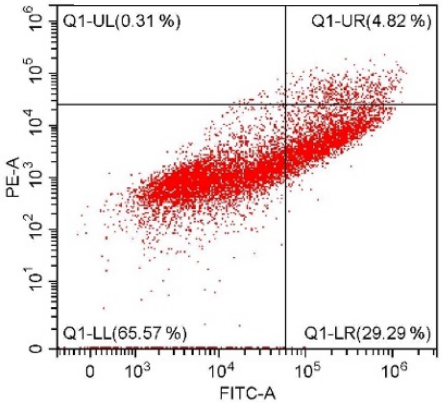
c) PANC-1-1UYM:P1



d) PANC-1-2UYMs:P1



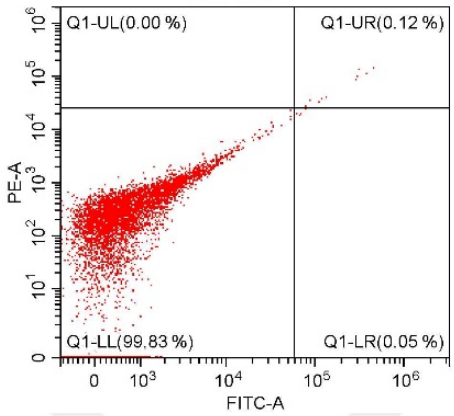
e) PANC-1-2UYM:P1



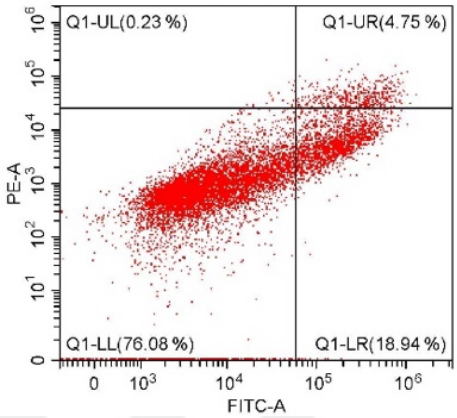
Şekil 5.3 (Devam)

f-j) *V. agnus-castus toprak üstü kısımlarının Annexin V FITC: Apoptoz bulguları*

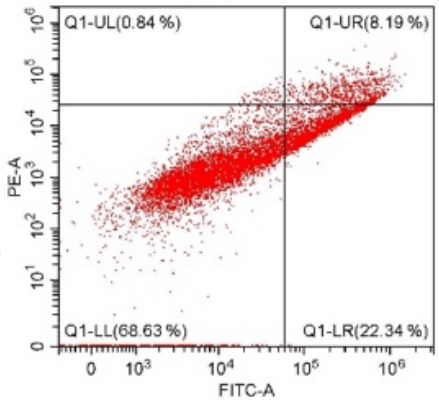
f) PANC-1-3UYMs:P1



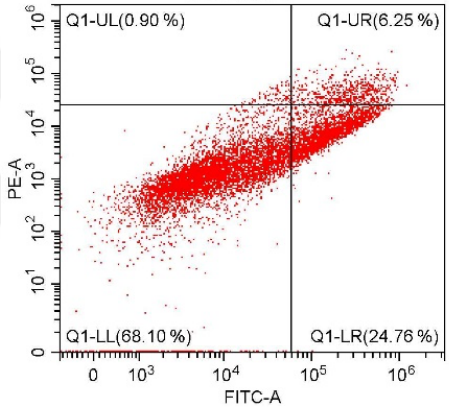
g) PANC-1-3UYM:P1



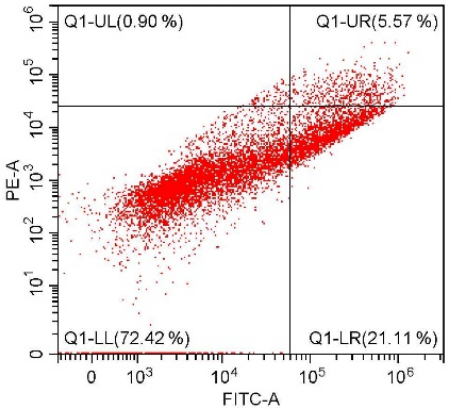
h) PANC-1-1EMs:P1



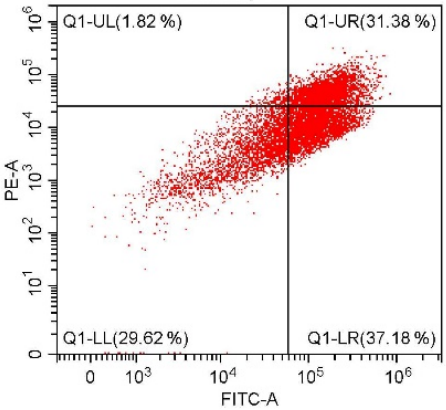
I) PANC-1-1EM:P1



i) PANC-1-2EM:P1



j) PANC-1-Sispilatin:P1



Tablo 5.10

Uçucu yağlar ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin Annexin V FITC/Propidyum İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analizinin apoptoz yüzdeleri

Test örnekleri %	Erken apoptoz hücreleri	Geç apoptoz hücreleri	Canlı hücreler
Kontrol	0.00	0.00	100.00
1UYMs	9.61	13.65	76.04
1UYM	29.48	5.48	64.69
2UYMs	15.25	4.54	79.98
2UYM	29.29	4.82	65.57
3UYMs	0.05	0.12	99.83
3UYM	18.94	4.7	76.08
Sisplatin	37.18	31.38	29.62

Tablo 5.11

Ekstreler ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin Annexin V FITC/Propidyum İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analizinin apoptoz yüzdeleri

Test örnekleri %	Erken apoptoz hücreleri	Geç apoptoz hücreleri	Canlı hücreler
Kontrol	0.00	0.00	100.00
1EMs	22.34	8.19	68.63
1EM	24.76	6.25	68.10
2EM	21.11	5.57	72.42
Sisplatin	37.18	31.38	29.62

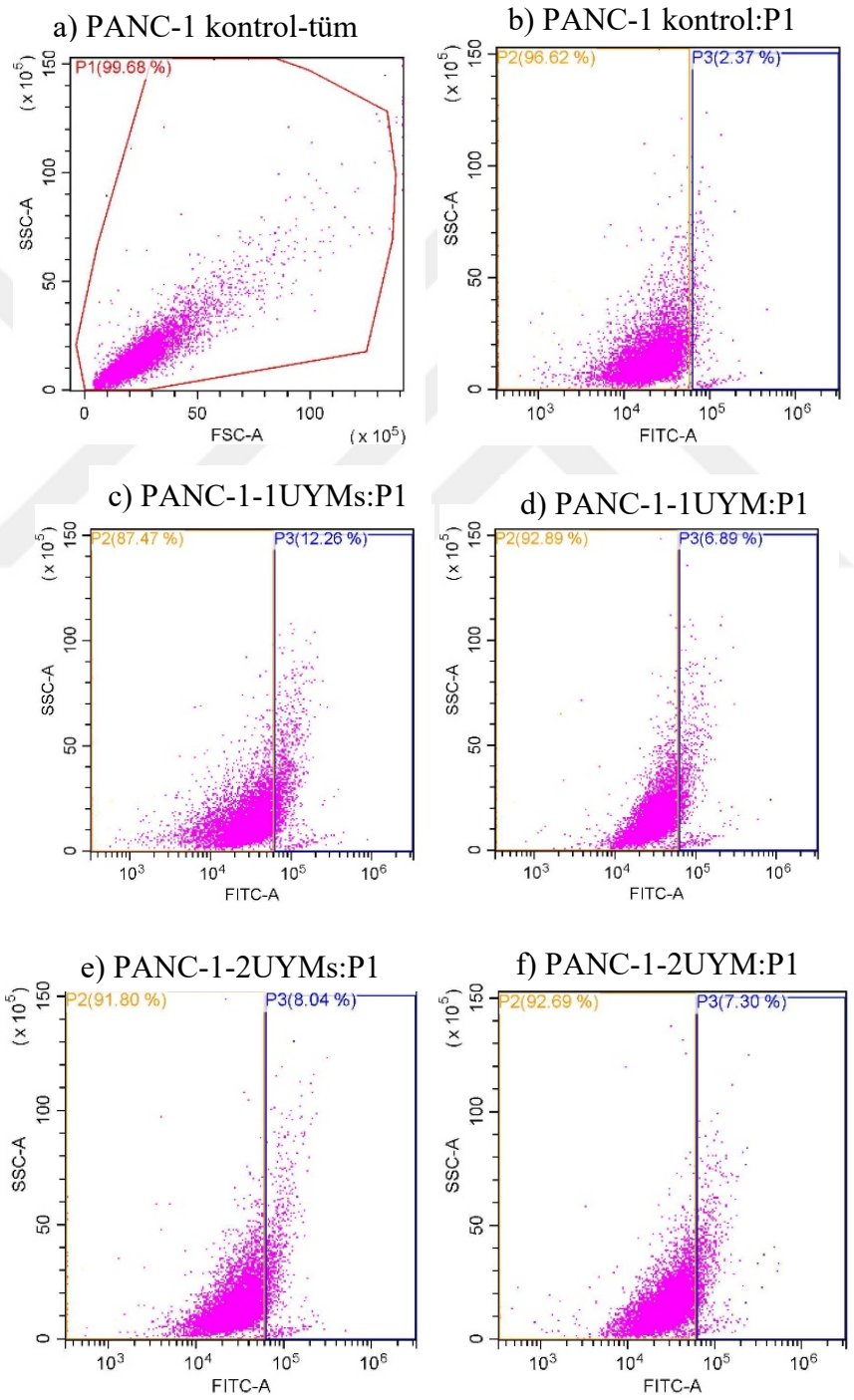
5.4.5.3.3 Annexin V FITC: Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri ile belirlenmesi bulguları

PANC-1 hücrelerinin, IC_{50} değerlerinde ekstreleri, uçucu yağları ve sisplatini ayrı ayrı içeren ortamda 24 saat boyunca kültüre edilmesiyle ve örnek başına en az 10.000 hücre analiz edilerek kaspaz-3 aktivite bulguları elde edilmiştir. PANC-1 hücrelerinin uçucu yağların ve ekstrelerin test örnekleri ve sisplatin ile muamele edilmiş Annexin V

FITC/Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analizleri kaspaz-3 için Şekil 5.4'de ve bu analizlerin yüzdelerine ait bulgular Tablo 5.12 ve Tablo 5.13'de yer almaktadır.

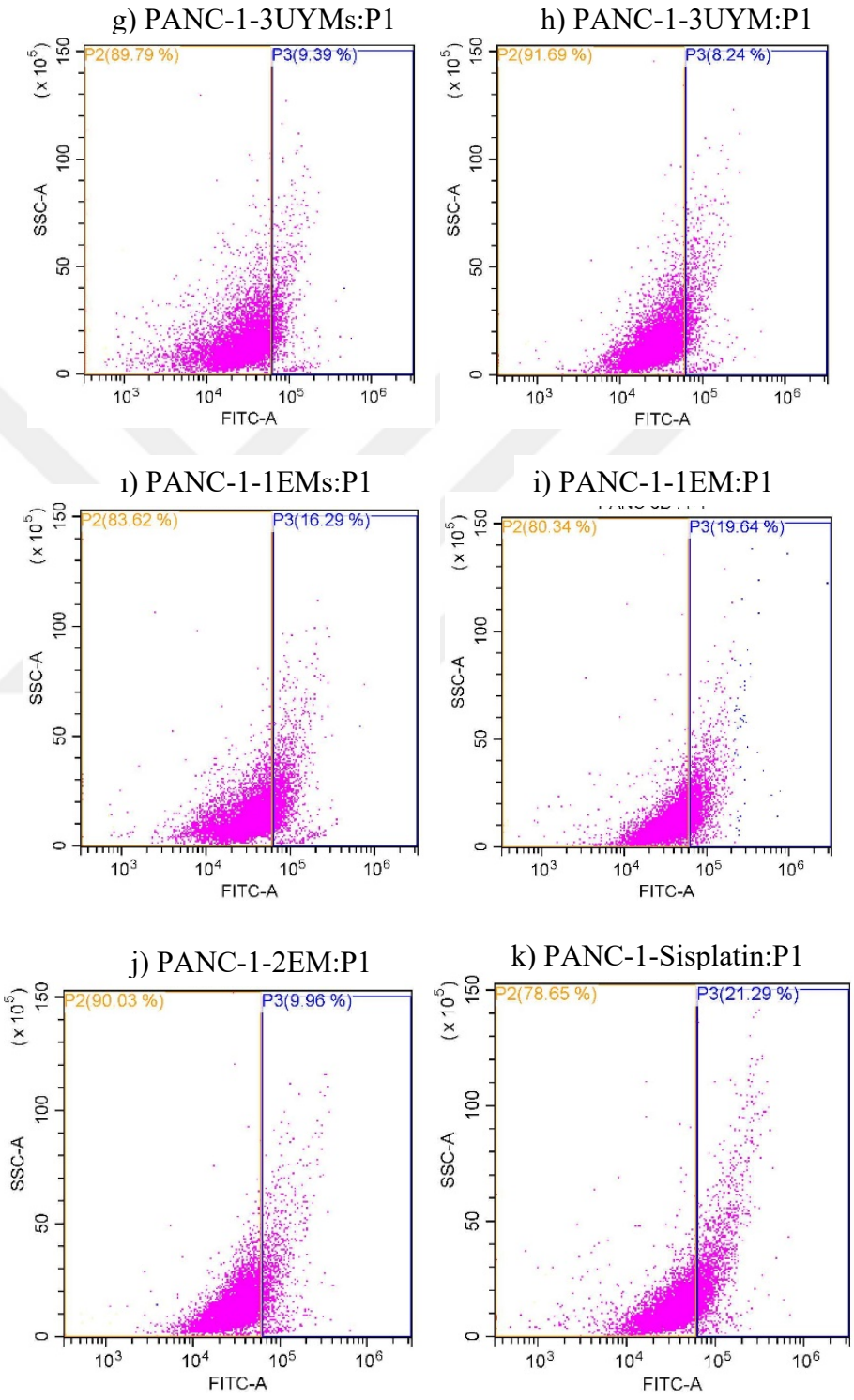
Şekil 5.4

a-f) *Vitex agnus-castus toprak üstü kısımlarının ekstreleri, uçucu yağları ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin Kaspaz-3 için Annexin V FITC/Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analiz bulguları*



Şekil 5.4 (Devam)

g-k) *V. agnus-castus toprak üstü kısımlarının ekstreleri, uçucu yağları ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin Kaspaz-3 için Annexin V FITC/Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analiz bulguları*



Tablo 5.12

Uçucu yağlar ve sisplatinle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin Kaspaz-3 pozitif ve negatif hücrelerinin yüzdeleri

Test örnekleri %	Kaspaz-3 pozitif hücreler	Kaspaz-3 negatif hücreler
Kontrol	2.37	96.62
1UYMs	12.26	87.47
1UYM	6.89	92.89
2UYMs	8.04	91.80
2UYM	7.30	92.69
3UYMs	9.39	89.70
3UYM	8.24	91.69
Sisplatin	21.29	78.65

Tablo 5.13

Ekstreler ve sisplatinle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin Kaspaz-3 pozitif ve negatif hücrelerinin yüzdeleri

Test örnekleri %	Kaspaz 3 pozitif hücreler	Kaspaz 3 negatif hücreler
Kontrol	2.37	96.62
1EMs	16.29	83.62
1EM	19.64	80.34
2EM	9.96	90.03
Sisplatin	21.29	78.65

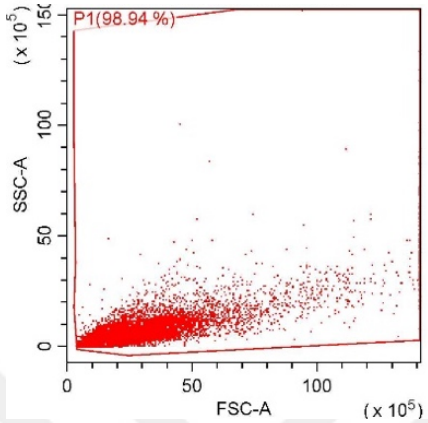
5.4.5.3.4. Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması) bulguları

PANC-1 hücrelerinin 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs, 3UYM ve 1EMs, 1EM, 2EM, IC_{50} konsantrasyonlarının PANC-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeline ilişkin kadran analizleri Şekil 5.5'te ve bu analizlerin yüzdelerine ait bulgular Tablo 5.14'te yer almaktadır.

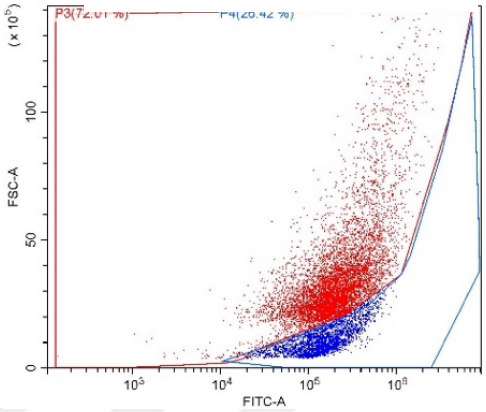
Şekil 5.5

a-f) *V. agnus-castus toprak üstü kısımlarının ekstreleri, uçucu yağları ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin JC-1 ile boyanması için Annexin V FITC /Propidium İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analiz bulguları*

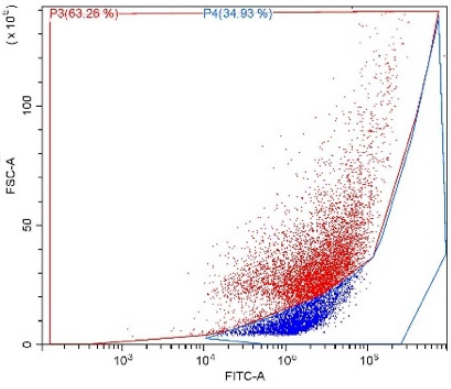
a) PANC-1 kontrol-tüm



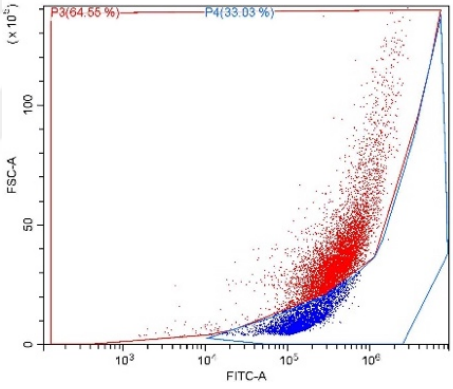
b) PANC-1 kontrol:P1



c) PANC-1-1UYMs:P1

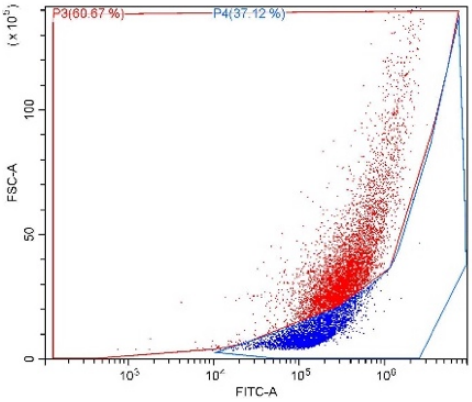


d) PANC-1-1UYM:P1

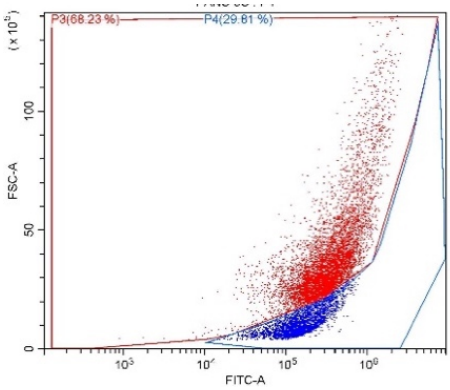


,

e) PANC-1-2UYMs:P1



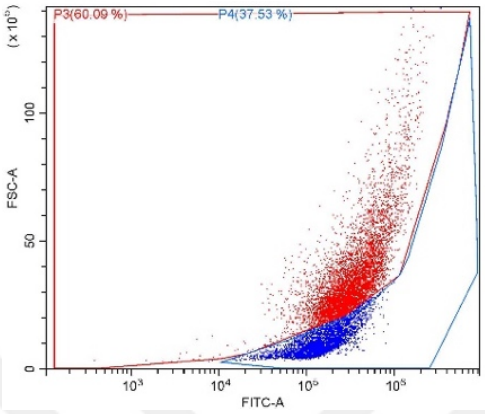
f) PANC-1-2UYM:P1



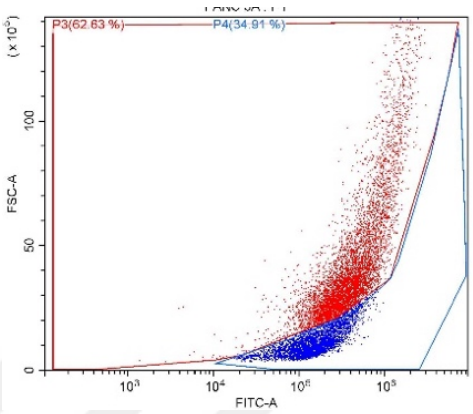
Şekil 5.5 (Devam)

g-k) *V. agnus-castus toprak üstü kısımlarının ekstreleri, uçucu yağları ve sisplatin ile muamele edilmiş PANC-1 hücrelerinin JC-1 ile boyanması için Annexin V FITC /Propidyum İyodür akış sitometrisinin tipik kadran analiz bulguları*

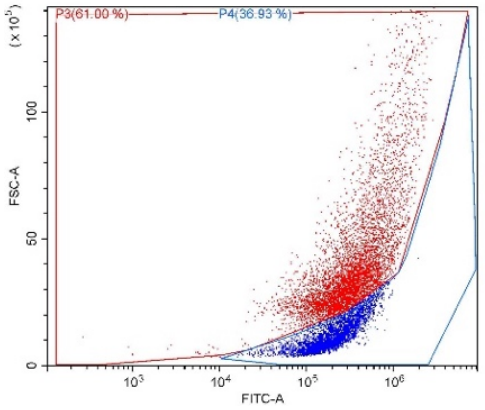
g) PANC-1-3UYMs:P1



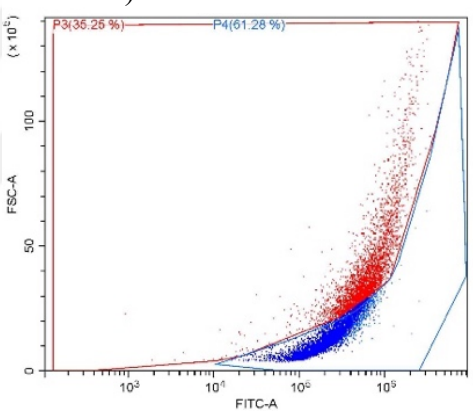
h) PANC-1-3UYM:P1



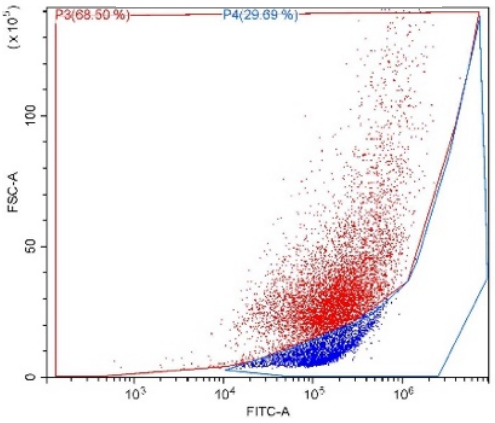
ı) PANC-1-1EMs:P1



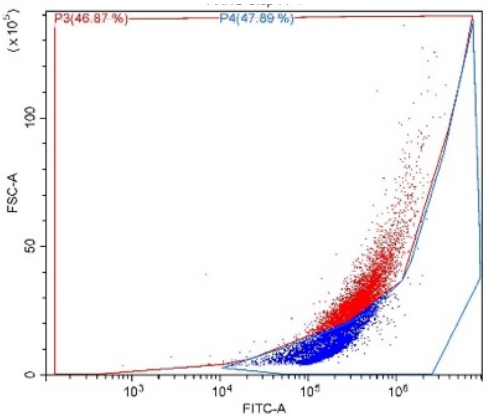
i) PANC-1-1EM:P1



i) PANC-1-1EM:P1



k) PANC-1-Sisplatin:P1



Tablo 5.14

Ekstrelerin, uçucu yağların ve sisplatinin IC_{50} konsantrasyonlarının PANC-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini azaltması

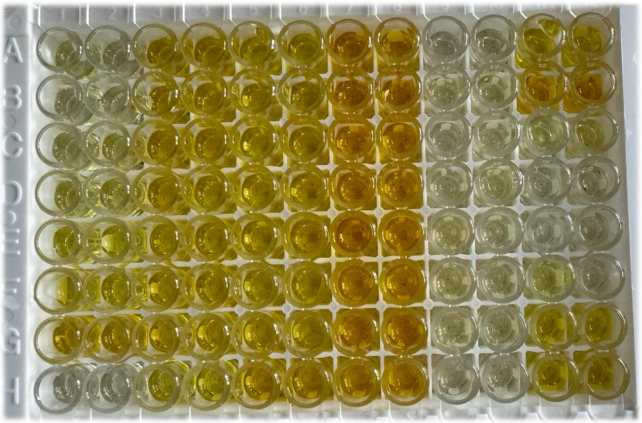
Test örnekleri	Mitokondriyal membran polarize (P3) hücreler (%)	Mitokondriyal membran depolarize (P4) hücreler (%)
Kontrol	72.01	26.42
1UYMs	63.26	34.93
1UYM	64.55	33.03
2UYMs	60.67	37.12
2UYM	68.23	29.81
3UYMs	60.09	37.53
3UYM	62.63	34.91
1EMs	61.00	36.93
1EM	35.25	61.28
2EM	68.50	29.69
Sisplatin	46.87	47.89

5.4.5.3.5. CD46 ölçümü: Human CD46 Elisa kit deneyi bulguları

V. agnus-castus toprak üstü kısımlarının uçucu yağ ve ekstrelerine ait CD46 Elisa Kit deneyine ait mikroplak görüntüsü Görsel 5.13'de, CD46 reseptör ekspresyonu ait absorbans ölçüm bulguları Şekil 5.6 (a-e)'da ve Şekil 5.7 (a-c)'de görülmektedir.

Görsel 5.13

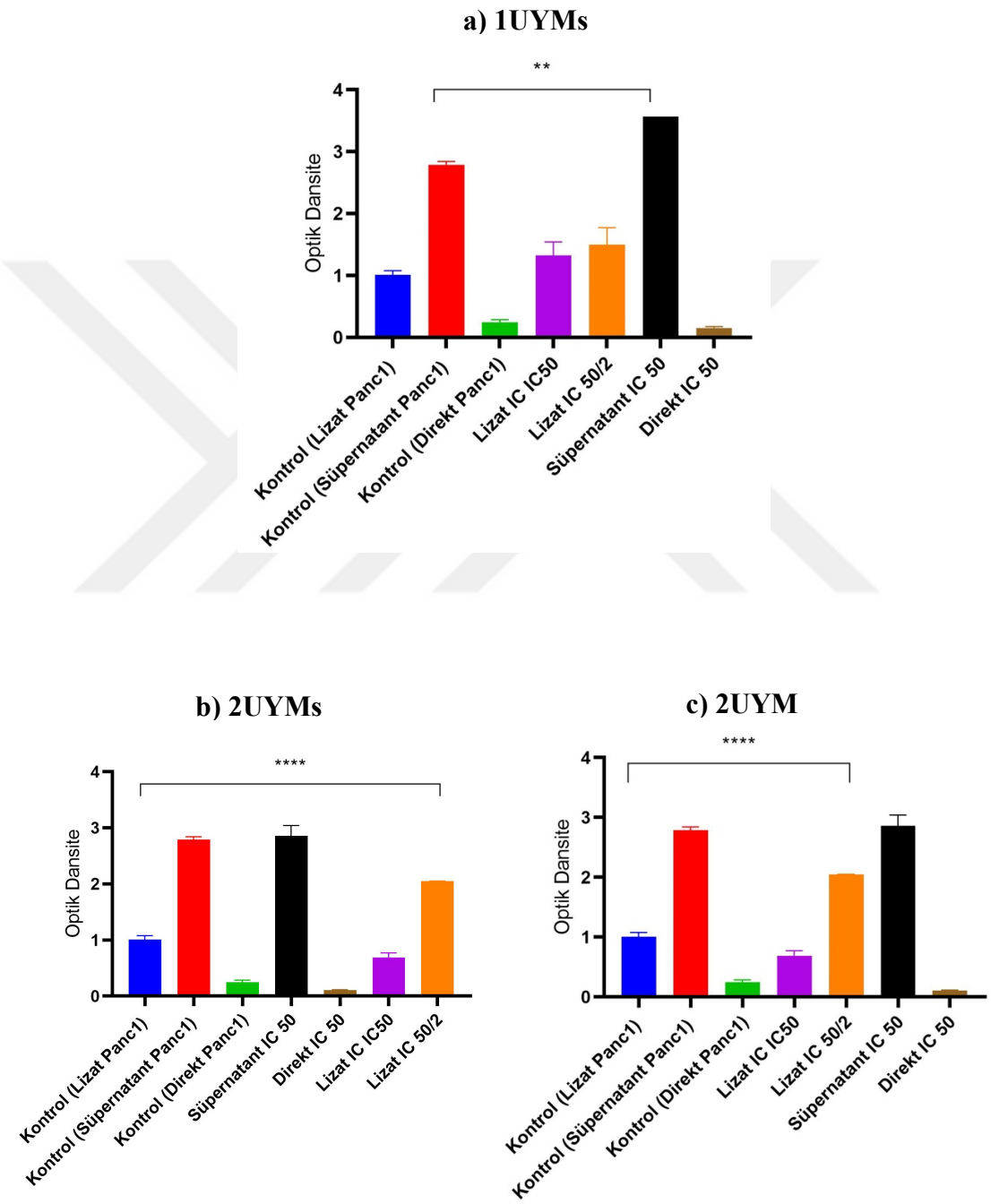
V. agnus-castus toprak üstü kısımlarının uçucu yağ ve ekstrelerine ait CD46 Elisa Kit deneyi bulguları



Fotoğraf: T. Tuncel

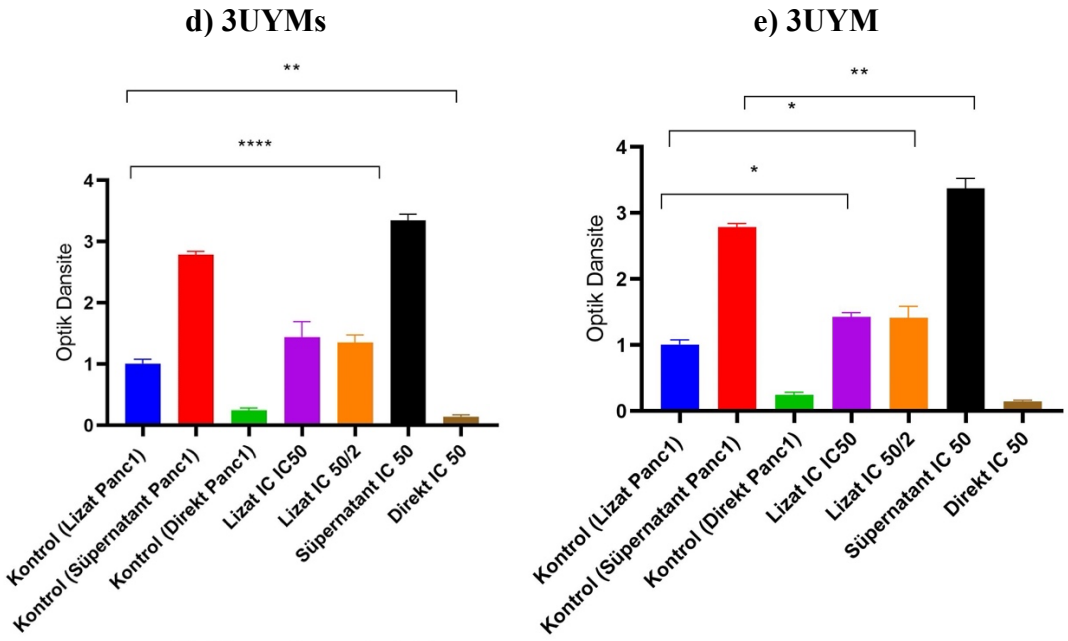
Şekil 5.6

a-c) *PANC-1 hücrelerinde uçucu yağların CD46 optik dansiteleri a) 1UYMs uygulanan örnek b) 2UYMs uygulanan örnek c) 2UYM uygulanan örnek. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) **p<0.05 (anlamlı), **** p<0.001 (yüksek düzeyde anlamlı)*



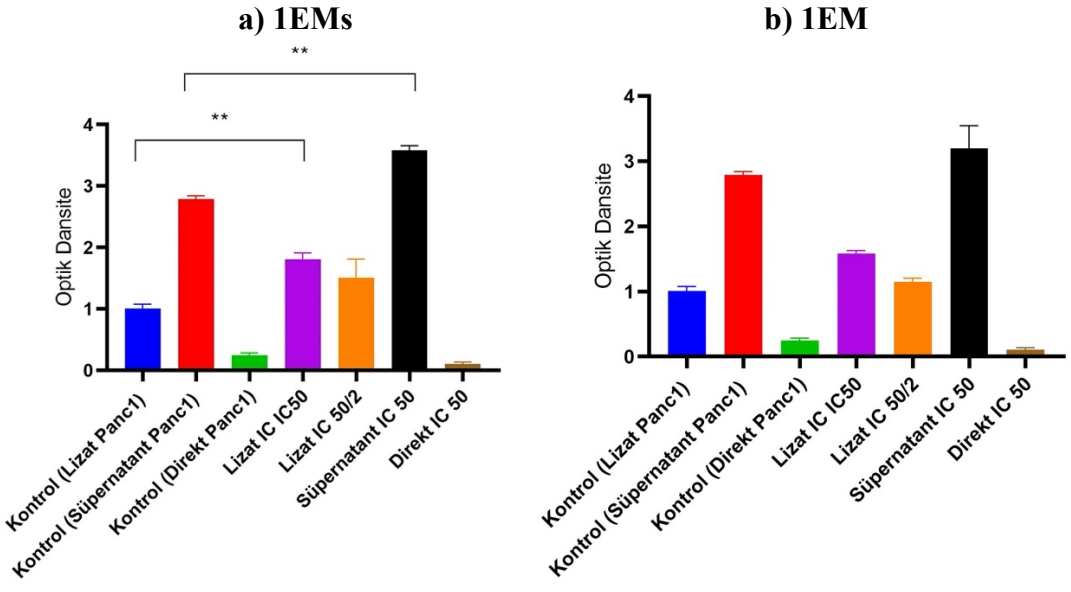
Şekil 5.6 (Devam)

d-e) *PANC-1 hücrelerinde uçucu yağlara ait CD46 optik dansite d) 3UYMs uygulanan örnek e) 3UYM uygulanan örnek. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) **p<0.05 (anlamlı) **** p<0.0001 (yüksek düzeyde anlamlı)*



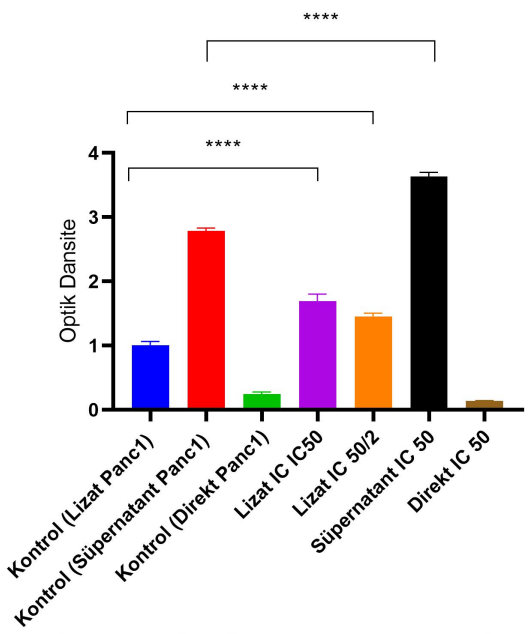
Şekil 5.7

a-b) *PANC-1 hücrelerinde ekstrelere ait CD46 optik dansite a) 1EMs uygulanan örnek b) 1EM uygulanan örnek. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) **p<0.05 (anlamlı) **** p<0.0001 (yüksek düzeyde anlamlı)*



Şekil 5.7 (Devam)

PANC-1 hücrelerinde ekstrelere ait CD46 optik dansite ***c)*** *2EM uygulanan örnek. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) **p<0.05 (anlamlı), **** p<0.0001 (yüksek düzeyde anlamlı)*



6 SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

6.1 Sonuç

6.1.1 Makroskobik inceleme sonuçları

Vitex agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M örneklerinin makroskobik incelemeler sonucunda yaprakların parmak şeklinde, üstte gri-yeşil renkte ve altta daha açık renkte, aromatik oluşu ile; çiçeklerin salkım halinde, menekşe renkli ve meyvelerin karabibere benzer oluşu ile Türkiye Florasına uygunluk gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Görsel 5.1).

6.1.2 Mikroskobik inceleme sonuçları

Vitex agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü droglarının mikroskobik incelemelerinde örtü tüyleri (Görsel 5.2a,b,c,e,f), papilsi çıkıntılar (Görsel 5.2d), mezokarp hücreleri (Görsel 5.2g,h), örtü tüyleri (Görsel 5.2ı), parenkima hücreleri (Görsel 5.2i), epikarp hücreleri (Görsel 5.2j) ve taş hücreleri (Görsel 5.2k) görülmüştür.

6.1.3 Yabancı madde miktar tayin sonuçları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımları toplandıktan ve kurutulduktan sonra incelemiş, yabancı madde olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Avrupa Farmakope 9.0'da en fazla %3 yabancı madde olarak verilen değere uygunluk gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

6.1.4 Total kül miktar tayin sonuçları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımlarına ait kül miktar ve yüzdeleri Avrupa Farmakope 9.0'da verilen en fazla %8 kül miktar değerine uygunluk gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 5.1).

6.1.5 Nem miktar tayin sonuçları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımlarına ait nem miktar tayin bulguları Avrupa Farmakope 9.0'da en fazla %10 nem olarak verilen değere uygunluk gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 5.2).

6.1.6 Uçucu yağ eldesi sonuçları

V. agnus-castus uçucu yağ elde bulguları değerlendirildiğinde uçucu yağ verimi en fazla % 0.6 ile 2UYM ve %0.5 ile 2UYM olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Uçucu yağ verimi en

az olan örnek ise 3UYMs olarak tespit edilmiştir. Bu durum lokalite, vejetasyon dönemi, toplanma saati farklılıklarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Örneklerin çiçeklenme döneminde ve meyveli dönemde uçucu yağ verimleri karşılaştırıldığında örnekler arasında belirgin bir fark olmadığı görülmektedir (Tablo 5.3).

6.1.7 Çiçeklenme ve meyveli dönemde toplanan toprak üstü kısımlarının etanol ekstraksiyonu sonuçları

V. agnus-castus 1Ms, 1M, 2Ms, 2M, 3Ms ve 3M toprak üstü kısımlarının %70'lik etanol ekstraksiyonu ile elde edilen ekstre miktarları ve verimleri incelendiğinde en yüksek verim 2EMs'de en az verim 3EM'de olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Örneklerin aynı lokaliteye ait çiçekli ve meyveli örnekleri karşılaştırıldığında çiçekli örneklerde ekstre veriminin daha fazla olduğu çıkarımı yapılabilir (Tablo 5.4).

6.1.8 İnce tabaka kromatografisi sonuçları

V. agnus-castus 1EMs, 1EM, 2EMs, 2EM, 3EMs ve 3EM örneklerinin su:metanol:etilasetat (2:4:19) çözücü sisteminde yürütülmesi ile elde edilen İTK bulguları değerlendirildiğinde bantlaşmaların birbirine benzer olduğu sonucuna varılmıştır (Görsel 5.3).

V. agnus-castus 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs ve 3UYM örneklerinin hekzan:etilasetat:formik asit (15:5:1) çözücü sisteminde yürütülmesi ile elde edilen İTK bulguları değerlendirildiğinde birbiriyle benzerlik gösterdiği görülmüştür (Görsel 5.4).

Kastisin (a) standart ile 1EMs; 2EMs; 3EM kloroform:aseton:formik asit (18.75:4.125:2.125) çözücü sisteminde yürütülmesi ile elde edilen İTK bulguları değerlendirildiğinde 1EMs; 2EMs; 3EM İTK görüntüleri kastisin ile aynı Rf değerinde bant görülmüş (Rf: 0.64) ve kastisin tespiti yapılmıştır (Görsel 5.5).

6.1.9 Uçucu yağın gaz kromotografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) analiz sonuçları

V. agnus-castus 1UYMs, 1UYM, 2UYMs, 2UYM, 3UYMs ve 3UYM GK ve GK/KS analiz bulguları değerlendirildiğinde test örneklerinin en fazla oranda içerdikleri bileşenler 1UYMs için %24.4 terpinen-4-ol; 1UYM için %16 β-karyofillen; 2UYMs için %16.4 sabinen; 2UYM için %12.6 sabinen; 3UYMs için %10 β-karyofillen ve %10.2 M^{+}288 bp 191; 3UYM için %8 α-karyofillen ve % 8.2 (Z)-β-farnasen olduğu sonucuna

varılmıştır. (Tablo 5.5). İncelenen uçucu yağların bileşenleri arasında görülen farklılıkların, lokalite, vejetasyon dönemi ve gün içindeki toplanma zamanından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

6.1.10 Kolon kromatografi ile kastisin izolasyon sonuçları

20-27 fraksiyonlara ait İTK bulguları standart ile karşılaştırıldığında kastisin ile eşleştiği sonucuna varılmıştır (Görsel 5.6, Görsel 5.7 ve Görsel 5.8). 24-27 arası kastisin standart ile karşılaştırılmış ve 24. fraksiyon ayrımının daha iyi olduğu sonucuna varılarak 24. fraksiyonda SK/KS-KS analizi gerçekleştirilmiştir.

6.1.11 Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (SK/KS-KS) analiz sonuçları

SK spektrum ve KS-KS kromotogramları analiz edildiğinde izole edilen örnek içinde 374,4 g/mol molekül ağırlıklı bileşik tespit edilmiş olup bu bileşiğin kastisin olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 5.1; Şekil 5.2a-b).

6.1.12 Antimikrobiyal aktivite çalışması sonuçları

V. agnus-castus 1UYMs MİK değerleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 üzerinde 31,25 µg/mL, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 üzerinde 125 µg/mL; *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerinde 62,5 µg/mL; *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde 125 µg/mL; 1UYM MİK değerleri; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 üzerinde 31,25 µg/mL; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 üzerinde 62,5 µg/mL, *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerinde 62,5 µg/mL, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde 31,25 µg/mL; 2UYMs MİK değerleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 üzerinde 31,25 µg/mL, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 üzerinde 125 µg/mL, *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerinde 125 µg/mL, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde 125 µg/mL; 2UYM MİK değerleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 üzerinde 31,25 µg/mL, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 üzerinde 31,25 µg/mL, *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerinde 62,5 µg/mL, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde 31,25 µg/mL; 3UYMs MİK değerleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 üzerinde 31,25 µg/mL, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 üzerinde 62,5 µg/mL, *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerinde 15,625 µg/mL, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde 62,5 µg/mL; 3UYM MİK değerleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 üzerinde 31,25

μg/mL; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 üzerinde 125 μg/mL; *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerinde 62,5 μg/mL, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde 31,25 μg/mL konsantrasyonlarda etkilidir. (Görsel 5.9-5.12 ve Tablo 5.6 ve 5.7). Test örneklerinin tümünün *Escherichia coli* NRRL B-3008 ve *Serratia marcescens* NRRL B-2544 üzerinde araştırılan konsantrasyonlarda etkisiz olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Test uçucu yağlarının ve ekstrelerinin kloramfenikol'e kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğu çıkarımı yapılmıştır. Tüm test örnekleri içinde en düşük konsantrasyonda etkili olan test örneği; *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerinde 15,625 g/mL'de etkili 3UYMs olarak tespit edilmiştir (Tablo 5.6). 1EMs, 2EMs, 2EM, 3EMs ve 3EM test örnekleri tüm test organizmaları üzerinde araştırılan konsantrasyonlarda etkisiz, 1EM örneği ise 1000 μg/ml konsantrasyonda *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 üzerinde etkili olup diğer test mikroorganizmaları üzerinde etkisiz olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 5.6).

6.1.13 Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon sonuçları

V. agnus-castus uçucu yağlarına ve ekstrelerine ait 5-LOX bulguları değerlendirildiğinde; uçucu yağ ve ekstrelerin (10 mg/mL) 5-LOX % inhibisyon etkisinin, NDGA (0.6 mg/mL) etkisine göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Uçucu yağların ekstrelere göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. 1UYMs 65.350±10.011 ve 2UYMs 66.517±3.406 % inhibisyon değerleri ile araştırılan diğer uçucu yağlara göre daha etkili bulunmuştur (Tablo 5.8).

6.1.14 Hücre kültürü yöntemi ile in vitro antikanser etki çalışmaları sonuçları

6.1.14.1 MTT sonuçları

V. agnus-castus 3 ayrı lokaliteden toplanan bitki örnekleri uçucu yağlarından 3UYM (Antalya-Manavgat yol kenarı örneği-meyveli) PANC-1 üzerindeki 24 saatlik IC_{50} değeri 8.13±0.49 μg/mL ile en etkili olduğu sonucuna varılmıştır. 3UYM (Antalya-Manavgat yol kenarı örneği-meyveli) (IC_{50}=8.13±0.49 μg/mL), 2UYMs (Muğla-Köyceğiz-D400 kara yolu yol kenarı örneği-meyvesiz)(IC_{50} değeri 9.11±1.48 μg/mL), 1UYMs (Muğla-Köyceğiz-Karabörtlen yol kenarı örneği-çiçekli) (IC_{50} =10.17±0.60 μg/mL) ve 3UYMs (Antalya-Manavgat yol kenarı örneği-çiçekli) (IC_{50}=15.43±3.55 μg/mL) pozitif kontrol olan sisplatine kıyasla (IC_{50}=27.78±3.39 μg/mL) daha etkili olarak tespit edilmiştir. Htert-HPNE'de sitotoksik etkinin düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 5.8).

Araştırılan *V. agnus-castus* ekstreleri içinde 1EMs (Muğla-Köyceğiz-D400 kara yolu yol kenarı örneği-çiçekli) (IC_{50}=35.22±17.07 µg/mL) ve 1EM (Muğla-Köyceğiz-D400 kara yolu yol kenarı örneği-meyveli) (IC_{50}=72.10±20.60 µg/mL) Htert-HPNE'de sitotoksik etkinin düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 5.9).

6.1.14.2 Annexin V FITC: Apoptozun belirlenmesi sonuçları

V. agnus-castus uçucu yağ ve ekstrelerinin PANC-1 üzerinde sitotoksik etkilerini hangi yol üzerinden gösterdiği ile ilgili gerçekleştirilen testlerden Annexin V FITC: Apoptozun belirlenmesi bulgularına göre araştırılan tüm test örneklerinin PANC-1 hücrelerini apoptoza sürüklediği sonucuna ulaşılmıştır. 1UYM hücrelerin %29.48'unu, 2UYM % 29.29'unu, 3UYM %18.94'ünü erken apoptoza sürüklemesi ile hücrelerin %37.18'ini erken apoptoza sürükleyen sisplatine yakın etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. 2UYMs, %15.25 ile meyveli örneklerin uçucu yağlarına yakın apoptoza sürüklemiştir (Tablo 5.10; Şekil 5.3). Bu durumun 2UYMs içeriğinin meyveli örnek içeriklerine yakın olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Geç apoptozda ise hücrelerin %13.65'ini apoptoza sürüklemesi ile 1UYMs'de daha etkili sonuç elde edilmiştir. Bu durumun 1UYMs'in diğer test edilen uçucu yağların majör bileşenlerinden daha farklı kompozisyona sahip olması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. 3UYMs örneğinde ise %0.17 ile en az etki olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 5.10; Şekil 5.3). Meyveli *V. agnus-castus* örneklerinden elde edilen uçucu yağların çiçekli örneklerden elde edilen uçucu yağlara göre daha çok apoptoza sürüklediği ve daha çok erken apoptoza sürüklediği çıkarımına ulaşılmıştır. Bu durumun uçucu yağların içerik analizlerinde görülen bileşik çeşiti ve miktarı farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Uçucu yağların sitotoksik etkilerinde ve bu etkileri ortaya çıkarma yollarında görülen farklılıkların test bitkilerinin toplanma yeri, vejetasyon dönemi ve gün içindeki toplanma zamanı farklılığına bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

V. agnus-castus 1EMs, hücrelerin %22.34'ünü, 1EM %24.76'sını ve 2EM %21.11'ini apoptoza sürüklemesi ile sisplatine (%37.18) göre hücrelerin daha azını olsa da apoptozu indüklediği sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 5.11; Şekil 5.3). Muğla-Köyceğiz-Karabörtlen lokalitesinden elde edilen %70 etanol ekstresinde meyveli örnek çiçekli örneğe göre daha etkili olmuştur. Ekstrelerin aralarında görülen bu farklılıklar lokalite ve toplanma zamanı ile ilgili olabilir. Araştırılan uçucu yağların ekstrelere göre apoptotik etkisinin daha iyi olduğu söylenebilmektedir.

6.1.14.3 Annexin V FITC: Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometrisi ile belirlenmesi sonuçları

Kaspaz-3 aktivite bulguları incelendiğinde 1UYMs için % 2.26, sisplatin için %21.2 olan pozitif hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldığında 1UYMs'nin PANC-1 üzerinde daha az kaspaz-3'ü aktive etttiği ancak, diğer test edilen uçucu yağlara göre daha fazla kaspaz-3 aktivitesi oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 5.4 ve Tablo 5.12). 1EMs için %16.29, 1EM için %19.64 ve 2EM için %9.96 ve sisplatin için %21.2 olan pozitif hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldığında; PANC-1 hücreleri üzerinde 2EM daha az kaspaz-3 aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 5.4 ve Tablo 5.13). 1EMs ve 1EM ise PANC-1 üzerinde sisplatine çok yakın kaspaz-3 aktivite göstermektedir. *V. agnus-castus* uçucu yağlarının aralarındaki bu farklılığın lokalite farklılığından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. 1EMs ve 1EM arasındaki etki farklılığı ise vejetasyon döneminden kaynaklı olabileceği çıkarımı yapılmıştır. Meyveli örnek çiçekli örneğe göre PANC-1 üzerinde daha fazla kaspaz-3 aktivite göstermiştir.

6.1.14.4 Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması) sonuçları

Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması) bulguları incelendiğinde tüm test örneklerinin mitokondrial membran bütünlüğünü depolarize ederek bozduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bulgularda membran bütünlüğü bozulan hücrelerin %'si sisplatin değerlerine yakındır. 3UYMs hücrelerin %37.53'ünün ve 2UYMs ise %37.12'sinin depolarizasyonuna yol açarak sisplatine (%47.89) çok yakın değerlerde membran bütünlüğünü bozmuştur. 1EM ise hücrelerin %61.28'nin depolarizasyona uğramasına yol açarak membran bütünlüğünü bozup PANC-1 hücrelerinde sisplatinden çok daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 5.5 ve Tablo 5.14).

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde uçucu yağlar içinde 1UYM PANC-1 üzerinde hem apoptotik ve kaspaz-3 üzerinden hem de hücre membran bütünlüğünde bozunmaya yol açarak etkililiğini gösterdiği sonucuna varılmıştır. 1EM ise ekstreler arasında sitotoksik etkisini hem apoptotik ve kaspaz-3 üzerinden hem de hücre membran bütünlüğünde bozunmaya yol açarak etkililiğini göstererek araştırılan ekstreler içinde en etkili sonucuna varılmıştır.

6.1.14.5 CD46 ölçümü: Human CD46 Elisa kit deney sonuçları

CD46 Elisa Kit deney bulguları incelendiğinde *V. agnus-castus* 1UYMs, 2UYM, 3UYMs ve 3UYM (uçucu yağlar) 1EMs, 1EM, 2EM (ekstreler) örnekleri uygulanmış Lizat IC_{50}, lizat IC_{50} /2, süpernatant IC_{50} CD46 optik dansiteleri ve miktarları örnek uygulanmamış lizat PANC-1 hücrelerine (kontrol) ve süpernatant PANC-1 hücrelerine (kontrol) göre daha fazla CD46 bulundurduğu tespit edilmiştir. 2UYMs örneği uygulanmış Lizat IC_{50} /2, Süpernatant IC_{50} CD46 optik dansiteleri ve miktarları örnek uygulanmamış Lizat PANC-1 hücrelerine (kontrol) ve süpernatant PANC-1 hücrelerine (kontrol) göre daha fazla CD46 bulundurduğu tespit edilmiştir (Görsel 5.13; Şekil 5.6 ve Şekil 5.7). Örnek uygulanmış ölçümlerde CD46 miktarlarının uygulanmamış örneklere göre fazla olmasından örneklerin CD46 reseptörü inhibe etmediği, aksine miktarını olumlu etkilediği çıkarımına varılmıştır. Araştırılan test örneklerinin antikor kaplı plakalara doğrudan uygulanıp gerçekleştirilen direkt uygulamada örnekler direkt PANC-1 (kontrol) ile karşılaştırıldığında CD46 optik dansitenin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Antikor inhibisyon yüzdeleri; 1UYMs %38, 2UYMs %36, 2UYM %57, 3UYMs %42, 3UYM %39, 1EM %55, 2EM %44, 1EMs %57 olarak hesaplanmıştır. Test örneklerinin antikora bağlanarak CD46 bağlanmasını engellediği, bu yüzden CD46 miktarının çok düşük ölçüldüğü sonucuna varılmıştır (Görsel 5.13; Şekil 5.6 ve Şekil 5.7). Bu sonuçlardan yola çıkılarak CD46 üzerinden konak hücrelerine bağlanan adenovirüslerin araştırılan *V. agnus-castus* uçucu yağları ve ekstreleri ile engellenebileceği çıkarımı yapılmıştır.

6.2 Tartışma

Makroskobik ve mikroskopik inceleme sonuçları literatürdeki çalışmalarla uyumludur. (Dogan, 2008; Hürkul & Köroğlu, 2018; İşcan vd. 2019 s.174-175).

Sargın Güzel, 2002'de yüksek lisans tezinde, *V. agnus-castus* meyvelerinden Kasım 1999 yılında elde edilmiş Wild Herbs of Crete rnarkalı uçucu yağ içeriğinin majör bileşeni 1,8-sineol %16.23 ve terpinen-4-ol %11.04 tespit etmiştir. Bu çalışmada ise, Muğla Köyceğiz Karabörtlen örneğinin uçucu yağı terpinen-4-ol'ü %24.4 majör bileşen olarak içermektedir. Gulsoy, 2011 ve Gulsoy Toplan vd. 2015 yılında gerçekleştirdiği Zonguldak, Edirne, Balıkesir, Muğla ve Antalya illerinden topladıkları *V. agnus-castus* meyvelerinin uçucu yağ içeriklerine ait analizlerinde tüm örneklerde bisiklogermakren'i ve Muğla, Antalya örneklerinde sabinen'i ve β-karyofillen'i majör olarak tespit etmişleridir. Duymus vd. 2014'te İzmir'den topladıkları bitkinin meyve ve meyvesiz

herba uçucu yağlarının analizlerinde major bileşeni 1,8-sineol, sabinen ve (Z)-β-farnesen olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmadaki meyveli toprak üstü örneklerin uçucu yağı az oranda bisiklogermakreni içermektedir. Muğla Döğüşbelen mevkii-D400 karayolu yol kenarı meyveli toprak üstü örneklerinin uçucu yağında sabinen, (Z)-β-farnesen ve β-karyofillen, Antalya ve Muğla Köyceğiz Karabörtlen meyveli toprak üstü örneklerin uçucu yağında ise β-karyofillen majör bileşen olarak belirlenmiştir. Çiçekli toprak üstü örneklerin uçucu yağ içerikleri meyveli toprak üstü örneklerin uçucu yağ içeriklerine benzerlik göstermesine karşın Muğla Köyceğiz Karabörtlen örneği terpinen-4-ol'ü %24.4 oranında majör bileşen olarak içermesi ile diğer örneklerin uçucu yağ içeriklerinden farklılık göstermektedir. Ayrıca çiçekli Muğla Köyceğiz Karabörtlen örneği uçucu yağ içeriği diğer örneklerden farklı olarak bisiklogermakren içermediği tespit edilmiştir.

Novak vd., 2005 yılında gerçekleştirdikleri *V. agnus-castus* yaprakları, olgunlaşmamış ve olgun meyvelerinin uçucu yağ içeriklerine ait analizlerinde α-pinen ve α-terpinil asetat kemotipleri tespit etmişlerdir. Tez kapsamında Muğla toprak üstü meyveli örneklerin uçucu yağ içerikleri α-pinen'i az oranda, α-terpinil asetatı α-pinen'e göre daha çok oranda içermektedir. Antalya toprak üstü meyveli örneklerin uçucu yağ içerikleri α-pinen'i α-terpinil asetata göre daha çok oranda içermektedir.

Sevindik vd. 2023'te beyaz, pembe ve mor *V. agnus-castus* çiçeklerinden elde ettikleri uçucu yağları analiz çalışmalarında majör bileşenleri (-)-allospatulenol, pirolo (3,2,1-jk) karbazol ve karyofillen olarak tespit etmişlerdir. Bu tezde, toprak üstü çiçekli dönemindeki Muğla ve Antalya örnekleri uçucu yağ içeriklerinde 1,8-sineol ve sabinen majör bileşen olmakla birlikte β-karyofillen bileşeni relatif yüzdesi de fazladır. Farklı olarak Muğla-Köyceğiz Karabörtlen'den toplanan çiçekli örneklere ait uçucu yağın içeriğinde β-karyofillen tespit edilmemiştir.

Küçükboyacı ve Şener 2010'da *V. agnus-castus'*un meyvelerinin etanol ekstresinin *n*-hekzan ve kloroform ekstraksiyonu sonrası kloroform fraksiyonundan kolon kromatografisi ve preparatif İTK ile kastisin izolasyon çalışmaları ve Shakir ve Awad 2017 çalışmalarındaki verilerle bu çalışma verileri karşılaştırılmış ve bu çalışmada elde edilen izolatın kastisin verilerini desteklediği düşünülmüştür.

Kavaz vd. 2022'de gerçekleştirdikleri çalışmalarında *V. agnus-castus* tohum etanol ekstresinin 156 µg/mL'de *S. aureus*, *E. coli* ve *S. typhimurium* üzerinde büyümeyi

engellediğini bildirmişlerdir. Bakr vd. 2020' de *V. castus-agnus* yaprak uçucu yağının *B. subtilis*'e karşı kloramfenikol ile karşılaştırılabilir etki gösterdiğini bulurken, *S. aureus*'a karşı daha düşük etkili bulmuşlardır. *V. agnus-castus*'un *B. subtilis*'e karşı MİK değerini 15 mg/mL tespit etmişlerdir. Bu tezde, Antalya-Manavgat ve Muğla Köyceğiz-Karabörtlen meyveli toprak üstü örneğin uçucu yağı MİK değeri, *B. subtilis* NRRL B-4378 üzerinde 31,25 µg/mL olarak daha etkili tespit edilmiştir.

V. agnus-castus'un toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinden izole edilen birkaç sekonder metabolitin lipoksijenaz inhibisyonunun analiz edildiği bir deneyde artemetin ve kastisin güçlü lipoksijenaz inhibitör potansiyeli göstermiştir (Choudhary vd., 2009). Bu çalışmada da araştırılan uçucu yağ ve ekstreler standart inhibitöre kıyasla daha az etkili olmasına rağmen etkili olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 5-LOX üzerinde etkisi araştırılan ekstreler de etkili bulunmuştur. Bu etkinin Choudhary vd.'nin 2009 çalışmalarında bildirdiği üzere kastisinin güçlü etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Duymus vd. 2014'te İzmir'den topladıkları *V. agnus-castus* bitkisinin meyveli herba uçucu yağlarının A549, MCF 7, C6 hücre hatlarına sitotoksik etkisine ait A549, MCF 7, C6 hücre hattı üzerinde IC_{50} değerlerini sırasıyla 90.0 ± 5.0, 70.0 ± 10.0, 169.7 ± 4.5 µg/mL; meyvesiz herba uçucu yağlarının ise sırasıyla 156.7+15.3, 111.7+7.6 ve 280.0 + 62.4 µg/mL olarak bulmuşlardır. MCF 7 hücre hatlarının, her iki uçucu yağa da diğerlerinden daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Meyve uçucu yağının hem A549 hem de MCF 7 hücre hatlarında apoptozu indüklediği bulunmuştur. A549, MCF 7 üzerinde meyveli örneğin apoptoz ve kaspaz-3 aktivitesini meyvesiz herbaya göre daha yüksek tespit etmişlerdir. Bu tezde, *V. agnus-castus* meyveli ve çiçekli toprak üstü uçucu yağları genel olarak sisplatine kıyasla PANC-1 hücreleri üzerinde oldukça etkili bulunmuştur. En az etkili Muğla Köyceğiz-Karabörtlen meyveli toprak üstü örneği uçucu yağı (1UYMS) 30.74±4.44 µg/mL olarak bulmuşlardır.

V. agnus-castus bileşeni olan kastisin ile ilgili araştırmalarda kastisinin çeşitli kanser hücre hatlarının büyümesini engellediği bildirilmiştir. Literatürdeki çalışmalarda araştırılan hücre hatları ile ilgili tespit edilmiş IC_{50} değeri: HL-60 (0,3 µg/mL) ve U-937 (0,4 µg/mL); mol/L); HeLa (2,8 µg/mL); K562 (5,9 µmol/L), Kasumi-1 (4,8 µmol/L mol/L); Hs578T (0,25 µmol/L) ve MCF-7 (0,53 µmol/L); PLC/PRF/5 (9,4 µmol/L) (Chan vd., 2018). Ding vd. 2012'de gerçekleştirdiği çalışmada kastisinin PANC-1 hücreleri

üzerinde büyümeyi inhibe edici etkisi olduğunu bildirmişlerdir ve 10 μM'de, kontrol grubuna kıyasla 24 saat sonra istatistiksel olarak anlamlı bir büyüme inhibisyonu gözlemişlerdir. Ayrıca maksimum büyüme inhibisyonu, yaklaşık %90 olan 80 μM'de bulmuşlardır. G2/M fazında pankreas kanseri hücre döngüsünün durdurulması üzerinde büyümeyi engelleyici etkiye sahip olduğunu ve ayrıca antiapoptotik protein Bcl-2'nin aşağı regülasyonu yoluyla apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (Ding vd. 2012). Bu tezde, ekstreler içerisinde PANC-1 üzerinde en etkili olanı 35.22±17.07 μg/mL IC_{50} değeri ile Muğla Köyceğiz-Karabörtlen çiçekli toprak üstü ekstresi (1EMs) bulunmuştur. Ancak bu etki sisplatine ve uçucu yağlara kıyasla daha düşüktür.

Zubaidy 2014 yılında gerçekleştirdiği çalışmasında *V. agnus castus* metanol yaprak ekstrelerinin T47D meme kanseri hücre hattı üzerinde IC_{50} değeri 92.82 μg/mL olarak bulmuştur (Al-Zubaidy, 2014). Literatür ile karşılaştırmalar neticesinde de diğer kanser hücre hatlarındaki etkinliklerine kıyasla bu çalışmada araştırılan ekstreler içerisinde en etkili 1EMs'in ve uçucu yağların genelinde apoptotik, kaspaz-3 ve mitokondriyal membran bütünlüğünü bozarak PANC-1 üzerinde güçlü antikanser etkinlik gösterdiği söylenebilir.

6.3 Öneriler

Bu yüksek lisans tezinde *V. agnus-castus* uçucu yağları ve %70'lik etanol ekstreleri farmakognozik ve farklı biyoaktiviteleri açısından detaylı araştırılmış olup bu tez sonuçlarının ileriki çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir. Muğla Köyceğiz Karabörtlen örneğinin terpinen-4-ol'ü %24.4 oranında majör bileşen olarak içermesi literatüre farklı bir katkı olarak düşünülmekte ve uçucu yağının burada araştırılan aktiviteleri ile ilişkisinin araştırılabileceği düşünülmektedir. *V. agnus-castus* bitkisi uçucu yağları ve %70'lik etanol ekstreleri ile ilgili antimikrobiyal ve 5-LOX inhibisyon çalışmalarının az olması ve bu tez ile bu açıdan yeni bilgiler sağlamış olması, bitki üzerinde antimikrobiyal ve 5-LOX açısından antiinflamatuar etkileri ile ilgili detaylı çalışmalar yapılabileceğini öngörmektedir. Üç farklı lokaliteden toplanan *V. agnus-castus* bitkisinin ekstre ve uçucu yağlarının pankreas kanseri hücre hattına karşı antikanser etkileri apoptotik yolak üzerinden bu tez kapsamında değerlendirilmiş olup sonuçların literatüre katkıda bulunabileceği ve *in vivo* çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu tez çalışmasının CD46 deneylerinden elde edilen bilgilerin adenovirüs üzerinde *in vitro* olarak antiviral etki mekanizmalarının aydınlatılmasında yol

gösterici olabileceği çıkarımına varılmıştır. Adenovirüs yüzeylerine bağlanarak viral aktivitesinin engellenebileceği hedefe yönelik ilaç araştırmalarında test edilen *V. agnus-castus* uçucu yağlarının ve ekstrelerinin potansiyel olabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKÇA

Ababutain, I. M., & Alghamdi, A. I. (2021). In vitro anticandidal activity and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) screening of *Vitex agnus-castus* leaf extracts. *PeerJ*, *9*, e10561. https://doi.org/10.7717/peerj.10561

Al-Zubaidy, A. A. (2014). Anti-proliferative activity of Vitex agnus castus methanol leaves extract on Human ductal breast epithelial tumor cell line T47D.

Allahtavakoli, M., Honari, N., Pourabolli, I., Kazemi Arababadi, M., Ghafarian, H., Roohbakhsh, A., Esmaeili Nadimi, A., & Shamsizadeh, A. (2015). *Vitex agnus castus* extract ımproves learning and memory and ıncreases the transcription of estrogen receptor α in hippocampus of ovariectomized rats. *Basic and clinical neuroscience*, *6*(3), 185–192.

Altunay, C., & Taştan, Ö. (2023). *Vitex agnus-castus*: Beneficial Properties, Clinical Studies, and Potential Future Applications in Food . *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, *11*(11), 2185-2193. https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i11.2185-2193.6114

Amann W, 1975. *Akne vulgaris* and *Agnus castus* (AgnolytR). *Allgemeinmedizin* 51: 1645-1648.

Antolić, A. & Ź. Maleś. (1997). Quantitative analysis of the polyphenols and tannins of Vitex agnus-castus. *Acta Pharm., 47*, 207–211.

Aslantürk, Ö.S., & Çelik, T.A. (2013). Antioxidant activity and anticancer effect of Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) seed extracts on MCF-7 breast cancer cells. *Caryologia, 66*, 257-267.

Aydamırov, A. S. (2020). Çeşitli antiviral ajanların adenovirüse karşı etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi. *Çukurova Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı Doktora Tezi*.

Bakr, R. O., Zaghloul, S. S., Hassan, R. A., Sonousi, A., Wasfi, R., & Fayed, M. A. A. (2020). Antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* Essential Oil and Molecular Docking Study of Its Major Constituents. *Journal of Essential Oil Bearing Plants, 1–10.* doi:10.1080/0972060x.2020.1727

Balpınar, N., Okmen, G., Vurkun, M. (2019). Antibacterial and antioxidant activities of *Vitex agnus-castus* L. against mastisis pathogens. *Fresenius Environmental Bulletin, Volume 28, No 12A*, page 9731-9737.

Baylac, S. ve Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *Int. J. Aromather., 13* (2-3), 138-142.

Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları, İstanbul.

Belic, I., Bergant-Dolar, J., & Morton, R. A. (1961). *485.* Constituents of *Vitex agnus castus* seeds. Part I. Casticin. *Journal of the Chemical Society (Resumed), 2523.* doi:10.1039/jr9610002523

Berger, D., Schaffner, W., Schrader, E., Meier, B., & Brattström, A. (2000). Efficacy of *Vitex agnus castus* L. extract Ze 440 in patients with premenstrual syndrome (PMS). *Archives of Gynecology and Obstetrics, 264*(3), 150-153. doi:10.1007/s004040000123

Bleier W. (1959). Therapie von Zyklus-und Blutungsstörungen und weiteren endokrin bedingten Erkrankungen der Frau mit pflanzlichen Wirkstoffen [Use of plant substances in the therapy of menstruation & bleeding disorders & other endocrine diseases of women]. *Zentralblatt fur Gynakologie*, *81*(18), 701-709.

Blumenthal, M., Busse, WR, Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, CW ve Rister, RS, editörler (1998). *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines* , Austin, TX/Boston, MA, Amerikan Botanik Konseyi/Bütünleşik Tıp İletişimleri.

Boujbiha, M. A., Chahdoura, H., Adouni, K., Ziani, B. E. C., Snoussi, M., Chakroun, Y., Ciudad-Mulero, M., Fernández-Ruiz, V., Achour, L., Selmi, B., Morales, P., Flamini, G., & Mosbah, H. (2023). Wild *Vitex agnus-castus* L.: Phytochemical Characterization, Acute Toxicity, and Bioactive Properties. *Molecules*, *28*(13), 5096. https://doi.org/10.3390/molecules28135096

Catalogue of Life (2019). Annual Checklist: Taxonomic Tree. 2019. Available online: http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2019/browse/tree/id/c0ad8fe8ccf5c8738376cf6778 4a1c03 [Erişim Tarihi: 05.2025].

Celep F. ve Dirmenci T. (2017). Systematic and biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. Natural Volatiles and Essential Oil Research 4 (4): 14-27.

Cengiz, M., Bardakci, Z., Erdoğan, Y. (2003). Olgun, A., "Analysis of fatty acids obtained from the fruit of *Vitex agnus-castus" Int. J. Chem.,* 13(3), 127-131.

Chadha, A. S., Khoo, A., Aliru, M. L., Arora, H. K., Gunther, J. R., & Krishnan, S. (2016). Recent Advances and Prospects for Multimodality Therapy in Pancreatic Cancer. *Seminars in radiation oncology*, *26*(4), 320-337. https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2016.05.002

Chan, E. W. C., Wong, S. K., & Chan, H. T. (2018). Casticin from Vitex species: a short review on its anticancer and anti-inflammatory properties. *Journal of Integrative Medicine, 16*(3), 147–152. doi:10.1016/j.joim.2018.03.001

Chen, S.-N., Friesen, J. B., Webster, D., Nikolic, D., van Breemen, R. B., Wang, Z. J., … Pauli, G. F. (2011). Phytoconstituents from *Vitex agnus-castus* fruits. *Fitoterapia, 82*(4), *528–533.* doi:10.1016/j.fitote.2010.12.0

Choudhary, M. I., Azizuddin, Jalil, S., Nawaz, S. A., Khan, K. M., Tareen, R. B., & Atta-ur-Rahman. (2009). Antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from *Vitex agnus-castus*. *Phytotherapy Research, 23*(9), *1336-1339.* doi:10.1002/ptr.2639

Chung, S.-T., Huang, Y.-T., Hsiung, H.-Y., Huang, W.-H., Yao, C.-W., & Lee, A.-R. (2015). Novel Daidzein Analogs and Theirin VitroAnti-Influenza Activities. *Chemistry & Biodiversity, 12*(4), 685–696. doi:10.1002/cbdv.201400337

CLSI. (2006). Methods for dilütion antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, 26.

Cossuta, D., Simándi, B., Vági, E., Hohmann, J., Prechl, A., Lemberkovics, É., … Keve, T. (2008). Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. *The Journal of Supercritical Fluids, 47*(2), 188–194. doi:10.1016/j.supflu.2008.07.014

Cress R. D., Yin D., Clarke L., Bold R., Holly E.A. (2006). Survival among patients with adenocarcinoma of the pancreas: a population-based study (United States). *Cancer Causes & Control : CCC.;17*(4):403-409. doi: 10.1007/s10552-005-0539-4. PMID: 16596292.

Çetin H., Yanikoglu A., Çilek J.E. (2011). Larvicidal activity of selected plant hydrodistillate extracts against the house mosquito, *Culex pipiens*, a West Nile virus vector. *Parasitol Res*; *108*:943-8.

Daniele, C., Coon, J.T., Pittler, M.H. *et al. Vitex agnus castus*. (2005). *Drug-Safety 28,* 319–332. https://doi.org/10.2165/00002018-200528040-00004

Ding C., Khan M., Zheng B., Yang J., Zhong L., Ma T. (2012). Casticin induces apoptosis and mitotic arrest in pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *Afr J Pharm Pharmacol.; 6*(6): 412−8. doi: 10.5897/AJPP11.830

Dirmenci, T. (2012). *Vitex* L. In: Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Edits., Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M.T., Eds.; Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, Türkiye, s. 602.

Dogan, Y., Ay, G., & Kozuharova, E. (2008). A study on the anatomical characteristics of *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae). *Phytologia Balcanica*, *14*(1), 97-101.

Duymuş, H. G., Çiftçi, G. A., Yıldırım, Ş. U., Demirci, B., & Kırımer, N. (2014). The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. *Industrial Crops and Products, 55,* 33-42. doi:10.1016/j.indcrop.2014.01.041

Ekundayo, O., Laakso, I., Holopainen, M., Hiltunen, R., Oguntimein, B., & Kauppinen, V. (1990). The Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Oil of *Vitex agnus-castus L. Journal of Essential Oil Research, 2*(3), 115-119. doi:10.1080/10412905.1990.9697

Eryiğit, T., Çig, A., Okut, N., Yildirim, B., & Ekici, K. (2015). Evaluation of Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Vitex agnus castus* L. Fruits' Essential Oils from West Anatolia, Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18*(1), 208–214. doi:10.1080/0972060x.2014.976665

ESCOP Monographs. (2003). *The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products.* New York: Thieme.

European Pharmacopoeia 9.0., (2016). Volume 1, 1231-1232.

Fakir, H., Erbaş, S. ve Dönmez, E. (2014). Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.)'da Farklı Toplama Zamanlarının Uçucu Yağ Oranı ve Bileşenleri Üzerine Etkisi, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* Cilt. 1, No. 2, S. 25-28.

Ghannadi, A., Bagherinejad, M., Abedi, D., Jalali, M., Absalan, B., & Sadeghi, N. (2012). Antibacterial activity and composition of essential oils from Pelargonium graveolens L'Her and *Vitex agnus-castus* L. *Iranian journal of microbiology*, *4*(4), 171–176.

Girman, A., Lee, R., & Kligler, B. (2003). *An integrative medicine approach to premenstrual syndrome. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 188*(5), S56–S65. doi:10.1067/mob.2003.403

Gomaa, C.S., El-Moghazy, M.A., Halim, F.A., El-Sayyad, A.E. (1978). "Flavonoids and iridoids from *Vitex agnus-castus*" *Planta Med*., *33*(3), 277.

Goncalves, J. (2001). Antiviral effect of flavonoid-rich extracts of (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine, 8*(6), 477-480. doi:10.1078/s0944-7113(04)70069-0

Görler, K., Oehlke, D., & Soicke, H. (1985). Iridoid führung von *Vitex agnus-castus. Planta Medica, 51*(06), 530-531. doi:10.1055/s-2007-969589

Gruenwald J., Brendler T. & Jaenicke C. (2007). PDR for herbal medicines. Thomson, Reuters.

Gülsoy G., Kürkçüoğlu M., Başer K.H.C., Sariyar G. (2011). Variation in the essential oil composition of the fruits of *Vitex agnus-castus*, *Planta Med., 77*, 1302.

Gülsoy, G. (2011). *Vitex agnus-castus* (Hayıt) Meyvelerinin Fitoterapi Açısından Değerlendirilmesi. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD. Yüksek Lisans Tezi*. İstanbul.

Gülsoy Toplan, G., Kurkcuoglu, M., Husnu Can Baser, K., & Sariyar, G. (2015). Composition of the essential oils from samples *of Vitex agnus-castus* L. growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research, 27*(4), 337-342. doi:10.1080/10412905.2015.1025920

Hadju, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupko, I., Falkay, G., Cossuta, D., Mathe, I. (2007)."Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents" *Phytotherapy Res., 21*(4), 391-394.

Harley R. M., Atkins S., Budantsev A., Cantino P. H., Conn B. et al. (2004). Labiatae. In: Kadereit J.W. (ed.). The families and genera of vascular plants (Kubitzki K.: ed.). Volume 7, pp. 167-275

Heskes, A. M., Sundram, T. C. M., Boughton, B. A., Jensen, N. B., Hansen, N. L., Crocoll, C., … Pateraki, I. (2018). Biosynthesis of bioactive diterpenoids in the medicinal plant *Vitex agnus-castus* . *The Plant Journal, 93*(5), 943-958. doi:10.1111/tpj.13822

Hirobe, C., Palevitch, D., Takeya, K. and Itokawa, H. (1994). Screening test for antitumor activity of crude drugs (IV) studies on cytotoxic activity of Israeli medicinal plants. *Natural Medicines*, *48*: 168-170.

Hirobe, C., Qiao, Z.S., Takeya, K. and Itokawa, H. (1997). Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus. Phytochemistry, 46*: 521-524.

Hirobe, C. and Kunio, O. (2000). Cytotoxic effect of *Vitex agnus-castus* extract on human cultured uterine cervical fibroblasts and breast and ovarian cancer cells. *Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica, 52*(10): 1449-1456.

Hoberg, E. (1999). Phytochemical and analtical investigations of *Vitex agnus-castus* L. *Degree of Doctor of Natural Sciences*.

Hoberg, E., Orjala, J., Meier, B., Sticher, O. (1999). "Diterpenoids from the fruits of *Vitex agnus-castus" Phytochemistry, 52*, 1555-1558.

Hochmuth, D. H. (2008). MassFinder 4.0, Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg, Germany

Horio, Y., Sogabe, R., Shichiri, M., Ishida, N., Morimoto, R., Ohshima, A., & Isegawa, Y. (2020). Induction of a 5-lipoxygenase product by daidzein is involved in the regulation of influenza virus replication. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 66*(1), 36–42. doi:10.3164/jcbn.19-70

Hürkul, M. M., & Köroğlu, A. (2018). Morphological and anatomical studies on hayıt fruit fructus agni-casti and leafs sold in the market. *Biological Diversity and Conservation, 11*(2), 47-59.

Ibrahim, N. A., Shalaby, A. S., Farag, R. S., Elbaroty, G. S., Nofal, S. M., & Hassan, E. M. (2008). Gynecological efficacy and chemical investigation of *Vitex agnus-castus* L. fruits growing in Egypt. *Natural product research*, *22*(6), 537-546. https://doi.org/10.1080/14786410701592612

Ibrahim A. Y., El-Newary S. A., Youness E. R., Ibrahim A. M. M., El-Kashak W. A. (2017). Protective and therapeutic effect of *Vitex agnus-castus* against prostate cancer in rat. *J Appl Pharm Sci* 7: 133-143.

İşcan, G., Köse, Y. B., Demirci, F. (2019). Bitkisel Drogların Makroskobik Ve Mikroskobik Özellikleri. Antalya Eczacı Odası Yayını No: 1, 174-175.

Jarry, H., Spengler, B., Porzel, A., Schmidt, J., Wuttke, W., & Christoffel, V. (2003). Evidence for estrogen receptor beta-selective activity of *Vitex agnus-castus* and isolated flavones. *Planta medica*, *69*(10), 945–947. https://doi.org/10.1055/s-2003-45105

Johansson, C., Jonsson, M., Marttila, M., Persson, D., Fan, X.-L., Skog, J., … Arnberg, N. (2007). Adenoviruses Use Lactoferrin as a Bridge for CAR-Independent Binding to and Infection of Epithelial Cells. *Journal of Virology, 81*(2), 954-963. doi:10.1128/jvi.01995-06

Kardosh, A., Lichtensztajn, D. Y., Gubens, M. A., Kunz, P. L., Fisher, G. A., & Clarke, C. A. (2018). Long-Term Survivors of Pancreatic Cancer. *Pancreas, 47*(8), 958-966. doi:10.1097/mpa.0000000000001133

Kavaz, A., Işık, M., Dikici, E., & Yüksel, M. (2022). Anticholinergic, Antioxidant, and Antibacterial Properties of Vitex Agnus-Castus L. Seed Extract: Assessment of Its Phenolic Content by LC/MS/MS. *Chemistry & biodiversity*, *19*(10), e202200143. https://doi.org/10.1002/cbdv.202200143

Khalil, A., & Tazeddinova, D. (2020). The upshot of Polyphenolic compounds on immunity amid COVID-19 pandemic and other emerging communicable diseases: An appraisal. *Natural Products and Bioprospecting, 10*(6), 411-429. doi:10.1007/s13659-020-0027

Kirmizibekmez, H., Demir, D. (2016). Iridoid glycosides and phenolic compounds from the flowers of *Vitex agnus-castus*. Helv. *Chim. Acta 99*, 518-522.

Kolancı, Y. B. (2017). Karahayıt'ta (Denizli) Hayıt Ağacının (*Vitex agnus-castus* L.) Geleneksel Kullanımı. *Phaselis III 49-60*. doi: 10.18367/pha.17002

Köngül, E. (2019). *Agnus castus. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements,* 139-143. doi:10.1016/b978-0-12-812491-8.00019-9

Kuruüzüm-Uz, A., Ströch, K., Demirezer, L. Ö., & Zeeck, A. (2003). Glucosides from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry, 63*(8), 959-964. doi:10.1016/s0031-9422(03)00285-1

Küçükboyacı, N., Şener B. (2010). Two major flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* L. *Turk J. Pharm. Sci. 7* (2), 119-126.

Land WEM. (1985). Mechanisms of action of anti-inflammatory drugs. *Adv Drug Res 14*: 147-167.

Latenstein, A. E. J., van Roessel, S., van der Geest, L. G. M., Bonsing, B. A., Dejong, C. H. C., Groot Koerkamp, B., de Hingh, I. H. J. T., Homs, M. Y. V., Klaase, J. M., Lemmens, V., Molenaar, I. Q., Steyerberg, E. W., Stommel, M. W. J., Busch, O. R., van Eijck, C. H. J., van Laarhoven, H. W. M., Wilmink, J. W., Besselink, M. G., & Dutch Pancreatic Cancer Group (2020). Conditional Survival After Resection for Pancreatic Cancer: A Population-Based Study and Prediction Model. *Annals of surgical oncology*, *27*(7), 2516-2524. https://doi.org/10.1245/s10434-020-08235-w

Lauritzen, C., Reuter, H. D., Repges, R., Böhnert, K.-J., & Schmidt, U. (1997). Treatment of premenstrual tension syndrome with *Vitex agnus castus* controlled, double-blind study versus pyridoxine. *Phytomedicine, 4*(3), 183-189. doi:10.1016/s0944-7113(97)80066-9

Lee H, Jung KH, Lee H, Park S, Choi W, Bae H, et al. (2015). Casticin, an active compound isolated from *Vitex fructus*, ame orates the cigarette smoke-induced acute lung inflammatory response in a murine model. *Int Immunopharmacol; 28*:1097-101.

Lei, J., Jacobus, E. J., Taverner, W. K., Fisher, K. D., Hemmi, S., West, K., … Seymour, L. W. (2018). Expression of human CD46 and trans-complementation by murine adenovirus 1 fails to allow productive infection by a group B oncolytic adenovirus in murine cancer cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 6*(1). doi:10.1186/s40425-018-0350-x

Li, S.-H., Zhang, H.-J., Qiu, S.-X., Niu, X.-M., Santarsiero, B.D., Mesecar, A.D., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Sun, H.-D. (2002). "Vitexi lactam A, a novel labdane diterpene lactam from the fruits of *Vitex agnus-castus" Tetrahedron Lett,* 43, 5131-5134.

Li S., Qiu S., Yao P., Sun H., Fong HH., Zhang H., et al. (2013). Compounds from the fruits of the popular European medicinal plant *Vitex agnus-castus* in chemoprevention via NADP (H):Quinone oxidoreductase type 1 induction. *Evid Based Complement Alternat Med*; 2013:432829.

Li B, Cantino PD, Olmstead RG, Bramley GLC, Xiang CL et al. (2016). A large-scale chloroplast phylogeny of the Lamiaceae sheds new light on its subfamilial classification. Scientific Reports 6 (1): 34343. doi: 10.1038/srep34343

Li, Y., Shen, Y. (2016). Casticin attenuates rheumatoid arthritis through PKC-NF-κB signaling in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol; 9* (3): 2879-288.

Li B, Olmstead RG (2017). Two new subfamilies in Lamiaceae. Phytotaxa 313(2): 222-226. doi:10.11646/phytotaxa.313.2.9

Liu, J., Burdette, J. E., Xu, H., Gu, C., van Breemen, R. B., Bhat, K. P. L., … Bolton, J. L. (2001). Evaluation of Estrogenic Activity of Plant Extracts for the Potential Treatment of Menopausal Symptoms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(5), 2472-2479. doi:10.1021/jf0014157

Liu, J., Burdette, J. E., Sun, Y., Deng, S., Schlecht, S. M., Zheng, W., … Farnsworth, N. R. (2004). Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of *Vitex agnus-castus* L. (chaste-berry). *Phytomedicine, 11*(1), 18-23.doi:10.1078/0944-7113-00331

Ma, G., Zhong, B., Okamoto, S., Jiang, Y., Kawamura, K., Liu, H., … Tagawa, M. (2015). A combinatory use of adenoviruses expressing melanoma differentiation-associated gene-7 and replication-competent adenoviruses produces synergistic effects on pancreatic carcinoma cells. *Tumor Biology, 36*(10), 8137-8145. doi:10.1007/s13277-015-3555-3.

Maltaş E, Uysal A, Yıldız S, Durak Y. (2010). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Vitex agnus castus* L. Fresenius Environ Bull; 19: 3094-9.

Mancho P., Edwards Q.T. (2005). Chaste tree for premenstrual syndrome. An evolving therapy in the United States. *Advance for Nurse Practitioners. 13*: 43-4, 46. PMID: 15898315.

Mari, A., Montoro, P., D'Urso, G., Macchia, M., Pizza, C., & Piacente, S. (2015). Metabolic profiling of *Vitex agnus castus* leaves, fruits and sprouts: Analysis by LC/ESI/(QqQ)MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 102,* 215-221. doi:10.1016/j.jpba.2014.09.018

Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Gonçalves, M. J., Salgueiro, L., … Lai, R. (2010). Extraction, separation and isolation of volatiles from *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) wild species of Sardinia, Italy, by supercritical CO_2. *Natural Product Research, 24*(6), 569-579. doi:10.1080/14786410902899915

Marttila, M., Persson, D., Gustafsson, D., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., Wadell, G., & Arnberg, N. (2005). CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *Journal of virology*, *79*(22), 14429-14436. https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14429-14436.2005

Mazzio E.A., Soliman K.F. (2009). *In vitro* screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. *Phytother Res*; *23*:385-98.

McLafferty, F.W. ve Stauffer, D.B. (1989). The wiley/NBS registry of mass spectral data, J. Wiley and Sons, New York.

Mehlhorn, H., Schmahl, G., & Schmidt, J. (2005). Extract of the seeds of the plant Vitex agnus castus proven to be highly efficacious as a repellent against ticks, fleas, mosquitoes and biting flies. *Parasitology Research, 95*(5), 363-365. doi:10.1007/s00436-004-1297-z

Mejri, R., Al Rashidi, R. R., Hasni, Y., Laouani, A., Chelly, S., ELFEKIH, H., Ben Rejeb, O., Kouira, M., SAAD, G., & Zaïri, A. (2024). Phytochemical Characterization, Bioactive Properties, and Acute Toxicity of Wild *Vitex agnus-castus* L. methanolic extracts. Preprints. https://doi.org/10.20944/preprints202410.1414.v1

Mesaik M.A., Azizuddin, M.S., Khan K.M., Tareen R.B., Ahmed A., et al. (2009). Isolation and immunomodulatory properties of a flavonoid, casticin from *Vitex agnus-castus*. *Phytother Res*; *23*:1516-20.

Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., & Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet, 395*(10242), 2008-2020. doi:10.1016/s0140-6736(20)30974-0

Moreno, F. N., Campos-Shimada, L. B., da Costa, S. C., Garcia, R. F., Cecchini, A. L., Natali, M. R., Vitoriano, A.deS., Ishii-Iwamoto, E. L., & Salgueiro-Pagadigorria, C. L. (2015). *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) Improves the Liver Lipid Metabolism and Redox State of Ovariectomized Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, *2015*, 212378. https://doi.org/10.1155/2015/212378

Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Goncalves, M. J., Salgueiro, L., Maxia, A., & Lai, R. (2010). Extraction, separation and isolation of volatiles from *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) wild species of Sardinia, Italy, by supercritical CO2. *Natural product research*, *24*(6), 569-579. https://doi.org/10.1080/14786410902899915

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods, 65*(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

Nie D., Honn K.V. (2002). Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci 59:* 799-807.

Nigam, M., Saklani, S., Plygun, S., & Mishra, A. P. (2018). Antineoplastic potential of the *Vitex* species: An overview. *Boletin Latinoamericanoy del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, *17*(5).

Niroumand M.C., Heydarpour F., Farzaei M.H. (2018). Pharmacological and therapeutic effects of *Vitex agnus-castus* L.: A review. *Phcog Rev;12*:103-14.

Novak, J., Draxler, L., Göhler, I., & Franz, C. M. (2005). Essential oil composition of *Vitex agnus-castus*-comparison of accessions and different plant organs. *Flavour and Fragrance Journal, 20*(2), 186-192. doi:10.1002/ffj.1404

Ohyama, K., Akaike, T., Hirobe, C., & Yamakawa, T. (2003). Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *Vitex agnus-castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biological & pharmaceutical bulletin*, *26*(1), 10-18. https://doi.org/10.1248/bpb.26.10

Ohyama, K., Akaike, T., Imai, M., Toyoda, H., Hirobe, C. and Bessho, T. (2005). Human gastric ring carcinoma (KATO-III) cell apoptosis induced by *Vitex agnus-castus* fruit extract through intracellular oxidative stres. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *37*: 1496-1510.

Ono, M., Eguchi, K., Konoshita, M., Furusawa, C., Sakamoto, J., Yasuda, S., … Nohara, T. (2011). A New Diterpenoid Glucoside and Two New Diterpenoids from the Fruit of *Vitex agnus-castus*. *Chemıcal & Pharmaceutıcal Bulletın, 59*(3), 392-396. doi:10.1248/cpb.59.392

Ono, R., Takayama, K., Onishi, R., Tokuoka, S., Sakurai, F., & Mizuguchi, H. (2023). Treatment of Human Pancreatic Cancers Following Local and Systemic Administration of Oncolytic Adenovirus Serotype 35. *Anticancer research*, *43*(2), 537-46. https://doi.org/10.21873/anticanres.16190

Öztürk A., Ilman A.A., Sağlam H., Yalçinkaya U., Aykut S., Akgöz S., et al. (2008). The effects of phytoestrogens on fracture healing: Experimental research in New Zealand white rabbits. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg; 14*:21-7.

Pal, M., Li, S.H., Tewari, S.K., Sun, H.D. (2013). Diterpenoid compounds from *Vitex agnus-castus*. *Chem. Nat. Comp. 49*, 635-638.

Ramazanov, N. (2004). Ectysteroids and iridodial glycosides from *Vitex agnus-castus Chem. Nat. Comp., 40*(3), 299-300.

Rani, A., & Sharma, A. (2013). *The genus Vitex: A review. Pharmacognosy Reviews, 7(14), 188.* doi:10.4103/0973-7847.120522

Rimpler, H. (1972). Irıdoids and ecdysones from *Vitex* species. *Phytochemistry, 11,* 2653-2654.

Roberts, M., White, J., Grutter, M., & Burnett, R. (1986). Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science, 232*(4754), 1148-1151. doi:10.1126/science.3704642

Roemheld-Hamm B. (2005). Chasteberry. *American family physician*, *72*(5), 821-824.

Royal Botanic Gardens, Kew (2025). Royal Botanic Gardens, Kew - Herbarium Specimens. Occurrence dataset https://doi.org/10.15468/ly60bx accessed via GBIF.org on 2025-05-29. https://www.gbif.org/occurrence/2284053415

Ryosuke O., Kosuke T., Rıka O., Sora T., Fumınorı S. and Hıroyukı M. (2023). Treatment of Human Pancreatic Cancers Following Local and Systemic Administration of Oncolytic Adenovirus Serotype 35. *Anticancer Research, 43* (2) 537-546. doi: https://doi.org/10.21873/anticanres.16190.

Rux, J. J., & Burnett, R. M. (2004). Adenovirus Structure. *Human Gene Therapy, 15*(12), 1167-1176. doi:10.1089/hum.2004.15.1167

Saraca N., Ugurb A., Senc B. (2015). *In vitro* antimutagenic activity of *Vitex agnus-castus* L. essential oils and ethanolic extracts. *Ind Crops Prod; 63*:100-3.

Sargın Güzel, N. (2002). *Vitex agnus-castus* uçucu yağının bileşimi ve bazı diterpenlerinin ve seskiterpenlerinin izolasyonu. *Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*.

Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., & Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology, 47*(10), 2479-2483. doi:10.1016/j.fct.2009.07.005

Selem, G.S. and El-Sheikh, E. A. (2015). Toxicity and biochemical effects of NeemAzal T/S, willow (*Salix aegyptiaca* L.) and Chasteberry (*Vitex agnus-castus* L.) on house fly, *Musca domestica* L. (Diptra: Muscidae). *Journal of Biopesticides*, *8*(1):37-44.

Selvi, S., Polat, R., Çakilcioğlu, U., Celep, F., Dirmenci, T. ve Ertuğ, Z. F. (2022). An ethnobotanical review on medicinal plants of the Lamiaceae family in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, *46*(4), 283-332.

Semmler, M., Abdel-Ghaffar, F., Al-Rasheid, K., Klimpel, S., & Mehlhorn, H. (2010). Repellency against head lice (*Pediculus humanus capitis*). *Parasitology research*, *106*(3), 729-731. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1698-0

Sevindik, E., Karakoyun, D., Güldere, İ. M., Borhan, F., Apaydın, E., & Kabil, E. (2023). Chemical composition of *Vitex agnus-castus* L. flowers collected from populations distributed in Aydin, Türkiye. *Notulae Scientia Biologicae*, *15*(1), 11377. https://doi.org/10.55779/nsb15111377

Shakir, A. A., & Awad, J. Z. (2017). Phytochemical study of flavonoid "casticin" present in the fruits of *Vitex agnus-castus* L. cultivated in Iraq. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences* , *22*(1), 104-109. https://doi.org/10.31351/vol22iss1pp104-109

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). *Cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians.*doi:10.3322/caac.21590

Sliutz, G., Speiser, P., Schultz, A., Spona, J., & Zeillinger, R. (1993). Agnus Castus Extracts Inhibit Prolactin Secretion of Rat Pituitary Cells. *Hormone and Metabolic Research, 25*(05), 253-255. doi:10.1055/s-2007-1002090

Souto, E. B., Durazzo, A., Nazhand, A., Lucarini, M., Zaccardelli, M., Souto, S. B. vd. (2020). *Vitex agnus-castus* L.: main features and nutraceutical perspectives. *Forests*, *11*(7), 761.

Stewart, P. L., Fuller, S. D., & Burnett, R. M. (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *The EMBO journal*, *12*(7), 2589-2599. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05919.x

Stojković, D., Soković, M., Glamočlija, J., Džamić, A., Ćirić, A., Ristić, M., & Grubišić, D. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry, 128*(4), 1017-1022. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.007

Strait, M., Rimpler, H., Haensel, R. (1962). Flavonoids from *Vitex agnus-castus Experientia, 18*, 72, 1962.

Senatore, F., Napolitano, F. (2003). Özcan, M., Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from fruits of *Vitex agnus-castus* L. *J. Essential Oil-Bearing Plants,* 6(3), 185-190.

Sørensen, J. M., & Katsiotis, S. T. (1999). Variation in Essential Oil Yield and Composition of Cretan *Vitex agnus castus* L. Fruits. *Journal of Essential Oil Research, 11(5),* 599-605. doi:10.1080/10412905.1999.970

Sørensen, J. M., & Katsiotis, S. T. (2000). Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from Cretan *Vitex agnus-castus* fruits. *Planta medica*, *66*(3), 245-250. https://doi.org/10.1055/s-2000-10685

Souto, E. B., Durazzo, A., Nazhand, A., Lucarini, M., Zaccardelli, M., Souto, S. B., Silva, A. M., Severino, P., Novellino, E., & Santini, A. (2020). *Vitex agnus-castus* L.: Main Features and Nutraceutical Perspectives. *Forests*, *11*(7), 761. https://doi.org/10.3390/f11070761

Steinhilber D. 1999. 5-Lipoxygenase: A target for anti- inflammatory drugs revisited. *Curr Med Chem 6:* 71-85.

Tandon, S., Mittal, A. K., & Pant, A. K. (2008). Insect growth regulatory activity of *Vitex trifolia* and *Vitex agnus-castus* essential oils against *Spilosoma obliqua*. *Fitoterapia*, *79*(4), 283-286. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.032

Towsend, C.C. (1982). "*Vitex* L." In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 7, PH. Davis (Ed.). Edinburgh: Edinburgh University Press, pp. 34-35.

Van Raaij, M. J., Louis, N., Chroboczek, J., & Cusack, S. (1999). Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 A resolution. *Virology*, *262*(2), 333-343. https://doi.org/10.1006/viro.1999.9849

Van Raaij, M. J., Mitraki, A., Lavigne, G., & Cusack, S. (1999). A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature*, *401*(6756), 935-938. https://doi.org/10.1038/44880

Wollenweber E., Mann K. (1983). Flavonoids of fruits of *Vitex agnus-castus*. *Planta Med 48*: 126-127.

Zahid, H., Rizwani, G. H., & Ishaqe, S. (2016). Phytopharmacological Review on *Vitex agnus-castus*: A Potential Medicinal Plant. *Chinese Herbal Medicines, 8*(1), 24-29. doi:10.1016/s1674-6384(16)60004-7

Zhang, Y., & Bergelson, J. M. (2005). Adenovirus receptors. *Journal of virology*, *79*(19), 12125-12131. https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12125-12131.2005

Zhao, F., Chen, Y.-P., Salmaki, Y., Drew, B. T., Wilson, T. C., Scheen, A.- C., vd. (2021). An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics. *BMC biology*, *19*, 1-27.

Zhou, J., Hu, H., Long, J., Wan, F., Li, L., Zhang, S., Shi, Y. E., & Chen, Y. (2013). Vitexin 6, a novel lignan, induces autophagy and apoptosis by activating the Jun N-terminal kinase pathway. *Anti-cancer drugs*, *24*(9), 928-936. https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328364e8d3

Zoghbi, M. das G. B., Andrade, E. H. A., Maia, J. G. S., & Maia, J. G. S. (1999). The essential oil of *Vitex agnus-castus* L. growing in the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal*, *14*(4), 211–213. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199907/08)14:4<211::AID-FFJ812>3.0.CO;2-W

Zubieta, C., Schoehn, G., Chroboczek, J., & Cusack, S. (2005). The Structure of the Human Adenovirus 2 Penton. *Molecular Cell, 17*(1), 121-135. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.041

Zwaving, J.H. ve Bos, R. (1996). Composition of the essential fruit oil of *Vitex agnus-castus*. Planta Med., 62, 83-84.

http-1: http://www.bizimbitkiler.org.tr/v3/demo/details.php?id=8989 . [Erişim Tarihi: 06.2025].

http-2: http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=7401 [Erişim Tarihi: 03.2025].

http-3: https://en.wikipedia.org/wiki/Casti)cin [Erişim Tarihi: 05.2025].

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Tuğba Tuncel

Yabancı Dil Bilgileri : İngilizce (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi);

Almanca (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Doğum Yeri/Yılı :

E-Posta :

ORCID Numarası :

Eğitim-Öğrenim Bilgileri:

Yüksek Lisans : 2022-2025, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı

Lisans (Tezsiz Yüksek Lisans): 2002 - 2008, Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Ortaöğretim Fen Ve Matematik Alanlar Eğitimi- Biyoloji Öğretmenliği (Almanca)

Deneyim / İşyeri Bilgileri:

2011-Devam Ediyor : Uzman Öğretmen, Milli Eğitim Bakanlığı

Yayınlar:

Bağlan, İ., Yanbakan, E., Tuncel, T., Koçak Sezgin, A., Bozoğlan, E., Berikten, D., & Kar, F. (2024). 3D printed kombucha biomaterial as a tissue scaffold and L929 cell cytotoxicity assay. *Journal of cellular and molecular medicine*, *28*(9), e18316. https://doi.org/10.1111/jcmm.18316

Kurban, B., Tuncel, T., Görgülü, Ş., Kar, F., Öztürk, A., & Özek, T. (2023). Elemi essential oil nanocapsulated drug ameliorates lung cancer via oxidative stress, apoptosis and inflammation pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, *27*(13), 1887–1899. https://doi.org/10.1111/jcmm.17801

Şimşek I., Tuncel, T., Akaydın G. & Yeşilada E., (2016). Marmara Bölgesi'nin Bazı Yerleşim Merkezlerinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2630-6344, 21,132-148. doi: 10.12991/marupj.259891

Demirci B., Temel H. E., Tuncel T., Kırmızıbekmez H., Demirci F. & Başer K. H. C. (2011). Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* essential oil on lipoxygenase, *Turkısh Journal of Biochemıstry-Türk Bıyokimya Dergısı*, 0250-4685, 36, 4, 290-295.

Bildiriler:

Güner E., Akçin C. & Tuncel T. (2018). *Citrus aurantium* var. *amara* (turunç) yaprağı ve *Pelargonium* X *Asperum bourbon* (Itır) Uçucu Yağlarının Antibakteriyal Özelliklerinin Araştırılması, Tam Metin Bildiri, *1. Ulusal Lise Öğrencileri Kongresi*

Demirci B., Temel H. E., Tuncel T., Kırmızıpekmez H., Demirci F. & Başer K. H. C. (2009). Evaluation of the Inhibitory Effect of *Calamintha nepeta* subs. *glandulosa* essential oil on Lipoxygenase and Radical Scavenging, Poster Sunumu, *9. International Symposium on Pharmaceutical Sciences*

Demirci F., Tuncel T., İşcan G., Temel H. E., Kırımer N. & Başer K. H. C. (2009). *In vitro* Lipoxygenase Inhibition of Some Stilbene, Poster Sunumu, *8. International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds*

Akaydın G., Şimşek I., Tuncel T., Yabancı Ayhan N. & Yeşilada E. (2008). Bilecik, Bursa ve Edirne Çevrelerinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bazı Bitkiler, Poster Sunumu, *18. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*

Tuncel T., Şimşek I., Yeşilada E. & Akaydın G. (2008). Bilecik, Bursa ve Edirne Çevrelerinde Etnobotanik Amaçla Kullanılan Bazı Bitkiler, Poster Sunumu, *19. Ulusal Biyoloji Kongresi*

Şimşek I., Akaydın G., Yabancı Ayhan N., Tuncel T. & Yeşilada E. (2007). İç Anadolu nun Bazı Yerleşim Birimlerinde Etnobotanik Bir Çalışma, Özet Bildiri, *17. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*