

**BAZI *HYPERICUM* L. TÜRLERİ ÜZERİNDE BİYOLOJİK AKTİVİTE**

**ÇALIŞMALARI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Emine YILDIZ**

**Eskişehir 2024**

**BAZI *HYPERICUM* L. TÜRLERİ ÜZERİNDE BİYOLOJİK AKTİVİTE  
ÇALIŞMALARI**

**Emine YILDIZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Botanik Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Fatma Pınar KAFA**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Şubat 2024**

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2138 ID no.lu proje (Proje kodu:  
2204S031) kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emine YILDIZ'ın "Bazı *Hypericum* L. Türleri Üzerinde Biyolojik Aktivite Çalışmaları" başlıklı tezi 06/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Botanik Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Fatma Pınar KAFA	.....
Üye	: Prof. Dr. Galip AKAYDIN	.....
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Gözde ÖZTÜRK	.....

Prof. Dr. Saime ÖNCE  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### BAZI *HYPERICUM* L. TÜRLERİ ÜZERİNDE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Emine YILDIZ

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2024

Danışman: Prof. Dr. Fatma Pınar KAFA

Bu tez çalışmasında, ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren *Hypericum organifolium* Willd.'un iki varyetesi, *H. organifolium* var. *organifolium* Willd. (HOR) ve *H. organifolium* var. *depilatum* (Freyn & Bornm.) N. Robson (HOD)'ın toprak üstü kısımlarından metanol (MeOH) ve etil asetat (EtOAc) ekstreleri hazırlanmış, ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları, DPPH' radikalini süpürücü, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca bitkilerin salgı yapıları anatomik olarak incelenmiş, toprak üstü kısımlarından uçucu yağları elde edilmiş, uçucu yağ ve ekstrelerin kimyasal içerikleri sırasıyla, GC-GC/MS ve LC-MS/MS ile kalitatif ve kantitatif olarak ortaya konmuştur.

En yüksek toplam fenolik madde miktarı ( $245,46 \pm 9,41$  GAE/g ekstre) ve en yüksek DPPH' süpürücü aktivite ( $\%Inh=84,85 \pm 0,08$ ) HOD-MeOH ekstresinde gözlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi (MİK  $<0,19$  mg/mL), *B. cereus*, *S. typhimurium* ve *B. subtilis*'a karşı, en yüksek sitotoksik aktiviteyi ( $IC_{50}=13,364 \pm 0,563$  mg/mL) ise MCF-7 hücre hattında HOR-EtOAc ekstresi göstermiştir. Anatomik çalışmalarda, teşhiste önemli olan farklı tipte salgı yapıları tespit edilmiştir. Uçucu yağ analizinde, nonakosan ve germakren D her iki taksondaki ortak majör bileşikler olarak dikkati çekmiştir. HOR ayrıca  $\alpha$  ve  $\beta$ -selinen ve trikosan bakımından zengin bulunmuştur. LC-MS/MS analizinde en yüksek miktarda tespit edilen kimyasal bileşikler; HOR-MeOH ( $35.712,48$  mg/kg ekstre) ve HOR-EtOAc ( $15.123,88$  mg/kg ekstre)'de kersitrin; HOD-MeOH ( $75.741,45$  mg/kg ekstre) ve HOD-EtOAc ( $42.331,12$  mg/kg ekstre)'ta ise hiperozit olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** *Hypericum*, Salgı yapıları, Uçucu yağ, LC-MS/MS, Antioksidan, Antimikrobiyal, Sitotoksik.

## ABSTRACT

### BIOLOGICAL ACTIVITY STUDIES ON SOME *HYPERICUM* L. SPECIES

Emine YILDIZ

Department of Pharmaceutical Botany

Anadolu University, Postgraduate Education Institute, February 2024

Advisor: Prof. Dr. Fatma Pınar KAFA

In this thesis, two varieties of *Hypericum organifolium* Willd., which is naturally occurring in our country, namely *H. organifolium* var. *organifolium* Willd. (HOR) and *H. organifolium* var. *depilatum* (Freyn & Bornm.) N. Robson (HOD) were investigated. Methanol (MeOH) and ethyl acetate (EtOAc) extracts were prepared from the above-ground parts of these plants, and the total phenolic content, DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity, antimicrobial, and cytotoxic activities of the extracts were explored. Additionally, the glandular structures of the plants were anatomically examined, volatile oils were obtained from the aerial parts, and the chemical compositions of volatile oils and extracts were qualitatively and quantitatively determined using GC-GC/MS and LC-MS/MS, respectively.

The highest total phenolic content ( $245.46 \pm 9.41$  GAE/g extract) and DPPH<sup>•</sup> scavenging activity (Inh % =  $84.85 \pm 0.08$ ) were found in HOD-MeOH. The HOR-EtOAc extract exhibited the highest antimicrobial activity (MIC value  $< 0.19$  mg/mL) against *B. cereus*, *S. typhimurium*, and *B. subtilis* and the highest cytotoxic activity ( $IC_{50} = 13.364 \pm 0.563$  mg/mL) against MCF-7 cell line. In anatomical studies, various types of secretory canals, which are important for diagnosis, were observed. In the analysis of essential oils, nonacosane and germacrene D have been highlighted as common major compounds in both taxa. Additionally, HOR has been found to be rich in  $\alpha$  and  $\beta$ -selinene, as well as tricosane. In LC-MS/MS analysis, it was observed that kersitrin was the most abundant chemical compound in HOR-MeOH (35712.48 mg/kg extract) and HOR-EtOAc (15123.88 mg/kg extract), while hyperoside was predominant in HOD-MeOH (75741.45 mg/kg extract) and HOD-EtOAc (42331.12 mg/kg extract).

**Key Words:** *Hypericum*, Secretory structures, Essential oil, LC-MS/MS, Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin akademik bilgisi, desteği ve tecrübesiyle yanımda olan Prof. Dr. Fatma Pınar KAFA'ya teşekkürlerimi ve minnetimi sunuyorum. Bu yolda tezim için verdiği motivasyon ve değerli bilgiler bu süreci başarıyla tamamlamamı sağladı.

Tez bitkilerimin uçucu yağ analizlerinde yardımını esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU'na,

Antikanser deneylerinin yapılması sırasındaki değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Begüm Nurpelin SAĞLIK ÖZKAN'a,

Antimikrobiyal aktivite deneylerinin yapılması sırasındaki değerli katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Gözde ÖZTÜRK'e,

Taramalı Elektron Mikroskop analizlerinde emeği geçen Dr. Bio. Şennur GÖRGÜLÜ'ye,

Tez çalışmalarımın her aşamasında akademik bilgisi ve tecrübesi ile bana her zaman yardımcı olup desteğini esirgemeyen, bana hem dost hem yoldaş olan Uzm. Bio. Merve HAS'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, bu tez çalışması sırasında desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşım Uzm. Bio. İpek ÖZEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak akademik hayatım boyunca beni her durumda ve şartta destekleyip her zorluğu aşabileceğimi dile getiren, bana güç veren sevgili annem Elif YILDIZ, babam Okay YILDIZ ve tezimin birçok aşamasında emeği geçen ablam İrem YILDIZ'a çok teşekkür ediyorum. Ailemin desteği olmadan bu tezi tamamlamam mümkün olamazdı. Emeği geçen herkese sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum...

## **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 intihal 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.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Botanik Bilgiler.....	4
2.1.1. Hypericaceae familyasının genel özellikleri .....	4
2.1.2. <i>Hypericum</i> L. cinsinin sistematığı, yayılışı ve taksonomik özellikleri .....	5
2.1.3. <i>Hypericum</i> L. cinsinin botanik özellikleri.....	6
2.1.3.1. <i>Salgı yapıları</i> .....	7
2.1.4. Tez kapsamında çalışılan taksonların sistematığı ve botanik özellikleri 10	
2.1.4.1. <i>Origanifolia Stef. seksiyonunun botanik özellikleri</i> .....	10
2.1.4.1.1. <i>H. origanifolium Willd.</i> .....	11
2.2. Etnobotanik çalışmalar .....	12
2.3. <i>Hypericum</i> L. Türlerinin Fitokimyasal Özellikleri .....	14
2.3.1. Naftodiantronlar .....	14

2.3.2. Floroglusinoller .....	16
2.3.3. Flavonoitler .....	17
2.3.4. Uçucu yağlar.....	18
2.3.5. Diğer bileşikler .....	21
2.4. <i>Hypericum</i> L. Cinsinin Biyolojik Aktiviteleri .....	22
2.4.1. Antioksidan aktivite.....	22
2.4.2. Antimikrobiyal aktivite .....	24
2.4.3. Sitotoksik aktivite .....	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Bitkisel Materyal .....	29
3.1.1. <i>Hypericum organifolium</i> var. <i>organifolium</i> Willd. Sp. Pl. ed. 4, 3(2): 1467 (1802) .....	30
3.1.2. <i>Hypericum organifolium</i> var. <i>depilatum</i> (Frey & Bornm.) N. Robson in Phytotaxa 4: 38 (2010).....	31
3.2. Kullanılan Kimyasallar .....	33
3.3. Kullanılan Aletler .....	34
3.4. Morfolojik Görüntüler ve Anatomik Çalışmalar .....	35
3.5. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması.....	36
3.6. Miktar Tayini ve Kimyasal Çalışmalar.....	39
3.6.1. Toplam fenolik madde miktar tayini .....	39
3.6.2. Uçucu yağ eldesi ve analizi.....	39
3.6.3. LC-MS/MS analizi .....	40
3.7. Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....	41
3.7.1. DPPH' (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü aktivite .....	41
3.7.2. Antimikrobiyal aktivite tayini .....	42
3.7.3. Sitotoksik aktivite çalışmaları .....	43
3.7.3.1. MTT yöntemi sitotoksik aktivitenin belirlenmesi.....	44

3.7.3.1.1. Hücrelerin çoğaltılması .....	44
3.7.3.1.2. Hücrelerin plakalara ekilmesi .....	44
3.7.3.1.3. MTT sitotoksikite testinin uygulanması .....	44
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
4.1. Anatomik Bulgular.....	46
4.1.1. <i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i> .....	46
4.1.2. <i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i> .....	48
4.2. Miktar Tayini ve Kimyasal Bulgular .....	50
4.2.1. Ekstraksiyon verimleri .....	50
4.2.2. Toplam fenolik madde miktar tayini .....	50
4.2.3. Uçucu yağ analizi .....	51
4.2.4. LC-MS/MS analizi .....	54
4.3. Biyolojik Aktivite Bulguları .....	58
4.3.1. Antioksidan aktivite bulguları.....	58
4.3.2. Antimikrobiyal aktivite bulguları .....	59
4.3.3. Sitotoksik aktivite bulguları.....	60
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>62</b>
5.1. Anatomik çalışmalar .....	62
5.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı .....	63
5.3. Uçucu Yağ Analizi.....	63
5.4. LC-MS/MS Analizi.....	64
5.5. Antioksidan Aktivite .....	65
5.6. Antimikrobiyal Aktivite.....	67
5.7. Sitotoksik Aktivite.....	68
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>69</b>

## **ÖZGEÇMİŞ**

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 3.1.</b> Bitkilerin herbaryum örneklerine ait bilgiler .....	29
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler .....	33
<b>Tablo 3.3.</b> Kullanılan aletler.....	34
<b>Tablo 4.1.</b> Ekstraksiyon verimleri .....	50
<b>Tablo 4.2.</b> Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları (mgGAE/g ekstre) .....	51
<b>Tablo 4.3.</b> <i>H. origanifolium</i> alt taksonlarının uçucu yağ bileşikleri .....	52
<b>Tablo 4.4.</b> LC-MS/MS Analiz Sonuçları .....	55
<b>Tablo 4.5.</b> Ekstrelerin DPPH' radikal süpürücü aktiviteleri.....	59
<b>Tablo 4.6.</b> Ekstrelerin MİK değerleri (mg/mL) .....	59
<b>Tablo 4.7.</b> Ekstrelerin A549, MCF-7 ve NIH3T3 hücre hatlarına ait IC <sub>50</sub> değerleri (µg/mL).....	60
<b>Tablo 5.1.</b> Salgı kanalları .....	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. <i>Hypericum</i> L. cinsinin sistematikteki yeri.....	5
Şekil 2.2. <i>Hypericum</i> cinsinin dünya üzerindeki yayılış haritası .....	5
Şekil 2.3. <i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i> 'un Türkiye'deki dağılımı .....	12
Şekil 2.4. <i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i> 'un Türkiye'deki dağılımı .....	12
Şekil 2.5. <i>Hypericum</i> türlerinde bulunan başlıca naftodiantron türevleri.....	15
Şekil 2.6. <i>Hypericum</i> türlerinde bulunan başlıca floroglusinoller.....	16
Şekil 2.7. <i>Hypericum</i> türlerinde bulunan başlıca flavonoidler .....	18
Şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon grafiği .....	50
Şekil 4.2. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları.....	51
Şekil 4.3. LC-MS/MS kromatogramı <b>A:</b> Standart maddeler, <b>B:</b> HOR-MeOH, <b>C:</b> HOR-EtOAc .....	56
Şekil 4.4. LC-MS/MS kromatogramı <b>A:</b> Standart maddeler, <b>B:</b> HOD-MeOH, <b>C:</b> HOD-EtOAc .....	57
Şekil 4.5. Ekstrelerin DPPH' radikal süpürücü aktivitesi .....	58
Şekil 4.6. Toplam fenolik madde miktarları ve DPPH' (% İnhibisyon) radikal süpürücü aktivite sonuçları.....	66

## GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. Yarı saydam glandlar.....	8
Görsel 2.2. A tipi salgı kanalları .....	8
Görsel 2.3. B tipi salgı kanalları.....	9
Görsel 2.4. C tipi salgı kanalları.....	9
Görsel 3.1. <i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i> Willd. ....	30
Görsel 3.2. <i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i> 'un stereomikroskop görüntüleri .....	31
Görsel 3.3. <i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i> Robson.....	32
Görsel 3.4. <i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i> 'un stereomikroskop görüntüleri .....	32
Görsel 3.5. Mikroskoplar .....	35
Görsel 3.6. Laboratuvar ortamında kurutulan bitki materyali.....	36
Görsel 3.7. Bitki materyalini toz haline getirme işlemi .....	36
Görsel 3.8. Toz haline getirilmiş bitki materyalinin tartımı.....	37
Görsel 3.9. Ultrasonik banyo işlemi.....	37
Görsel 3.10. Çalkalayıcı işlemi .....	37
Görsel 3.11. Süzme işlemi .....	38
Görsel 3.12. Süzüntülerin rotavaporda (Heidolph) uçurulması işlemi .....	38
Görsel 3.13. Toplam fenolik madde miktar tayini deney plağı.....	39
Görsel 3.14. Clevenger apareyi ve GC/MS cihazı .....	40
Görsel 3.15. DPPH' süpürücü aktivite plağı.....	41
Görsel 3.16. Mikroorganizmaların plağa ekilmesi ve deney sonucunda üremeye bağlı olarak görülen renkler.....	43
Görsel 4.1. <i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i> 'un kök enine kesiti .....	46
Görsel 4.2. <i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i> 'un gövde enine kesiti.....	47
Görsel 4.3. <i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i> 'un yaprak enine kesiti.....	47
Görsel 4.4. <i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i> 'un kök enine kesiti .....	48
Görsel 4.5. <i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i> 'un gövde enine kesiti.....	49
Görsel 4.6. <i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i> 'un yaprak enine kesiti.....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ae	Alt epidermis
BHT	Butillenmiş Hidroksi Toluen
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH•	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü aktivite tayini
E	Epidermis
ESSE	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
EtOAc	Etil asetat
EtOH	Etanol
FCR	Folin-Ciocalteau reaktifi
G	Gram
Fl	Floem
GAE	Gallik asite eşdeğer miktar
GC/MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
HOD	<i>Hypericum organifolium</i> var. <i>depilatum</i>
HOR	<i>Hypericum organifolium</i> var. <i>organifolium</i>
IC <sub>50</sub>	Yüzde ellisini inhibe eden konsantrasyon
IM	Bileşiklerin tanımlanması
kp	Korteks parenkiması
ks	Ksilem
m/z	Kütle/yük
me	Mezofil
MeOH	Metanol
mg	Miligram

$\mu$ l	Mikrolitre
MS	Kullanılan kütüphane ve literatürlerdeki indeksler ve mas spektrumları ile karşılaştırmaya dayalı tanımlama
pe	Peridermis
RRI	Relatif Tutunma İndeksleri, alkanların kolonda tutunma zamanına göre Hesaplama
t <sub>R</sub>	HP Innowax kolonda standart bileşiklerin analizi ile belirlenen tutunma zamanlarına ve spektrumlarına göre tanımlama metodu
var.	Varyete
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WFO	World Flora Online
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanoğlu ile doğa arasında güçlü bir bağ vardır ve geçmişten günümüze insanoğlu hastalıklara çare bulabilmek için bitkiler alemine başvurmuştur. Bu nedenle tıbbi bitkiler her zaman araştırma konusu olarak önemli bir yere sahip olmuştur.

Tıbbi bitkilerin geçmişine bakıldığı zaman çok eski zamanlara kadar uzandığı görülmektedir. Nippur'da yer alan Sümer kil tabletlerindeki M.Ö. 5000 yıllarına ait yazılı belgeler, Mısır papirüsleri, Eski Ahit, Yunan hekim Hipokrat'ın yaklaşık 300'den fazla kadar tıbbi bitkinin yer aldığı eserleri, Theophrastus, Dioscorides, Galen ve Pliny gibi Romalı yazarların eserleri, Hint vedaları eski kültürlerde tıbbi bitkilerin kullanımı ve önemine dair kanıt niteliğindeki tarihi kayıtlar veya yazılı belgelerdendir. Geçmiş zamanlarda kullanılan pek çok bitkinin tıbbi etkileri, uzun yıllar sonra bilimsel çalışmalarla doğrulanmış ve bu bitkilerin birçoğu farmakopelere girmiş ve kullanılışları günümüze kadar ulaşmıştır (Šantić vd., 2017).

Türkiye florası, 174 farklı familyaya ait 1251 cins ve 12.000'i aşan bitki taksonu ile oldukça çeşitli olan bitki örtüsüne sahiptir. Bu taksonların 233'ü yabancı ve kültür bitkisiyken, 8988 takson ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bitkiler olarak rapor edilmiştir. Floramızdaki taksonların, 3649'u endemik olup, endemizm oranı yaklaşık %30'dur (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011; Güner vd., 2012).

Ülkemiz florasının zenginliği ve biyoçeşitliliği, ülkemizin kıtalararası coğrafi konumu, Akdeniz, İran-Turan ve Avrupa-Sibirya olmak üzere üç fitocoğrafik bölgelede yer alması, farklı iklimlerin görülmesi, değişik topoğrafya özellikleri, toprak tiplerinin çeşitli olması gibi faktörlerle açıklanmaktadır (Avcı, 2005; 2014).

*Hypericum* L. cinsi, 36 seksiyonda yer alan 500 civarında çok yıllık otsu, çalimsı nadiren ağaçsı tür ile Hypericaceae (Guttiferae, Clusiaceae) familyasının en geniş cinsi olup, Antartika hariç dünyadaki tüm kıtalarda yayılış göstermektedir. En yaygın olduğu kıtalar ise Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'dır (Crockett ve Robson, 2011; Walker vd., 2001).

“Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası”nda *Hypericum* türlerinin sayısı 69 olarak kayıtlı ise de (Robson, 1968), daha sonra yayınlanan taksonlar ile *Hypericum* cinsinin ülkemizde 20 seksiyona ait 111 taksonla yayılış gösterdiği, bu taksonların %48'inin endemik olduğu bildirilmiştir. Ülkemizdeki takson sayısı ve yüksek endemizm oranı,

Türkiye'nin *Hypericum* cinsi için gen merkezi olduğunu göstermektedir (Fırat ve Eroğlu, 2023).

Anadolu'da sarı kantaron, mayasıl otu, binbirdelik otu, mide otu, sarı çiçek, kılıç otu, püren vb. değişik adlarla anılan çeşitli *Hypericum* türlerinin çiçek, çiçekli dal ve toprak üstü kısımları ülkemizde halk ilacı olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. Halk arasında, bitkinin zeytinyağında bekletilerek hazırlanan maserasyonu haricen yara ve yanık tedavisinde kullanılırken; infüzyon ve dekoksilyonunun dahilen iştah açıcı, sedatif, kurt düşürücü olarak, diyabet, romatizma, karın ağrısı, kabızlık, hazımsızlık, hemoroit ve ülserde, ayrıca mide, bağırsak, böbrek, kardiyovasküler ve menstrual rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Baytop,1999; Varel, 2011; Nobakht vd., 2022).

*Hypericum* türlerinin; hiperisin ve psödohiperisin gibi naftodiantronları; hiperforin ve adhiperforin gibi floroglusinol türevlerini; hiperozit, kersetin, izokersetin, kersitrin, rutin, kemferol gibi flavonoidleri; biapigenin gibi biflavonidleri; kateşin, epikateşin, lökosiyanidin gibi kateşik ve konsanse tanenleri; kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit gibi fenolik asitleri; ksantonları, A ve C vitaminlerini ve uçucu yağları ihtiva ettikleri bildirilmiştir (Bilia vd., 2002; Pellati vd., 2005; Hostettmann ve Wolfender, 2005; Varel, 2011).

Biyoaktivite çalışmaları, ofisinal tür olan *H. perforatum* başta olmak üzere birçok *Hypericum* türünün antidepresan (Williamson, 2001), antistres (Kumar vd., 2001a), anti-aging (Boran, 2018), antioksidan (Sun vd., 2014), antiviral (Hu vd., 2016), anti-*Helicobacter pylori* (Moon vd., 2011), antifungal (Tocci vd., 2018), antimikrobiyal (Saddiqe vd., 2010), antikanser (Agostinis vd., 2002), sitotoksik (Al-Anee vd., 2023), hepatoprotektif (Bayramoğlu vd., 2014), anti-enflamatuvar ve analjezik (Kumar vd., 2001b, Dellafiora vd., 2018), antinosiseptif (Stojanović vd., 2016) vb. çeşitli aktivitelere sahip olduklarını göstermiştir.

*Hypericum* türlerinin bir diğer önemli özelliği de ekonomik öneme sahip bir cins olmasıdır. Dünya çapında halk arasında geniş kullanıma sahip *H. perforatum* içeren müstahzarların gıda takviyesi veya ruhsatlı ilaç olarak satışı yapılmaktadır (Linde, 2009). Almanya, Polonya ve İspanya ise *H. perforatum* üretiminin yapıldığı önemli ülkeler arasında yer alırlar (Gärber ve Schenk, 2004, Crockett ve Robson, 2011).

Tıbbi amaçlarla halk arasında pek çok kullanılışı olan, farmakopelerde,

monograflarda yer alan, pek çok preparatı bulunan ve oldukça aktif olan *Hypericum* türlerinin, ülkemizde yetişen türlerinin biyolojik aktivitelerinin ortaya konması hem bilim dünyası adına hem de doğal kaynaklarımızın değerlendirilmesi adına önem teşkil etmektedir.

Bu tez çalışmasında ise Hypericaceae familyasının *Origanifolia* seksiyonundan *H. origanifolium* Willd.'in iki alt taksonu olan

- *H. origanifolium* var. *origanifolium* Willd. ve
- *H. origanifolium* var. *depilatum* (Freyn & Bornm.) N. Robson'un

toplam fenolik madde içerikleri, DPPH\* radikal süpürücü, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri incelenmiş, uçucu yağlarının ve hazırlanan ekstrelerin kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir. Ayrıca *Hypericum* türleri için taksonomik öneme sahip olan salgı kanal yapıları ortaya konmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Botanik Bilgiler

#### 2.1.1. Hypericaceae familyasının genel özellikleri

Linnaeus döneminden itibaren, *Hypericum* cinsine ait bitkilerin taksonomik sınıflandırılması üzerine farklı görüşler ortaya çıkmıştır. Bazı bilim insanları, Hypericaceae adlı ayrı bir familyanın varlığını savunarak bu cinsin bağımsız bir takson olarak ele alınması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Ancak, genel olarak kabul gören görüş ile, *Hypericum*'un Clusiaceae (Guttiferae) familyasına ait bir alt cins şeklinde sınıflandırılması yapılmıştır. Yapılan son moleküler biyolojik çalışmalarla, Hypericaceae'nin Clusiaceae (Guttiferae) familyasından farklı bir sınıflandırmaya tabi tutulması gerektiğini desteklemekte ve *Hypericum*'un bu familyaya ait bir cins olduğunu ortaya koymaktadır (Crockett ve Robson, 2011).

Bu familyadaki bitkiler, çok veya tek yıllık otsu, çalimsı ya da ağaçsıdırlar. Yapraklar basit, opposit ve dekusate, tam, sapsızdan kısa petiyollüye kadar, sıklıkla az çok yarı saydam veya bazen siyah ya da kırmızı glandlı noktalar ve/veya çizgiler şeklinde. Çiçek durumu simoz, tirsoid veya nadiren rasemoz, çok çiçekli. Çiçekler biseksüel aktinomorfik, homostilöz ya da heterodistilöz. Sepaller 5 veya nadiren 4, serbest veya  $\pm$  birleşik, imbrikat, tam veya kenarları çeşitli şekillerde parçalanmış ve sıklıkla glandular, lamina glandları yapraktakine benzer, genellikle noktadan daha çok linear şekilde, kalıcı. Petaller 5 veya nadiren 4 serbest, imbrikat, tam veya kenarları çeşitli şekillerde parçalanmış ve sıklıkla glandular, lamina glandları yapraktakine benzer, tüysüz, düşücü veya kalıcı. Stamen demetleri 5(4), epipetal, serbest veya çeşitli şekillerde birleşmiş, her biri 1-çok stamenli. Filamentler çeşitli şekilde birleşmiş veya görünüşte serbest. Ovaryum 1, üst durumlu, 3-5 hücreli veya 2-5 paryetal plasentalı 1-hücreli. Stilus (2-)3-5, serbest veya birleşmiş elongat. Meyve kapsular, septumlardan veya lokuluslardan yarılan, bakka veya nadiren drupa. Tohumlar 1-çok, endospermasızdır (Robson,1974; Robson, 1978).

Hypericaceae familyası toplam sekiz cinsten meydana gelmektedir (Robson, 2012).

1. *Vismia* Vand
2. *Triadenum* Rafinesque
3. *Harungana* Lamarck
4. *Thornea* Breedlove & McClintock
5. *Hypericum* L.
6. *Cratoxylum* Blume
7. *Lianthus* N. Robson
8. *Eliea* Cambess

### 2.1.2. *Hypericum* L. cinsinin sistematığı, yayılışı ve taksonomik özellikleri

*Hypericum* L. cinsinin sistematikteki yeri Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. *Hypericum* L. cinsinin sistematikteki yeri



Şekil 2.2. *Hypericum* cinsinin dünya üzerindeki yayılış haritası (<http-1>)

■ Doğal ■ Kültür

*Hypericum* (Hypericaceae) cinsi, yaklaşık 500 türle dünya üzerinde Antartika hariç tüm kıtalarda yayılış gösteren bitkilerdir. Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika en yaygın olduğu kıtalardır (http-1) (Crockett ve Robson, 2011; Walker vd., 2001).

Ülkemizde ise 20 seksiyona ait 111 taksonla temsil edilmekte olup endemizm oranı %48 olarak saptanmıştır (Fırat ve Eroğlu, 2023). Son yapılan revizyon çalışmalarında *Hypericum* cinsine ait 36 seksiyona yer verilmiştir (http-2):

1. Seksiyon <i>Campylosporus</i>	13. Seksiyon <i>Oligostema</i>	25. Seksiyon <i>Psorophytum</i>
2. Seksiyon <i>Umbraculoides</i>	14. Seksiyon <i>Tripentas</i>	26. Seksiyon <i>Adenosepalum</i>
3. Seksiyon <i>Ascyreia</i>	15. Seksiyon <i>Crossophyllum</i>	27. Seksiyon <i>Elodeouida</i>
4. Seksiyon <i>Takasagoya</i>	16. Seksiyon <i>Santomasia</i>	28. Seksiyon <i>Brathys</i>
5. Seksiyon <i>Androsaemum</i>	17. Seksiyon <i>Taeniocarpium</i>	29. Seksiyon <i>Sampsonia</i>
6. Seksiyon <i>Inodora</i>	18. Seksiyon <i>Coridium</i>	30. Seksiyon <i>Trigynobrathys</i>
7. Seksiyon <i>Bupleuroides</i>	19. Seksiyon <i>Myriandra</i>	31. Seksiyon <i>Concinna</i>
8. Seksiyon <i>Hypericum</i>	20. Seksiyon <i>Webbia</i>	32. Seksiyon <i>Roscyna</i>
9. Seksiyon <i>Olympha</i>	21. Seksiyon <i>Arthrophyllum</i>	33. Seksiyon <i>Graveolentia</i>
10. Seksiyon <i>Campylopus</i>	22. Seksiyon <i>Triadenioides</i>	34. Seksiyon <i>Hirtella</i>
11. Seksiyon <i>Origanifolia</i>	23. Seksiyon <i>Heterophylla</i>	35. Seksiyon <i>Humifusoidum</i>
12. Seksiyon <i>Drosocarpium</i>	24. Seksiyon <i>Adenotrias</i>	36. Seksiyon <i>Monanthea</i>

### 2.1.3. *Hypericum* L. cinsinin botanik özellikleri

*Hypericum* cinsi, genellikle tek yıllık ya da çok yıllık otlar, çalılar, ağaçlar, tüysüz ya da basit tek sıralı tüylü bitkilerdir. Gövdeler yeşilden sarı-kahverengiye kadar veya kırmızı renkli, tüysüz veya tüylü; salgısız veya soluktan koyu renkliye kadar glandlı veya glandiferöz. Yapraklar opozit, dekusat veya bazen alternan. Lamina düz veya tabanda kulakçıkların kenarları glandlı, nadiren tamamen dentikulat veya fimbriat glandlı, glandlar lineardan nokta şekline kadar, soluk ve/veya koyu renkli, kenardan laminaya kadar; tüy yok veya var. Çiçekler biseksüel, aktinomorf, stellatan kampanulata veya nadiren psödotübüler şekilde. Sepaller genellikle 4-5, kenarları düz veya dentikulattan fimbriat glandlıya kadar veya fimbriat eglandular şekilde. Petaller limon renginden altın sarısına veya turuncuya kadar veya nadiren krem veya beyaz, tomurcuk halinde görülebildiği yerlerde dorsal olarak genellikle hafif tonlu veya kırmızı damarlı veya çok nadiren tamamen parlak kırmızı, genellikle 4-5, düz veya kenarları glandlı veya siliat glandlı. Stamen demetleri 4-5, antipetalus (stamen demetlerinin petallerin önünde),

serbest veya çeşitli şekillerde birleşmiştir. Ovaryum 2-5 parçalı, tüysüz; stiluslar 2-5, uzun, serbest veya kısmen veya tamamen birleşik. Meyve kapsül şeklinde, 2-5 kapaklı. Meyve ve ovaryum duvarlarındaki dar glandlar vittae, kısa şişkin glandlar vesicle olarak adlandırılır (Robson 1967; http-2).

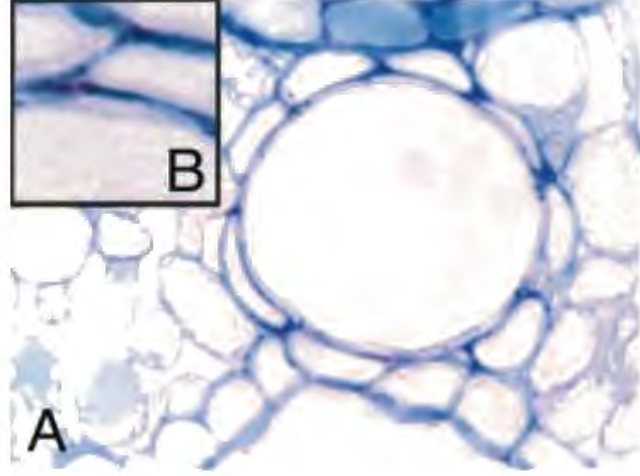
Hypericaceae familyasının en önemli özelliği bütün türlerinin yapraklarında şeffaf glandlar şeklinde görülen şizogen salgı kanallarına sahip olmasıdır. Anatomik olarak incelendiğinde salgı yapılarının floemde ve bazen birincil kortekste, perisiklda, öz bölgesinde ve yaprağın sapında ve damarlarında rastlanır. *Hypericum* cinsi, diğer cinslerden odun kısmının çok küçük olması, spiral şeklinde kalınlaşmış odun borusuna sahip olması, parenkimasının olmaması, tamamen tek sıralı ışınları ve septalı lifleri olmasıyla farklılık gösterir. Perisiklda, genellikle sklerenkimatöz liflerden oluşan bir halka içerir. Bitkide tek ve kümelenmiş şekilde görülen kalsiyum oksalat kristallerine rastlanılır. Yaprak çoğunlukla dorsiventraldir. Stoma hücreleri genellikle alt yüzeyde yer almakta olup 2 veya daha fazla hücre ile çevrelenmiştir (Metcalf ve Chalk 1957).

### **2.1.3.1. Salgı yapıları**

*Hypericum* taksonlarının ayırt edilmesinde glandların yayılışı ve konfigürasyonu önem taşımaktadır (Robson, 1967). Biyolojik maddelerin sentezlendiği veya depo edildiği kısımlar olarak düşünülen bu glandlar, her taksonda bulunmadığı gibi bulunduğu organ ve bulunma sıklığı açısından farklılık göstermektedirler. Ayrıca salgı yapıları çeşitlilik göstermekte olup

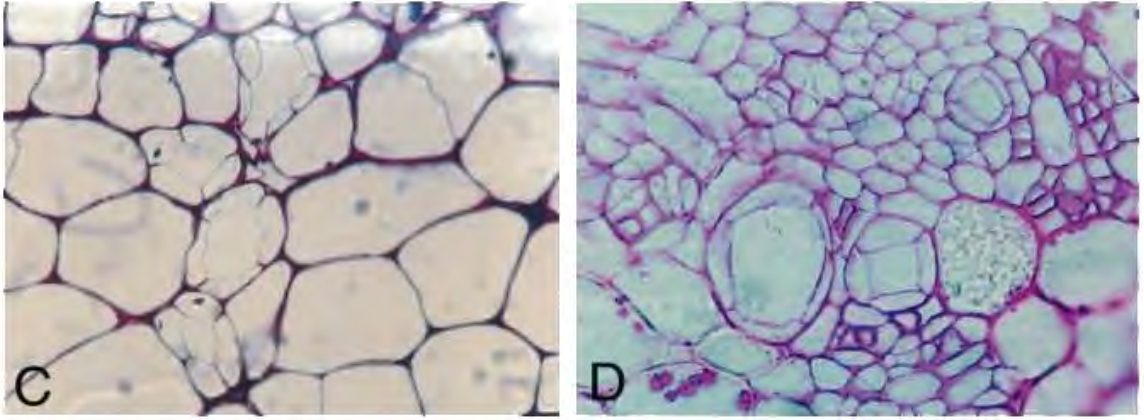
- Yarı saydam glandlar,
- Siyah glandlar ve
- Salgı kanalları (A tipi, B tipi ve C tipi) olarak sınıflandırılmaktadır (Ciccarelli vd., 2001).

**a) Yarı saydam glandlar:** Glandular cepler ya da donuk renkli glandlar olarak isimlendirilebilmektedir. Küremsi ve oblong olarak görülen bu salgı yapıları iki katmanlı alt epidermal hücreler tarafından etrafi sarılmış boşluklardan meydana gelmektedir. İç tarafı ince katmanlı, düz salgı yapılarından oluşurken dış tarafı daha kalın katmanlı parenkimatik hücreleri içermektedir (Görsel 2.1).



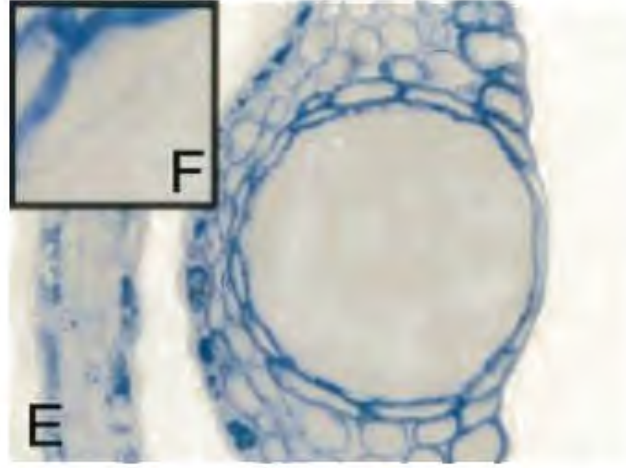
*Görsel 2.1. Yarı saydam glandlar (Ciccarelli vd., 2001)*

**b) A tipi salgı kanalı:** Şekil itibariyle poligonal olan dört hücre dar açıklığa doğru boşluğu çevrelemiştir. Kanal boşluğu boyunca A tipi hücreler oldukça ince duvarlı görünmektedirler. Kök ile pistilde A tipi kanallarının değişken lümen açıklıklarına ya da çeşitli sayıda salgı hücrelerine sahip olduğu bulunmuştur (Görsel 2.2).



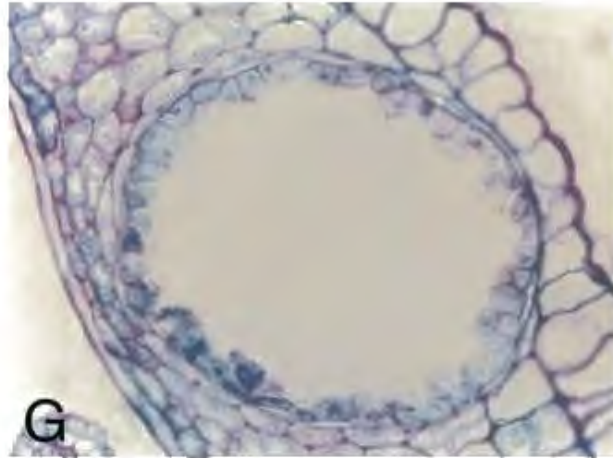
*Görsel 2.2. A tipi salgı kanalları (Ciccarelli vd., 2001)*

**c) B tipi salgı kanalı:** Bu tip salgı kanalının geniş açıklıkları vardır. Enine alınan kesitte yarı saydam glandlarla oldukça benzer yapıya sahiptirler. B tipi salgı kanalları soluk renge sahip glandlar halinde olup oldukça uzamış şekilde gözükmektedirler (Görsel 2.3).



*Görsel 2.3. B tipi salgı kanalları (Ciccarelli vd., 2001)*

**d) C tipi salgı kanalları:** Bir ya da daha çok katmana sahip çok lekeli, ince duvarlı ve geniş açıklıklara sahip salgı hücreleri ile sarılmış hücrelerdir. C tipi salgı kanalları bir ya da iki katlı oldukça düz şekilli parenkimatik hücrelerle etrafı sarılmış haldedir. Ayrıca C tipi kanalların, ontogenez sırasındaki farklılaşma düzeni açısından B tipi kanallardan farklılık gösterdiği görülmüştür (Görsel 2.4).



*Görsel 2.4. C tipi salgı kanalları (Ciccarelli vd., 2001)*

## 2.1.4. Tez kapsamında çalışılan taksonların sistematığı ve botanik özellikleri

### 2.1.4.1. *Origanifolia Stef. seksiyonunun botanik özellikleri*

Bu seksiyon çok yıllık, bazen tabanda çalimsı, örtü tüyü tüysüzden pubeskente kadar; sepaller, petaller, anterler ile çoğunlukla gövde ile yapraklar üzerinde siyah glandlar taşıyan taksonlardan oluşmaktadır. Gövdeler koltuk sürgünsüz. Petaller ile stamenler kalıcı. Petallerin yüzeyinde siyah ve amber glandlar var. Stamenler 3. stiluslar 3. kapsül vavları kesintili vittae veya vesicle veya bazen de dorsalde vittae şeklinde. Tohumlar hafif pürüzlü veya kabarık ve çizik veya linear-foveolattır (Robson, 1967).

Türkiye Florası eserine göre *Hypericum* cinsi 7 gruptan oluşmaktadır. *Origanifolia* seksiyonu G grubunda yer almakta olup, Türkiye’de 4 türle yayılış gösterdiği bildirilmiştir. Bu gruptaki türlerin sepalleri tam ya da boyu uzun olmayan siliat ya da dentikulat; kapsülleri çeşitli glandulardır (Robson, 1967). Türkiye Florası *Origanifolia* seksiyonu teşhis anahtarı;

1. Gövdede koltuk sürgünleri yok; yapraklar genellikle donuk mavimsi yeşil veya papilliden pubescente kadar; sepal kenarları glandular

2. Gövdeler pubescent veya puberulous

3. Gövdeler ve yapraklar beyaz-pubescent; sepaller genellikle puberulous

**62. *origanifolium***

3. Gövdeler puberulous ; yapraklar papilli; sepaller tüysüz

**63. *aviculariifolium***

2. Gövde tüysüz

4. Yapraklar tabanda kuneattan yuvarlağa kadar, genellikle imbrikat değil, kenar içindeki siyah glandlar ile 5-35 mm **63. *aviculariifolium***

4. Yapraklar (en azından alttakiler) kordat-ampleksikaul ± yoğun imbrikat, 1-7 mm, sıklıkla kenar içinde siyah glandlar yok

5. Pedisel yok veya 0.5 mm’ye kadar; infloresens gevşek; yapraklar bariz olarak heteromorfik, saydam glandlılar **64. *salsugineum***

5. Pedisel yaklaşık 1 mm; infloresans kapitat; yapraklar hafifçe heteromorfik, saydam glandlar yok **65. *imbricatum***

**Habitatı:** Kireç taşı veya şist üzerindeki açık taşlı veya kayalık yerler veya *Pinus* veya *Quercus* ormanlarında; 30–2400 m yüksekliğinde.

**Dağılımı:** Türkiye, Gürcistan, Suriye (Robson, 2010).

#### **2.1.4.1.1. *H. origanifolium* Willd.**

Gövde 5-30(-37) cm, hemen hemen dikten tabanda meyilli sonra dikleşerek yükselmiş dallanan ama genellikle köklenme tabandan değil, kısa beyaz pubescent. Yapraklar 5-30 mm, ovat ya da obovattan eliptik-oblonga kadar, kenar içi ile bazen yüzeysel kısım siyah glandlı, pubescent. Sepaller dar oblongtan oblong-spatulat, akuttan obtusa kadar veya nadiren yuvarlak, siliat glandlı, genellikle bazı yüzeyler siyah noktacıklı, puberuloz ya da tüysüz. Petaller 9-15 mm, yüzeyde siyah veya amber glandlı veya nadiren kenarlar siyah glandlı. Kapsül 7-12 mm, dorsalde vittae, lateralde vesicle.

**Çiçeklenme:** Mayıs-Ağustos

**Habitat:** Kuru otlar, kayalık yamaçlar ya da bozkır.

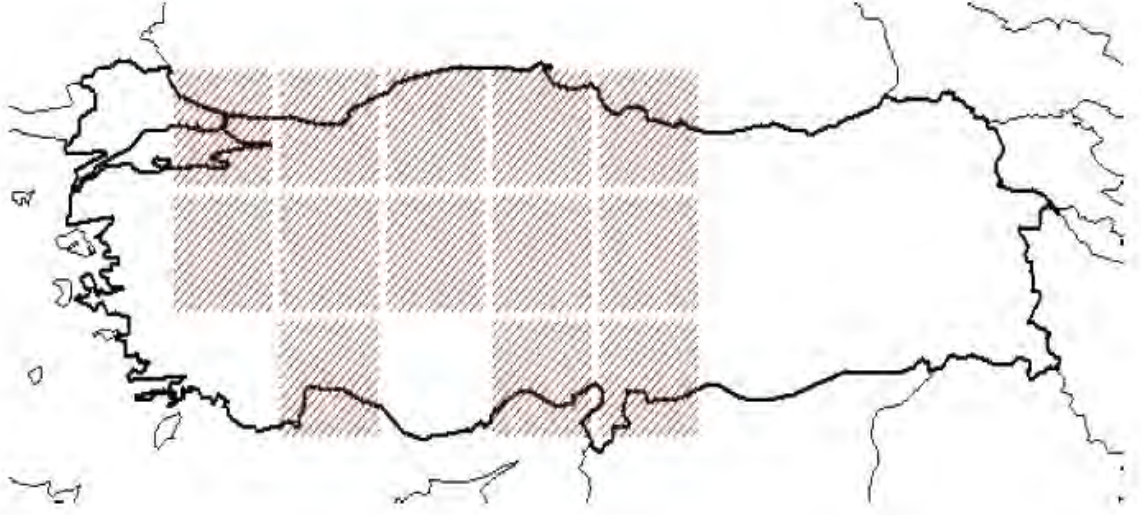
**Yetiştği yükseklik:** 50-2400 m (Robson 1967).

Robson (1967) Türkiye Florası eserinde, *H. aviculariifolium* Jaub. & Spach türünün *H. origanifolium* Willd. türü ile yakın akraba olduğundan ve *H. aviculariifolium*'un polimorfik bir tür olup sınıflandırmasının zor olduğundan bahsetmektedir. *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* (Freyn & Bornm.) Robson var. *depilatum* taksonu, *H. aviculariifolium* teşhis anahtarında gövdesinin hemen hemen dikten tabanda meyilli sonra dikleşerek yükselmiş, çiçek durumunun piramidalden silindirik şekilliye kadar ve çok çiçekli olmasıyla ayrılmaktadır.

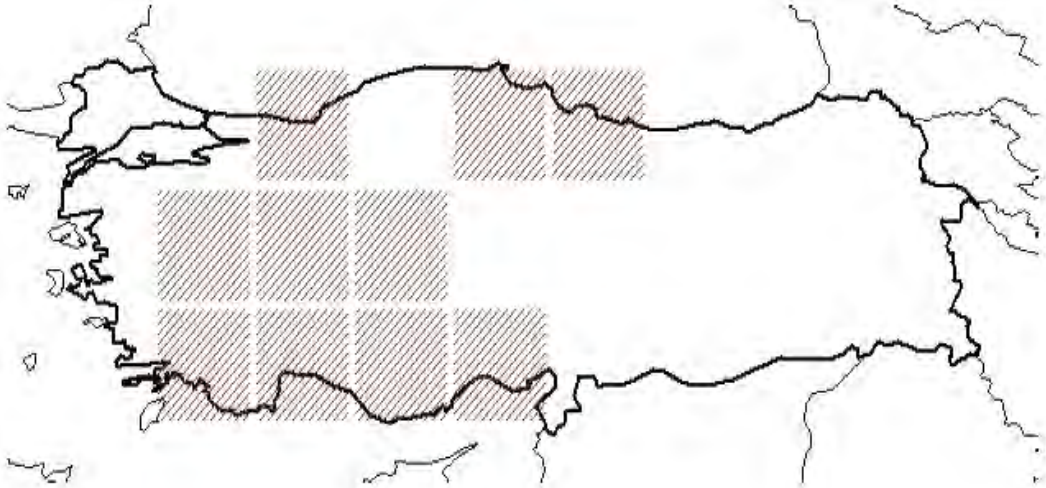
Son yapılan revizyon çalışmalarında *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* taksonun statüsü *Origanifolia* seksiyonu içerisinde ilişkili olduğu *H. origanifolium* türünün varyetesi olarak değiştirilerek, bitkinin adının *H. origanifolium* var. *depilatum* (Freyn & Bornm.) Robson olarak kabul edildiği görülmektedir. Bu durumda *H. origanifolium* türü dünya üzerinde *H. origanifolium* var. *depilatum* ve *H. origanifolium* var. *origanifolium* olmak üzere iki taksondan oluşmaktadır (Robson, 1967; http-3).

Bu tez çalışması kapsamında Flora of Turkey eserine göre *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* olarak teşhis edilen takson, son kabul edilmiş ismi olan *H. origanifolium* var. *depilatum* olarak anılacaktır.

*H. origanifolium* var. *origanifolium* ve *H. origanifolium* var. *depilatum* taksonlarının ülkemizdeki yayılışı sırasıyla Şekil 2.4 ve Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.3. *H. origanifolium* var. *origanifolium*'un Türkiye'deki dağılımı: A2, A3, A4, A5, A6, B2, B3, B4, B5, B6, C3, C5, C6 ([http-4](#))



Şekil 2.4. *H. origanifolium* var. *depilatum*'un Türkiye'deki dağılımı: A3, A5, A6, B2, B3, B4, C2, C3, C4, C5 bölgesi ([http-5](#))

## 2.2. Etnobotanik çalışmalar

*Hypericum* cinsinin geleneksel tıpta önemli bir yere sahip olduğu ve tıbbi amaçlarla kullanımı eski zamanlardan beri bilinmektedir. Antik çağda yaşamış olan Yunan hekim Dioscorides tarafından yazılmış "De Materia Medica"da *Hypericum* cinsinin yara iyi edici olarak kullanımıyla ilgili ilk bilgilere yer verilmiştir (Istikoglou vd., 2010).

*H. perforatum* türünün, *Hypericum* cinsinin dünya üzerinde ve ülkemizde en sık kullanılan tıbbi bitkilerden biri olduğu yapılan etnobotanik çalışmalar ile saptanmıştır.

Bu türün dünya üzerindeki kullanımı araştırıldığında genellikle toprak üstü kısımlarından infüzyon, dekoksasyon veya yağ şeklinde hazırlanarak, dahilen veya haricen depresyon, sindirim sistemi rahatsızlıkları, karaciğer rahatsızlıkları, solunum yolları enfeksiyonları, cilt problemleri ve kas ağrılarına karşı kullanıldığı bildirilmiştir (Petkeviciute vd., 2010; Cavero ve Calvo, 2015; Savić vd., 2019; Zivkovic' vd., 2021).

Ülkemizde yapılan etnobotanik çalışmalar incelendiğinde birçok *Hypericum* türünün halk arasında farklı hazırlanma yöntemleriyle, farklı hedef hastalıkların tedavisinde kullanıldığı saptanmıştır. Tez çalışmasının bu kısmında ülkemizde halk arasında geniş kullanımı olan bazı *Hypericum* türlerinin kullanımları hakkında bilgiler derlenmiştir.

*H. perforatum*'un toprak üstü kısımları dekoksasyon şeklinde hazırlanarak dahilen kullanımda, yatıştırıcı, sakinleştirici, kurt düşürücü, hemoroit, kabızlık, prostatit, diyabet ve hipertansiyonda, idrar yolu enfeksiyonlarına karşı; infüzyon şeklinde hazırlanarak dahilen ishalde ve kolik tedavisinde; yağ şeklinde haricen yara, romatizma ve hemoroit tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Cakilcioglu ve Turkoglu, 2010; Özdemir ve Alpınar, 2015). Aynı zamanda *H. perforatum*'un yağ şeklinde haricen hayvanların tedavisinde de kullanıldığı bilinmektedir (Aydın ve Yeşil, 2018).

Halk arasında kullanımı olan *H. triquetrifolium*'un toprak üstü kısımları infüzyon şeklinde hazırlanarak dahilen safra kesesi hastalıklarında; dekoksasyon şeklinde hazırlanarak dahilen diyabet tedavisinde, yağı haricen romatizma ağrılarında kullanılmaktadır (Gürdal ve Kültür, 2013; Arasan ve Kaya, 2015).

*H. scabrum* türünün toprak üstü kısımlarının infüzyon şeklinde hazırlanarak dahilen ve haricen hemoroit, yatıştırıcı, öksürük, ishal, kolik rahatsızlıklarında kullanıldığı kaydedilmiştir (Cakilcioglu ve Turkoglu, 2010; Özdemir ve Alpınar, 2015).

*H. empetrifolium* türünün toprak üstü kısımlarından infüzyon şeklinde hazırlanarak dahilen, ağrı kesici, yara, yanık ve diyabet tedavisinde; yağ şeklinde hazırlanarak haricen romatizma ağrılarında kullanıldığı bildirilmiştir (Gürdal ve Kültür, 2013). Ayrıca bu türün çiçek kısımlarının Batı Anadolu'da, kumaşların sarı renge boyanmasında kullanıldığı kaydedilmiştir (Baytop, 1999).

## 2.3. *Hypericum* L. Türlerinin Fitokimyasal Özellikleri

### 2.3.1. Naftodiantronlar

Naftodiantronlar arasında en iyi bilinenleri hiperisin ve türevi olan bileşiklerdir (Barnes vd., 2001).

Bitkinin en çok yapraklarında ve çiçeklerinde görülen bu bileşiklerin, ışık altında siyah, delikli ve nokta şeklindeki glandlarda yer aldığı, toprak üstünden elde edilen yağda ise kırmızı-amber rengin oluşmasında etkili oluşu bilinmektedir (Saddiqa ve Maimoona, 2010).

Hiperisinler çiçek tomurcuklarında %1-14 oranında bulunurken, yapraklarda bu oran %0,03-0,3 oranında bulunmaktadır (Tekel'ová vd., 2000). Hiperisinin, *Hypericum* türleri için bitkilere zararlı böceklerin gelmesini önlemek amacıyla bir çeşit caydırıcı allokimyasal madde olarak salgılandığı düşünülmüştür (Giese, 1980).

Hiperisinin kimyasal formülü  $C_{30}H_{16}O_8$  şeklindedir. Temel halka yapısına bakıldığında antrakinon bileşikleriyle benzerlik gösterse de, hiperisin daha kompleks bir yapıdadır. Antrakinonların üç halkalı yapısı olmasına karşılık hiperisinin sekiz halkalı yapıya sahiptir. Emodin-antranol türevi bir bileşik olan hiperisinin, biyosentez olayında stabilliği sağlayamayan bileşikler oluşur (Dewick, 2003). Stabilliği sağlayabilen hiperisin bileşiği ve psödohiperisin bileşiğine dönüşebilmek için ışığa ihtiyaç duydukları farkedilmiştir. (Delaey vd., 1999). Bir başka çalışmada *H. perforatum* türünde ana naftodiantron bileşiğin psödohiperisin olduğu ve farklı türlerdeki miktarının hiperisine göre daha yüksek olabileceği de görülmüştür (Karioti, 2010).

Hiperisinin fotosensibilizan özelliğiyle kanser tedavisinde önemli bir yer tutan antitümoral fotodinamik terapide tercih edilebilecek bir moleküldür. Aynı zamanda Alzheimer hastalığı gibi nörolojik hastalıklar için potansiyel bir bileşik olarak görüldüğünden bu molekül üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır (Zhang vd., 2016; Choudhary vd., 2022).

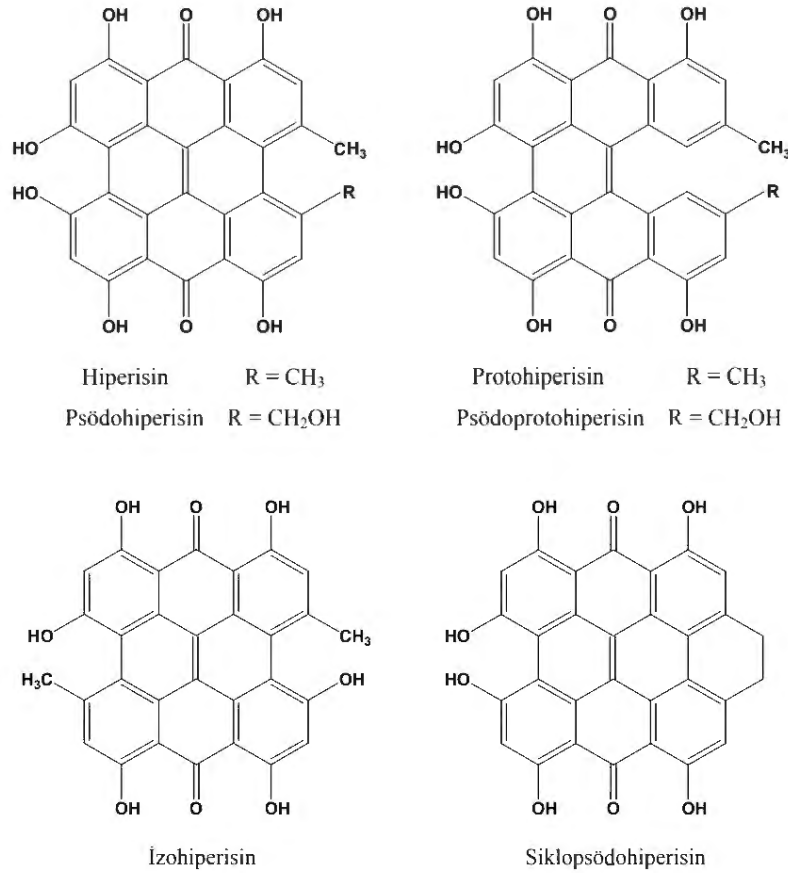
Çırak ve arkadaşlarının (2007b) çalışmasında sekiz *Hypericum* türünün (*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*, *H. organifolium*, *H. lydium*, *H. orientale*, *H. perforatum*, *H. montbretii*, *H. pruinatum*, *H. perforatum*) etanol (EtOH)

ekstrelerinin HPLC ile kimyasal bileşimi araştırılmış, hepsinde psödohiperisin bulunmuştur. *H. lydium* türü hariç diğerlerinde hiperisin görülmüştür.

*H. avicularifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*'un fenolik bileşikleri üzerinde yapılan çalışmalarda floroglusinol türevi bileşikler, flavonoidler ve fenolik asitlerle birlikte bitkide hiperisin (Uzun, 2009; Çırak vd., 2006) ve psödohiperisin varlığı bildirilmiştir (Çırak vd., 2007b).

*H. organifolium* üzerine yapılan bir çalışmada farklı dokuların üreme organları arasında hiperisin, kersitrin ve kersetin yüksek oranda birikmiş şekilde tespit edilmiştir. Fakat yapraklar daha yüksek oranda hiperozit ve klorojenik asit üretmiştir. Rutin ve apigenin-7-O-glukozit bileşikleri ise sadece meyvenin olgunlaşma evresinde tüm dokularda görülmüştür (Çırak vd., 2007).

*Hypericum* türlerinde en çok rastlanan naftodiantron türevi bileşikler Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. *Hypericum* türlerinde bulunan başlıca naftodiantron türevleri

### 2.3.2. Floroglusinoller

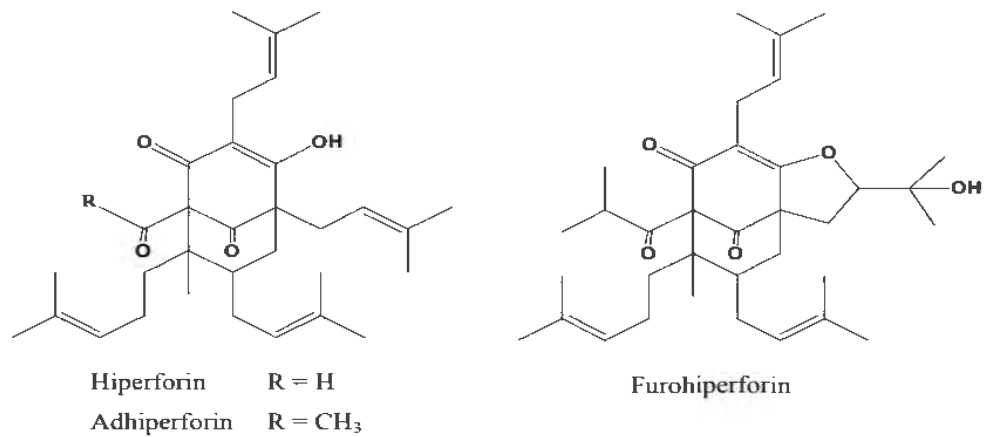
Floroglusinol türevi bileşikler çoğu doğal kaynaklarda bulunan geniş dağılıma sahip fenolik bileşikler olarak adlandırılır. (Singh ve Bharate, 2006).

Bitkinin içermiş olduğu fluoroglusinol bileşiklerinin yapılarında oluşan farklılıkların sonucunda bitkinin biyolojik aktivitesi belirlenmiş olup kemotaksonomik sınıflandırmada bu durumdan faydalanılmıştır. Robson sınıflandırma yaparken *Hypericum* taksonlarının sahip olduğu floroglusinol bileşiklerindeki farklılıklardan yararlanmışır (Robson,1977; Robson, 2002).

*Hypericum* türlerinin yapraklarında ve çiçeklerinde 300'den fazla floroglusinol türevi görülmüştür. Bileşikler arasında en önemlisi olan hiperforin, bakterilere karşı olan yapısından dolayı ilk kez Gurevich ve çalışma arkadaşları ile 1971 tarihinde bulunmuştur. Hiperforin başta olmak üzere, adhiperforin, furohiperforin gibi hiperforin türevleri de bulunmaktadır (Barnes vd., 2001; Schmidt ve Heilmann, 2013; Guverich vd., 1971).

Tatsis ve diğer araştırmacılar, *H. perforatum*'daki hiperforin ile adhiperforin sentezindeki öncü bileşiklerinden yeni bileşikler izole ederek hiperfirin ve adhiperfirin adlarını vermişlerdir (Tatsis vd., 2007).

*Hypericum* türlerinin yapısında bulunan önemli kimyasal floroglusinollerin açık formülleri Şekil 2.6'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. *Hypericum* türlerinde bulunan başlıca floroglusinoller

Yeni bulunan bileşiklerin birçoğunun üzerinde farmakolojik ve biyolojik aktivitelerini keşfedebilmek için birçok araştırma yapılmıştır. Başta depresyon üzerinde büyük bir aktivitesi olduğu saptanmıştır. Bilinen bazı diğer aktiviteleri ise; antiproliferatif aktivite (Schmidt vd., 2012; Sun vd., 2014) antinosiseptif aktivite (Stolz vd., 2014) antioksidatif aktivite (Sun vd., 2014), antianjiyogenik aktivite (Schmidt, 2013), antimikrobiyal aktivite (Dall’Agnol vd., 2003), anti-enflamatuar aktivite (Crockett vd., 2008), analjezik aktivite (Stolz vd., 2016), antiviral aktivite (Hu vd., 2016), sitotoksik aktivite (Al-Anee vd., 2023; Liu vd., 2013), nöroprotektif aktivite (Gao vd., 2016), antifungal aktivite (Tanaka vd., 2008) olarak söylenebilir.

### 2.3.3. Flavonoidler

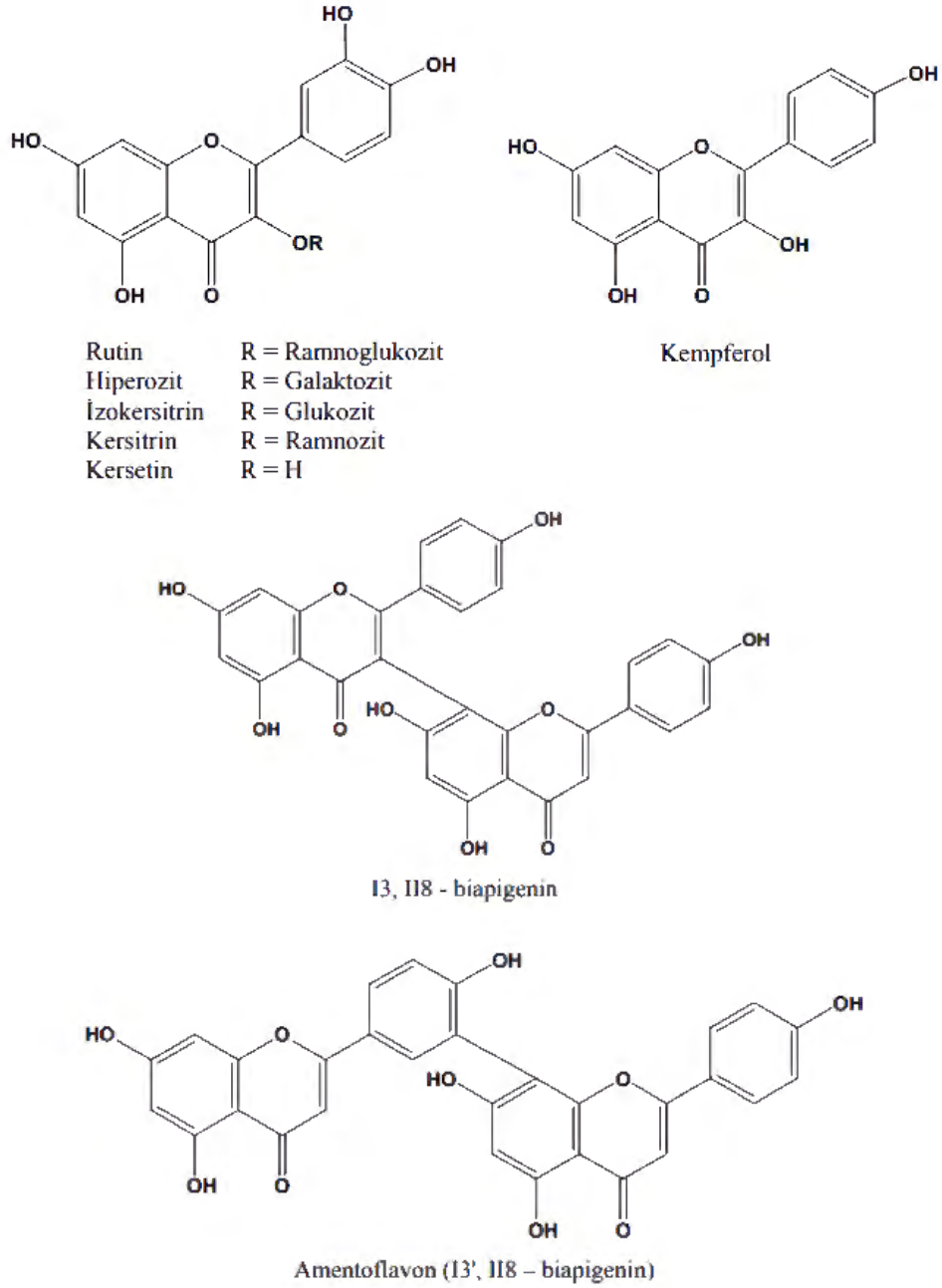
Flavonoidler bitkilerin yapısında en fazla yer alan sekonder bileşiklerdir. Flavonoidler renk veren bir yapıda olduklarından dolayı bitkiyi polen taşıyıcı canlılar için odak noktası haline getirerek bitkiye doğru çekme işlevleri vardır. Yapraklarda bulunan flavonoidlerse, bitkiyi çeşitli UV-B radyasyonlarından koruyup bazı patojen mantarlardan uzak tutarlar. Aynı zamanda flavonoidler, bitki büyüme hormonlarının kontrolünde ve fotosentezde, enerji transferinde, fotosensibilizasyon reaksiyonlarında da rol oynarlar. İçerdikleri hetero halkaları nedeniyle bölümlere ayrılmalarında önem taşırlar (Cushnie ve Lamb, 2005). *Hypericum* türlerinin yapısında bulunan önemli kimyasal flavonoidlerin açık formülleri Şekil 2.7’de verilmiştir.

Çiçek ve yapraklarda daha fazla flavonoid varken gövde de bu oran daha azdır. Flavonoidler, flavonoller (kamferol, kersetin), flavonlar (luteolin), biflavonlar (biapigenin), mirisetin ve amentoflavon, glikozitler (hiperozit, izokersitrin ve rutin), gibi bileşiklerden ve kateşinlerden meydana gelmektedir (Barnes vd., 2001; Olliver vd., 1985).

*H. avicularifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*’un fenolik bileşikleri üzerinde yapılan çalışmalarda, bitkide rutin, hiperozid, izokersetin, kersitrin ve kersetin, apigenin-7-O-glikozit tespit edildiği bildirilmiştir (Çırak vd., 2007b).

Çırak ve arkadaşlarının (2007b) çalışmasında sekiz *Hypericum* türünün (*H. avicularifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*, *H. origanifolium*, *H. lydium*, *H. orientale*, *H. perforatum*, *H. montbretii*, *H. pruinatum*, *H. perforatum*) EtOH

ekstrelerinin kimyasal bileşimi HPLC ile araştırılmış, hepsinde hiperozit ve kersetin varlığı bildirilmiştir.



Şekil 2.7. *Hypericum* türlerinde bulunan başlıca flavonoitler

#### 2.3.4. Uçucu yağlar

Uçucu yağlar genel anlamda bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve marin organizmalardan oluşturulan sıvı yapıdaki, canlıya koku ve tat özelliklerini sağlayan uçucu maddeler karışımı olarak bilinmektedir (Bakkali vd., 2008).

*Hypericum* türleri, genel olarak uçucu yağlar açısından yoksun türler olarak sınıflandırılmasına rağmen, uçucu yağlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler yönünden önemli oldukları bildirilmiştir (Crockett, 2010). *Hypericum* türlerinden elde edilen uçucu yağların büyük oranda hidrokarbonlar ya da mono ve seskiterpenlerden oluştuğu rapor edilmiştir (Ríos, 2016).

*Hypericum* cinsinin uçucu yağ bileşimleri birçok faktöre göre değişebilmektedir. Bunlar coğrafik dağılım, mevsimsel değişiklikler, uçucu yağın üretildiği ve biriktiği organa göre uçucu yağ kompozisyonunda farklılıklar görülebilmektedir (Guedes vd., 2012).

*Hypericum* türlerinde uçucu yağ bileşenleri genellikle yaprak ve çiçeklerde bulunan deliğe benzer glandlarda yer almaktadır, bu yapılarda bulunan uçucu yağ miktarı, çiçeklenme zamanının başlaması ile bitişi gibi dönemlerde farklılık gösterebilmektedir (Nahrstedt ve Butterweck, 1997).

2010 yılında yapılan bir çalışmada 88 *Hypericum* türünün uçucu yağ kompozisyonu derlenmiş ve ana bileşikleri şu şekilde listelenmiştir:  $\gamma$ -kadinen; 2,4-diizopropenil-1-metil-1-vinil-sikloheksan, izokaryofililen, menton,  $\alpha$ -guaiene, hegzadekanik asit, (*E*)-2-heksanal,  $\gamma$ -Himakalen; ishwarane, terpinolen,  $\alpha$ -gurjunen, ar-kurkumen;  $\beta$ -selinen,  $\gamma$ -muurolen,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -humulen, *cis*-ödesma-6,11-dien, *cis*- $\beta$ -guianen, ödesmadienon, kuparen, trikosan,  $\delta$ -kadinen,  $\beta$ -seskifellandren,  $\gamma$ -kurkumen,  $\alpha$ -kurkumen,  $\gamma$ -gurjunen, (*Z,Z*)-9,12-oktadekadienik asit, allo-aromadandren; *T*-kadinol; 4,5-dimetil-2-etilfenol; timol, (*Z*)- $\beta$ -osimen,  $\gamma$ -terpinen, *n*-hegzadekanik asit, 7-hidroksikalamenen, tetradekanol; *p*-farnesen,  $\beta$ -terpen,  $\alpha$ -kadinol, 1-setanol, globulol, osimen,  $\alpha$ -kopaen;  $\alpha$ -longipinen, bisiklogermakren, (*E*)- $\gamma$ -bisabolen, *cis*-kalamenen, eremofilen,  $\alpha$ -humulen, sabinen,  $\beta$ -bisabolen,  $\beta$ -ödesmol, desil asetat, alloaromadendrene, (*E*)-nerolidol, (*Z*, *Z*)-farnesol,  $\alpha$ -muurolen,  $\beta$ -akoradien, (*E*)-anetol, paçulen, (*E,E*)- $\alpha$ -farnesen,  $\alpha$ -*trans*-bergamoten, humulen oksit II, 2,4-dimetilheptan'dır (Crockett, 2010).

Aynı çalışmada, 11 farklı ülkede yetişen *H. perforatum* örneklerinin uçucu yağlarının ana bileşikleri; hegzadekanik asit, *n*-nonan; *n*-undekan; humulen, 1-tetradekanol,  $\beta$ -funebren, 1-dodekanol ve  $\gamma$ -muurolen, *n*-dekan,  $\beta$ -selinen;  $\alpha$ -selinen, heksadekanik asit; *n*-tetradekanol; timol,  $\alpha$ - ve  $\gamma$ -ödesmol; bisiklogermakren,  $\alpha$ -amorfen, 2,6-dimetilheptan, 2,6-dimetiloktan, viridiflorol; tetradekanol,  $\alpha$ -bergamoten; (*E*)-anetol,  $\beta$ -farnesen, (*Z*)- $\beta$ -farnesen, bis-(2-etil)-1,2-benzen-dikarboksilik asit; *n*-

eikosan; 1-tetradekanol; palmitik asit; 10-metil-1-undesen, 10-metil-1-undesen; 1-tetradekanol olarak derlenmiştir (Crockett, 2010).

Bir başka çalışmada ise, 2012-2022 yılları arasında 45 *Hypericum* türünün uçucu yağlarının ana bileşiklerinin literatür taraması yapılmıştır. Ana bileşikler;  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -elemen,  $\beta$ -selinen,  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -selinen, osthol,  $\gamma$ -muurolen, germakren D,  $\beta$ -karyofillen, spatulenol, curdione, eikosil nonil eter, ancak Undes-10-inoik asidin -3-yn-2-il esteri, palmitil palmitoleat, *n*-nonan, izo-longifolen,  $\delta$ -kadinen, iswaran, allo-aromodendren,  $\alpha$ -terpineol, (*E*)- $\beta$ -farnesen, sabinen, mirsen, geranil asetat, (*E*)- $\beta$ -osimen,  $\beta$ -fellandren, *cis*- $\beta$ -guaiene,  $\delta$ -selinen, izolongifolan-7- $\alpha$ -ol, triakontan, 1-iodotetrakosan, 2-metil- 2-dekanol, 2-(5-etenil-5-metiloksolan-2-il) propan-2-il etil karbonat, aromadendren, *n*-undekan, 2-metil oktan, (2*Z*)-nonenol, *n*- dekanal, allo-aromadandren epoksit, *trans*-kalamenen, hegzadekanoik asit, limonen, verticiol, 3-metil-nonan, 2-metil-oktan, minenon, tetradekanol, 2,6-dimetil-heptan, dekan, dodekan, etilsikloheksan, 5 -metilnonan, 3-metilnonan, tetradekan,  $\alpha$ -amorfen, karvakrol, heptakosan, geranilgeraniol, palmitik asit, (*Z*)- $\beta$ -osimen, (*E*)- $\beta$ -osimen, bisiklogermakren, dodekanoik asit, baeckeol, 1-hekzanal, benzoik asit, sikloheksasiloksan olarak bildirilmiştir. (Grafakou vd., 2022)

*H. origanifolium* türünün uçucu yağı bitkinin toprak üstü yapılarından hidrodistilasyon ile elde edilmiştir. Ana bileşiklerinin  $\alpha$ -selinen (%19,62),  $\beta$ -selinen (%16,12), spatulenol (%4,21-5,1),  $\gamma$ -muurolen (%4,6-4,7) ve  $\delta$ -cadinen (%7,7-8,2) olduğu bulunmuştur (Bertoli vd., 2015).

*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* 'un toprak üstü kısımlarının hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ bileşiklerinin araştırıldığı bir çalışmada, Yeniköy ilçesinden %99,4 olmak üzere bileşiklerin içerikleri aydınlatılmıştır ve ana bileşikler  $\alpha$  ve  $\beta$ -selinen (%12-%16), *cis* ve *trans* linalol oksit (%7-%13)'tir (Çırak ve Bertolli, 2013).

Bir diğer çalışmada Şanlıurfa'dan toplanan *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* 'un toprak üstü kısmı su distilasyonu yöntemi ile %89,8 olmak üzere ana bileşikleri aydınlatılmıştır. Bunlar da,  $\alpha$ -pinen (%52,1), germakren D (8,5%) ve  $\beta$ -pinen (%3,6) olarak bulunmuştur (Yüce ve Bağci, 2012).

*H. avicularifolium* subsp. *depilatum* var. *bourgaei* (Aydın, Didim)'un toprak üstü kısımlarının su distilasyonu yöntemi ile uçucu yağ elde edilip GC ve GC/MS analizi yapıldığında ana bileşiklerin hekzadekanoik asit (%28), laurik asit (%11,3), miristik asit (%9,7) karyofillen oksit (%8,7) olduğu tespit edilirken uçucu yağ veriminin de %1,3 olduğu görülmüştür (Küçük vd., 2015).

### 2.3.5. Diğer bileşikler

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını fenolik asitler teşkil etmektedir. *Hypericum* türlerinin (*Hypericum hircinum* subsp. *majus*, *H. pallens* L., *H. russegeri* L. ve *H. lanuginosum* L.) üzerine yapılan bir çalışmada fenolik asitlerden ferulik asit, klorojenik asit ile kafeik asit elde edildiği görülmüştür (Odabas vd., 2016).

*H. avicularifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* 'un fenolik bileşikleri üzerine yapılan çalışmada, bitkinin klorojenik asit içerdiği ortaya konmuştur (Çırak vd., 2007b).

Tanenler, *Hypericum* türlerinde bulunan bir diğer bileşik grubudur. Tanenler bitkiler tarafından üretilip bitkinin fizyolojik ihtiyaçlarına göre koruma işlevini yerine getirerek antioksidan özelliği gösterirler (Germ vd., 2010). *H. lanuginosum* bitkisinde yapılan bir araştırmada su, aseton, MeOH ve hekzan ekstraktları hazırlanmıştır. Bitkinin hekzan eksteresi hariç diğer ekstraktlarda tanen bileşikleri açısından oldukça zengin olduğu görülmüştür (Jaradat vd., 2022).

*H. perforatum*'un kimyasal bileşiklerinde kondanse tanenlerin olduğu 1925'de bulunmuş ve 1953'de ise Neuwald ile Hagenström, bitkinin yapraklarında %12,4, sürgün kısımlarında %3,8 ve çiçeklerinde %16,2 miktarlarında tanen bileşiklerini bulmuşlardır (Ernst, 2003).

*H. perforatum* bitkisinin toprak üstü yapılarında az da olsa ksanton bileşikleri de görülmektedir. Ksantonların bitkide en çok görüldüğü kısım ise köktür. Kitanov ile Nedialkov'un 1998'deki çalışmasında *H. perforatum* türünün toprak üstündeki yapılarında mangiferin görülmüştür (Kitanov ve Medialkov, 1998).

*Hypericum* türlerinde ayrıca, fenilpropanoitler, A ve C vitaminleri, steroller vd. maddelerin de bulunduğu kayıtlıdır (Varel, 2011).

## 2.4. *Hypericum* L. Cinsinin Biyolojik Aktiviteleri

Birçok *Hypericum* türü ile ilgili yapılan biyoaktivite çalışmaları, cinse ait türlerin antidepresan (Williamson, 2001), antistres (Kumar vd., 2001a), anti-aging (Boran, 2018), antioksidan (Sun vd., 2014), antiviral (Hu vd., 2016), anti-*Helicobacter pylori* (Moon vd., 2011), antifungal (Tocci vd., 2018), antimikrobiyal (Saddiqe vd., 2010), antikanser (Agostinis vd., 2002), sitotoksik (Al-Anee vd., 2023) hepatoprotektif (Bayramoğlu vd., 2014), anti-enflamatuvar ve analjezik (Kumar vd., 2001b, Dellaflora vd., 2018), antinosiseptif (Stojanović vd., 2016) vb. çeşitli aktivitelere sahip olduklarını göstermiştir. Bu bölümde tez kapsamında çalışılan aktiviteler derlenmiştir.

### 2.4.1. Antioksidan aktivite

Dış orbitalinde bir ya da birçok eşleşmemiş elektrona sahip atom ya da moleküller, serbest radikaller olarak isimlendirilir. Eşlenmemiş elektron bulundurmaları yüzünden her zaman kararsız yapıda olurlar ve diğer moleküllerle tepkimeye girme eğilimi gösterirler. Bu radikaller nitrojen temelli olduğunda reaktif nitrojen türlerine (RNT), oksijen kaynaklı olduğunda reaktif oksijen türleri (ROT) adını alır. ROT'a örnek olarak hidroksil (OH<sup>\*</sup>), süperoksit anyon (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), alkoksil (RO<sup>\*</sup>) ve peroksil (ROO<sup>\*</sup>) gibi yapılar gösterilebilir. Bu tür reaktifler mutajendirler ve Alzheimer, kanser ve AIDS gibi ciddi hastalıklara yol açabilirler (Gioti vd., 2009).

Biyolojik sistemde oksidatif hasarın meydana getirdiği etkiyi azaltan moleküller antioksidanlardır. Bu moleküllerin vücuda alınmasıyla hasar alan vücut iyileşir ve diğer hastalıkların doğması önlenmiş olur (Singh ve Downing, 1995). Birçok tayin yöntemi kullanılarak bitkilerin antioksidan aktiviteleri araştırılmaktadır. Bilhassa bitkisel fenollerin öncül antioksidan aktivite gösterdikleri bilinmektedir (Rice-Evans vd., 1997).

Genel olarak *Hypericum* türlerindeki bileşikler incelendiğinde zengin fenolik içeriğinden dolayı antioksidan aktivite gösterdikleri söylenebilir.

*H. organifolium* (Sivrihisar), *H. montbretti* (Eskişehir, Kalabak köyü) ve *H. perforatum*'un (Eskişehir, Türkmen Dağı) yaprak ve çiçeklerinin MeOH, su ve EtOAc ekstralarının antioksidan aktivitesi incelenmiş ve *H. perforatum* ve BHT ile karşılaştırma yapılmıştır. En yüksek antioksidan aktivite EtOAc ile hazırlanan ekstelerde bulunmuştur. MeOH ekstralarında gerçekleşen antioksidan aktivite sulu ekstreler göre daha fazladır fakat EtOAc ekstralarından daha az olduğu tespit edilmiştir. *H. organifolium* yaprak

EtOAc ekstresi  $IC_{50}=3,37$  mg/ml; *H. montbretti* yaprak EtOAc ekstresi  $IC_{50}=2,84$  mg/ml; *H. perforatum* çiçek EtOAc ekstresi  $IC_{50}=2,63$  mg/ml değer ile en yüksek antioksidan aktiviteyi vermiştir. Aynı zamanda bu 3 bitki türünün EtOAc ekstreleri BHT'ye göre daha fazla antibiyotik aktivite göstermişlerdir (İbadova, 2006).

Başka bir çalışma da *H. aviculariifolium* (Eskişehir, Dağküplü-Şoförler Çeşmesi) ve *H. bithynicum*'un (Bilecik) MeOH ve su ekstrelerinin antioksidan aktivitesi incelenmiştir.  $IC_{50}$  değerlerine bakıldığı zaman *H. aviculariifolium* MeOH ekstresi ( $IC_{50}=0,16$  mg/ml) ile en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. En zayıf antioksidan aktiviteyi gösteren ekstre ise *H. bithynicum* su ekstresi ( $IC_{50}=0,21$  mg/ml) olmuştur (Türkten, 2022).

*H. origanifolium*, *H. scabrum* ve *H. perforatum* (Amasya)'un antioksidan aktivitelerinin ve ana bileşenlerinin incelendiği bir çalışmada, toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü-sulu ekstrelerinin DPPH' süpürücü aktivite deneyinde en güçlü aktiviteyi *H. perforatum* ( $3,17 \pm 0,23$  µg/mL) gösterirken en düşük aktiviteyi *H. origanifolium*'un ( $3,17 \pm 0,27$  µg/mL) gösterdiği bulunmuştur (Seyrekoğlu vd., 2022).

*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*, *H. salsugineum* ve *H. perforatum* (İç Anadolu) türlerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonundaki MeOH ekstreleri antioksidan aktiviteleri bakımından incelenmiş, *H. salsugineum*' un MeOH ekstresi  $88,29 \pm 0,96$  mg/ml ile en etkili ekstre olmuştur. *H. aviculariifolium*'un antioksidan aktivitesi  $86,88 \pm 0,87$  mg/ml ile *H. perforatum* MeOH ekstresine  $81,21 \pm 0,58$  mg/ml göre daha yüksektir. Tüm bitki ekstreleri BHT ve BHA ile karşılaştırıldığında antioksidan aktivitelerinin daha az olduğu görülmüştür (Maltas vd., 2013).

Başka bir çalışmada *H. origanifolium* (Sivrihisar, Tekören köyü) ve *H. montbretii*'nin (Kalabak köyü) çiçek ve yaprak kısımlarından hazırlanan EtOAc, MeOH ve su ekstreleri DPPH' süpürücü aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Ekstrelerin aktivitesi *H. perforatum* (Türkmen Dağı) ile karşılaştırılmıştır. Deney sonucunda, *H. origanifolium*'un yaprak EtOAc ekstresi  $IC_{50}$  değeri  $3,37 \pm 0,26$  µg/ml ile DPPH' süpürücü aktivitesinin *H. montbretii* yaprak EtOAc ekstresi  $IC_{50}$  değeri  $2,84 \pm 0,07$  g/ml ve *H. perforatum*'un yaprak EtOAc ekstresinde  $IC_{50}$  değeri  $2,57 \pm 0,12$  µg/ml ile BHT ( $IC_{50}$  değeri  $4,39 \pm 0,43$  µg/ml) 'den etkili olduğu görülmüştür (Öztürk vd., 2009).

## 2.4.2. Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal ilaçlar canlıların hastalıklarının tedavisinde çokça kullanılan ilaçlardır. Ancak antibiyotiklerin sık kullanımı bakterilerin direnç mekanizmalarının oluşmasına sebep olmuş, sonuç olarak bakterileri dirençli bir patojen haline getirmiştir (Gürel ve Aslan, 2019). Bakterilerin direnç mekanizmasının gelişmesiyle her geçen gün mevcut antimikrobiyal ilaçların kullanım alanı azalmakta, etkili yeni ilaçlara duyulan ihtiyaç ise artmaktadır (Erdoğan ve Everest, 2013).

Tüm bu nedenlerden dolayı bilim insanları bakterileri inhibe edebilmek için, yeni moleküllerin arayaşına girmişlerdir. Bilinen en önemli antibiyotik kaynakları küfler olarak görülse de bitkilerdeki sekonder metabolitlerin bir kısmı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Dall'Agnol vd., 2003). Bu sekonder metabolitlerin arasında; alkoloitler, flavonoitler, tanenler, izotiyosiyanatlar, lipidler, steroidler, glukozinolatlar, gallotanik asit, metil salisilat, bazı kompleks ve basit yapılı fenolikler bileşiklerin yer aldığı görülmüştür (Orhan vd., 2012).

Standart etken maddelerin ve bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerine bakabilmek için difüzyon testleri, dilüsyon testleri ve biyootografik yöntemler kullanılmaktadır (Balouiri vd., 2016).

*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (Batı Karadeniz) ve *H. origanifolium* türünün (Batı Karadeniz) çiçek ve yaprak kısımlarının EtOH ekstreleri, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* suşlarında antimikrobiyal aktiviteleri bakımından incelenmiştir. *H. aviculariifolium*'un en yüksek antimikrobiyal aktivitesi çiçek EtOH ekstresinin 64 µg/mL MİK değeri ile *P. aeruginosa*, *B. pumilis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* suşlarına karşı görülmüştür. Yaprak EtOH ekstresinde de *P. aeruginosa* suşuna karşı yine 64 µg/mL MİK değeri göstermiştir. *H. origanifolium* için en yüksek antimikrobiyal aktivite ise çiçek EtOH ekstresinin 32 µg/mL MİK değeri ile *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. pumilis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* suşlarına karşı görülmüştür (Gül vd., 2021).

Diğer çalışmada *H. aviculariifolium*'un (Eskişehir, Dağküplü-Şoförler Çeşmesi) toprak üstü kısımlarından MeOH ve su ile hazırlanmış eksrelerinin *S. aureus*, *E. coli*, *S.*

*enterica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* suşlarında antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Sonuç olarak *H. aviculariifolium*'un MeOH ekstresi deneydeki tüm mikroorganizmalara karşı 250-1000 µg/mL MİK değeri ile en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir (Türkten, 2022).

*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*, *H. perforatum* ve *H. salsugineum*'dan (İç Anadolu Bölgesi) bitkinin tamamı kullanılarak hazırlanan ekstrenin üzerine yapılan bir çalışmada Gram pozitif bakterilerden *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'e karşı  $97,65 \pm 1,74$  µg/ml MİK değeri görülmüştür. Diğer standart antibiyotiklerle karşılaştırıldığında güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. *H. perforatum*'un ise *L. monocytogenes* suşuna karşı  $29,68 \pm 4,35$  µg/ml; *H. salsugineum*'un *B. cereus* suşuna karşı  $781,25 \pm 0$  µg/ml MİK değeri ile en yüksek antimikrobiyal aktiviteleri gösterdikleri görülmüştür (Maltas vd., 2013).

Bir başka çalışma da *H. imbricatum*, *H. vacciniifolium*, *H. rupestre* (Mersin, İçel) türlerinin toprak üstü kısımlarının %80'lik EtOH ekstresi ile sulu ekstreleri, metisiline karşı dirençli *S. aureus* suşunda antimikrobiyal aktivitesi yönünden çalışılmıştır. Tüm bitkilerin *S. aureus* suşuna karşı gösterdiği en yüksek antimikrobiyal aktivite değerleri şu şekildedir; *H. imbricatum*'da EtOH ekstresi, 0,1-0,4 mg/mL MİK değeri; *H. vacciniifolium* EtOH ekstresi 0,4-1,6 mg/mL MİK değeri, *H. rupestre* EtOH ekstresi 0,8-3,2 mg/mL MİK değerlerini vermişlerdir (Dulger ve Hacıoğlu, 2009).

### **2.4.3. Sitotoksik aktivite**

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde kanser hastalarının sağlıklı insanlara göre bitkisel ürünleri tercih etme oranlarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Berretta vd., 2017). İnsanlar hastalık boyunca semptomları azaltmak, kanserin metastaz yapmasını önlemek, immün sistemi güçlendirmek vb. amaçlarla kemoterapi ve temel kanser tedavisine ek olarak bitkisel ürünleri tercih etmektedirler. Bununla beraber hastalık durumu ortadan kalkan kişilerden üçte birinin bu bitkisel ilaçları kullandıkları görülmüştür (Anderson ve Taylor, 2012).

Aynı zamanda kullanılan bitkisel ürünlerin içeriğindeki bitkisel antioksidanların, tedavi sırasında kemoterapötik ajanların oluşturabileceği toksik yan etkileri azaltabileceği ve daha yüksek dozlarda antikanser ilaçların alınmasına destek olabileceği de belirtilmiştir (Yıldız vd., 2018).

Kanser hastaları, tedavi süreçlerine katkı sağlayacağını, ilaçların yan etkilerini azaltacağını, psikolojik ve fiziksel olarak daha iyi hissedeceklerini düşünerek, bitkileri kurutarak çay, drog ve diğer bitkisel ürünler şeklinde kullanmaktadırlar (Viscuse vd., 2017).

Diğer yandan, *Hypericum* türlerinin kanser hastalıklarının tedavisinde tercih edilen bitkilerden olduğu bilinmektedir (Kintzios, 2006). ABD’de 7000 kişinin 5 sene izlendiği bir çalışmada, deneklere bitkisel takviyeleri kullanmaları söylenip kolorektal ve akciğer kanseri riskini nasıl etkilediği araştırılmıştır. *H. perforatum*’un düzenli kullanımını sonucu akciğer kanserine karşı koruyucu bir etkisi gözlenmezken, kolorektal kanserinin riskine karşı %65 oranında bir azalma etkisi olduğu görülmüştür (Satia vd., 2009).

Kersetin, *Hypericum* türlerinde flavonoidler içinde önem teşkil eden bir bileşiktir, kersetin-3-*O*- $\beta$ -D-galaktopiranozitin antikanser, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesi bilinmektedir (Kong vd., 2020).

Ayrıca *H. perforatum*’un ana bileşeni olan hiperforinin, kanserojen maddelerin genotoksik etkilerini önlediği tespit edilmiştir. Hiperforin, kanser hastalarında inflamasyon araçlarını yavaşlatma ve reaktif oksijen türleri oluşumunu ve vücuttaki pH dzensizliğini düzelten bir bileşiktir (Menegazzi vd., 2020).

Hiperforinin antitümör ve antianjiogenik aktiviteleri de rapor edilmiştir. Hücre içi çeşitli hedefler üzerine yönelenerek neoplastik hastalıkların tedavisini üstlenir hem de hastalığın oluşmasını önleyerek tümör oluşumunu engeller. Bu bileşik, tümör büyümesini engelleyen sinyal yollarında moleküllere karşı pleiotropik aktivite göstererek etki etmektedir (Deng vd., 2020).

Hiperisin molekülünün birbirinden farklı üç prostat kanseri hücre hattında oldukça iyi sitotoksik aktivite gösterdiği görülmüştür (Xie vd., 2001). *H. perforatum* prostat kanseri için önemli bir yer teşkil eder çünkü serotonin hormonu bu kanserin erken teşhisinde bakılacak parametrelerden biridir. Kandaki hücrelerin büyümesine yardımcı olan serotonin hormonunun artması ve prostat antijen oranının yükselmesiyle tanı konulmaktadır. Yapılan çalışmalarda *H. perforatum* türünün MeOH ekstresinin serotonin hormonunun alınmasını iptal ettiği ve bunun yanında kontrolsüz çoğalan bu hücrelerin büyümesini durdurduğu görülmüştür. Ayrıca bitkide yer alan hiperisin, hiperforin ve kersetin bileşiklerinin sitotoksik aktivite göstererek kanserli hücreleri öldürdüğü tespit

edilmiştir. Bu şekilde *H. perforatum*'un prostat kanseri için umut vadettiği görülmüştür (Martarelli vd., 2004).

*H. origanifolium*, *H. montbrettii* ve *H. perforatum*'un çiçek ile yapraklarından elde edilen ekstralarının HeLa, A549 ve NIH3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif aktiviteleri incelenmiştir. *H. montbrettii* çiçek ekstresi, A549 hücrelerinde 100 µg/ml konsantrasyonunda uygulandığında maksimum inhibisyon (% 45,2683 ± 1,0253) ikinci günde elde edilmiştir. *H. montbrettii* yaprak ekstresinde ise A549 hücrelerinde 100 µg/ml dozunda (% 51,5308 ± 2,9960) üçüncü günde sonuçları görülmüştür. *H. montbrettii* çiçek ekstresi HeLa hücrelerine 250 µg/ml dozda uygulanması ile dördüncü günde maksimum sitotoksik aktivite (% 15,7500 ± 0,6160) göstermiştir. *H. montbrettii* yaprak ekstresi HeLa hücrelerinde 250 µg/ml dozda maksimum aktiviteyi (% 26,0700 ± 1,8520) dördüncü günde vermiştir. *H. montbrettii* çiçek ekstresi sağlıklı olan NIH3T3 hücrelerinde DMSO'ya oldukça yakın aktivite gösterdiği, maksimum sonucun (% 12,8938 ± 5,9829 µg/ml) 250 µg/ml dozda dördüncü günde gösterdiği görülmüştür. *H. montbrettii* yaprak ekstresi NIH3T3 hücrelerinde dördüncü günde DMSO'ya benzer şekilde 250 µg/ml dozda (% 11,7300 ± 2,3256) inhibisyon göstermiştir. *H. origanifolium* çiçek ekstresi ile, A549 hücrelerinde maksimum sitotoksik aktivite (% 34,3650 ± 0,4879) 100 µg/ml dozda üçüncü günde elde edilirken, HeLa ve NIH3T3 hücrelerinde 250 µg/ml dozda dördüncü günde maksimum sitotoksik aktivite (sırasıyla % 20,7250 ± 1,6330 ve % 22,0875 ± 2,359) gözlenmiştir. *H. origanifolium* yaprak ekstresi ise, A549 ve HeLa hücrelerinde en yüksek sitotoksik aktiviteyi 250 µg/ml dozda (sırasıyla % 55,9588 ± 1,4989 ve % 27,3863 ± 2,7658) dördüncü günde göstermiştir. Sağlıklı hücre olan NIH3T3 hücrelerinde verilen dozdan dolayı sitotoksik aktivitenin görüldüğü ve bu aktivitenin ilk günden başlayarak artmasıyla dördüncü güne kadar devam ettiği, en yüksek verinin 250 µg/ml dozda (% 16,0125 ± 2,3256) inhibisyon ile dördüncü günde görüldüğü tespit edilmiştir. *H. perforatum* toprak üstü kısımları ile hazırlanan ekstrenin A549 ve HeLa hücrelerine 250 µg/ml dozda uygulanması ile maksimum sitotoksik aktivitenin (sırasıyla % 40,1358 ± 1,1194 ve % 18,3413 ± 1,1708) üçüncü günde elde edildiği görülmüştür. Sağlıklı olan NIH3T3 hücrelerinde doz nedeniyle toksisite oluştuğu ve aktivitenin ikinci günden başlayarak artmasıyla dördüncü güne kadar devam ettiği, en yüksek sonucun 250 µg/ml dozda (% 11,7850 ± 0,3409) inhibisyon ile dördüncü günde görüldüğü tespit edilmiştir (Güzey, 2007).

Işığın birçok hastalıkta kullanılması ve iyileştirici özelliği binlerce yıldır bilinmektedir. Fotodinamik terapi (PDT) son yüzyılda ortaya çıkmış ve sıkça kullanılmış bir yöntemdir (Dougherty vd., 1998). PDT'nin prensibinde ışığa karşı duyarlı bir ajan, serbest oksijen molekülü ile görünür ışık veya UV ışığı tercih edilmektedir. Tercih edilen ışığa karşı duyarlı olan ajan yani fotosensibilizan madde kanserli hücreler tarafından absorbe edilir ve tutulur. UV ışığın dalga boyu ise duyarlaştırıcı ajan ile aynı spektrumda olmalıdır. Bu duyarlaştırıcı ajan, UV ışığı ve oksijenli ortamda sitotoksik ürünler oluşturmaktadır. Oluşan bu ürünler, hücre zarındaki yağ ile proteinleri oksitler ve tümörün zarar görmesini sağlayarak hücreyi öldürür (Liu vd., 2000). Bu tedavi yöntemi, *in vivo* ve *in vitro* olarak kullanılmaktadır. Kontrolsüz çoğalan kötü huylu olmayan hücrelerin ve kanserli hücrelerin çoğalmasının durdurulmasını sağlayıp nekroz ve apoptozu başlatmaktadır (Ali vd., 2001).

*H. perforatum*'un %70'lik EtOH ekstresinin menopoz dönemine giren kadınlarda östrojeni taklit ederek agonist bir özellik göstermiştir. Aynı zamanda hiperisin PDT'nin ışığa karşı duyarlaştırıcı etkisi nedeniyle de kullanılmaktadır. Buna dair yapılan bir çalışmada, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hattında kemo-önleyici etkisini anlayabilmek için bitkinin pro-apoptotik ve antiproliferatif aktivitelerine bakılmıştır. Sonuç olarak mitokondriyal yolun aktivasyonu ve AMPK/mTOR'un baskılanmasıyla EtOH ekstrenin bu etkileri gösterdiği görülmüştür (You vd., 2018).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyal

Çalışılan bitkilerin adları, lokalite bilgileri, toplandığı tarihler ve herbaryum numaraları Tablo 3.1’de, herbaryum örneklerinin ve stereomikroskop görüntülerinin fotoğrafları Görsel (3.2-3.4)’te verilmiştir.

Türlerin tayinleri, “Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası” (Robson, 1967) eserlerinden yararlanılarak Uzm. Bio. Merve Has ve Prof. Dr. Galip Akaydın tarafından yapılmıştır.

Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası’na göre *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* N.Robson var. *depilatum* (Freyn & Bornm.) olarak teşhis edilen takson, tez kapsamında WFO’ya göre (http-3) son kabul edilen ismi olan *H. organifolium* var. *depilatum* (Freyn & Bornm.) N. Robson olarak anılacaktır.

**Tablo 3.1.** Bitkilerin herbaryum örneklerine ait bilgiler

<i>H. organifolium</i> var. <i>organifolium</i>				
Lokalite	Yükseklik	Tarih	Esse No	
B3 Eskişehir: Odunpazarı, Maide Balel Huzurevi civarı.	932.3 m	24.05.2022	15877	
<i>H. organifolium</i> var. <i>depilatum</i>				
Lokalite	Yükseklik	Tarih	Esse No	
B3 Eskişehir: Odunpazarı, Lütfiye Mahallesi civarı.	947.8 m	08.06.2022	15882	

**3.1.1. *Hypericum organifolium* var. *organifolium* Willd. Sp. Pl. ed. 4, 3(2): 1467 (1802)**

**Sinonimler:**

*H. organifolium* var. *willdenovianum* C.A. Mey in Ind. Oct. Sem. Hort. Bot. Imp. Petrop.: 64 (1841).

*H. pulverulentum* in Fenzl Pug. Pl. Nov. Syr. 7 (1842).

*H. gheiwense* Boiss. in Fl. Orient. 1: 810 (1867) (http-7).

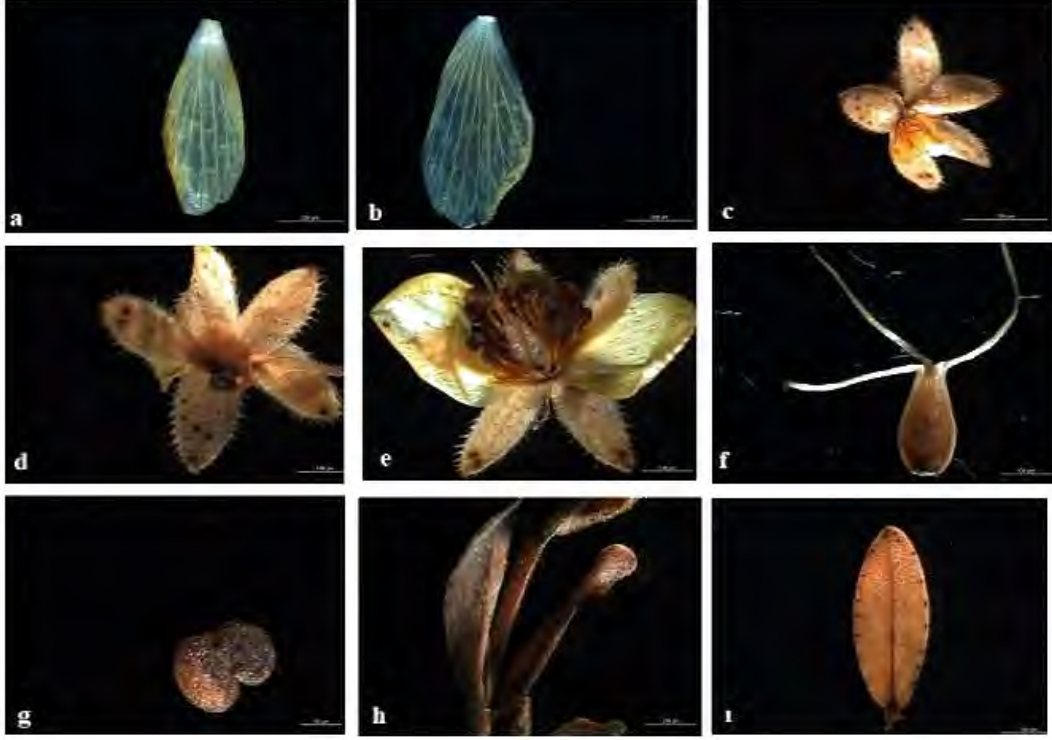
Bitkiye ait fotoğraflar Görsel 3.1.'te verilmiştir.



**Görsel 3.1. *H. organifolium* var. *organifolium* Willd.**

**A: Genel Görünüş, B: Çiçek, (Foto:Merve Has) C: Herbarium Numunesi**

*H. organifolium* var. *organifolium*'un stereomikroskop görüntüleri Görsel 3.2. verilmiştir.



**Görsel 3.2.** *H.organifolium* var. *organifolium*'un stereomikroskop görüntüleri a)petal içi b)petal dışı c)sepal içi d)sepal dışı e)çiçek genel f)ovaryum g)stamen h)gövde genel ı)yaprak genel  
(Foto: Emine Yıldız)

**3.1.2. *Hypericum organifolium* var. *depilatum* (Freyn & Bornm.) N. Robson in Phytotaxa 4: 38 (2010)**

**Sinonimler:**

*Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* (Freyn & Bornm.) N.Robson in Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh 27: 203 (1967)

*Hypericum organifolium* subsp. *depilatum* Freyn & Bornm. in Oesterr. Bot. Z. 41: 366 (1891)

*Hypericum depilatum* (Freyn & Bornm.) Bornm. in Feddes Rep. Beih. 89: 126 (1938) (http-6).

Bitkiye ait fotoğraflar Görsel 3.3'de, stereomikroskop görüntüleri Görsel 3.4.'de verilmiştir.



### 3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.2’de deneylerin gerçekleştirilmesinde kullanılan kimyasal maddeler belirtilmiştir.

**Tablo 3.2.** *Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler*

Madde	Marka
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH,1gr)	SAFC®
5,5’-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma, Almanya
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck
Donepezil	Sigma, Almanya
Gallik asit (100 g)	SAFC®
AChE, electric eel	Sigma, Almanya
Folin-Ciocalteu’s phenol reagent (1L)	SAFC®
Asetiltiyokolin iyodür (ATC)	Fluka, Almanya
BChE, equine serum	Sigma, Almanya
Jelatin	SAFC®, Almanya
Takrin	Sigma, Almanya
Sodyum karbonat (500 g)	SAFC®
DMSO	Merck
Bütiriltiyokolin iyodür (BTC)	Fluka, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma, Almanya
Absolute ethanol (2.5 lt)	Supelco
Tyrosinase from mushroom, $\geq 1000$ unit/mg solid	SAFC®
Kojik asit (5 g)	SAFC®
L-DOPA	SAFC®
Methanol (2.5 lt) HPLC, gradient grade, $\geq 99.9\%$	SAFC®
Mueller Hilton Agar	Sigma-Aldrich
Mueller Hilton Broth	Sigma-Aldrich
Agar agar	Sigma-Aldrich
Tween 80	Merck
MCF-7 Hücre Hattı	: ATCC, USA
A549 Hücre Hattı	: ATCC, USA
NIH3T3 Hücre Hattı	: ATCC, USA

### 3.3. Kullanılan Aletler

Tablo 3.3'te deneylerin gerçekleştirilmesinde kullanılan aletler belirtilmiştir.

**Tablo 3.3.** *Kullanılan aletler*

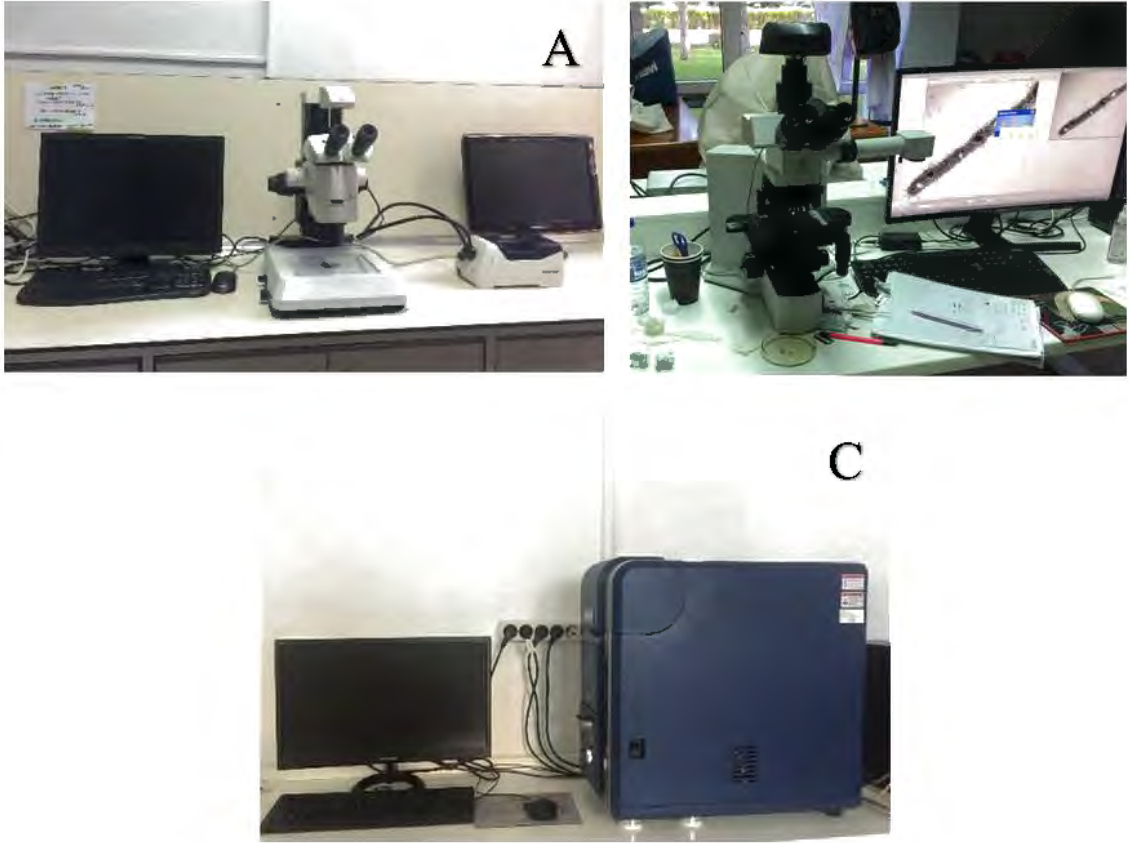
Marka ve Aletler	Amacı
Mettler Toledo/ hassas terazisi	Örneklerin tartımı
BINDER marka etüv	Ekipmanları kurutma işlemi
Elmasonic S 100 (H)/Ultrasonik su banyosu	Fraksiyon-Ekstre çözeltisi hazırlama, Ekstre çözme işlemi
GFL® 1086/Çalkalamalı su banyosu	Fraksiyonların yoğunlaştırılması
Heidolph marka rotavapor	Fraksiyonların konsantre edilmesi
WTW marka pH ölçer	Tampon çözeltisinin pH ayarlama işlemi
Heidolph reaxtop marka vortex cihazı	Sıvı örneklerin çözünmesi için karıştırılması
Buzdolabı	Numunelerin saklanması
Liyofilizatör	Lyovac
McFarland Densitometre	Biosan
Mikroplate okuyucu	Biotek, Synergy, H1
Mikroskop	Zeiss
Nükleer manyetik rezonans	Bruker
Otoklav	Hirayama HV-50
Otomatik tekli ve çoklu pipetler	Eppendorf
pH Metre	WTW-Inolab pH720
Rotavapor	Heidolph
Spektrofotometre	Shimadzu PharmaSpec UV-1700
Steril kabin	Class Bio II
Sıvı kromatografisi- Kütle spektroskopisi/Kütle spektroskopisi	Applied Biosystem 3200Q trap
Ultra derin doldurucu	New Brunswick Scientific
Ultrasonik banyo	ELMA S100H
Analitik terazi	Mettler Toledo-MS204S
Bakteriyolojik etüv	MMM-Incucell
Clevenger Apareyi	İldam
Çalkalamalı inkübatör	Stuart SI 500
ELISA	ELx808 IU
Gaz kromatografisi	Agilent 6890 N GC
Gaz kromatografisi/Kütle spektroskopisi	Agilent 5975 GC-MSD
İyon tuzaklı uçuş zamanlı kütle spektrometresi	Shimadzu

### 3.4. Morfolojik Görüntüler ve Anatomik Çalışmalar

Anatomik çalışmalardan önce tez konusu *Hypericum* taksonlarının teşhisinin gerçekleştirilmesi ve sahip oldukları kenar, kenar içi ve yüzeysel glandların belirlenmesi için bitki örneklerinin toprak üstü kısımları Leica M205 C stereo mikroskop (Görsel 3.5 A) ile incelenmiş ve fotoğraflandırılmıştır.

Anatomik inceleme için %70'lik alkolde saklanan kök, gövde, yaprak yapılarından enine kesitler alınmış ve Sartur reaktifi ile incelenmiştir. Kesitler, Olympus BX51T mikroskobu (Görsel 3.5 B) ile incelenerek fotoğraflandırılmıştır (Kameram programı).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) çalışmaları Hitachi TM3030 Plus masaüstü mikroskobu (Görsel 3.5 C) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



**Görsel 3.5. Mikroskoplar**

**A: Leica M205 C, B: Olympus BX51T C: Hitachi TM3030 Plus SEM)**

### 3.5. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

*H. origanifolium* var. *origanifolium* ve *H. origanifolium* var. *depilatum*'un toprak üstü kısımları serin, ışık almayan, nemden uzak bir laboratuvar ortamında kurutulmuştur (Görsel 3.6). Kurutulan bitki materyali, öğütücü kullanılarak toz haline getirilmiş (Görsel 3.7) ekstraksiyon işlemi MeOH ve EtOAc ile yapılmıştır. Toz haline getirilen *H. origanifolium* var. *origanifolium* 12,11 g tartılmış, üzerine 200 ml MeOH eklenerek 15 dakika ultrasonik banyoda tutulmuş, ardından 15 dakika çalkalayıcı da ekstraksiyon işlemine devam edilmiştir. (Görsel 3.8, 3.9, 3.10) Yine aynı bitkiden 11,85 g tartılarak 200 ml EtOAc eklenerek ekstraksiyon yapılmıştır. *H. origanifolium* var. *depilatum*'dan ise 10,33 g tartılarak üzerine 200 ml MeOH eklenmiştir ve yine 10,34 g tartılarak üzerine 200 ml EtOAc eklenerek iki ayrı çözücü ile ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Tüm bu işlemler her bitki ve çözücüsü için 3 kez tekrarlanmıştır.



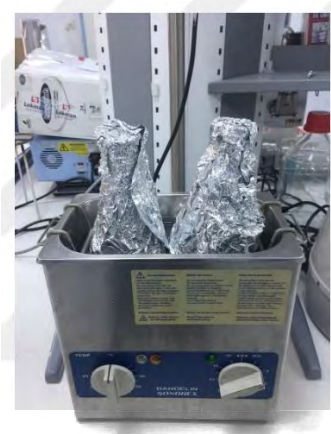
**Görsel 3.6.** Laboratuvar ortamında kurutulan bitki materyali



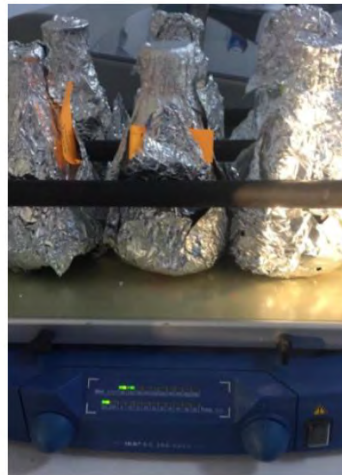
**Görsel 3.7.** Bitki materyalini toz haline getirme işlemi



**Görsel 3.8.** Toz haline getirilmiş bitki materyalinin tartımı



**Görsel 3.9.** Ultrasonik banyo işlemi



**Görsel 3.10.** Çalkalayıcı işlemi

Çalkalama işleminden sonra örnekler pileli kâğıttan süzölmüştür (Görsel 3.11). Ekstraksiyon işlemleri 3 kez daha tekrarlanarak tüm örnekler birleştirilip, elde edilen ekstre numunelerinden MeOH ve EtOAc, alçak basınçta rotavaporda (Görsel 3.12) (< 45°C) kuruluğa kadar uçurulup +4 °C de buzdolabında saklanmıştır. Ekstraksiyon verimleri % a/a olarak hesaplanmıştır.



**Görsel 3.11.** Süzme işlemi



**Görsel 3.12.** Süzöntülerin rotavaporda (Heidolph) uçurulması işlemi

Elde edilen ekstraktler aşağıdaki şekilde isimlendirilmiştir:

**HOR-MeOH :** *H. organifolium* var. *organifolium* MeOH ekstresi

**HOR-EtOAc :** *H. organifolium* var. *organifolium* EtOAc ekstresi

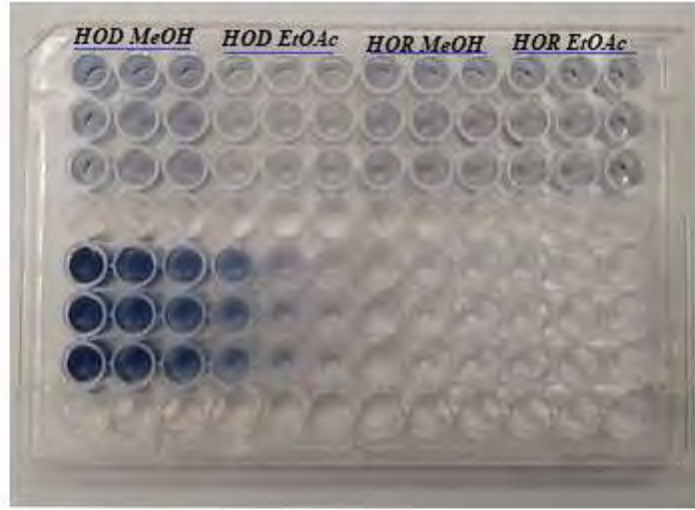
**HOD-MeOH :** *H. organifolium* var. *depilatum* MeOH ekstresi

**HOD-EtOAc:** *H. organifolium* var. *depilatum* EtOAc ekstresi

### 3.6. Miktar Tayini ve Kimyasal Çalışmalar

#### 3.6.1. Toplam fenolik madde miktar tayini

Bitki ekstrelerindeki toplam fenolik madde miktarını bulabilmek amacıyla, Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılıp gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla, 20 µl bitki ekstresi mikropalak kuyucuklara eklenmiştir. Ardından 20 µl GA (Gallik asit) koyulmuştur. Kontrol olarak 20 µl MeOH koyulurken tüm 96- kuyucuklu mikropalağa 1560 µl distile su eklenmiştir. 100 µl FCR’de koyulup karışım, 1-2 dakika bekletildikten sonra 300 µl %20’lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ile deney tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 2 saat bekletildikten sonra oluşan karışım 300 µl’lik 96-kuyucuklu mikropalağa alınıp 760 nm’de absorbansına bakılmıştır (Görsel 3.13). Gallik asidin kalibrasyon eğrisi 1mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.2 mg/ml ve 0.1 mg/ml konsantrasyonlarına göre ayarlanarak diğer örneklerle kıyaslanmıştır. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlanarak, bitki ekstrelerindeki toplam fenol madde miktar tayinine bakılmıştır (Singleton vd., 1999).



Görsel 3.13. Toplam fenolik madde miktar tayini deney plağı

#### 3.6.2. Uçucu yağ eldesi ve analizi

Uçucu yağ eldesi için gölgede kurutulan bitkilerin çiçekli toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Bitki örneklerinden (17 g), uçucu yağlar 3 saat boyunca Clevenger apareyinde su distilasyon işlemi ile elde edilmiştir (Görsel 3.14). İşlem sonunda uçucu yağ miktarları yeterli olmadığından dolayı *n*-hekzan ile alınmış ve yağlar koyu renkli cam şişelerde (+4C°) saklanmıştır.

## GC/MS analizleri

Agilent 5975 GC-MSD sistemi ve sistem üzerinde kolon olarak HP-Innowax Silika kapiler (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 mm film kalınlığı) kullanılarak yapılmıştır. Sıcaklık programı 60°C de 10 dak // 4°C/dak artışla 220°C ye // 220°C de 10 dak // 1°C/dak artışla 240°C'ye, Enjektör 250°C ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum (0.8 ml/dak) kullanılmıştır. Split oranı 40:1, Elektron enerjisi 70 eV, Kütle aralığı  $m/z$  35-450 olarak ayarlanmıştır. GC analiz koşulları; eş zamanlı olarak GC/MS sistemindeki madde çıkış zamanları ile aynı olacak şekilde ayarlanmıştır (FID 300°C). Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde BAŞER Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi ile Wiley ve Adams kütüphaneleri kullanılmıştır (McLafferty ve Stauffer, 1989; Koenig vd., 2004).



*Görsel 3.14. Clevenger apareyi ve GC/MS cihazı*

### 3.6.3. LC-MS/MS analizi

15 fitokimyasalın kantitatif olarak araştırması, yüksek performanslı sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sistem, Shimadzu marka LC-MS-8040 cihazıdır. Kolon parametreleri şu şekildedir: 150 mm×4.6 mm, 2.7 µm; Kolon sıcaklığı ise 40 °C olarak ayarlanmıştır. Mobil fazlar A: su, 5 mM amonyum formiat ve %0,15 formik asit; B: MeOH, 5 mM amonyum formiat ve %0,15 formik asit içermektedir. Gradyan programı şu şekildedir: 20–100% B (0–25 dakika), 100% B (25–35 dakika), 20% B (35–45 dakika). Lineerlik (lineerlik aralıkları; 100–3200, 75–2400, 50–1600 ve 10–320), belirlenim korelasyonu ( $R^2 \geq 0.990$ ), tekrarlanabilirlik, kantifikasyon sınırları (0,51 ile 11,65 mg/L arasında), tespit sınırları (0,32 ile 10,51 mg/L arasında), gün içi ve günler arası RSD (sırasıyla 0,0218 ve 0,0227'den küçük), göreceli standart belirsizlik ve geri kazanım (%99,41 ile

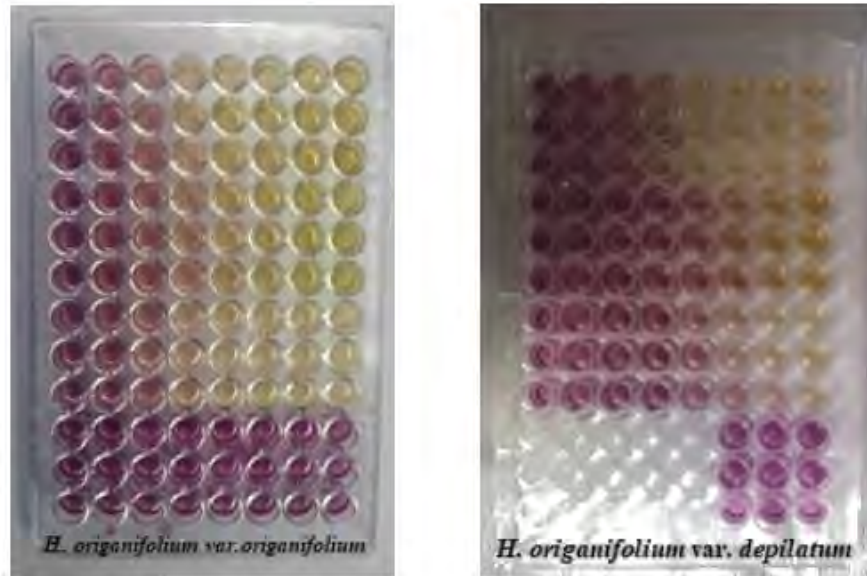
%101,04 arasında) geliştirilen yöntemin analitik doğrulamasında incelenen parametrelerdir (Akdeniz vd., 2020).

### 3.7. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

#### 3.7.1. DPPH\* (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü aktivite

DPPH\* moleküler diziliminde tek bir elektron olan serbest radikaldır. Mor renkli olan bu radikal çözeltiliye konduğunda antioksidanların rengini sarı ya da renksiz bir hale gelmektedir. Deney sonucu değişen bu rengi ise DPPH\* radikal süpürücü aktivitesi ile spektrofotometrede ölçülmektedir. İlk olarak mikroplağın tüm kuyucuklarına 200 µl bitki ekstrallerinden koyulmuştur. Ardından kalan kuyucukların tümüne 100 µl MeOH eklenip seri dilüsyon işlemine geçilip kontrol grubu için 100 µl MeOH ile DPPH\* eklenmiştir. BHT pozitif kontrol olarak kullanılıp 200 µl koyulmuştur. En son 96-lı mikroplağın her kuyucuğuna 100 µl DPPH\* eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübeye bırakılmıştır. Mikroplaka spektrofotometresi ile 517 nm'de oda sıcaklığı şartlarında UV absorbansı ölçülüp kaydedilmiştir (Görsel 3.15). Çıkan sonuçlar ortalama ± standart sapma ile değerlendirilmiştir. Deneyle 3 kez tekrarlanıp % inhibisyon değerleri aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (Kumarasamy vd. 2007):

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



Görsel 3.15. DPPH\* süpürücü aktivite plağı

### 3.7.2. Antimikrobiyal aktivite tayini

Deneyde kullanılacak olan Mueller Hinton Agar (MHA) ile Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerleri saf su ekleyerek belli koşullar altında hazırlanmıştır. Otoklav cihazına deneyde kullanılacak kontamine olan laboratuvar malzemeleri yerleştirilmiştir. 120°C, 1.5 atm basınçta 1 saat kadar steril edilmiştir.

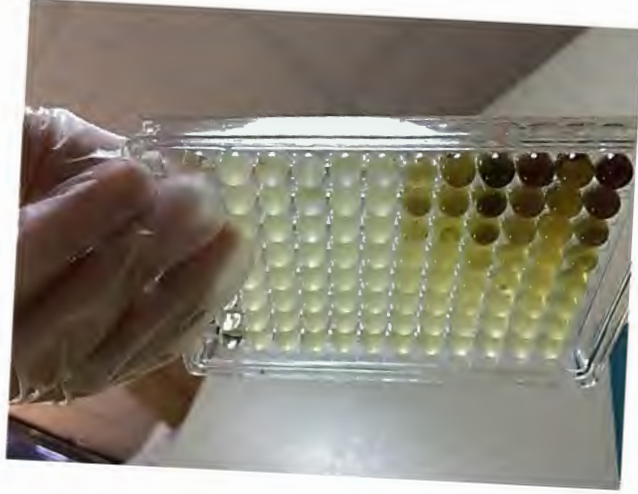
CLSI (2006)'nın geliştirdiği teknik ile antimikrobiyal aktivite çalışması yapılmıştır. 96-kuyucuklu mikrolateler ile deney yapılmıştır. İlk konsantrasyonu 50 mg/mL olan çözeltiden 100'er µL mikrolatelerin ilk sırasına konmuştur. 100 µL alınarak çift katlı seri dilüsyon işlemi uygulanmıştır. Çalışılacak olan mikroorganizmalar Mcfarland No: 0.5 şeklinde ayarlanıp MHB ile 1/100 oranında seyreltilmiştir. Ardından 100'er µL mikrolatelere uygulanmıştır takibinde 24 saat ile 37°C' de inkübasyon edilmiştir (Görsel 3.16). Süre bitiminde Resazurin boyası eklenmiştir ve 37°C'de 3 saat süreyle inkübasyonda renklenme durumu kontrol edilmiştir. İşlem sonunda mavi renkli kuyucuklar mikroorganizmanın üremenin olmadığını gösterirken pembe renkli kuyucuklar mikroorganizmanın üremeye devam ettiğini sergilemiştir (CLSI, 2006).

Deney sonuçları minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ile gösterilmiştir (CLSI, 2006). Besiyerinin bulunduğu kuyucuklar ile ortam sterilizasyonunun kontrolü sağlanırken üreme kontrolü için mikroorganizmalar ile besiyerin bulunduğu kuyucuklar değerlendirmeye alınmıştır. Deneyin pozitif kontrolü ise siprofloksasinin bulunduğu kuyucuktur. Yapılan deneyler üç kez tekrarlanmış ve bunların ortalamaları alınarak sonuca karar verilmiştir.

Kullanılan suşlar ve suş numaraları:

- *Escherichia coli* NRLL B-3008
- *Bacillus cereus* NRLL B-3711
- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311
- *Bacillus subtilis* NRLL B-4378
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

NRLL suşları, Tarımsal Araştırma Hizmeti Kültür Koleksiyonu'ndan, ATCC suşları ise Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'dan liyofilize halde temin edilmiştir.



*Görsel 3.16. Mikroorganizmaların plağa ekilmesi ve deney sonucunda üremeye bağlı olarak görülen renkler*

### **3.7.3. Sitotoksik aktivite çalışmaları**

Bitki ekstralarının sitotoksik aktivitesinin araştırılmasında MCF7 (İnsan meme adenokarsinoma) ve A549 (İnsan akciğer karsinoma) hücre dizileri ile çalışılmıştır. Selektivitesi için NIH3T3 (fare embriyo fibroblast) hücre dizisi tercih edilmiştir.

Besiyerine fetal buzağı serumu ile 100 mg/mL streptomisin ve penisilin eklenmiştir. MCF7 ve A549 için RPMI 1640 ve NIH3T3 için DMEM tercih edilmiştir. Bitki ekstralarında bulunan bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla günümüzde kanser tedavisinde en sık kullanılan doksorubisin MTT testlerinde çalışılmıştır.

### **3.7.3.1. MTT yöntemi sitotoksik aktivitenin belirlenmesi**

#### **3.7.3.1.1. Hücrelerin çoğaltılması**

MCF7, A549 ve NIH3T3 hücre dizileri, deney hazırlık aşamasında 2-3 günde bir pasajlanmıştır. Önceden inkübatöre konmuş olan hücre flaskı alınarak, besiyeri çözeltisi içine geçmesi beklenen ölü hücreler hafif bir şekilde çalkalanır ardından steril olan bir pipet yardımıyla besiyeri hücre flaskının içinden alınıp uzaklaştırılmıştır.

Flaska 5 ml fosfat tamponu eklenerek hücrelerin yıkanması sağlanmıştır sonra bu yıkama çözeltisi şişeden atılmıştır. Yine içerisine EDTA çözeltisi (1X) eklenerek hafif bir şekilde çalkalandıktan sonra 5 dakika kadar inkübatörde tutulmuştur. İnkübatör koşulları ise %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ve 37<sup>0</sup>C'dir. Hücre flaskı inkübatörden çıkartıldıktan sonra içine 20-25 mL besiyeri eklenerek hücreler süpanse hale getirilip 1:2, 1:3 oranlarında bölünerek yeni hücre flasklarına aktarılmıştır. İşlem sonunda hazırlanan hücre flaskları inkübatörde yine aynı koşullar sağlanarak yerleştirilmiştir.

#### **3.7.3.1.2. Hücrelerin plakalara ekilmesi**

İnkübatöre bırakılan hücreler alınır ve ardından ölmüş hücrelerin hazırlanan besiyeri çözeltisine geçebilmesi amacıyla hafif bir şekilde çalkalanır ve steril pipet ile flask içindeki besiyerinden alınıp uzaklaştırılmıştır.

Flasklara tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek hafif bir şekilde çalkalanıp inkübatörde 5 dakika kadar yine aynı koşullarda bekletilmiştir. Daha sonra inkübatörden flasklara besiyeri eklenerek steril pipetle santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücre süspansiyonunun içinde bulunduğu santrifüj tüpü biraz çalkalanıp içinden 10 µL alınarak otomatik hücre sayma cihazında sayılma işlemi yapılmıştır. Ardından hücre süspansiyonu küvetlere alınmıştır ve 200 µL/kuyucuk şeklinde 96-kuyucuklu hücre kültür plakasına konarak 24 saat süreyle %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ve 37<sup>0</sup>C şartlarında inkübasyona bırakılmıştır.

#### **3.7.3.1.3. MTT sitotoksikite testinin uygulanması**

İnkübasyondan sonra hazırlanan plakalar ters çevrilerek besiyerlerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bitki ekstraktlarının 0.0000316 mM-1 mM 10 seri konsantrasyonu pozitif kontrollerle beraber plakalara eklenmiştir. Ardından %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ve 37<sup>0</sup>C şartlarında 24 saat inkübasyona bırakılıp sonrasında hücre kültürlerinin üst

kısmı tersine getirilerek atılmıştır. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra tampon atılmıştır. Deney için MTT çözültisi (5 mg/mL) ve besiyeri 1:10 oranında karıştırılıp hazırlanmıştır. Plakalara 100 µL/kuyucuk olacak şekilde hazırlanan karışımdan eklenerek 3 saat süreyle aynı koşullar altında inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Süre bitiminde plakalar ters çevrilerek üst kısmı uzaklaştırılmıştır. DMSO'dan 100 µL/kuyucuk şeklinde eklenmiş, sonra ELISA cihazında 540 nm'de OD değerleri ölçülmüştür. Bitki ekstralarının bütün konsantrasyonlarda % inhibisyon değerleri ve IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmış ve ekstraların sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir (Sağlık vd., 2016; Osmaniye vd., 2022).

## 4. BULGULAR

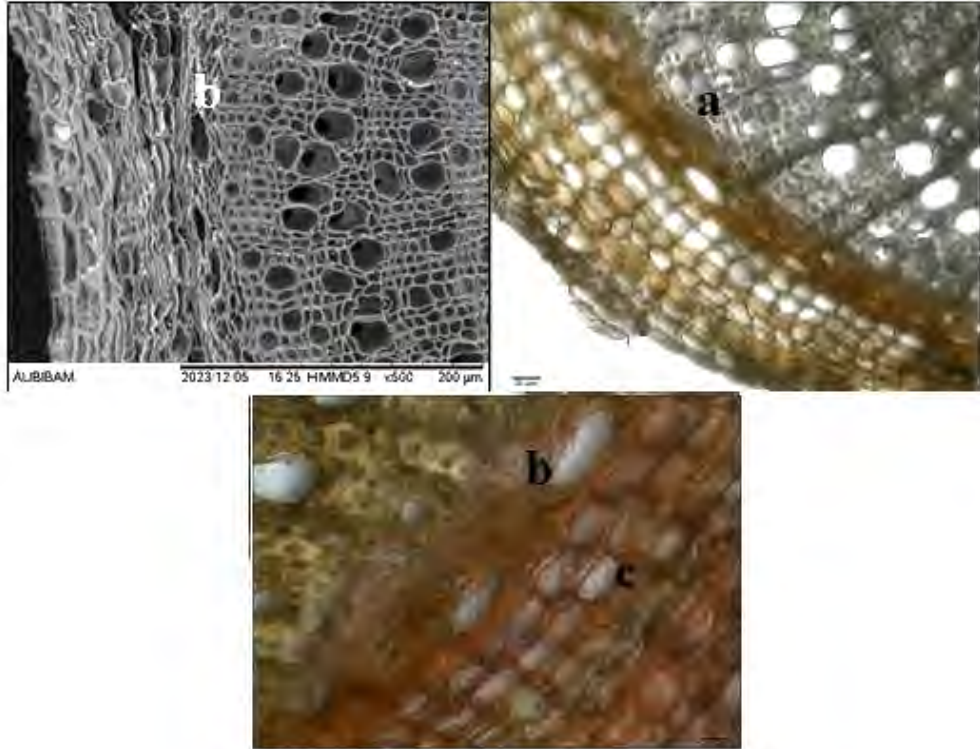
### 4.1. Anatomik Bulgular

#### 4.1.1. *H. origanifolium* var. *origanifolium*

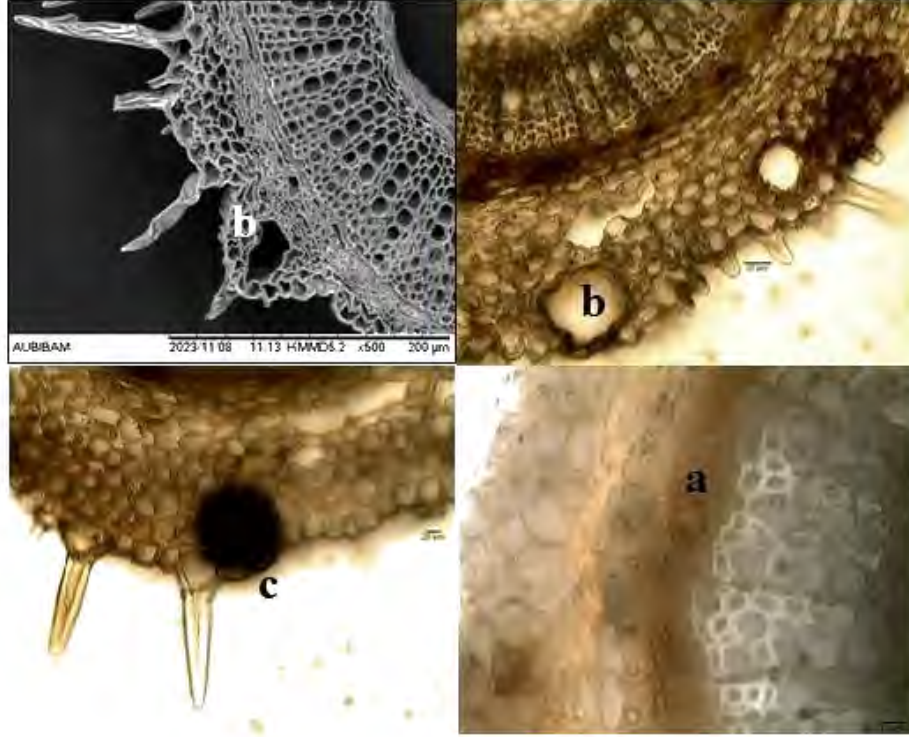
Kök enine kesitte periderm ile floem arasında çok sayıda **B tipi salgı kanalları** bulunur (Görsel 4.1).

Gövde enine kesitte epidermis tabakasının altında **yarı saydam glandlar** ile **siyah glandlar** bulunur ve floem halkası boyunca çok sayıda **A tipi salgı kanalı** yer alır (Görsel 4.2).

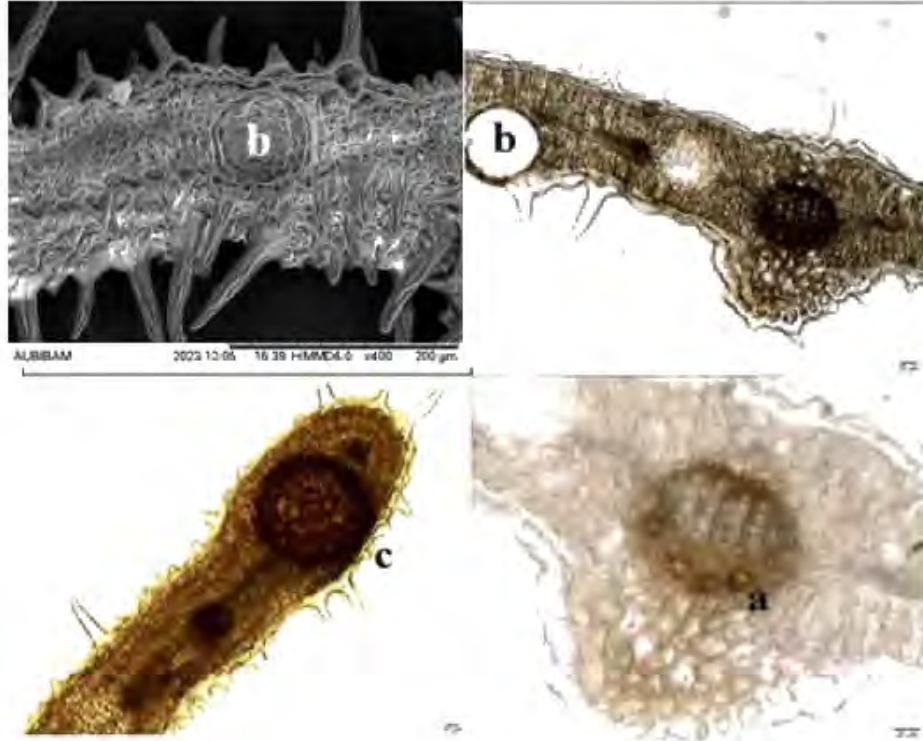
Yaprak enine kesitte orta damardaki floemde **A tipi salgı kanalları** yer alır. Mezofil tabakasında birkaç tane **yarı saydam gland** bulunmakta olup alt epidermise yakındır. **Siyah glandlar** ise yaprak uçlarına doğru konumludur (Görsel 4.3).



**Görsel 4.1.** *H. origanifolium* var. *origanifolium*'un kök enine kesiti; a) floem b) B tipi salgı kanalı c) periderm



**Görsel 4.2.** *H. origanifolium* var. *origanifolium*'un gövde enine kesiti; a) A tipi salgı kanalı b) yarı saydam gland c) siyah gland



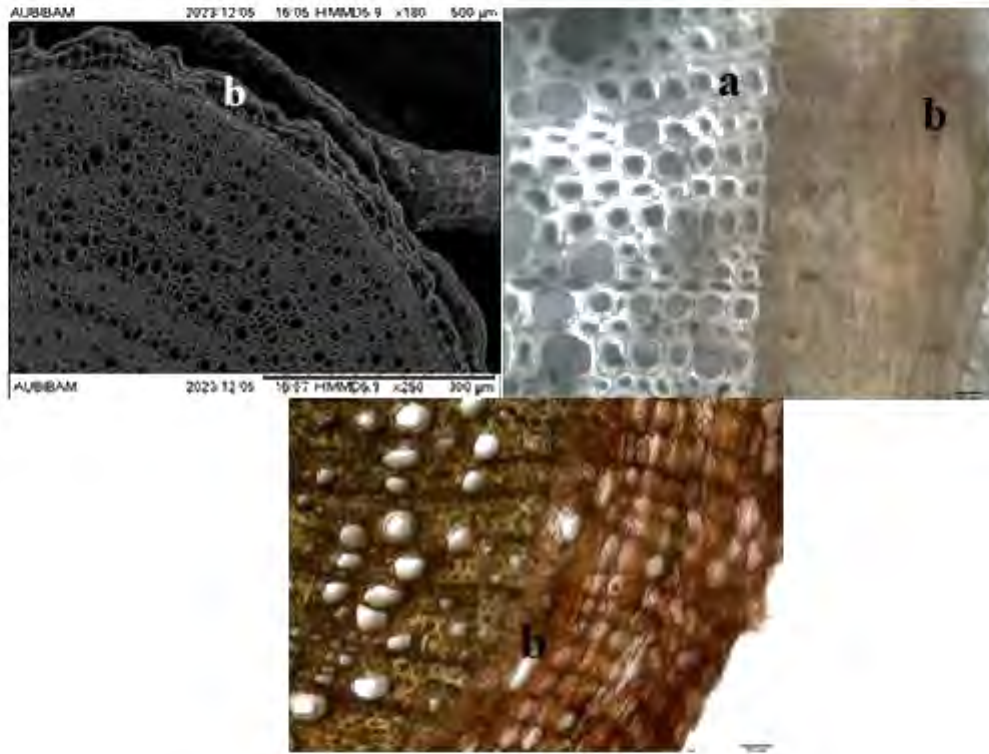
**Görsel 4.3.** *H. origanifolium* var. *origanifolium*'un yaprak enine kesiti; a) A tipi salgı kanalı b) yarı saydam c) siyah gland

#### 4.1.2. *H. origanifolium* var. *depilatum*

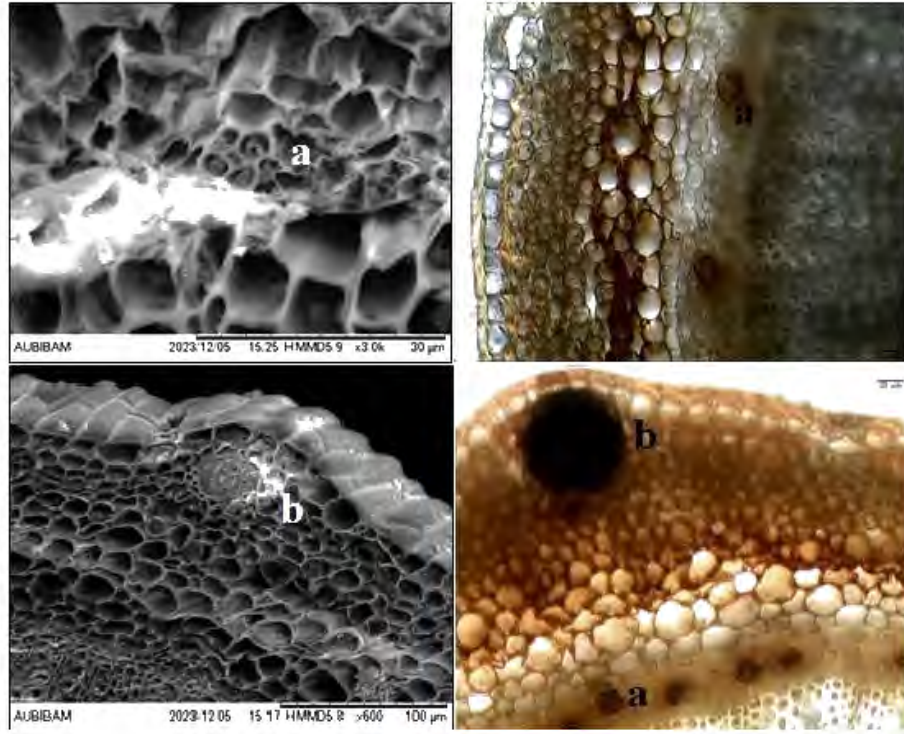
Kök enine kesitte periderm ile floem arasında **B tipi salgı kanalları** bulunur (Görsel 4.4)

Gövde enine kesitte epidermis tabakasının altında **siyah glandlar** ve floem halkası boyunca çok sayıda **A tipi salgı kanalı** yer alır (Görsel 4.5).

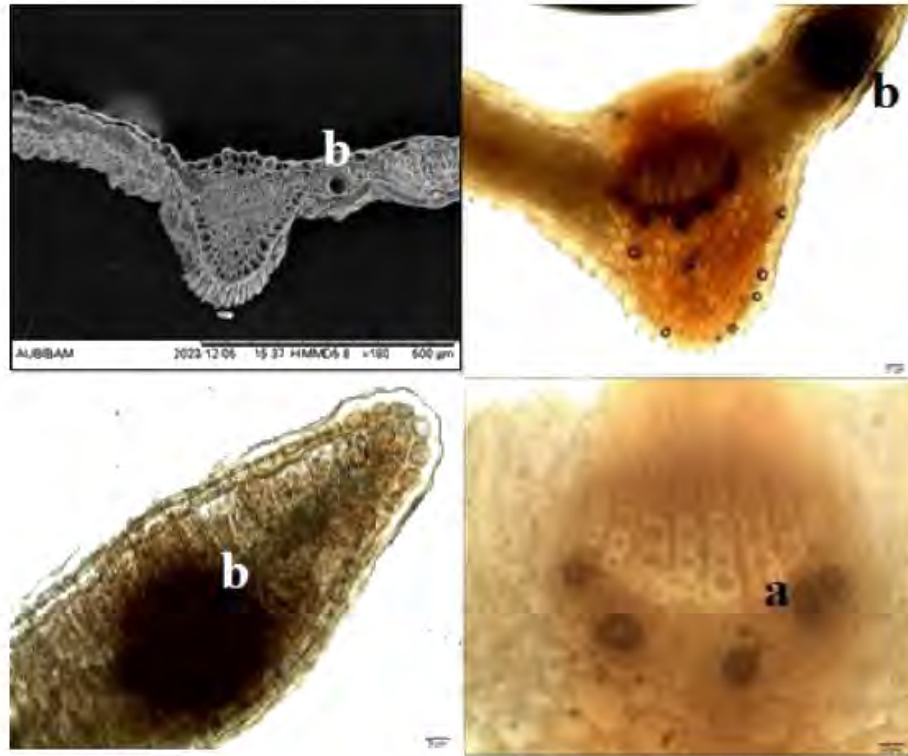
Yaprak enine kesitte orta damardaki floem hücreleri arasında çok sayıda **A tipi salgı kanalı** görülür. Mezofil tabakasında bir ya da birkaç adet **siyah gland** vardır ve bunlar genellikle alt damara yakın konumlanmıştır (Görsel 4.6).



**Görsel 4.4.** *H. origanifolium* var. *depilatum*'un kök enine kesiti; a) floem b) B tipi salgı kanalı c)periderm



**Görsel 4.5.** *H. organifolium* var. *depilatum*'un gövde enine kesiti; a) A tipi salgı kanalı b) siyah gland



**Görsel 4.6.** *H. organifolium* var. *depilatum*'un yaprak enine kesiti; a) A tipi salgı kanalı b) siyah gland

## 4.2. Miktar Tayini ve Kimyasal Bulgular

### 4.2.1. Ekstraksiyon verimleri

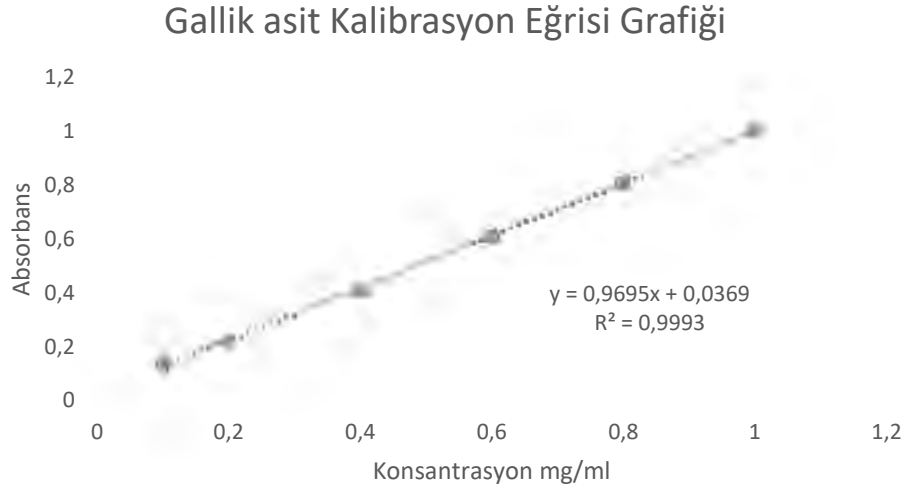
Tez kapsamında çalışılan bitkilerin ekstraktlarına ait % verimler (a/a) Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Ekstraksiyon verimleri

Türler	% Verim (a/a)
HOR-MeOH	27,12
HOR-EtOAc	7,21
HOD-MeOH	37,43
HOD-EtOAc	6,52

### 4.2.2. Toplam fenolik madde miktar tayini

Şekil 4.1’de standart gallik asitin kalibrasyon eğrisi grafiği hesaplanarak verilmiştir. Deneyle 3 kez tekrarlanmıştır. Bitki ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde miktarları, standart eğri denklemine göre hesaplanmıştır.



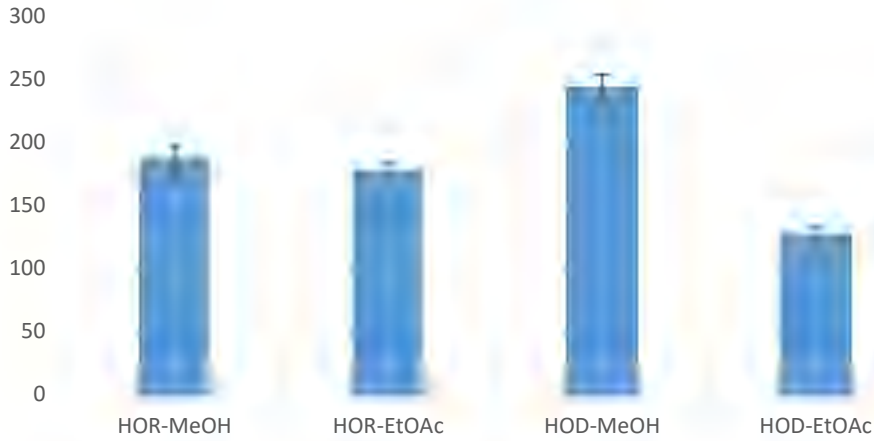
**Şekil 4.1.** Gallik asit kalibrasyon grafiği

Tablo 4.2'deki verilerin değerler baz alındığında HOD-MeOH ekstresinin çalışılan türler arasında en fazla toplam fenolik madde miktarına sahip olduğu ( $245,46 \pm 9,41$  GAE/g) görülmüştür. Diğer bitki ekstraktları sıralanacak olursa toplam fenolik madde miktarları şu şekildedir: HOR-MeOH > HOR-EtOAc > HOD-EtOAc.

**Tablo 4.2.** Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/ekstre)

Türler	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g ekstre)
HOR-MeOH	$186,92 \pm 11,01$
HOR-EtOAc	$179,57 \pm 4,90$
HOD-MeOH	$245,46 \pm 9,41$
HOD-EtOAc	$128,77 \pm 5,77$

**Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g ekstre)**



**Şekil 4.2.** Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları

#### 4.2.3. Uçucu yağ analizi

Tez konusu taksonların uçucu yağ bileşenlerinin GC-GC/MS analizinin sonuçları Tablo 4.3'te belirtilmiştir.

**Tablo 4.3.** *H. origanifolium* alt taksonlarının uçucu yağ bileşikleri (HOR: *H. origanifolium* var. *origanifolium*; HOD: *H. origanifolium* var. *depilatum*)

RRI	Bileşikler	HOR %	HOD %	IM Identification Metod
1032	$\alpha$ -Pinen	-	1,1	t <sub>R</sub> , MS
1100	Undekan	-	3,0	t <sub>R</sub> , MS
1444	Dimetil tetradekan	-	1,3	MS
1495	Bisikloelemen	-	0,5	MS
1497	$\alpha$ -Kopaen	0,9	0,7	MS
1589	$\beta$ -Ylangen	-	0,6	MS
1600	$\beta$ -Elemen	5,8	0,3	MS
1604	$\beta$ -Küben izomeri	-	0,6	MS
1612	$\beta$ -Karyofillen	0,7	0,3	t <sub>R</sub> , MS
1628	Aromadendren	-	0,4	MS
1655	( <i>E</i> )-2-Dekenal	-	0,2	MS
1661	Alloaromadandren	-	0,4	MS
1668	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Farnesen	-	0,2	MS
1678	<i>epi</i> -Zonaren	-	0,1	MS
1684	$\gamma$ -Gurjunene	-	0,1	MS
1687	$\alpha$ -Humulen	-	0,5	t <sub>R</sub> , MS
1688	Selina-4,11-diene (4,11 eudesmadien)	1,0	-	MS
1704	$\gamma$ -Muurolen	1,7	1,3	MS
1726	Germakren D	<b>9,5</b>	<b>12,3</b>	MS
1740	$\alpha$ -Muurolen	-	0,8	MS
1742	$\beta$ -Selinen	<b>9,5</b>	-	MS
1744	$\alpha$ -Selinen	<b>8,6</b>	0,3	MS
1755	Bisiklogermakren	3,1	3,8	MS
1765	( <i>E</i> )-2-Undekenal	-	0,2	MS
1776	$\gamma$ -Kadinen	1,2	1,3	MS
1799	Cadina-1,4-dien (cubenene)	-	0,2	MS

**Tablo 4.4.** *H. origanifolium* alt taksonlarının uçucu yağ bileşikleri (HOR: *H. origanifolium* var. *origanifolium*; HOD: *H. origanifolium* var. *depilatum*)(devam)

RRI	Bileşikler	HOR %	HOD %	IM Identification Metod
1807	$\alpha$ -Kadinen	-	0,3	MS
1826	(E,E)-2,4-Dekadienal	-	0,2	MS
1849	Kalamenen	-	0,3	MS
1868	(E)-Geranil aseton	-	0,4	t <sub>R</sub> , MS
1893	Dodesil asetat	1,4	2,5	MS
1965	Dodekanol	5,9	-	MS
1984	$\gamma$ -Kalakoren	-	3,0	MS
2037	Salvial-4(14)-en-1-one	-	0,7	MS
2098	Globulol	-	0,6	MS
2104	Viridiflorol	-	0,4	MS
2131	Hekzahidrofarnesil aseton	0,6	2,4	t <sub>R</sub> , MS
2144	Spatulenol	4,8	6,5	t <sub>R</sub> , MS
2180	3,4-Dimetil-5-pentiliden- 2(5H)-furanon	-	0,5	t <sub>R</sub> , MS
2187	T-Kadinol	-	0,6	MS
2209	T-muurolol	-	0,6	MS
2255	$\alpha$ -Kadinol	-	1,7	t <sub>R</sub> , MS
2273	Selina-11-en-4 $\alpha$ -ol	4,4	-	MS
2278	Torilenol	-	1,2	MS
2300	Trikosan	<b>8,8</b>	-	t <sub>R</sub> , MS
2369	Ödesma-4(15), 7-dien-1 $\beta$ -ol	-	3,0	MS
2500	Pentakosan	-	1,5	t <sub>R</sub> , MS
2503	Dodekanoik asit (Laurik asit)	-	4,2	t <sub>R</sub> , MS
2700	Heptakosan	-	3,5	t <sub>R</sub> , MS
2900	Nonakosan	<b>22,8</b>	<b>28,9</b>	t <sub>R</sub> , MS

**Tablo 4.5.** *H. origanifolium* alt taksonlarının uçucu yağ bileşikleri (*HOR: H. origanifolium* var. *origanifolium*; *HOD: H. origanifolium* var. *depilatum*)(devam)

<b>RRI</b>	<b>Bileşikler</b>	<b>HOR</b> %	<b>HOD</b> %	<b>IM</b> <b>Identification</b> <b>Metod</b>
	Monoterpen hidrokarbonlar - MH	-	1,1	
	Seskiterpen hidrokarbonlar - ST	45,2	30,6	
	Oksijenli seskiterpenler - OST	9,2	15,3	
	Diğerleri - D	39,5	48,8	
	<b>Toplam %</b>	<b>93,9</b>	<b>95,8</b>	
	Toplam Bileşik sayısı	18	45	

**RRI:** Relatif Tutunma İndeksleri, alkanların kolonda tutunma zamanına göre hesaplanmıştır. %: FID kromatogramlarından hesaplanmıştır. **IM:** Bileşiklerin tanımlanma metotudur. **IR:** HP Innobox kolonda standart bileşiklerin analizi ile belirlenen tutunma zamanlarına ve spektrumlarına göre tanımlama metotudur. **MS:** Kullanılan kütüphane ve literatürlerdeki indeksler ve mas spektrumları ile karşılaştırmaya dayalı tanımlamadır.

HOR uçucu yağının %93,9'unu teşkil eden 18 bileşik, HOD uçucu yağının %95,8'ni teşkil eden toplam 45 bileşik tanımlanmıştır. HOR'un ana bileşikleri nonakosan (%22,8), germakren D (%9,5),  $\beta$ -selinen (%9,5), trikosan (%8,8) ve  $\alpha$ -selinen (%8,6); HOD'un ana bileşikleri ise nonakosan (%28,9) ve germakren D (%12,3), olarak belirlenmiştir.

HOR uçucu yağının %45,2'si seskiterpen, %9,2'si oksijenli seskiterpen, %39,5'i diğer bileşiklerden, HOD uçucu yağının %1,1'i monoterpen hidrokarbon, %30,6'sı seskiterpen, %15,3'ü oksijenli seskiterpen, %48,8'i diğer grup bileşiklerden oluşmaktadır.

#### 4.2.4. LC-MS/MS analizi

Tez kapsamındaki taksonlar, *Hypericum* cinsi için önemli olan 15 kimyasal bileşik bakımından LC-MS/MS analizi yapılarak kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiştir (Tablo 4.4., Şekil.4.3., 4.4.).

Klorojenik asitin en fazla bulunduğu ekstreler HOD-MeOH (14.493,68 mg/kg) ve HOR-MeOH (10.988,07 mg/kg)'dür.

Hiperozit, en fazla HOD-MeOH ekstresinde (75.741,45 mg/kg) ve HOD-EtOAc'de (42.331,12 mg/kg) görülmüştür. HOR-MeOH ekstresi de 10367,36 mg/kg hiperozit içermektedir.

Kersitrin ise en fazla HOR-MeOH'da (35.712,48 mg/kg) görülürken, sırasıyla HOR-EtOAc (15.123,88 mg/kg) ve HOD-MeOH (4.547,25) ekstrelerinde de yüksek miktarda tespit edilmiştir.

Psödohiperisin, en yüksek HOD-MeOH'da (14.015,49 mg/kg) gözlenirken, HOR-MeOH'da psödohiperisin miktarı 6.545,98 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

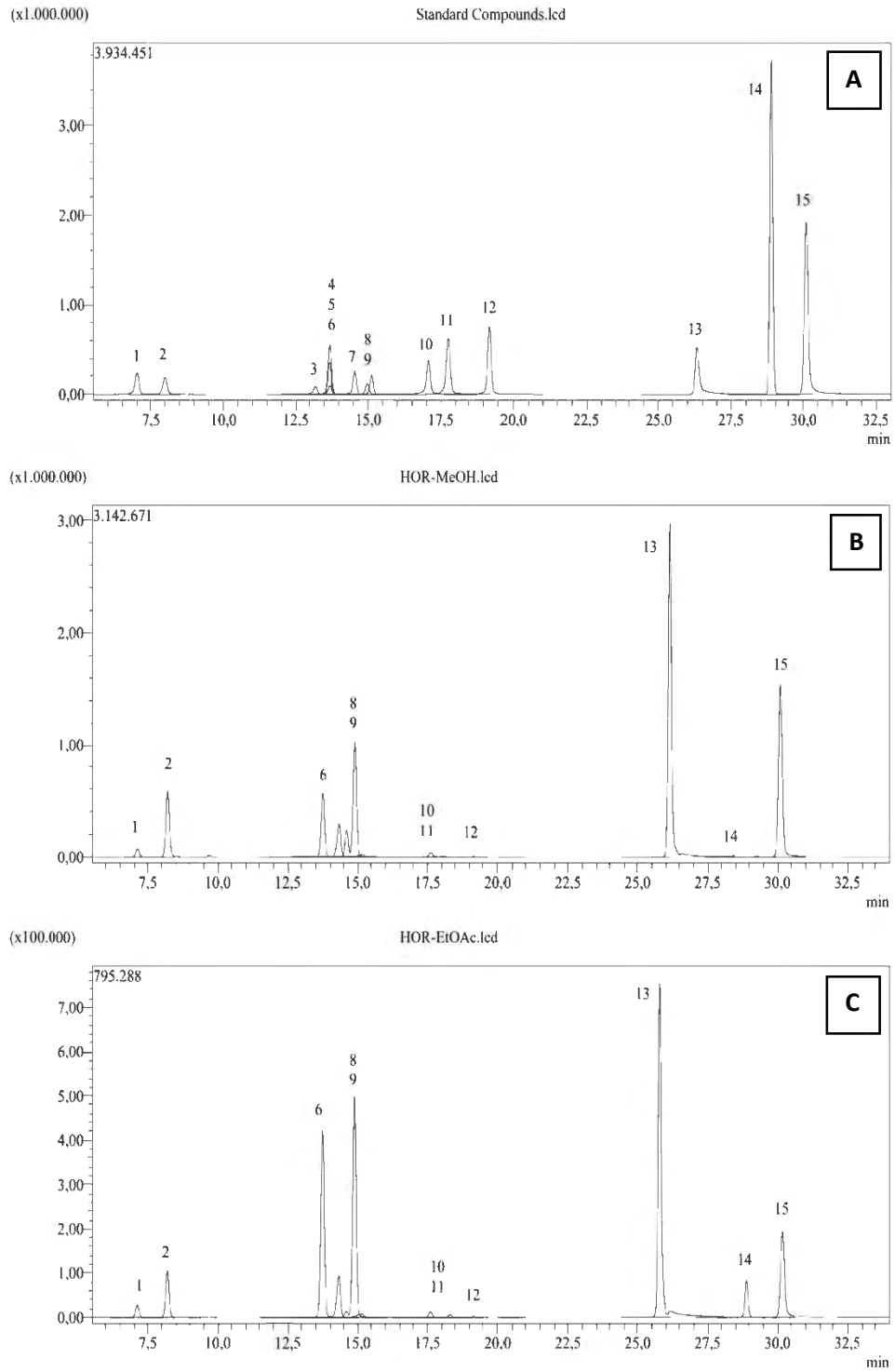
En fazla Hiperisin ise HOD-MeOH'da (5470,93 mg/kg) ölçülmüştür.

**Tablo 4.6.** LC-MS/MS Analiz Sonuçları

Kantitatif analiz (mg /kg ekstre)						
No	Analytes	R.T.(dak)	HOR-MeOH	HOR-EtOAc	HOD-MeOH	HOD-EtOAc
1	Protokateşik asit	7	1680,22	712,36	1789,65	1354,18
2	Klorojenik asit	8,03	10988,07	1496,56	14493,68	4104,87
3	Luteolin-7-glukozit	13,2	N.D.	N.D.	108,12	16,45
4	Rutin	13,67	N.D.	N.D.	25,84	19,68
5	Hesperidin	13,68	N.D.	N.D.	57,12	58,24
6	Hiperozit	13,69	10367,36	3224,99	75741,45	42331,12
7	Apigetrin	14,54	N.D.	N.D.	16,77	N.D.
8	Kersitrin	14,98	35712,48	15123,88	4547,25	2018,31
9	Astragalin	15,13	258,31	102,15	622,52	367,02
10	Kersetin	17,1	118,25	46,19	988,05	823,69
11	Luteolin	17,78	26,87	31,09	40,15	69,33
12	Apigenin	19,2	4,89	6,12	8,75	15,44
13	Psödohiperisin	26,34	6545,98	1620,93	14015,49	991,14
14	Hiperforin	28,97	0,42	9,9	1,92	503,66
15	Hiperisin	30,18	1210,35	164,06	5470,93	79,68

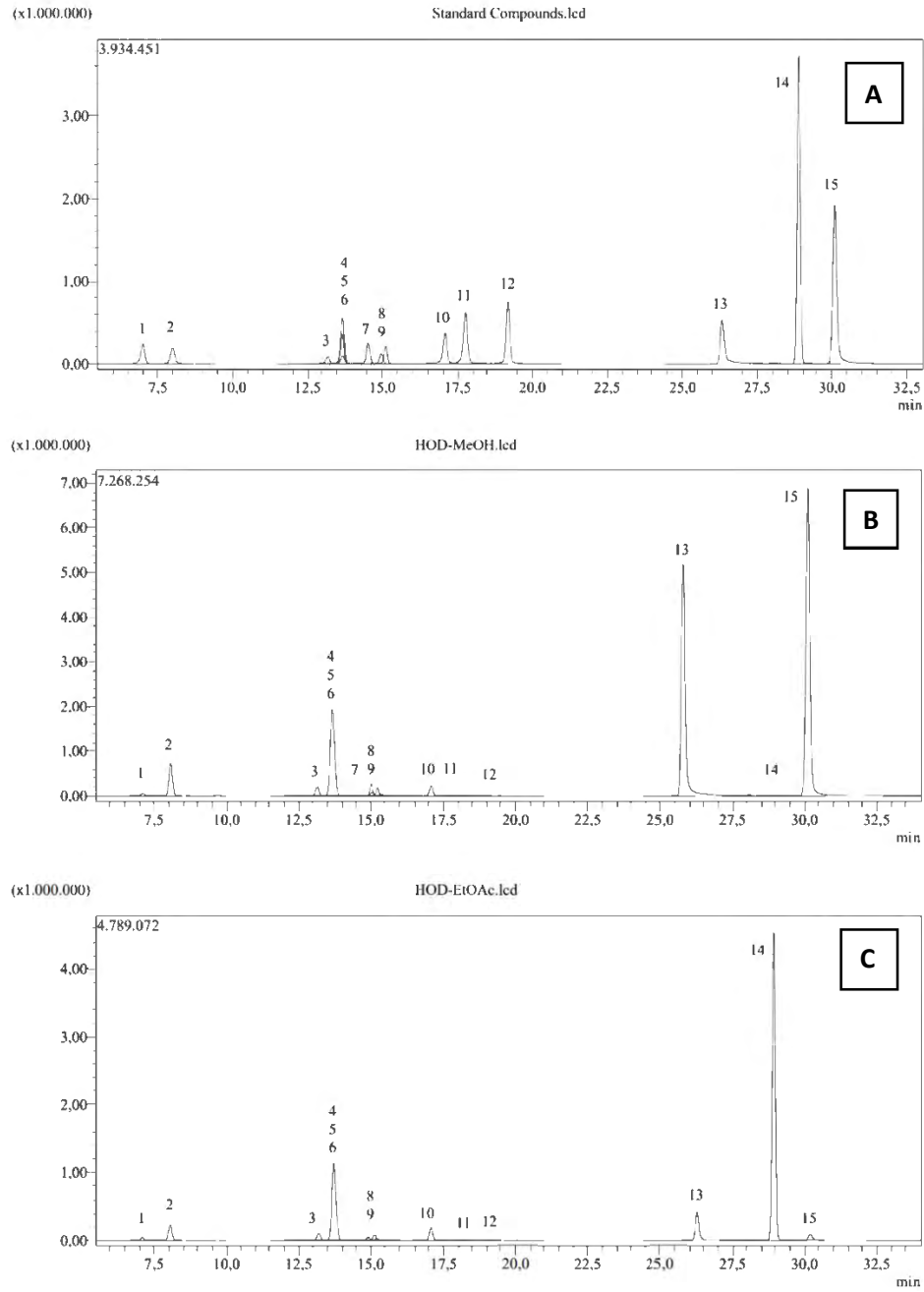
**R.T.:** Alıkonma zamanı (dak.)

**N.D.:** Tespit edilmedi



**Şekil 4.3.** LC-MS/MS kromatogramı **A:** Standart maddeler, **B:** HOR-MeOH, **C:** HOR-EtOAc

1-Protokateşik asit, 2-Klorojenik asit, 3-Luteolin-7-glukozit, 4-Rutin, 5-Hesperidin, 6-Hiperozit, 7-Apigetrin, 8-Kersitrin, 9-Astragalın, 10-Kersetin, 11-Luteolin, 12-Apigenin, 13-Psödohiperisin, 14-Hiperforin, 15-Hiperisin



**Şekil 4.4.** LC-MS/MS kromatogramı **A:** Standart maddeler, **B:** HOD-MeOH, **C:** HOD-EtOAc

1-Protokateşik asit, 2-Klorojenik asit, 3-Luteolin-7-glukozit, 4-Rutin, 5-Hesperidin, 6-Hiperozit, 7-Apigetrin, 8-Kersitrin, 9-Astragalın, 10-Kersetin, 11-Luteolin, 12-Apigenin, 13-Psödohiperisin, 14-Hiperforin, 15-Hiperisin

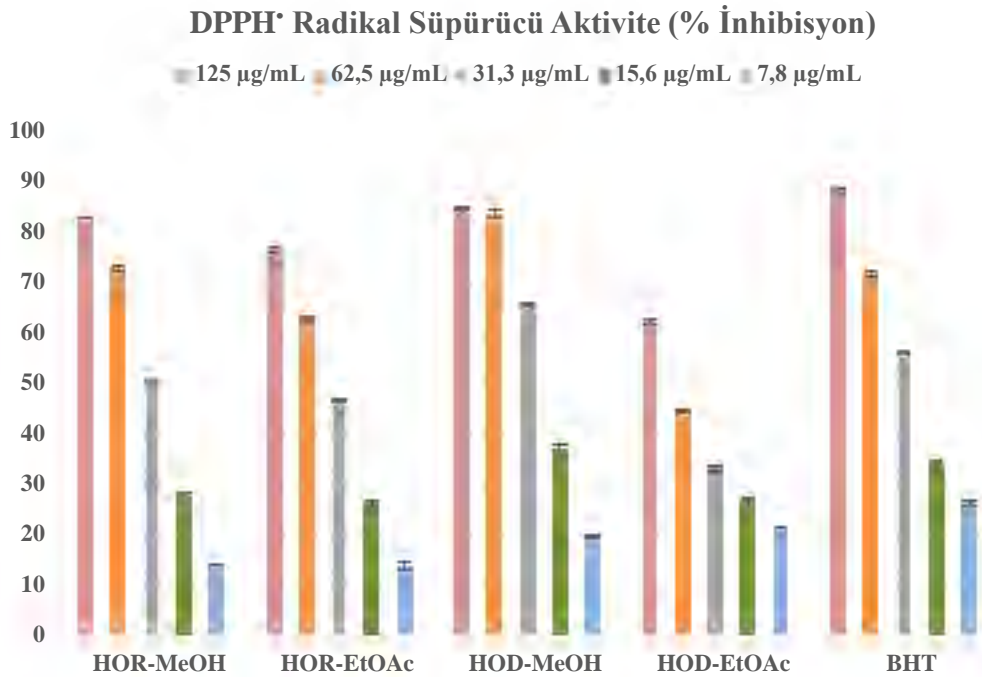
### 4.3. Biyolojik Aktivite Bulguları

#### 4.3.1. Antioksidan aktivite bulguları

Ekstrelerin DPPH<sup>•</sup> radikalini süpürücü aktiviteleri gallik asit pozitif kontrol olarak kullanılarak spektrofotometrik yöntemle analiz edilmiştir. Sonuçlar % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Deney dört tekrarlı yapılmış, veriler standart sapma değerleriyle birlikte Tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmalarında en yüksek aktivite tüm türlerde 125 µg/ml konsantrasyonda görülmüş olup HOD-MeOH ekstresi (% İnh= 84,852 ± 0,089) en aktif çıkan ekstre olmuştur (BHT'nin % İnh= 88,396 ± 0,155). Şekil 4.5'te ekstrelerin DPPH<sup>•</sup> radikal süpürücü aktivitesinin grafiği verilmiştir.

Diğer bitki ekstrelerinin antioksidan aktivitesini sıralayacak olursak; HOR-MeOH > HOR-EtOAc > HOD-EtOAc şeklindedir.



Şekil 4.5. Ekstrelerin DPPH<sup>•</sup> radikal süpürücü aktivitesi

**Tablo 4.7.** Ekstrelerin DPPH\* radikal süpürücü aktiviteleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ort % İnhibisyon				
	HOR-MeOH	HOR-EtOAc	HOD-MeOH	HOD-EtOAc	BHT
125	82,967 ± 0,223	76,785 ± 0,753	84,852 ± 0,089	62,269 ± 0,527	88,396 ± 0,155
62,5	73,074 ± 0,237	62,971 ± 0,749	83,760 ± 0,716	44,803 ± 0,546	72,110 ± 0,605
31,3	50,611 ± 0,298	46,845 ± 0,963	66,072 ± 0,089	33,456 ± 0,659	56,317 ± 0,134
15,6	27,999 ± 0,595	26,257 ± 0,699	36,988 ± 0,446	26,697 ± 0,250	34,409 ± 0,134
7,8	14,313 ± 0,446	13,945 ± 0,651	19,744 ± 0,532	21,549 ± 0,482	26,411 ± 0,336

#### 4.3.2. Antimikrobiyal aktivite bulguları

*Hypericum* taksonlarının MeOH ve EtOAc ekstrelerinin Tablo 4.6.'da belirtilen suşlara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Deney aşamasında en düşük miktarda üremeyi durdurucu aktiviteye sahip olan konsantrasyonu MİK (mg/mL) değeri ile verilmiştir.

**Tablo 4.8.** Ekstrelerin MİK değerleri (mg/mL)

Ekstreler	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	NRL B-3008	NRL B-3711	ATCC-13311	NRL B-4378	ATCC 27853
<b>HOR-MeOH</b>	-	0,781	1,562	0,39	12,5
<b>HOR-EtOAc</b>	-	< 0,195	< 0,195	< 0,195	12,5
<b>HOD-MeOH</b>	-	1,562	1,562	3,125	12,5
<b>HOD-EtOAc</b>	-	0,195	0,195	0,39	12,5
<b>Siprofloksasin</b>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Antimikrobiyal aktivite sonuçları incelendiğinde, HOD-MeOH, HOD-EtOAc, HOR-MeOH, HOR-EtOAc kodlu ekstrelerin 0,195-12,5 mg/mL konsantrasyonları arasında inhibe edici aktiviteleri görülmüştür. HOR-EtOAc ekstresi diğer ekstrele göre

daha güçlü bir şekilde *B. cereus*, *S. typhimurium* ve *B. subtilis*'e karşı 0,195 mg/mL konsantrasyondan daha küçük dozda etki edebileceği gözlenmiştir.

*P. aeruginosa*'ya karşı ekstrelerin tümü 12,5 mg/mL MİK değeri göstererek aynı antimikrobiyal aktiviteyi sergilemiştir.

*E. coli*'ye karşı ekstrelerden hiçbiri antimikrobiyal aktivite göstermemiştir.

Bunun yanında, HOD-EtOAc ekstresi, *B. cereus* ve *S. typhimurium*'a karşı 0,195 mg/mL konsantrasyonunda MİK değeri göstermiştir.

#### 4.3.3. Sitotoksik aktivite bulguları

Ekstrelerin sitotoksik aktiviteleri A549 ve MCF7 hücre dizileri üzerinde araştırılmıştır. Ayrıca ekstrelerin sağlıklı hücelere etkisi, NIH3T3 fare fibroblast hücreleri üzerinde incelenmiştir. Standart olarak dokrorubisin kullanılmıştır. Hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri (µg/mL) Tablo 4.7'te verilmiştir.

**Tablo 4.9.** Ekstrelerin A549, MCF-7 ve NIH3T3 hücre hatlarına ait IC<sub>50</sub> değerleri (µg/mL)

Ekstreler	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	A549	MCF-7	NIH3T3
HOR-MeOH	88,056 ± 2,184	61,724 ± 1,945	205,057 ± 6,521
HOR-EtOAc	24,658 ± 1,035	13,364 ± 0,563	113,596 ± 4,168
HOD-MeOH	56,528 ± 1,023	30,967 ± 0,974	193,418 ± 5,974
HOD-EtOAc	>1000	>1000	>1000
Doksorubisin	11,265 ± 0,488	5,927 ± 0,975	185,320 ± 5,418

A549 hücre hattı üzerinde en güçlü aktiviteyi HOR-EtOAc ekstresi IC<sub>50</sub>=24,658 µg/mL değeri ile göstermiştir. HOR-EtOAc'den sonra sırasıyla en yüksek aktivite HOD-MeOH (56,528 ± 1,023 µg/mL) ve HOR-MeOH (88,056 ± 2,184 µg/mL)'de saptanmıştır. HOD-EtOAc ise aktif bulunmamıştır (>1000 µg/mL).

MCF-7 hücre hattında ise en güçlü sitotoksik aktivite gösteren HOR-EtOAc ekstresi (IC<sub>50</sub>=13,364 ± 0,563 µg/mL) olmuştur. HOR-EtOAc'den sonra en yüksek aktiviteler sırasıyla HOD-MeOH (IC<sub>50</sub>=30,967 ± 0,974 µg/mL) ve HOR-MeOH

( $IC_{50}=61,724 \pm 1,945 \mu\text{g/mL}$ )’de tespit edilmiştir. HOD-EtOAc ise aktif bulunmamıştır ( $>1000 \mu\text{g/mL}$ ).

Sağlıklı hücreler olan, NIH3T3 hücre hattında, doksorubisinin  $IC_{50}$  değeri  $185,320 \pm 5,418 \mu\text{g/mL}$  olarak tespit edilirken, HOR-EtOAc ekstresinin doksorubisinden daha düşük  $IC_{50}$  değeri ( $113,596 \pm 4,168 \mu\text{g/mL}$ ) gösterdiği bulunmuştur. Aynı hücre hattı için HOD-MeOH ( $IC_{50}=193,418 \pm 5,974 \mu\text{g/mL}$ ) ve HOR-MeOH ( $IC_{50}=205,057 \pm 6,521 \mu\text{g/mL}$ ) ekstrelerinin doksorubisine göre daha az sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında *H. origanifolium* var. *origanifolium* (HOR) ve *H. origanifolium* var. *depilatum* (HOD) üzerinde anatomik, kimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Anatomik çalışmalarda, her iki taksonun salgı yapıları ortaya konmuştur. Taksonların toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağları ile MeOH ve EtOAc ekstralarının kimyasal kompozisyonları sırasıyla GC-MS/MS ve LC-MS/MS ile kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiştir. Ekstrelerin, toplam fenolik madde miktarları, DPPH' radikal süpürücü, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır.

### 5.1. Anatomik çalışmalar

Bu tez çalışmasında *Hypericum* cinsi için taksonomik olarak önemli olan salgı yapıları üzerinde yoğunlaşmış, tez kapsamındaki taksonların kök, gövde ve yapraklarında bulunan salgı yapıları ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur (Tablo 5.1).

**Tablo 5.1.** Salgı kanalları

Türler	Kök	Gövde	Yaprak
<i>H. origanifolium</i> var. <i>origanifolium</i>	B Tipi	A Tipi, Yarı Saydam Gland Siyah Gland	A Tipi, Yarı Saydam Gland Siyah Gland
<i>H. origanifolium</i> var. <i>depilatum</i>	B Tipi	A Tipi Siyah Gland	A Tipi Siyah Gland

Ciccarelli vd., (2001)'nin, *H. perforatum* üzerinde salgı kanalları ile ilgili yapmış oldukları çalışmaya göre, bitkinin gövde ve kök kesitlerinde A ve B tipi salgı kanalları görülürken yapraklarda A tipi salgı kanalı ve yarı saydam glandları bulmuştur.

Bir başka çalışmada ise, *H. perforatum* (Crockett, 2010)'un kök kısmında sadece A tipi salgı kanalı; gövdede A ve B tipi salgı kanalı ile siyah gland; yaprakta A tipi salgı kanalı, yarı saydam gland ve siyah gland bulunduğu bildirilmiştir. Bulgularımız, çalışılan taksonların salgı kanalları bakımından ofisinal tür olan *H. perforatum*'dan farklılıklar gösterdiğine işaret etmektedir.

## 5.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Tez kapsamında değerlendirme yapılacak olursa en yüksek toplam fenolik madde miktarı HOD-MeOH ekstresinde ( $245,46 \pm 9,41$  GAE/g) görülmüştür. Ardından HOR-MeOH ekstresi ( $186,92 \pm 11,01$  GAE/g) ile HOR-EtOAc ( $179,57 \pm 4,90$  GAE/g) ve son olarakta HOD-EtOAc ekstresi ( $128,77 \pm 5,77$  GAE/g) toplam fenolik madde miktarı bakımından sıralanmaktadır.

İbadova (2006), *H. origanifolium*'un çiçek ve yapraklarının MeOH, EtOAc ve su ekstraktları üzerinde toplam fenolik madde miktarı tayini yapmış, *H. origanifolium* için en yüksek fenolik madde miktarının bitkinin yapraklarından hazırlanan EtOAc ekstresinde ( $451,33 \pm 4,81$  mg GAE/g) tespit edildiği bildirilmiştir.

Boran (2018), *H. origanifolium* üzerine yaptığı çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarının EtOH ekstresinin toplam fenolik madde miktarının  $93,4 \pm 1,6$  mg GAE/g olduğunu tespit etmiştir. Diğer bir çalışmada (Öztürk vd., 2009), *H. origanifolium*'un çiçek ile yapraklarından EtOAc, MeOH ve su ekstraktları hazırlanmış ve toplam fenolik madde miktarı tayininde *H. origanifolium* yaprak EtOAc ekstresi en yüksek fenolik madde miktarını ( $451,33 \pm 4,8$  mg GAE/g) vermiştir.

Tez kapsamındaki çalışmalarımızda, yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak, bitkilerin toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH ekstraktlarının, EtOAc ekstraktlarından daha fazla fenolik madde taşıdığı tespit edilmiştir.

Türkten (2022), *H. aviculariifolium*'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH ekstresinde fenolik madde miktarını 103 mg GAE/g olarak bildirmiştir. Tez kapsamında yaptığımız çalışmalarda, HOD-MeOH ekstresinin ( $245,46 \pm 9,41$  mg GAE/g) daha yüksek oranda fenolik maddeye sahip olduğu görülmüştür.

## 5.3. Uçucu Yağ Analizi

Tez kapsamında çalışılan 2 taksonun uçucu bileşikleri aydınlatılmıştır. HOR uçucu yağının %93,9'u 18 bileşikten oluşurken, HOD'un %93,05'inde 45 bileşik tanımlanmıştır. Uçucu yağ analizinde, nonakosan (HOR %22,8; HOD %28,9) ve germakren D (HOR %9,5; HOD %12,3) her iki taksondaki ortak majör bileşikler olarak

dikkati çekmiştir. HOR ayrıca  $\beta$ -selinen (%9,5), trikosan (%8,8) ve  $\alpha$ -selinen (%8,6) bakımından zengin bulunmuştur.

Bertoli vd (2015), *H. origanifolium* türünün uçucu yağının ana bileşiklerini  $\alpha$ -selinen (%19,62),  $\beta$ -selinen (%16,12), spatulenol (%4,21),  $\gamma$ -muurolene (%4,6-4,7) ve  $\delta$ -cadinen (%7,7-8,2) olarak saptamıştır.

Çırak vd (2013), *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*'un Amasya'nın iki ilçesinde yetişen örneklerinin uçucu bileşiklerini karşılaştırılmıştır. Yeniköy ilçesinden toplanan örneklerde ana bileşikler  $\beta$ -selinen (%16), *cis-ve-trans* linalol oksit (%7-%13),  $\alpha$ -selinen (%12) olarak tespit edilirken, Gümüş ilçesinden toplanan örneklerde ana bileşikler  $\beta$ -selinen (%14,17) ve  $\alpha$ -selinen (%9,61) olarak rapor edilmiştir.

Bir başka çalışmada Küçük vd (2015), Aydın-Didim'den toplanan *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *bourgaei*'nin uçucu yağının ana bileşiklerinin hegzadekanoik asit (%28), laurik asit (%11,3), miristik asit (%9,7) karyofillen oksit (%8,7) olduğunu rapor etmiştir.

#### 5.4. LC-MS/MS Analizi

Ekstrelerin kimyasal kompozisyonlarında en yüksek miktarda tespit edilen kimyasal bileşik HOD-MeOH (75.741,45 mg/kg) ve HOD-EtOAc (42.331,12 mg/kg)'de hiperozit olmuştur. HOR-MeOH ekstresi de 10367,36 mg/kg hiperozit içermesi ile dikkati çekmiştir. Hiperozitin ardından en yüksek miktarda tespit edilen ikinci bileşik ise HOR-MeOH (35.712,48 mg/kg) ve HOR-EtOAc (15.123,88 mg/kg)'de kersitrindir. HOD-MeOH ekstrelerindeki kersitrin miktarı da 4.547,25 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar çalışılan taksonların flavonozitlerce zengin olduğunu göstermektedir.

Yüksek oranda tespit edilen diğer bir bileşik ise fenolik asit yapısındaki klorojenik asittir. HOD-MeOH, HOR-MeOH ve HOD-EtOAc ekstrelerinde sırasıyla 14.493,68 mg/kg, 10.988,07 mg/kg ve 4.104,87 mg/kg tespit edilmiştir.

Hiperisin ve psödohiperisin gibi naftodiantronların, *Hypericum* türleri için karakteristik bileşikler olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, en yüksek hiperisin HOD-MeOH'da (5.470,93 mg/kg) tespit edilmiştir. Psödohiperisin ise, en yüksek HOD-MeOH (14.015,49 mg/kg) ve HOR-MeOH (6.545,98 mg/kg) ekstrelerinde görülmüştür.

*Hypericum* türlerinin hiperforin ve adhiperforin gibi floroglusinol türevlerini de içerdiği bilinmekle birlikte, tez kapsamındaki her iki taksonda hiperforin miktarı oldukça düşük çıkmıştır. Çalışılan ekstreler arasında en fazla hiperforin HOD-EtOAc'de (503,66 mg/kg) gözlenmiştir.

Smelcerovic vd. (2008), *H. origanifolium* ve *H. aviculariifolium*'un (Türkiye-Kuzey Bölgesi) çiçek EtOH ekstrelerinin LC-MS/MS ile fitokimyasal içeriğini araştırmış ve en yüksek oranda tespit edilen bileşiklerin *H. origanifolium*'da kersetin (0,55 mg/g), *H. aviculariifolium*'da ise kersitrin (3,96 mg/g) olduğunu rapor etmiştir.

Seyrekoğlu vd (2022), *H. origanifolium*'un (Amasya) toprak üstü kısımlarının etanol-su ekstresinin HPLC ile fitokimyasal içeriği araştırmış, en yüksek orandan tespit edilen bileşik psödohiperisin ( $4,77 \pm 0,05$  µg/mL) olarak rapor edilmiştir.

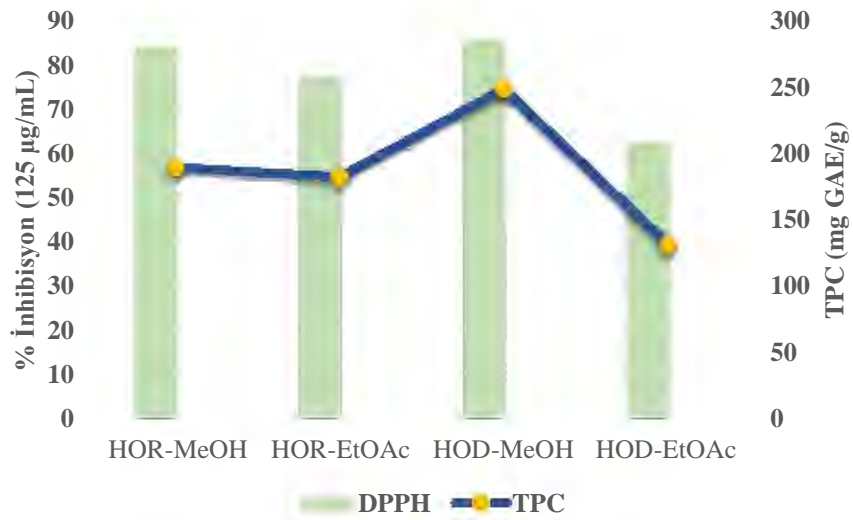
Ayan vd (2008), *H. origanifolium*'un (Samsun) toprak üstü kısımlarından hazırlanan EtOH ekstresinin HPLC ile fitokimyasal içeriği araştırılmıştır. Hiperozit (0,45–29,55 mg/g) en yüksek miktarda bulunan bileşik olmuştur.

*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*'un (Samsun) toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH ekstresinin HPLC ile fitokimyasal içeriği araştırılmıştır (Çırak vd. 2013). En yüksek oranda tespit edilen bileşikleri hiperisin, psödohiperisin ve kersitrin (sırasıyla 0,71-1,78 ve 4,15 mg/g) olarak tespit edilmiştir.

## 5.5. Antioksidan Aktivite

DPPH' radikalini süpürücü aktiviteleri incelendiğinde, maksimum inhibisyonun görüldüğü 125 µg/ml konsantrasyonda, tez kapsamında çalışılan ekstreler en aktiften başlayarak sırasıyla HOD-MeOH > HOR-MeOH > HOR-EtOAc > HOD-EtOAc olarak sıralanmaktadır (sırasıyla,  $84,852 \pm 0,089$ ;  $82,967 \pm 0,223$ ;  $76,785 \pm 0,753$ ;  $62,269 \pm 0,527$  ve BHT:  $88,396 \pm 0,155$ ). Buradan en aktif ekstrelerin MeOH ekstreleri olduğu görülmektedir.

Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri göz önünde bulundurularak, sonuçlar ayrıca toplam fenolik madde miktarları ile beraber değerlendirilmiştir. Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi, ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları ile DPPH' radikal süpürücü aktiviteleri arasında pozitif korelasyon görülmüştür.



Şekil 4.6. Toplam fenolik madde miktarları ve DPPH\* (% İnhibisyon) radikal süpürücü aktivite sonuçları

İbadova (2006)'nın, *H. origanifolium*'un (Eskişehir, Sivrihisar), yaprak ve çiçeklerinin MeOH, EtOAc ve sulu ekstralarının DPPH\* radikalini süpürücü aktivitesi üzerine yaptığı çalışmada, en yüksek aktivite bitkinin yaprak EtOAc ekstresinde ( $IC_{50}=3,37$  mg/ml) gözlenmiştir.

Benzer bir çalışmada, Öztürk vd. (2009), *H. origanifolium*'un (Sivrihisar, Tekören köyü) çiçek ve yaprak MeOH, EtOAc ve su ekstralarının DPPH\* radikalinin süpürücü aktivitesini incelenmiş, yaprak EtOAc ekstresinin ( $IC_{50}=3,37 \pm 0,26$  µg/ml) BHT ( $IC_{50}=4,39 \pm 0,43$  µg/ml)'den daha aktif olduğu tespit edilmiştir.

Seyrekoğlu vd. (2022)'nin, *H. origanifolium*'un (Amasya) DPPH\* radikalinin süpürücü aktivite çalışmasında, bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol-su ekstresinin  $IC_{50}$  değeri  $3,17 \pm 0,27$  µg/mL olarak verilmiştir.

Türkten (2022), *H. aviculariifolium* (Eskişehir, Dağköplü-Şoförler Çeşmesi) MeOH ve su ekstralarının DPPH\* radikalinin süpürücü aktivitesini incelemiştir. *H. aviculariifolium* MeOH ekstresi  $IC_{50}=0,16$  mg/ml değeri ile en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir.

Başka bir çalışmada Maltas vd. (2013), *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*'un (İç Anadolu) MeOH ekstresinin  $86,88 \pm 0,87$  mg/ml  $IC_{50}$  değerini vermiştir.

## 5.6. Antimikrobiyal Aktivite

Tez kapsamında yer alan HOR'un antimikrobiyal aktivitesi ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur. Genel olarak EtOAc ekstrelerinin MeOH ekstrelerinden daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği görülmüştür.

Tez bitkileri arasından en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi de HOR-EtOAc ekstresi, *B. cereus*, *S. typhimurium* ve *B. subtilis*'e karşı (MİK <0,195 mg/mL); HOD-EtOAc ekstresi ise *S. typhimurium* ve *B. cereus*'a karşı (MİK=0,195 mg/mL) göstermiştir. Tezde çalışılan ekstrelerin tümü en düşük antimikrobiyal aktiviteyi *P. aeruginosa*'ya karşı (MİK=12,5 mg/mL) göstermişlerdir.

*H. origanifolium* (Batı Karadeniz) ve *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* (Batı Karadeniz)'un çiçek ve yaprak kısımlarının antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği çalışmada, en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *H. origanifolium*'un çiçek EtOH ekstresi 32 µg/mL MİK değeri ile *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *B. cereus*'a karşı göstermiştir. *H. aviculariifolium*'un çiçek EtOH ekstresi ise *P. aeruginosa*, *B. subtilis*'e karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi (MİK 64 µg/mL) sergilemiştir. Yaprak EtOH ekstresi de *P. aeruginosa*'ya karşı yine 64 µg/mL MİK değeri göstermiştir (Gül vd., 2021).

Tezde çalışılan ekstrelerden hiçbiri *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Bizim sonucumuza benzer şekilde, Gül vd (2021) çalışmasında bitki ekstrelerinin *E. coli*'ye karşı 1028 µg/mL MİK değeriyle düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

Maltas vd (2013), İç Anadolu Bölgesi'nden toplanan *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*'un tamamı kullanılarak hazırlanan MeOH ekstresinin Gram-pozitif bakterilerden *S. aureus*'e karşı  $97,65 \pm 1,74$  µg/ml MİK değeri verdiğini rapor etmiştir.

Türkten (2022), Eskişehir, Dağköplü'den toplanan *H. aviculariifolium*'un MeOH ve su ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Genel olarak MeOH ekstresinin daha güçlü aktivite gösterdiği belirtilmiştir. MeOH ekstresi, *P. aeruginosa*'ya karşı 500 µg/mL MİK değeri gösterirken, *E.coli*'ye karşı 1000 µg/mL MİK değeri ile düşük inhibitör etki tespit edilmiştir.

## 5.7. Sitotoksik Aktivite

Tez kapsamındaki HOD'un A549, MCF-7 ve NIH3T3 hücre hatlarında sitotoksik aktivitesi ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur. Aynı şekilde HOR'un MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi ilk defa bu tez çalışmasında incelenmiştir.

Çalışılan bitki ekstraktları arasında hem A549 hücre hattında hem de MCF-7 hücre hattında, en güçlü sitotoksik aktiviteyi HOR-EtOAc ekstresi (sırasıyla,  $IC_{50}=24,658 \pm 1,035 \mu\text{g/mL}$  ve  $IC_{50}=13,364 \pm 0,563 \mu\text{g/mL}$ ) göstermiştir. Ancak sağlıklı hücreler olan, NIH3T3 hücre hattında da HOR-EtOAc, en yüksek sitotoksik aktiviteyi ( $IC_{50}=113,596 \pm 4,168 \mu\text{g/mL}$ ) sergilemiştir.

HOD-MeOH ekstresi, çalışılan her iki hücre hattında HOR-EtOAc'den daha az sitotoksikite göstermiş olmasına rağmen, (A549:  $IC_{50}=56,528 \pm 1,023 \mu\text{g/mL}$ ; MCF-7:  $IC_{50}=30,967 \pm 0,974 \mu\text{g/mL}$ ), sağlıklı hücrelerde sitotoksikitesinin doksorubisinden daha az olması sebebiyle dikkat çekmiştir (NIH3T3:  $IC_{50}=193,418 \pm 5,974 \mu\text{g/mL}$ ).

HOR-MeOH, sağlıklı NIH3T3 hücre hattında en az toksisite gösteren ekstre olmuştur ( $IC_{50}=205,057 \pm 6,521 \mu\text{g/mL}$ ). Ancak A549 ( $88,056 \pm 2,184 \mu\text{g/mL}$ ) ve MCF-7 ( $IC_{50}=61,724 \pm 1,945 \mu\text{g/mL}$ ) hücre hattında HOR-EtOAc ve HOD-MeOH'den daha zayıf etki göstermiştir.

HOD-EtOAc ise aktif bulunmamıştır ( $>1000 \mu\text{g/mL}$ ).

Güzey vd. (2011)'nin, *H. origanifolium*'un EtOH:su (50:50, v/v) ile hazırlanan çiçek ve yaprak ekstraktlarının çeşitli hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin incelediği çalışmada, MTT deneyinde çiçek ekstresi A549 hücre hattı üzerinde etki göstermezken, yaprak ekstresinin 250  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda zayıf etki gösterdiği bildirilmiştir.

## KAYNAKÇA

- Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W. and de Witte P.A. (2002). Hypericin In Cancer Treatment: More Light On The Way. *Int J Of Biochem Cell Biol.* 34, 221–41.
- Akdeniz, M., Yilmaz, M. A., Ertas, A., Yener, I., Firat, M., Aydin, F., and Kolak, U. (2020). Method validation of 15 phytochemicals in *Hypericum lysimachioides* var. *spathulatum* by LC–MS/MS, and fatty acid, essential oil, and aroma profiles with biological activities. *J Food Measu. and Charac*, 14, 3194-3205.
- Al-Anee, R. S., Al-Ani, E. H., & Omran, Z. S. (2023). Cytotoxic Activity of *Hypericum triquetrifolium* Turra Methanolic Extract Against Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 24(10), 3599.
- Ali, S. M., Chee, S. K., Yuen, G. Y. and Iivo, M. (2001). Hypericin and hypocrellin induced apoptosis in human mucosal carcinoma cells. *J. Photochem. Photobiol.*, 65, 59–73.
- Anderson, J. G. and Taylor, A. G. (2012). Use of complementary therapies for cancer symptom management: results of the 2007 National Health Interview Survey. *J Altern Complement Med.*, 18(3), 235-41.
- Arasan, S., & Kaya, I. (2015). Some important plants used against diabetes in folkloric medicine in Savur (Mardin/Turkey) area and their application areas. *Scientific Papers–Series A, Agronomy*, 58, 128-131.
- Avcı, M. (2005). Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü. *Coğrafya Dergisi*, 13, 27-55.
- Avcı, M. (2014). Türkiye'nin Bitki Çeşitliliği ve Coğrafi Açidan Değerlendirmesi. Ü Akkemik (Editör), *Türkiyenin Bitki Çeşitliliği ve Coğrafi Açidan Değerlendirmesi* içinde (s. 28-53). Ankara: Orman Genel Müdürlüğü Yayını.
- Ayan, A. K., & Çirak, C. (2008). Hypericin and Pseudohypericin contents in some *Hypericum*. species growing in Turkey. *Pharmaceutical biology*, 46(4), 288-291.

- Aydın, A., ve Yeşil, Y. (2018). İkizce Ordu-Türkiye ilçesinde etnobotanik bir ön çalışma. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 5(3), 25-43.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-A Review. *Food and Chem Toxi*, 46, 446-475.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibensouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *JPA*, 6, 71-79.
- Barnes, J., Anderson, L. A. and Phillipson, J. D. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology, and clinical properties. *J Pharm Pharmacol*, 53, 583-600.
- Başer, K. H. C. ve Kırimer, N. (2022). *Farmakognozi ve Fitoterapi*. İstanbul: Tıp Kitabevi.
- Bayramoğlu, G., Bayramoğlu, A., Engur, S., Şentürk, H., Öztürk, N. and Çolak, S. (2014). The Hepatoprotective Effects Of *Hypericum perforatum* L. On Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury In Rats. *Cytotechnology*, 66(3), 443-448. doi: 10.1007/s10616-013-9595-x. Epub 2013 Haz. 23.
- Baytop, A. (1983). *Farmasötik Botanik*. İstanbul Üniversitesi Yayınları No:3158 Eczacılık Fakültesi Yayınları 36, 249-250.
- Baytop, T. (1999). *Türkiye 'de Bitkiler ile Tedavi*. (2nd ed.). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
- Berretta, M., Della Pepa, C., Tralongo, P., Fulvi, A., Martellotta, F., Lleshi, A., Nasti, G., Fisichella, R., Romano, C., De Divitiis, C., Taibi, R., Fiorica, F., Di Francia, R., Di Mari, A., Del Pup, L., Crispo, A., De Paoli, P., Santorelli, A., Quagliariello, V., Iaffaioli, R. V., Tirelli, U. and Facchini, G. (2017). Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) in cancer patients: An Italian multicenter survey. *Oncotarget*, 8(15), 24401-24414.
- Bertoli, A., Çırak, C. and Seyis, F. (2015). *Hypericum origanifolium* Willd.: The essential oil composition of a new valuable species. *Ind Crops and Pro*, 77, 676-679.

- Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Spinelli, G. and Menichini, F. (2000). Constituents of *Hypericum hircinum* oils. *J Ess Oil Res*, 12, 617-620.
- Bilia, A. R., Gallori, S. and Vincieri, F. F. (2002). St. John's Wort And Depression: Efficacy, Safety And Tolerability-an Update. *Life Sci.*, 70, 3077–3096.
- Boran, R. (2018). Investigations of anti-aging potential of *Hypericum organifolium* Willd. for skincare formulations. *Ind Crops and Pro*, 118, 290-295.
- Cakilcioglu, U., and Turkoglu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *J Ethnop*, 132(1), 165-175.
- Cavero, R. Y., and Calvo, M. I. (2015). Medicinal plants used for musculoskeletal disorders in Navarra and their pharmacological validation. *J ethnop*, 168, 255-259.
- Ciccarelli, D., Andreucci, A. C. and Pagni, A. M. (2001). Translucent Glands and Secretory Canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, Anatomical and Histochemical Studies During the Course of Ontogenesis. *Annals of Botany*, 88(4):637-644.
- Cirak, C., Radusiene, J., Camas, N., Caliskan, O., and Odabas, M. S. (2013). Changes in the contents of main secondary metabolites in two Turkish *Hypericum* species during plant development. *Pharma Bio*, 51(3), 391-399.
- CLSI. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, 26.
- Couladis, M., Baziou, P., Petrakis, P. V. and Harvala, C. (2001). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece. *Fla and Frag J*, 16(3), 204-206.
- Crockett, S. L. (2010). Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). *NPC*, 5(9), 1934578X1000500926.

- Crockett, S., Wenzing, E.M., Kunert, O. and Bauer, R. (2008). Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytoche Lett*, 1 (1), a-43.
- Crockett, S.L. and Robson, N.K.B. (2011). Taxonomy And Chemotaxonomy Of The Genus *Hypericum*. *Medic and Aro Plant Sci and Biotech*, 5 (1), 1-13.
- Cushnie, T. T. and Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antim Agents*, 26(5), 343-356.
- Çakır, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S. and Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flav and Frag J*, 19(1), 62-68.
- Çırak C and Bertoli A. (2013). Aromatic profiling of wild and rare species growing in Turkey: *Hypericum aviculariifolium* Jaub. and Spach subsp. *depilatum* (Freyn and Bornm.) Robson var. *depilatum* and *Hypericum pruinatum* Boiss. and Bal. *Nat Prod Res*, 27(2), 100-107.
- Çırak, C. ve Kurt D., (2014). Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak *Hypericum* Türleri. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24(1), 38-52.
- Çırak, C., Radušienė, J., Janulis, V., Ivanauskas, L., and Arslan, B. (2007b). Chemical Constituents of Some *Hypericum* Species Growing in Turkey. *J Plant Bio*, 50(6), 632.
- Çırak, C., Sağlam, B., Ayan, A. K., and Kevseroğlu, K. (2006). Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis. *Bioche Sys and Eco*, 34(1), 1-13.
- Çırak, C., Radušienė, J., Ivanauskas, L. and Janulis V. (2007). Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum organifolium* during its phenological cycle. *Acta Physiol Plant*, 29(3), 197–203.
- Dall’Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A.P., Albring, D., Nör, C., Sarmiento, L., Lamb, L., Hass, M., Poser, G.V. and Schapoval, E.E.S. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytome*, 10, 511-516.

- Delaey, E. M., Kamuhabwa, A. R., Vandebogaerde, A. L. and de Witte, P. A. (1999). Photocytotoxicity of protohypericin after photoconversion to hypericin. *Planta medica*, 65(8), 719-722.
- Dellafiora, L., Galaverna, G., Cruciani, G., Dall'Asta, C. and Bruni, R. (2018). On the Mechanism of Action of Anti-Inflammatory Activity of Hypericin: An In Silico Study Pointing to the Relevance of Janus Kinases Inhibition. *Mole*. 23(12), 3058.
- Demirci, B., Baser, K.H.C., Crockett, S.L. and Khan, I.A. (2005). Analysis of the volatile constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae). *J Esse Oil Res*, 17, 659-663.
- Deng, L. J., Qi, M., Li, N., Lei, Y.H., Zhang, D. M. and Chen, J. X. (2020). Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 108(2), 493-508.
- Dewick, P. M. (2003). *Medicinal Natural Products: A Systematic Approach*. (2nd ed.). West Sussex: John Wiley and Sons Ltd.
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M. and Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *JNCI: J Nat Canc Ins*, 90(12), 889-905.
- Dulger, B. and Hacıoglu, N. (2009). Antibacterial activity of three endemic *Hypericum* species used in folkloric medicine against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotech and Biotech Equip*, 23(1), 763-765.
- Dulger, G., Dulger, B., and Aki, C. (2010). Antibacterial activity of two endemic *Hypericum* (*H. kazdaghensis* and *H. havvae*) against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian J Chem*, 22(9), 7083-7086.
- Erdoğan, A.E. ve Everest, A. (2013). Antimikrobiyal Ajan Olarak Bitki Bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6: 27-32.
- Erkara, İ. P. and Tokur, S. (2004). Morphological and anatomical investigations on some *Hypericum* L. species growing naturally in and around Eskisehir. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*.

- Ernst, E. (2003). Serious psychiatric and neurological adverse effects of herbal medicines—a systematic review. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 108(2), 83-91.
- Eroğlu Özkan E., Demirci B., Ünsal Güner Ç., Kültür Ş., Mat A. and Başer K.H.C. (2013). Essential Oil Composition of Five Endemic *Hypericum* Species From Turkey. *Medic and Arom Plants*, 2(2).
- Faydaoğlu E. ve Sürücüoğlu M.S. (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi, *Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1), 52 – 67.
- Fırat, M. and Eroğlu H. (2023). *Hypericum celikaensis* (Hypericaceae), a new species from southeastern Anatolia (Adıyaman–Turkey). *Candollea* 78: 79–87.
- Gao, W., Hou, W.-Z., Zhao, J., Xu, F., Li, L., Xu, F., Sun, H., Xing, J.-G., Peng, Y., Wang, X.L., Ji, T.F. and Gu, Z.Y. (2016). Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinol Congeners from *Hypericum scabrum*. *J. Nat. Prod.*, 79(6), 1538–1547.
- Gärber, U. and Schenk, R. (2004). Johanniskrautwelke, *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides*—Ergebnisse mehrjähriger Forschungsarbeiten im Überblick. *Drogenreport*. 16, 23–28.
- Germ, M., Stibilj, V., Kreft, S., Gaberščik, A. and Kreft, I. (2010). Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. *Food Chem*, 122(3), 471-474.
- Giese, A. C. (1980). Hypericism. *Photoc and Photob*, 5, 229– 255.
- Gioti, E. M., Fiamegos, Y. C., Skalkos, D. C. and Stalikas, C. D. (2009). Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem*, 117(3), 398-404.
- Grafakou, M. E., Barda, C., Karikas, G. A., and Skaltsa, H. (2022). *Hypericum* essential oils—composition and bioactivities: an update (2012–2022). *Mole*, 27(16), 5246.

- Guedes, A. P., Franklin, G. and Fernandes Ferraria, M. (2012). *Hypericum* sp.: essential oil composition and biological activities. *Phytochem Rev*, 11, 127–52.
- Gurevich, A. I., Dobrynin, V. N., Kolosov, M. N., Popravko, S. A. and Riabova, I. D. (1971). Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *Antibiotiki*, 16(6), 510.
- Gül, L. B., Özdemir, N., Gül, O., Çırak, C. and Çon, A. H. (2021). Some bioactive properties and antimicrobial activity of some *Hypericum* species growing wild in Black Sea Region of Turkey. *Euro Food Sci and Eng*, 2(1), 1-6.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., ve Babaç, M.T. (ed.) (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmalı Derneği Yayını, Flora Dizisi 1.
- Gürdal, B. and Kültür, Ş. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *J Ethnop*, 146(1), 113-126.
- Gürel, Z. ve Aslan, D. (2019). Halk Sağlığı Bakış Açısıyla Gıda Kaynaklı Krizler Ve Önleme Yaklaşımları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76, 361-376.
- Güzey, G. (2007). A549, HeLa ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde *Hypericum perforatum*, *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum organifolium* Türlerinin Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkileri. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Güzey, G., Ibadova, S., Öztürk, Y., Öztürk, N., Maggi, F., Sagratini, G., ... & Vittori, S. (2011). Antiproliferative and antioxidant effects of three *Hypericum* species of Turkish origin: *H. perforatum*, *H. montbrettii* and *H. organifolium*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 91-99.
- Hostettmann, K. and Wolfender, J. L. (2005). St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety. Basel: Birkhäuser Verlag. *Phytochem*, 5-20.
- Hu, L., Xue, Y., Zhang, J., Zhu, H., Chen, C., Li, X. N., Liu, J., Wang, Z., Zhang, Y. and Zhang, Y. (2016). (±)-Japonicols A-D, Acylphloroglucinol-Based Meroterpenoid

- Enantiomers with Anti-KSHV Activities from *Hypericum japonicum*. *J. Nat. Prod.*, 79(5), 1322-1328.
- Istikoglou, C.L., Mavreas, V. and Geroulanos, G. (2010). History And Therapeutic Properties Of *Hypericum perforatum* From Antiquity Until Today. *Psyc*, 21(4), 8-332.
- İbadova, S. (2006). Bazı *Hypericum* Türlerinin Fenolik Bileşimi İle Antioksidan Ve Serbest Radikal Süpürücü Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Jaradat, N. (2022). Qualitative, Quantitative, Cytotoxic, Free Radical Scavenging, and Antimicrobial Characteristics of *Hypericum lanuginosum* from Palestine. *Molecules*, 27(14), 4574.
- Karioti, A. and Bilia, A. R. (2010). Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci*, 11(2).
- Kintzios, S. E. (2006). Terrestrial Plant-Derived Anticancer Agents and Plant Species Used in Anticancer Research. *Cri Rev in Plant Sci*, 25, 79–113.
- Kong, Y., Sun, W. and Wu, P. (2020). Hyperoside exerts potent anticancer activity in skin cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 25(3), 463-479.
- Kumar V., Singh P.N. and Bhattacharya S.K. (2001a). Anti-stress activity of Indian *Hypericum perforatum* L. *Indian J Exp Biol*. 39(4),344-349.
- Kumar, V., Singh, P. N. and Bhattacharya, S. K. (2001b). Anti-inflammatory And Analgesic Activity Of Indian *Hypericum perforatum* L. *Indian J Exp Biol.*, 39(4), 339-43.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L. and Sarker, S. D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother Res*, 21(7), 615-621.
- Küçük, S., Kürkçüoğlu, M., Köse, Y. and Başer, K. (2015). Chemical Characterisation of the Essential Oil of *Hypericum aviculariifolium* Jaub. & Spach

subsp. *depilatum* (Freyn & Bornm.) Robson var. *bourgaei* (Boiss.) Robson from Turkey. *Nat Vol and Ess Oils*, 2(2), 52-56.

- Linde, K. (2009). St. John's wort—an overview. *Comp Med Res*, 16(3), 146-155.
- Liu, C. D., Kwan, D., Saxton, R. E. and Mcfadden, D. W. (2000). Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. *J. Surg. Res.*, 93, 137–143.
- Liu, X., Yang, X. W., Chen, C. Q., Wu, C. Y., Zhang, J. J., Ma, J. Z., Wang, H., Yang, L. X. and Xu, G. (2013). Bioactive polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum cohaerens*. *J. Nat. Prod.*, 76(9), 1612-1618.
- Luna, L., Luna Guevara, J. J. L., Hernández Carranza, P., Ruíz, H. ve Ochoa Velasco, C. E. (2018). Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. *Stud Nat Prod Chem*, 59, 79-108.
- Maltas Çağıl, E., Uysal, A., Yıldıztuğay, E., Aladağ, M., Yıldız, S. and Küçükoduk, M. (2013). Investigation of antioxidant and antibacterial activities of some *Hypericum* species. *Fre env bull*, 22(3a), 862-869.
- Martarellia, D., Martarelli, B., Pediconia, D., Nabissi, M. I., Perfumi, M. and Pompei, P. (2004). *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. *Can Lett*, 210(1), 27–33.
- Mazandarani, M., Yassaghi, S., Rezaei, M. B., Mansourian, A. R. and Ghaemi, E. O. (2007). Ethnobotany and antibacterial activities of two endemic species of *Hypericum* in North-East of Iran. *Asian J Plant Sci*, 6(2), 354-358.
- McLafferty, F.W. ve Stauffer, D.B. (1989). The wiley/NBS registry of mass spectral data, J. Wiley and Sons, New York.
- Menegazzi, M., Masiello, P. and Novelli, M. (2020). Anti-Tumor Activity of *Hypericum perforatum* L. and Hyperforin through Modulation of Inflammatory Signaling, ROS Generation and Proton Dynamics. *Antioxidants (Basel)*, 10(1), 18.

- Metcalf, C.R. and Chalk, L. (1957) Anatomy of the dicotyledons. Oxford University Press, Amen House, London E.C. 1, 165-169.
- Moon, H. I., Lee, Y. C. and Lee, J. H. (2011). Phenol glycosides with in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity from *Hypericum erectum* Thunb. *Phytother Res.* 25(9), 1389-1391.
- Nahrstedt, A. and Butterweck, V. (1997). Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacop*, 30(2), 129-134.
- Nobakht, S. Z., Akaberi, M., Mohammadpour, A. H., Tafazoli Moghadam, A. and Emami, S. A. (2022). *Hypericum perforatum*: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions. *Iran J Basic Med Sci.*, 25(9), 1045-1058.
- Odabas, M. S., Radusiene, J., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Camas, N., and Kayikci, S. (2016). Secondary metabolites in *Hypericum* species and their distribution in different plant parts. *Žemdirbystė (Agriculture)*, 103(2), 193-198.
- Ollivier, B., Balansard, G., Maillard, C. and Vical, E. (1985). Separation et identification des acides phenols par chromatographie liquide hauteperformance et spectroscopie ultra-violette. Application a'la parietaire (*Parietaria officinalis* L.) et au millepertuis (*Hypericum perforatum* L.). *J Pharm Belg*, 40, 173-177.
- Orhan, D., Özçelik, B., Hoşbaş, S. and Vural, M. (2012). Assessment of antioksidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi, *Turkish J Bio* (36), 672-696.
- Osmaniye, D., Hıdır, A., Sağlık, B.N., Levent, S., Özkay, Y. and Kaplancıklı, Z.A.(2022) Synthesis of new pyrimidine-triazole derivatives and investigation of their anticancer activities, *Chem & Bio*, DOI: 10.1002/cbdv.202200216, 19(8), e202200216.
- Özdemir, E. and Alpınar, K. (2015). An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde–Turkey). *J Ethnop*, 166, 53-65.

- Öztürk, N., Tunçel, M. and Potoğlu Erkara İ. (2009). Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*. *Pharma Bio*, 47(2), 120-127.
- Paponov, M., Antonyan, M., Slimestad, R., and Paponov, I. A. (2021). Decoupling of plant growth and accumulation of biologically active compounds in leaves, roots, and root exudates of *Hypericum perforatum* L. by the combination of jasmonate and far-red lighting. *Biomolecules*, 11(9), 1283.
- Pellati, F., Benvenuti, S. and Melegari, M. (2005). Chromatographic performance of a new polar poly (ethylene glycol) bonded phase for the phytochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. *J Chromatogr A*, 1088(1-2), 205-217.
- Petkeviciute, Z., Savickiene, N., Savickas, A., Bernatoniene, J., Simaitiene, Z., Kalveniene, Z. and Mekas, T. A. (2010). Urban ethnobotany study in Samogitia region, Lithuania. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(1), 064-071. Phenolic Compounds, *Trends in Plant Sci*, 2, 152-159.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- Ríos, J. L. (2016). *Gıdaların Muhafazasında, Lezzetinde ve Güvenliğinde Esansiyel Yağlar*. Amsterdam, Hollanda: Elsevier.
- Robson, N. K. B. (2012). Studies in the genus *Hypericum* L.(Hypericaceae) 9. Addenda, corrigenda, keys, lists and general discussion. *Phytotaxa*, 72, 1-111.
- Robson, N. K. B. (1967) *Hypericum* L. In: Davis PH, ed. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1967: 355-401.
- Robson, N.K.B. (1974). Hypericaceae. *Flora Malesiana-Series 1, Spermatophyta*, 8(1), 1-29.
- Robson, N. K. B. (1977). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 1. Infrageneric classification. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany*, 5, 291–355.

- Robson, N. K. B. (1978) Hypericaceae., Woodson Jr, R. E., Schery, R. W., Flora of Panama. Part VI. Family 123A. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 9-26.
- Robson, N. K. B. (1981). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 2. Characters of the genus. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany*, 8, 55–226.
- Robson, N. K. B. (2002). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 4(2). Section 9. *Hypericum* sensu lato (part 2): subsection 1. *Hypericum* series 1. *Hypericum*. *Bulletin of the Natural History Museum, Botany*, 32, 61–123.
- Robson, N. K. B. (2010). Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 5(1). Sections 10. Olympia to 15/16. Crossophyllum. *Phytotaxa*, 4:5-126.
- Robson, N. K. B. and Adams, P. (1968). Chromosome numbers in *Hypericum* and related genera, *Brittonia*. 20, 95–106.
- Saddiqe, Z., Naeem, I. and Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharma*, 131, 511-521.
- Šantić, Ž., Pravdić, N., Bevanda, M. and Galić, K. (2017). The Historical Use Of Medicinal Plants In Traditional And Scientific Medicine. *Psychiatr Danub.*, 4(4), 787-792.
- Satia, J. A., Littman, A., Slatore, C. G., Galanko, J. A. and White, E. (2009). Associations of herbal and specialty supplements with lung and colorectal cancer risk in the Vitamins and Lifestyle study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 18(5), 1419-28.
- Savić, J., Mačukanović-Jocić, M., and Jarić, S. (2019). Medical ethnobotany on the Javor mountain (Bosnia and Herzegovina). *Euro J Int Med*, 27, 52-64.
- Schmidt, S. and Heilmann, J. (2013). Review: The genus *Hypericum* and its acylphloroglucinols. Unpublished internal data.
- Schmidt, S., Jürgenliemk, G., Skaltsa, H. and Heilmann, J. (2012). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. *Phytochemistry*, 77, 218-225.

- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici, E. (2012). *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. (9). İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, 116, 194-195.
- Seyrekoğlu, F., Temiz, H., Eser, F. and Yıldırım, C. (2022). Comparison of the antioxidant activities and major constituents of three *Hypericum* species (*H. perforatum*, *H. scabrum* and *H. origanifolium*) from Turkey. *S Afr J Bot*, 146, 723-727.
- Singh, I. P. and Bharate, S. B. (2006). Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat Prod Rep*, 23(4), 558-591.
- Singh, R. B. and Downing, D. (1995). *Antioxidants and coronary artery disease*. *J Nut & Env Med*, 5(3), 219-224.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Smelcerovic, A., Zuehlke, S., Spiteller, M., Raabe, N., & Özen, T. (2008). Phenolic constituents of 17 *Hypericum* species from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(4), 316-319.
- Stojanović, N. M., Radulović, N. S., Randjelović, P. J., & Laketić, D. (2016). Antinociceptive properties of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) and other *Hypericum* species. *Natural Product Communications*, 11(11).
- Stolz, E. D., da Costa, P. F., Medeiros, L. F., Souza, A., Battastini, A. M., von Poser, G. L., Bonan, C., Torres, I. L. and Rates, S. M. (2016). Uliginosin B, a Possible New Analgesic Drug, Acts by Modulating the Adenosinergic System. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, doi: 10.1155/2016/5890590.
- Stolz, E. D., Hasse, D. R., von Poser, G. L. and Rates, S. M. (2014). Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multimediated antinociceptive effect in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 66(12), 1774-1785.

- Sun, Q., Schmidt, S., Tremmel, M., Heilmann, J. and König, B. (2014). Synthesis of natural-like acylphloroglucinols with anti-proliferative, anti-oxidative and tube-formation inhibitory activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 85, 621-628.
- Surmuş Asan, H. (2019). The Studies on The Endemic *Hypericum* Species from Turkey. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 9(2),253-268.
- Tanaka, N., Kubota, T., Ishiyama, H., Araki A., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Mikami, Y. and Kobayashi, J. (2008). Petiolins A-C, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Bioorg. Med. Chem*, 16(10), 5619-5623.
- Tatsis, E. C., Boeren, S. and Exarchou, V. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*, 68(3), 383–393.
- Tekel'ová, D., Repčák, M., Zemková, E. and Tóth, J. (2000). Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 66, 778–80.
- Tocci N., Perenzoni D., Iamónico D., Fava F., Weil T. and Mattivi F. (2018). Extracts From *Hypericum hircinum* subsp. *majus* Exert Antifungal Activity Against a Panel of Sensitive and Drug-Resistant Clinical Strains. *Front Pharmacol.* 20; 9:382.
- Turkish origin: *H. perforatum*, *H. montbretii* and *H. organifolium*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*.
- Türkiye Çevre Vakfı. (2001). Gap Yöresindeki Endemik ve Tıbbi Bitkiler. Ankara: Türkiye Çevre Vakfı Yayınları, Yayın 143.
- Türkten, V. (2022). Endemik *Hypericum aviculariifolium* Jaub. Et Spach Ve *Hypericum Bithynicum* Boiss. Türleri Üzerine Farmasötik Botanik Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- Uzun, F. (2009). Ontogenic changes in hypericin content of some *Hypericum* species in natural pastureland of Turkey. *Bangladesh J. Bot*, 38, 13-18.

- Varel, M. (2011). *Hypericum perforatum* Binbirdelikotu, Sarı Kantaron. L. O. Demirezer (Ed.). *FFD Monografıları Tedavide Kullanılan Bitkiler* içinde (s. 309-319). Ankara: MN Medikal & Nobel Tıp Kitap Sarayı.
- Viscuse, P. V., Price, K., Millstine, D., Bhagra, A., Bauer, B. and Ruddy, K. J. (2017). Integrative medicine in cancer survivors. *Curr Opinion in Onco*, 29(4),235-247.
- Walker, L., Sirvent, T., Gibson, G. and Vance, N., (2001). Regional Differences In Hypericin And Pseudohypericin Concentrations And Five Morphological Traits Among *Hypericum perforatum* Plants In The Northwestern United States. *Can J Bot.*, 79, 1248-1251.
- Williamson, E.M. (2001). Synergy And Other Interactions In Phytomedicines. *Phytomedicines*. 8(5), 401-409.
- World Health Organization (WHO) (2002): WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. vol. 2. World Health Organization, Geneva.
- Xie, X., Hudson, J. B. and Guns, E. S. (2001). Tumor-specific and photodependent cytotoxicity of hypericin in the human LNCaP prostate tumor model. *Photochem. Photobiol.*, 74, 221–225.
- Yıldız, S., Keskin, C., Şahintürk, V. and Ayhancı, A., (2018). Cardioprotective effects of *Hypericum triquetrifolium* Turra. against cyclophosphamide related cardiotoxicity in rats. *Marmara Pharma J*, 22 (3), 374-385.
- You, M. K., Kim, H. J., Kook, J. H. and Kim, H. A. (2018). St. John's Wort Regulates Proliferation and Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Inhibiting AMPK/mTOR and Activating the Mitochondrial Pathway. *Int J Mol Sci.*, 19(4), 966.
- Yüce, E. and Bağcı, E. (2012). The essential oils of the aerial parts of two *Hypericum* taxa (*Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (Clusiaceae)) from Turkey, *Nat Prod Res*. 26(21), 1985-1990.

Zhang, M., Wang, Y., Qian, F., Li, P. and Xu, X. (2016). Hypericin inhibits oligomeric amyloid  $\beta$ 42-induced inflammation response in microglia and ameliorates cognitive deficits in an amyloid  $\beta$  injection mouse model of Alzheimer's disease by suppressing MKL1 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 481, 71-76.

Živković, J., Ilić, M., Zdunić, G., Jovanović-Lješević, N., Menković, N. and Šavikin, K. (2021). Traditional use of medicinal plants in Jablanica district (south-eastern Serbia): ethnobotanical survey and comparison with scientific data. *Genetic Res and Crop Evo*, 68(4), 1655-1674.

### İNTERNET KAYNAKLARI

http-1: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30002180-2>  
(Eriřim tarihi: 05.01.2024)

http-2: <https://hypericum.myspecies.info/taxonomy/term/484> (Eriřim tarihi: 04.01.2024)

http-3: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000746600>  
(Eriřim tarihi: 04.01.2024)

http-4: [http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax\\_id=2091](http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=2091)  
(Eriřim tarihi: 06.01.2024)

http-5: [http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax\\_id=2094](http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=2094)  
(Eriřim tarihi: 06.01.2024)

http-6: <https://bizimbitkiler.org.tr/v3/demo/details.php?id=7864&t=1>  
(Eriřim tarihi: 06.01.2024)

http-7: <https://bizimbitkiler.org.tr/v3/demo/details.php?id=7865&t=1>  
(Eriřim tarihi: 06.01.2024)