

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**SALVIA VIRGATA BİTKİSİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE
FENOLİK BİLEŞİMİ BAKIMINDAN İNCELENMESİ**

Proje No: TSA-09-1095

Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof.Dr. Müberra KOŞAR
Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı

Prof.Dr. İlhan DEMİRHAN
Prof.Dr. Hatice ÖZBİLGE
Yrd.Doç.Dr. Esmâ KAYA
Yrd.Doç.Dr. Betül AYCAN
Arş.Gör. Canan ASLAN
Arş.Gör. Gökçe ŞEKER-KARATOPRAK

Eczacılık Fakültesi

Temmuz 2012

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM	3
2. GENEL BİLGİLER	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Ekstrelerin hazırlanışı	12
3.2. Toplam fenol miktar tayini	12
3.3. Toplam flavonoit miktar tayini	12
3.4. Toplam flavonol miktar tayini	12
3.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile fenolik bileşiklerin analizi ...	13
3.6. İndirgeme gücünün belirlenmesi	13
3.7. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•]) radikalini süpürücü etki tayini	14
3.8. 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS ^{+•}) redikalinin süpürücü etki tayini	14
3.9. Askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu	14
3.10. β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini	15
3.11. Demir(II) şelat (kelat) aktivite	15
3.12. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	16
3.13. Sitotosisite çalışması	17
3.14. MDA, GSH-Px ve SOD aktivitelerinin ölçülmesi	19
4. BULGULAR	20
4.1. Toplam fenol, flavonoit ve flavonol miktar tayini	20
4.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile fenolik bileşiklerin analizi ...	20
4.3. İndirgeme gücünün belirlenmesi	21
4.4. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•]) radikalini süpürücü etki tayini	22
4.5. 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS ^{+•}) redikalinin süpürücü etki tayini	23
4.6. Askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu	24
4.7. β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini	25
4.8. Demir(II) şelat (kelat) aktivite	26
4.9. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	27

4.10.	Sitotoksisite çalışması	27
4.11.	Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi	29
4.12.	Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi	30
4.13.	Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi	31
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6.	KAYNAKLAR	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.3. <i>S. virgata</i> ekstreleri ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü	22
Şekil 4.4. <i>S. virgata</i> ekstreleri ve standartların DPPH radikalini süpürücü aktiviteleri	23
Şekil 4.5. <i>S. virgata</i> ekstreleri ve standartların ABTS radikalini süpürücü aktiviteleri	24
Şekil 4.6. <i>S. virgata</i> ekstreleri ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu	25
Şekil 4.7. <i>S. virgata</i> ekstreleri ve standartların β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etkisi	26
Şekil 4.8. <i>S. virgata</i> ekstreleri ve standartların demir(II) şelat aktivitesi	27
Şekil 4.10. <i>S. virgata</i> ekstrelerinin sitotoksik etkileri	28
Şekil 4.11. <i>S. virgata</i> ekstrelerinin GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisi	29
Şekil 4.12. <i>S. virgata</i> ekstrelerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi	30
Şekil 4.13. <i>S. virgata</i> ekstrelerinin MDA düzeyi üzerine etkisi	31
Şekil 5.1. DPPH [•] radikali ile hidrojen verici fenolik bileşiklerin reaksiyon mekanizması	34

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.13. Hücre kültürü besi yeri içeriği, PBS tamponu ve krio çözeltisi içeriği	18
Tablo 4.1. <i>S. virgata</i> ekstrelerinin toplam fenol, flavonoit ve flavonol miktarları	20
Tablo 4.2. <i>S. virgata</i> ekstrelerinin YBSK sonuçları	21
Tablo 4.9. <i>Salvia virgata</i> ekstrelerinin antimikrobiyal etkileri	28

ÖZET

Bu proje kapsamında Lamiaceae familyasında yer alan *S. virgata* Jacq.'nın toprak üstü kısımlarından elde edilmiş farklı polaritelerdeki ekstrelerin antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik aktiviteleri ve kimyasal bileşimleri incelenmiştir. Toprak üstü kısımlarından maserasyon ile %70'lik metanol ekstresi ve su ile %5'lik dokoksiyonu hazırlanmıştır. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) ve 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{+•}) radikallerini süpürücü etkileri, fosfolipit oksidasyonunu engelleyici aktiviteleri, β -karoten-linoleik asit birlikte oksidasyonunu ve demir(II) ile şelat oluşumu incelenmiştir. Ayrıca ekstrelerin indirgeme kapasiteleri ile spektrofotometrik (toplam fenol, toplam flavonoit, toplam flavonol) ve kromatografik (YBSK) olarak kompozisyonları da belirlenmiştir. Aynı ekstrelerin Kronik Myeloid Lösemi hücresi olan Jurkat hücre serilerinde sitotoksitesi ve yine aynı hücre serisinde MDA, GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri de incelenmiştir. Metanol ekstresinin fenolik bileşiminin daha zengin ve her iki ekstrede de rozmarinik asitin ana bileşen olduğu tespit edilmiştir. Yapılan antioksidan aktivite ve sitotoksiste çalışmalarında rozmarinik asitin yüksek aktivite göstermesi etkiden sorunlu bileşiklerin başında geldiğini göstermiştir. Ayrıca yapılan sitotoksiste çalışmaları halkın kullanımını doğrular niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Salvia virgata*, Antioksidan Aktivite, YBSK, DPPH[•], ABTS^{+•}, Lipit Peroksidasyonu, Sitotoksiste

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND PHENOLIC COMPOSITION OF *SALVIA VIRGATA*

ABSTRACT

Within this project, the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic activity and chemical composition of different extracts obtained from aerial parts of *S. virgata* Jacq. (Lamiaceae) were investigated. The 70% methanol extract and 5% water extract of aerial parts of *S. virgata* were prepared using maseration and decoction methods, resp. In order to determine antioxidant activity of the extracts 1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{+•}) radical scavenging effect, preventing oxidation of the phospholipids, β -carotene-linolenic acid co-oxidation and iron(II) chelate formation was investigated. In addition, the reduction capacity of the extracts and the amounts of total phenol, total flavonoid, total flavonol were measured with a spectrophotometer and the known compounds were determined by HPLC. The cytotoxicity of the extracts was investigated using Chronic Myeloid Leukemia cells (Jurkat cell lines) and in the same cell line MDA, GSH-Px and SOD enzyme activities were also tested. The methanol extract enriched in phenolic compound and rosmarinic acid as the main component in both extracts has been identified. Rosmarinic acid was shown higher activity on antioxidant and cytotoxicity tests. In addition, cytotoxicity studies seem to confirm the traditional usage of plant.

Key Words: *Salvia virgata*, Antioxidant Activity, HPLC, DPPH[•], ABTS^{+•}, Lipit Peroxidation, Cytotoxicity

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Türkiye, tıbbi ve aromatik bitki çeşitliliği bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Türkiye Florası'nda 11.000'in üzerinde tür kayıtlıdır (Hedge 1982). Bunlardan yaklaşık 1000 kadarı halk arasında tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Baytop1999). Halk arasında tıbbi bitkiler en fazla çay formunda tüketilmektedir. Tıbbi çaylar arasında da önemli bir kısmı Lamiaceae (Labiatae) bitkileri oluşturmaktadır. Lamiaceae familyası tüm dünyada uçucu yağları ile en çok tanınan ve çalışılan bitkileri kapsar.

Ülkemizde *Salvia* cinsinin 89 türü ve 94 taksonu doğal olarak yetişmektedir. Bunların 45 taksonu endemiktir. *S. fruticosa*, *S. tomentosa* ve *S. aramiensis* çay olarak halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. *S. fruticosa* "elma" ve bu bitkiden elde edilen uçucu yağ ise "elma yağı" adıyla bilinmektedir. Hem yaprak hem de uçucu yağ Türkiye'nin önemli ihrac ürünlerindedir. 2002 yılında, Türkiye'nin adaçayı yaprak ihracatı 1500 tonun üzerindedir ve 3 milyon US\$ dolar girdi sağlanmıştır. Adaçayı Yağı üretimi ise 300-500 kg dır. *S. officinalis* ise tüm dünyada tıbbi amaçla kullanılan *Salvia* türüdür. *S. officinalis* Türkiye'nin doğal bitkisi değildir ve Ege bölgesinde kültürü yapılmaktadır. (Baytop 1999, Başer 2002)

Salvia türleri ülkemizde genellikle dahilen mideyi, terlemeyi durdurucu, diüretik ve haricen yara iyi edici olarak genellikle infüzyonları halinde kullanılmaktadır. Ülkemizde yetişen ve halk arasında tedavi amacıyla kullanılan türler şunlardır: *S. fruticosa* (Anadolu adaçayı, Elma çalbası), *S. aethiopsis* (Yünlü adaçayı), *S. dichroantha* (Kutnu), *S. forskahlei* (Şalba), *S. multicaulis* (Kürt reyhanı), *S. sclarea* (Ayıkulağı, Misk adaçayı, Tüylü adaçayı), *S. tomentosa* (Büyük çiçekli adaçayı), *S. verbenaca* (Yabani adaçayı), *S. virgata* (Yılcık), *S. viridis* (Yeşil adaçayı). (Baytop1991, Baytop1994, Baytop 1999)

Son yıllarda sentetik antioksidanların insanlar üzerindeki zararlı etkilerinin ortaya çıkması nedeniyle bunların yerine kullanılabilir doğal madde arayışı hızla sürmektedir. *Salvia* türleri de bu araştırmaların yoğun olarak sürdürüğü türlerin başında gelmektedir. Tüm dünyada tıbbi adaçayı olarak bilinen ve kullanılan *S. officinalis*'in antioksidan aktivitesi de çok iyi bilinmekte ve bu amaçla da kullanılmaktadır. *Salvia* türlerinin bu etkilerinden daha çok içermiş oldukları hidroksisinnamik asit türevleri (kafeik ve rozmarinik asitler), flavonoidler (luteolin, apigenin ve glikozitleri) ve diterpenoidleri (karnosol, karnosik asit ve metil karnosol gibi) sorumludur (Deans ve Simpson 2000).

Türkiye florası *Salvia* türleri bakımından da oldukça zengindir. Bu türler arasındaki endemizm oranı da oldukça yüksektir (yaklaşık %50). Bu proje kapsamında da ülkemizde

halk arasında kan kanseri tedavisinde dekoksasyonu halinde kullanılan (G. Tümen ve H. Malyer ile sözlü görüşme) *S. virgata* çalışılmak amacıyla seçilmiştir. *Salvia* türleri özellikle son yıllarda antioksidan aktivite araştırmacılarının büyük ilgisini çekmektedir. Farklı ülkelerde farklı türler hem aktivite hem de kimyasal çalışmalarda kullanılmaktadır.

Daha önce grubumuz tarafından gerçekleştirilen ve yayınlanan *S. virgata* bitkisinin antioksidan aktivitesi ve anti-inflamatuvar aktivitesi ile ilgili bazı ön çalışmalar da mevcuttur. Bu proje kapsamında bu ön verilerin ışığında *in vitro* - *in vivo* antioksidan aktivite karşılaştırılması, hücre kültürü ile lösemi üzerindeki etki çalışmaları ve *in vitro* antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılacaktır. Bu çalışmalar sonucunda halk arasındaki kullanıma eşdeğer sonuçların bulunması hedeflenmektedir. Projede elde edilecek bulgular ışığında bitkisel ilaç olarak potansiyel bir ürün elde edilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca bu şekilde halk arasındaki kullanım da doğrulanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Ülkemiz *Salvia* türleri bakımından oldukça zengin bir floraya sahiptir. Yaklaşık 89 tür ve 94 takson Türkiye Florasında kayıtlıdır. Ülkemizdeki endemizm oranı ise %50 civarındadır. Bu cins uçucu yağları bakımından Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı tarafından büyük oranda çalışılmıştır. Bu yapılan çalışmalar sonucunda *Salvia* türleri uçucu yağlarının kompozisyonlarına göre farklı gruplara ayrılmıştır (Başer 2002).

Salvia türleri tüm dünyada hem baharat olarak hem de tıbbi amaçla uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanımına paralel olarak pek çok farmakopede hem yaprakları hem de preparatları kayıtlıdır. British Herbal Pharmacopoeia (BHP) 1983'de (British Herbal Pharmacopoei 1983) ve 1996'da (British Herbal Pharmacopoei 1996) *S. officinalis* yaprağı kayıtlıdır. BHP 1996 da standardize yaprak tozu da yer almaktadır (British Herbal Pharmacopoei 1996). Alman Farmakopesi'nin 1999 basımında *S. triloba* yaprakları ve tentürü kayıtlıdır (Deutsches Arzneibuch 1999). *S. officinalis* aynı zamanda Avusturya, Fransa, Macaristan, İsviçre ve Çekoslovakya farmakopelerinde yer almakta ve İsviçre farmakopesinde *S. officinalis* ve *S. triloba* uçucu yağları da kayıtlıdır (Reynolds 1996) Ülkemizin de 1994 yılından beri resmi farmakopesi olan Avrupa Farmakopesi'nde ise *S. officinalis* yaprakları drog olarak kayıtlıdır (European Pharmacopoeia 1999).

Salvia, Latince kökenli olan *salvare* veya *salvere* (tedavi) sözcüğünden türemiştir (Kintzios 2000). *Salvia* türleri halk arasında yaygın olarak ve genellikle çay olarak kullanılmaktadır.

S. virgata Jacq. : Yılcık olarakta bilinir (Baytop 1994) Yapraklar haricen yara iyileştirici olarak kullanılır" (Baytop 1999). Ayrıca Bursa ve Balıkesir yöresinde dekoksiyonu halinde kan kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (G. Tümen ve H. Malyer ile sözlü görüşme).

Salvia'ların en önemli etken maddelerini terpenoitler, uçucu yağlar ve polifenoller oluşturmaktadır (Kintzios 2000). *Salvia* sulu ekstralarının ana bileşenlerini polar fenolik asitler oluşturmaktadır. Bu fenolik asitlerden pek çoğunun *S. miltiorrhiza*, *S. chinensis* ve *S. yunnanensis* den izole edilip yapıları aydınlatılmıştır. *Salvia* türlerinde rastlanan fenolik asitlerin başlıcası kafeik asit türevlerinden olan rosmarinik asit olmakla beraber 4-Hidroksibenzoik asit (Weng ve Wang 2000), 3,4-di hidroksibenzoik asit (protokateşik asit), 3-metoksi-4- hidroksibenzoik asit (vanillik asit) (Lu ve Foo 2002) ve 2,4-dimetoksibenzoik asit (Topçu ve ark 1995), heksil 4-hidroksibenzoat ve 6,7-dihidroksikumarin (eskuletin) (Ulubelen

ve Tuzlacı 1990) ve 7-metoksikumarin (herniarin) (Lu ve Foo 2002) gibi fenolik asitlere de rastlanmaktadır.

Salvia türlerinde bulunan fenolik asitler kimyasal olarak gruplandırılırsa kafeik asit türevleri ve fenolik glikozitleri olmak üzere iki çeşittir. Kafeik asit türevleri de kendi içinde monomerler, dimerler, trimerler, tetramerler ve oligomerler olmak üzere 5'e ayrılmaktadır.

Kafeik asit monomerlerine, kafeik asit ile birlikte ferulik asit (Cuvelier ve ark 1994), isoferulik asit (Ai ve Li 1992), tartarik asit (Lu ve Foo 2002) ve klorojenik asit örnek olarak verilebilir.

Kafeik asit dimerlerinin en önemlisi rosmarinik asittir (Cuvelier ve ark 1994, Lu ve Foo 2002) ve bu bileşik *Salvia* türlerinde antioksidan etkiden sorumlu asıl bileşik olarak belirlenmiştir (Cuvelier ve ark 1994). Rosmarinik asit ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır; hücre kültürlerinde üretilme çalışmaları (Morimoto ve ark 1994), kimyasal sentezi (Lu ve Foo 2002), ratlarda biyolojik aktivitesi (Nakazawa ve Ohsawa 1998) gibi.

Kafeik asit trimerleri grubunda litospermik asitle beraber salvianolik asitlerin bir kısmına da rastlanır. Litospermik asitlerin metil esterlerinde yüksek oranda setbest radikal süpürücü etkiye rastlanmıştır bu etkinin askorbik asitten daha yüksek olduğu gösterilmiştir. (Kang ve ark 1997) benzer etkilerin bu grubun diğer önemli üyesi olan salvianolic asitlerden salvionelik asit A da bulunduğu belirtilmiştir (Lu ve Foo 2002).

Kafeik asit tetramerleri aynı zamanda rosmarinik asit dimerleri de olmaktadır. Salvianolik asit B, L, yunnaneic acid, ve sagerinik asitler bu grupta yer almaktadır. Bu asitlerden salvianolik asit B litospermik asit olarakta bilinmekte ve *Salvia* türlerinde potasyum, magnezyum, amonyum tuzları halinde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Salvianolik asit E'ye *Salvia* türlerinden sadece *S. miltiorrhiza*' da rastlanmıştır (Lu ve Foo 2002).

Kafeik asit oligomerleri sınıfında sadece yunnaneic asit A ve B bulunmaktadır (Lu ve Foo 2002).

Ayrıca *Salvia* türlerinde fenolik asitlerin glikozit formları da bulunmaktadır. En çok rastlanan fenolik asit glikozitleri rosmarinik asit-3-glikozit ile *cis*- ve *trans*-kumarik asitlerin oluşturduğu glikozitlerdir (Lu ve Foo 2002).

Salvia türlerinin içerdiği polifenollerle ilgili yapılan çalışmalar flavonoitleri, antosiyaninleri ve proantosiyanidinleri kapsamaktadır.

Flavonoitlere *Salvia* türlerinde oldukça sık rastlanmaktadır (Ulubelen ve Tuzlacı 1990). Flavonitler bitkide flavonlar, flavonoller ve glikozitleri halinde bulunmaktadır. 6-

hidroksi flavonoller bu cins için taksonomik önem taşırlar ve *Salvia* türleri için karakteristiktir (Thomas-Barborean ve Wollenveber 1990).

Flavonoitlerin çoğunluğunu luteolin ve apigenin flavonolleri ve bunların 6-hidroksi türevleri oluştururlar. *Salvia*'ların yapraklarında flavonollerin metil esterlerine de sıklıkla rastlanmaktadır. *S. yosgadensis* de diğer *Salvia* türlerinden farklı olarak apigeninin-4-metil eter (acacetin) (Topcu ve ark 1996) ve luteolin-3-metil eter (chrysoeriol) ile 4-metil eter (diosmetin)'e de rastlanmaktadır (Topcu ve ark 1995). 6-hidroksi-apigenin (scutellarein) sadece *Salvia* ekstrelerinde bulunmaktadır. 6-hidroksi-apigenin-6,7-dimetileter (cirsimaritin)'nin yüksek orandaki antimikrobiyal etkisi, hispidulin'in ise antihepatotoksik etkileri bilinmektedir (Adzet ve ark 1988, Lu ve Foo 2002, Santos-Gomez ve ark 2002).

Salvia'larda bulunan flavonollerin çoğunluğunu kamferol ve kersetin flavonolleri oluşturur. Bu flavonollerden kersetine sadece *S. dorrii*'de rastlanmıştır (Lu ve Foo 2002).

Flavon glikozitleri *Salvia*'larda sıklıkla bulunan glikozitlerdir ve apigenin-7-glikozit ve luteolin-7-glikozit bu glikozitlerin başlıcasını oluşturmaktadır. Apigenin ve luteolin glikozitleri de kendi içlerinde karşılaştırılacak olursa luteolin glikozitlerinin *Salvia* türlerinde rastlanma oranı apigenin glikozitlerinden daha fazladır. Flavon ve flavonol aglikonlarında olduğu gibi burada da 6-hidroksi-flavon glikozitleri *Salvia* türleri için karakteristik bir önem taşımaktadır (Lu ve Foo 2001, 2002).

Antosiyaninlere *Salvia* çiçeklerinde bol miktarda rastlanır (Lu ve Foo 2002). *Salvia*'ların antosiyaninleri ilk olarak Willstater ve Bolton tarafından 1916 yılında incelenmiş ve salvianin pigmenti izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu pigmentin yapısı ile ilgili araştırmalar tekrar edilmiş ve yapısı kesin olarak belirlenmiştir. *Salvia*'larda yapılan araştırmalar çiçeklerde bulunan kırmızı ve pembe renklerden pelargonidin, mavi renklerden delphinidin, menekşe ve ara renklerinden ise siyanidin antosiyaninlerinin sorumlu olduğunu göstermiştir (Lu ve Foo 2002).

Proantosiyanidinler kondanse tanenler olarak da bilinmektedir ve *Salvia*'larda salvitanin olarak adlandırılmışlardır. *Salvia* preparatlarında tanen bulunması istenmez bu yüzden poliamid kolon kullanarak veya jel filtrasyon teknikleri ile ortamdan uzaklaştırılmalıdır. *Salvia*'larda salvitaninler olarak adlandırılan tanenlerin olduğu bilinmesine rağmen bu maddeler üzerinde çok fazla çalışma yapılmamış ve yapıları tam olarak aydınlatılmamıştır (Lu ve Foo 2002).

Ülkemizde yetişen *Salvia* türleri ile pek çok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar genellikle terpenoit bileşiklerin izolasyonu ve uçucu yağ çalışmalarıdır.

Antimikrobiyal ve antiviral etki

Salvia türleri ile yapılan antimikrobiyal çalışmalardaki sonuçlar, kullanılan *Salvia* türüne, kullanılan mikroorganizmanın hassasiyetine ve test edilen bileşiğin türüne göre farklılıklar göstermektedir. *S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. triloba* gibi uçucu yağ oranı yüksek *Salvia* türlerinde, uçucu yağlarında bulunan monoterpenlere bağlı olarak yüksek oranda antibakteriyel etkiler görülmektedir (Baricevic ve Bartol 2000, Delamare ve ark 2007). Gram-pozitif bakterilerde bu yağlara karşı direnç, gram-negatif bakterilerden daha fazla olmuştur. *Salvia* uçucu yağlarının ağız içi florasında bulunan *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Protonema denticola* gibi bakterilere karşı etkili olduğu gözlenmiştir. *Bacillus subtilis* gibi bazı bakterilere karşı uçucu yağın etki gösterebilmesi için bileşimindeki 1,8-sineol, *p*-simen, kamfor gibi maddelerin yüksek oranlarda bulunması gerekmektedir (Baricevic ve Bartol 2000). *Salvia stenophylla*, *Salvia repens* ve *Salvia runcinata* ekstrelerinde antimikrobiyal etkiye rastlanırken uçucu yağlarında bu etki zayıf olarak bulunmuştur (Kamatou ve ark 2005). *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) ve *Salvia multicaulis* (Vahl) ekstreleri ve uçucu yağları üzerinde yapılan araştırmalarda sonuç tam tersi olarak gözlenmiş bu bitkilerin ekstreleri antibakteriyel aktivite göstermezken uçucu yağlarında bu etkiye rastlanmıştır (Tepe ve ark 2004). Benzer sonuçlar *Salvia tomentosa* içinde geçerlidir (Tepe ve ark 2005).

Salvia officinalis, *S. tomentosa* ve *S. triloba* uçucu yağları ile Brezilyalı bilim adamlarının yaptığı çalışmalar da yukarıda bahsedilen etkileri doğrulamaktadır. 1,8-sineol'ce zengin bu iki yağda da *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophilla*, *Aeromonas sobria*, *Klebsiella oxytoca* bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermiştir (Haznedaroğlu ve ark 2001, Delamare ve ark 2007).

Salvia türlerinden elde edilen uçucu yağlarla yapılan antifungal aktivite çalışmalarında çeşitli funguslara karşı değişik sonuçlar alınmıştır. *Salvia triloba* ve *Salvia lavandulifolia* uçucu yağlarının *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans*, ve *Fusarium* türü funguslara karşı aktivitesi denenmiş ve etkili olmadıkları gözlenmiştir. Buna karşılık aynı uçucu yağların *Alternaria alternata* ve *Aspergillus parasiticus*'a karşı güçlü fungustatik etkileri olduğu görülmüş ve aynı bitkilerden elde edilen ekstreler ile yapılan çalışmalarda uçucu yağın gösterdiği yüksek orandaki antifungal etkiye ekstrelerde rastlanmamıştır (Baricevic ve Bartol 2000).

Salvia plebeia uçucu yağında da antifungal etkilere rastlanmıştır (Baricevic ve Bartol 2000).

Bazı *Salvia* türlerinde uçucu yağlar antimikrobiyal etkiler göstermezken bitkiden elde edilen ekstrelerde antimikrobiyal etkilere rastlanmıştır. *S. apiana* uçucu yağı, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* gibi bakterilere ve *Candida albicans* gibi funguslara karşı etki göstermezken aynı bitkinin diterpen asit fraksiyonu bu mikroorganizmalara karşı etkili olmuştur (Baricevic ve Bartol 2000).

S. officinalis metanol ekstresi ile yapılan çalışma sonuçlarına göre ise gram-pozitif bakterilere karşı aktif bulunurken gram-negatif bakterilere karşı aktif olmadığı görülmüştür (Baricevic ve Bartol 2000).

S. palaestina'dan elde edilen sirsimaritin adlı flavonoiti gram-pozitif ve negatif bakterilere karşı yüksek oranda aktivite göstermiştir (Baricevic ve Bartol 2000).

S. triloba uçucu yağının ve *S. officinalis* sulu ve alkollü ekstrelerinin HSV (*Herpes simplex* virus tip 1) e karşı antiviral etkileri bulunduğu belirlenmiştir (Baricevic ve Bartol 2000).

S. officinalis'ten elde edilen kafeik asit dimerlerinin HIV-1 virüsüne karşı yüksek oranda antiviral etkiler göstermiştir (Bailly ve ark 2005). *Salvia* Türlerinin ana bileşiklerinden olan rosmarinik asitte yüksek oranda antiviral etkiler göstermektedir (Petersena ve Simmonds 2003, Pereira ve ark 2005).

Antioksidan, antiinflamatuvar ve sitotoksik etki

Hücrel membranlar doymamış yağ asitlerince zengindir bu durum bu membranları oksidatif saldırılara açık hale getirmektedir. *Salvia*'ların yapısında bulunan karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asitin antioksidan etkilere sahip olmasına rağmen ursolik ve oleanolik asitin bu etkiyi göstermediği bilinmektedir (Lima ve ark 2004, Baricevic ve Bartol 2000). *S. miltiorrhiza* su ekstrelerinin ana bileşeni olan danshensu ve salvionolik asitin'in yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Ding ve ark 2005). Rosmarinic asitin de antioksidan aktivitesi bildirilmiştir (Petersena ve Simmonds 2003, Pereira ve ark 2005). *Salvia* türlerinin antioksidan aktivite çalışmaları ile bölümümüzde de çalışma yapılmış *S. chrysophylla*, *S. cilicica*, *S. halophila*, *S. fruticosa*, *S. cryphanta*, *S. sclarea*, *S. palaestina* antioksidan aktiviteleri bakımından pozitif kontrol olan BHT ile karşılaştırılmıştır ve *S. chrysophylla* serbest radikal süpürücü etkisi bakımından BHT den yüksek çıkmıştır (Bozan ve ark 2002). Benzer bir çalışmada *S. fruticosa* ekstreleri antioksidan etkileri bakımından incelenmiş, YBSK analizleri sonucunda karnosik asit, karnosol, rosmanol, kafeik asit, bileşenleri bulunmuş ve bu bileşikler antioksidan etkiden sorumlu olarak gösterilmişlerdir (Matsingou ve ark 2003). *S. officinalis*'in apolar ekstrelerinde polar ekstrelerine oranla daha

yüksek antioksidan aktiviteye rastlanmıştır (Miura ve ark 2002). Ayrıca antioksidan etkisinden yapısında bulunan kafeik asit, rosmarinik asit, karnosik asitin sorumlu olduğu belirtilmiştir (Bors ve ark 2004, Santos-Gomes ve ark 2002). Aynı bitkinin yüksek oranda antioksidan etkiye sahip olması sebebiyle yapılan bazı antioksidan aktivite çalışmaların da pozitif kontrol olarak kullanılmış ve diğer bitkilerden elde edilen sonuçlar *S. officinalis* ile karşılaştırılmıştır (Milioukas ve ark 2004). Bölümümüz de yapılan bir çalışmada *S. officinalis*'in bu yüksek orandaki antioksidan etkisini doğrulamaktadır (Koşar ve ark 2005). *Salvia* türleri ve antioksidan aktivite denilince akla gelen ilk tür, Çin'de geleneksel olarak kullanılan 700 bitkinin içinde yer alan ve antioksidan etkisinin çok yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile de kanıtlanan *S. plebeia*'dır (Gu ve Weng 2001). Bitki çinde "Lizhicao" olarak bilinir ve bitkinin antioksidan özelliklerinden β -sitosterol, 2-hidroksi-5-metoksi brokhonin ve koniferil aldehitin sorumlu olduğu gösterilmiştir (Weng ve Wang 2000). Bitki ile en son yapılan çalışma yağ asitlerinin oksidasyonunu önlemeye yönelik olmuştur ve bitkiden izole edilen 6-metoksi-luteolin-7-glikozit'in yağ asitlerinin bozulmasını yüksek konsantrasyonlarda - tokoferolden daha iyi engellediği görülmüştür (Ai-Li ve Chang-Hai 2006). Çin modern tıbbında preparatlarında kullanılan bir başka *Salvia* türünde *S. miltiorrhiza*'dır ve bu bitki de yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahiptir (Zhao ve ark 2006).

S. aethiopsis köklerinden elde edilen etiopin ile yapılan antiinflamatuvar etki araştırmalarında pozitif kontrol olarak kullanılan ve antiinflamatuvar olarak bilinen aspirin, ibuprofen, proksikam kadar etkili olduğu bulunmuştur. Aynı maddenin analjezik özellikleri de kayıtlıdır. *Salvia* türlerinin ana bileşenlerinden olan rosmarinik asitin de antiinflamatuvar aktivitesi bildirilmiştir. (Petersena ve Simmonds 2003)

S. canariensis'den elde edilen galdosol'ün tümör oluşumunu önleyici etkileri bulunmuş fakat aynı maddenin yüksek oranda sitotoksik olduğu bildirilmiştir. (Baricevic ve Bartol 2000)

S. miltiorrhiza ekstrelerinin X-ışını radyasyonundan koruyucu etkileri bildirilmiş ve bu bitkiden elde edilen tanşinone adlı maddelerin insan tümör hücrelerini yok ettiği buna karşılık bazı sitotoksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Baricevic ve Bartol 2000).

S. przewalskii var. *mandarinorum*'dan elde edilen pirzavakinon adlı bileşiğin de akciğer kanseri oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Baricevic ve Bartol 2000).

Hepatoprotektif etki

S. miltiorrhiza metanol ekstresi ve aynı bitkinin köklerinden elde edilen su ekstresinin hepatoprotektif etkileri olduğu ve bu etkinin salvionik asit A'dan ileri geldiği, ayrıca

Salvia'larda bulunan litospermik asit B'den türeyen litospermat B'nin de benzer etkileri olduğu bildirilmiştir (Baricevic ve Bartol 2000, Lin ve ark 2006). *S. plebeia* da Taiwan'da geleneksel olarak hepatit tedavisinde kullanılmaktadır (Baricevic ve Bartol 2000).

Toksikite çalışmaları

Salvia türleri ister inhalasyon yoluyla kullanılsın ister dahilen alınsın yüksek dozlarda merkezi sinir sistemi üzerine olumsuz etkiler yapabilir. *Salvia* cinsinin bu özellikleri yüzyıllardır bilinmektedir. Son yıllarda araştırmalar halüsinojenik etkileri olan *S. divinorium* üzerine yoğunlaşmıştır (Ruiz ve ark 2006). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda 0.3 g/kg dozda uçucu yağ verilen hayvanlarda olumsuz etkiler görülmezken, doz 0.5 g/kg'a çıkartıldığında merkezi sinir sisteminde olumsuzluklar görülmeye başlanmış verilen doz 1.25 g/kg'a çıkartıldığında ise ölümcül olmuştur. Uçucu yağın bu toksik etkisi tuyon, kamfor gibi keton türevi terpenoitlerinden ileri gelmektedir. Bu nedenle uçucu yağların dahilen alınmaması tavsiye edilmektedir. *S. lavandulifolia*'nın içeriğinde yüksek miktarda bulunan sabinil asetatdan dolayı hamilelerde çocuk düşürücü etkileri olabilmektedir. Bu nedenle *Salvia* cinsi preparatları ve ham drog hamilelikte dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır (Baricevic ve Bartol 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışmalarımızda Uludağ kampus alanından (Bursa) toplanan *Salvia virgata* bitkisinin toprak üstü kısımları kullanılacaktır. Uygulanacak deneysel çalışmalar aşağıda sıralanmıştır:

3.1. Ekstrelerin hazırlanışı

Kurutulmuş topraküstü kısımları kaba toz edildikten sonra oda sıcaklığında çalkalayıcıda %70 metanol kullanılarak ekstre edilecektir. Ayrıca bitkiden %5'lik dekoksion hazırlanacaktır. Elde edilen ekstreler yoğunlaştırılıp analiz anına kadar -18 °C'de saklanacaktır.

3.2. Toplam fenol miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenoller gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi (Singleton ve ark 1999) kullanılarak hesaplanacaktır. 6 mL distile su içeren 10 mL ölçekli kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilecektir. 1 dakika sonra 1.5 mL %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlanacaktır. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanılacaktır. 2 saat 25 °C'de inkübe edildikten sonra absorpsiyon 760 nm'de ölçülerek gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılacaktır. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplanacaktır. Üç paralel deney yapılarak sonuçlar ortalama değerler olarak verilecektir.

3.3. Toplam flavonoit miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları rutine eşdeğer olarak (RE) mg_{RE}/g_{ekstre} olarak hesaplanacaktır (Miliauskas ve ark 2004). 1 mL metanolde hazırlanmış ekstre (10 g/L), 1 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/L) ile karıştırılıp ve 25 mL ye etanol ile seyreltilenektir. Çözeltilerin absorpsiyonları 20 °C de 40 dakika bekletildikten sonra 415 nm de ölçülecektir. Şahit çözelti 1 mL ekstre ve 1 mL asetik asitin 25 mL etanolik çözeltisi olarak hazırlanacaktır. Rutinin kalibrasyon eğrisi etanolde çözülerek aynı şekilde hazırlanacaktır. Bütün ölçümler dört paralel olarak alınıp ve ortalama sonuçlar kullanılacaktır.

3.4. Toplam flavonol miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonol miktarları rutine eşdeğer olarak (RE) mg_{RE}/g_{ekstre} olarak hesaplanacaktır (Miliauskas ve ark 2004). Rutinin kalibrasyon eğrisi 0.5-

0.015 mg/mL konsantrasyonlardaki etanolik rutin çözeltilerinin 2 mL sinin 2 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/L) ve 6 mL sodyum asetat (50 g/L) ile karıştırılması ile hazırlanacaktır. Çözeltilerin absorbanları 20 °C de 2.5 saat bekletildikten sonra 440 nm de ölçülecektir. Aynı işlemler rutin yerine 2 mL ekstre (10 g/L) ile yapılacaktır. Bütün ölçümler dört paralel olarak alınıp ortalama sonuçlar kullanılacaktır.

3.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile fenolik bileşiklerin analizi

YBSK çalışma şartları:

- Cihaz : Agilent sıvı kromatografisi sistemi
Dedektör : PDA dedektör (200-500 nm arası)
Kolon : C18 analitik kolon (250 x 4.6 mm, 5 µm partikül çapı)
Sıcaklık : 22 C
Akım hızı : 1 mL/dak
Hareketli faz : A) metanol/su/asetik asit (10:88:2, h/h/h)
B) metanol/su/asetik asit (90:8:2, h/h/h)
C) metanol

Gradient akış :

zaman (dak)	hareketli faz A (%)	hareketli faz B (%)	hareketli faz C (%)
0	15	85	0
15	30	70	0
18	40	60	0
30	40	60	0
35	0	100	0
37	0	85	15
48	0	70	30
50	15	85	0

YBSK da ayrılan bileşiklerin tutunma zamanları ve UV spektrumları standartlarla karşılaştırılarak tanımlanacaktır. Bütün standart ve örnek çözeltiler üçer kere analiz edilerek ortalama değerler verilecektir.

3.6. İndirgeme gücünün belirlenmesi

Ekstrelerin demir(III)' ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu 1986 yöntemine göre yapılacaktır. 1 mL ekstre çözeltisi 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 mL %1 lik potasyum heksasiyanoferrat çözeltisi ile karıştırılacaktır. 50 C de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10 luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edilecek ve karışım 10 dakika santrifüj

edilecektir. Son olarak, 2.5 mL üst kısım 2.5 mL su ve 0.5 mL %0.1 lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm de absorbansları okunacaktır. Ekstrelerin indirgeme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verilecektir (Dorman ve ark 2003). Büyük AscAE değeri zengin indirgeme kapasitesini göstermektedir. Tüm analizler dört paralel olarak yapıp ortalama değerler olarak verilecektir.

3.7. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki tayini

Ekstrelerin DPPH[•] radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın metoduna 1999 göre yapılacaktır. Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) içerisinde hazırlanmış 50 µL ekstre çözeltisi 450 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) ve 1 mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH[•]) ile karıştırılacaktır. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontroller (BHT, askorbik asit) kullanılacaktır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm de okunacaktır. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanacaktır. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 version 7.0, SPSS Inc., Chicago, IL) hesaplanacaktır. Değerler dört paralel deneyin ortalaması olarak verilecektir.

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

3.8. 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS^{+•}) radikalinin süpürücü etki tayini

Ekstrelerin ABTS^{+•} radikalini süpürücü etkileri Re ve ark.'nın metoduna 1998 göre yapılacaktır. ABTS^{+•} radikali (7 mM) ABTS'in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2.45 mM, son konsantrasyon)'nun karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana gelir ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm de 0.700 (±0.030) olacak şekilde ayarlanır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (1.485µL) ile ekstre çözeltileri (15 µL) karıştırılacak ve 734 nm de 1 dakikalık aralıklarla 15 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçülecektir. Konsantrasyona karşılık ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplanacaktır.

3.9. Askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu

Ekstrelerin hidroksil radikalini süpürücü etkileri Aruoma ve ark. yöntemine (1997) göre yapılacaktır. Sığır beyin ekstresi (Bovine brain extract, Folch type VII) 10 mM PBS (pH 7.4) ile karıştırılıp buz banyosu içerisinde şeffaf bir süspansiyon olana kadar (5 mg/mL

fosfolipid lipozomu) ultrasonik banyoda tutulacaktır. 0.2 mL lipozom, 0.5 mL PBS tamponu, 0.1 mL 1 mM FeCl₃ ve 0.1 mL ekstre çözeltisi karıştırılacaktır. Peroksidasyon reaksiyonu 0.1 ml 1 mm askorbat ilavesiyle hızlandırılacaktır. Karışım 37 °C de 60 dakika inkübe edilecektir. İnkübasyondan sonra öncelikle 50 µL %2'lik (a/h) butillenmiş hidroksi toluen (etanol içerisinde) daha sonra da 1 mL %2.8 (a/h) trikloroasetik asit ve 1 mL %1 (a/h) 2-tiyobarbitürik asit (TBA, 0.05 M NaOH içerisinde) ilave edilecektir. Karışım 100 °C de su banyosunda 20 dakika ısıtılacaktır. Reaksiyon sonucunda oluşan (TBA)₂-MDA kromojenleri 2 mL n-butanol ile ekstre edilerek butanol fazlarının absorbanansı 532 nm de okunacaktır. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanacaktır. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 version 7.0, SPSS Inc., Chicago, IL) hesaplanacaktır. Değerler dört paralel deneyin ortalaması olarak verilecektir.

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

3.10. β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi β-karoten soldurma deneyine göre yapılacaktır (Oomah ve Mazza 1996, Velioğlu ve ark 1998). Kısaca, 1 mL β-karoten (0.2 mg/ml kloroform içerisinde) içerisinde linoleik asit (40 mg) ve Tween 20 (400 mg) bulunan kap içerisine ilave edilecektir. Kloroform azot altında yoğunlaştırılacaktır. 50 ml distile su ilave edilecek ve hızla çalkalanacaktır. Kontrol, örnek ve standart konulmadan aynı prosedür ile hazırlanacaktır. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise β-karotensiz olarak hazırlanacaktır. Tüm numunelerin örnekleri 470 nm de spektrofotometrede ölçülecektir. Sonra örnekler termal otooksidasyon için 50 °C de 105 dakika su banyosunda bekletilecektir. β-Karoten'in solma derecesi 15 dakikalık periyotlarla örnek alınarak izlenecektir. Antioksidan aktivite sonucu üç deneyin ortalaması olarak verilecektir (Oomah ve Mazza 1996, Velioğlu ve ark 1998).

$$AA\% = [1 - (Ab^0_{\text{örnek}} - Abs^{105}_{\text{örnek}}) / (Ab^0_{\text{kontrol}} - Abs^{105}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

3.11. Demir(II) şelat (kelat) aktivite

Demir(II) iyonlarının ekstrelerle kelasyonu Carter (1971)'e göre yapılacaktır. İki yüz mikrolitre ekstre çözeltisi 100 µL 2.0 mM sulu FeCl₂ ve 900 µL metanol karıştırılır. Kontrol çözeltileri ya pozitif kontrolleri içerecek ya da ekstreleri içermeyecektir. Reaksiyon karışımının 5 dakikalık inkübasyonundan sonra reaksiyon 400 µL 5.0 mM ferrozin çözeltisi

ile hızlandırılacak ve 10 dakikalık bekleme süresinden sonra absorbands 562 nm de okunacaktır. Demir kelasyon aktivitesi kontrolün absorbandsı (A_k) ve örnek absorbandsı ($A_ö$) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanacak ve Na_2EDTA ya eşdeğer ($mg_{Na_2EDTA}/g_{örnek}$) verilecektir. Sonuçlar üç paralel deneyin ortalaması olarak verilecektir.

$$[(A_k - A_ö) / A_k] \times 100$$

3.12. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Antimikrobiyal etkinlik testlerinde *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida glabrata* RSKK 90018 (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu) mikroorganizmaları kullanıldı. Gentamisin ve flukonazol standartları ticari olarak temin edildi. Gentamisin ve flukonazol standart çözeltileri distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Bütün bakteri izolatları MHA plaklarda 37 °C de bir gece ve bütün *Candida* izolatları SDA plaklarda 35 °C de 24-48 saat inkübe edilerek hazırlandı. Organizmaların canlılığı ve saflığı en az iki pasaj alınarak kontrol edildi.

Ekstre ve standartların çözeltileri 1256, 625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.06, 19.5, 9.76 µg/mL konsantrasyonlarda MHB içerisinde dilüe edildi.

Bakteriyel testler Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S16 (CLSI 2006). Standartına uygun olarak yapıldı. Bakteri süspansiyonları 10^5 CFU/mL olarak hazırlandı ve 0.5 Mc Farland standart yoğunluğu kullanılarak seyreltildi (10^7 CFU/mL). Bakteri süspansiyonlarının 10^5 CFU/mL yoğunluktaki çözeltileri bileşiklerin iki kez dilüe edilmiş çözeltilerine ilave edildi. Bu şekilde dağıtıldıktan sonra her kuyucukta 10^4 CFU/mL bakteri bulunmaktadır. Kültürler 37 °C de inkübe edilerek 24 saat sonra MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri okundu. Deneyler 3 kere tekrar edilerek ortalama değerler kullanıldı.

Candida süspansiyonları SDA plaklarda 35 °C de 24-48 saat inkübe edilerek hazırlandı. Kültürler pH 7 deki L-glutamin tamponu ile hazırlanmış RPMI-1640 besiyeri kullanılarak CLSI M27-A standartına göre hazırlandı. Maya kültürleri 10^4 CFU/mL olarak hazırlandı ve 0.5 Mc Farland standart yoğunluğu kullanılarak seyreltildi (10^6 CFU/mL). Maya süspansiyonlarının 10^3 CFU/mL yoğunluktaki çözeltileri bileşiklerin iki kez dilüe edilmiş çözeltilerine ilave edildi. Bu şekilde dağıtıldıktan sonra her kuyucukta 10^4 CFU/mL bakteri

bulunmaktadır. Kùltürler 35 °C de inkùbe edilerek 48 saat sonra MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri okundu. Deneyler 3 kere tekrar edilerek ortalama değerler kullanıldı.

3.13. Sitotoksisite alışması

Bu alışmada “NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, USA” programından temin edilen Jurkat (Clone E6-1, ATTC, TIB-152) hùcreleri kullanılacaktır. alışmalar süresince bu hùcreler + 37°C’ de CO₂ 'li inkùbatörde delikli kapaklı hùcre kùltür kapları içinde tutulacak ve düzenli olarak takip edilip besi yerleri iki gün ara ile değiştirilerek kùltür sürdürülecektir. oęalan hùcrelerin bir kısmı dondurulup - 80°C’de muhafaza edilecektir.

Jurkat Hùcrelerinin Kùltüre Edilmesi

Ticari olarak satın alınan ve krio tüp içinde dondurulmuş olan jurkat hùcreleri - 80°C’den çıkarıldıktan sonra, + 37 °C’ de özölüp, hùcrenin üzerine 5 ml PBS ekleyerek 1600 rpm’de 5 dakika 20°C’de santrifüj edilecektir. Süpernatant atıldıktan sonra hùcre pelleti üzerine 5 ml kadar taze besi yeri ekleyip yavaşça pipetleyerek homojenize edilecek ve delikli hùcre kùltür kabına aktarılıp CO₂ 'li inkùbatöre kaldırılacaktır.

Çalışma süresince kullanılacak olan Jurkat hùcrelerinin devamının sağlanması ve canlılığının korunması için pasajlar yapılacaktır.

Jurkat Hùcrelerinin Pasajı

Flask içinde kùltüre edilecek hùcreler iki günlük inkübasyon süresinin sonunda, 15 ml’lik falkon tüplere aktarılacak ve 800g’de +20 C°’de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısım dikkatlice uzaklaştırılacaktır. Pelet penisilin içeren yaklaşık 5 ml Fosfat Buffer Saline (PBS, pH; 7,3) tamponu içinde hùcelere zarar vermeyecek şekilde özölüp aynı koşullarda tekrar santrifüj edilecektir. Süpernatant uzaklaştırdıktan sonra oluşan pellet önceden hazırlanmış besi yeri içinde çözölerek kùltür kabına aktarılacaktır.

Pasajlama işleminin iki gün arayla yapılma nedeni olası kontaminasyonlardan ve ölü hùcre kalıntılarının zararlı etkilerinden canlı hùcrelerin etkilenmesini önlemektir.

Hùcre Dondurma ve Saklama

Hùcreler besi yeri değiştirirken olduğu gibi santrifüj ve yıkama işlemlerine tabi tutulacak, son aşamada oluşan pellet krio çözeltisi içinde özölüp krio tüplerine birer ml olacak şekilde dağıtılacaktır. Hazırlanan krioların kademeli olarak donmalarını sağlamak için ilk olarak +4C°’de yarım saat, -20C°’de 3 saat bekletildikten sonra -80C°’ye kaldırılacaktır. Hùcre kùltürü besi yeri içeriği, PBS tamponu ve krio çözeltisi içeriği Tablo 1’de verilmiştir.

Fetal Bovine Sera'un İnaktivasyonu

Fetal Bovin Sera (FBS), besiyerinin en önemli protein kaynağıdır. İnaktivasyon işlemi ile ısıya duyarlı komplement proteinler denatüre edilir. Ayrıca 0.22 µm'lik filtreden geçirilmelerine rağmen mikoplazma gibi mikroorganizmalar hala ortamda mevcut olabilir. Isıyla gerçekleştirilen bu inaktivasyon prosesi sayesinde besiyeri kontaminasyon riski azaltılmış olur.

Tablo 3.13. : Hücre kültürü besi yeri içeriği, PBS tamponu ve krio çözeltisi içeriği

Hücre Kültürü Besiyeri İçeriği	PBS Tamponu, 1L (PH:7,4)	Krio Çözeltisi
RPMI-1640 (Sigma®) 2mM L-glutamin %1 penicillin/streptomisine %10 Inactivated Fetal Bovine Sera (FBS)	136 mM NaCl 2 mM KCL 8 mM Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O 1.5 mM KH ₂ PO ₄	% 10 DMSO (Dimetilsülfoksit) % 90 Inactivated Fetal Bovine Serum
+ 4C°	15-25 C°	- 20C°

İnaktivasyon işleminde -20C°'de muhafaza edilen FBS alınıp 37C°'lik su banyosuna konacak ve burada aralıklarla çalkalanarak erimesi sağlanacaktır. Tamamen eridikten sonra 15 dakika kadar yine aralıklı olarak karıştırılacak ve FBS'nin ısısının 37C°'ye gelmesi beklenip su banyosunun ısısı +56C°'ye çıkarılacaktır. 5 dakika su banyosunu ısısının +56C°'ye gelmesi beklenip ısı tamamen yükselince her 10 dakikada bir karıştırmak suretiyle yarım saat su banyosunda bekletilecek süre sonunda steril tüplere bölünüp ve -20⁰C'de saklanacaktır.

Trypan Mavisi Canlılık Testi (Sitotoksosite Testi)

Etkisi araştırılacak bitki ekstraları hücreler üzerine toksik etkili olup olmadığına göre incelenecektir. Bitki ekstresi için tek bir konsantrasyonda çift kontrollü olarak inhibitörler denenip etüvde 48 saat inkübe edilecek, inkübasyon sonrasında her bir kuyucuktaki canlı ve ölü hücre sayısı trypan mavisi ile boyama yapılarak Thoma lamında sayılacaktır. Bu test de her inhibitör için ayrı kuyucuğa on milyon hücre ve uygun konsantrasyon oranında ekstre konulup, kontrol hücre grubuna ekstre yerine aynı oranda steril distile su konulacaktır. Ölü hücreler mavi renkli boyanacaktır.

3.14. MDA, GSH-Px ve SOD aktivitelerinin ölçülmesi

Hazırlanan hücre kültürlerinde *in vivo* antioksidan etkinlik total antioksidan tayini, glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz aktivitesi ve TBARS düzeyleri ticari kitler aracılığı ile kit prosedürüne göre spektrofotometrik olarak ölçülmek suretiyle değerlendirilecektir.

4. BULGULAR

Salvia virgata toprak üstü kısımlarından %70 metanol ve su ekstreleri hazırlandı. Elde edilen ekstreler Vakum altında yoğunlaştırıldıktan sonra -18C de analiz edilene kadar bekletildi. Ekstreler için verimler Tablo 4.1.' de verilmiştir.

4.1. Toplam fenol, flavonoid ve flavonol miktar tayini

Ekstrelerin toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam flavonol miktarları deneysel kısımda verilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam fenol miktarları gallik asite, toplam flavonoid ve toplam flavonol miktarları ise rutine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1. da verilmiştir. Sulu metanol ekstresinin toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam flavonol içerikleri bakımından su ekstresine göre daha zengin olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.1. : *S. virgata* ekstrelerinin toplam fenol, flavonoid ve flavonol miktarları

Ekstre*	Verim [%]	Toplam Fenol ^a [mg _{GAE} /g _{ekstre}]	Toplam Flavonoid ^b [mg _{RE} /g _{ekstre}]	Toplam Flavonol ^c [mg _{RE} /g _{ekstre}]
SME	25.94	195.22 ± 0.25	62.20 ± 0.57	15.24 ± 1.12
SSE	24.99	120.14 ± 2.27	14.17 ± 0.83	9.62 ± 0.60

*(SME), %70 metanol ekstresi; (SSE), su ekstresi; ^a mg_{GAE}/g_{ekstre}; ^b mg_{RE}/g_{ekstre}; ^c mg_{RE}/g_{ekstre}

4.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile fenolik bileşiklerin analizi

Ekstrelerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) sistemi ile yapılan analizlerinde PDA dedektör kullanılmış ve miktar tayinleri benzoik asit türevleri için 280 nm'de, hidroksisinnamik asit türevleri için 320 nm'de ve flavonoidler için ise 360 nm'de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2. de verilmiştir.

Ekstreler içerisinde *p*-OH-benzoik asit, kafeik asit, *o*-kumarik asit, rosmarinik asit ve luteolin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. *p*-OH-Benzoik asit 280 nm de, kafeik asit, *o*-kumarik asit, rosmarinik asit 320 nm de ve luteolin 360 nm de analiz edilmişlerdir. Ekstrelerin içerisindeki tanımlanan bu bileşiklerin miktarları standart maddelerden hazırlanan

kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiştir. Maddelerin tanımlanmasında hem tutunma zamanları hem de UV spektrumları kullanılmıştır.

Tablo 4.2. : *S. virgata* ekstralarının YBSK sonuçları

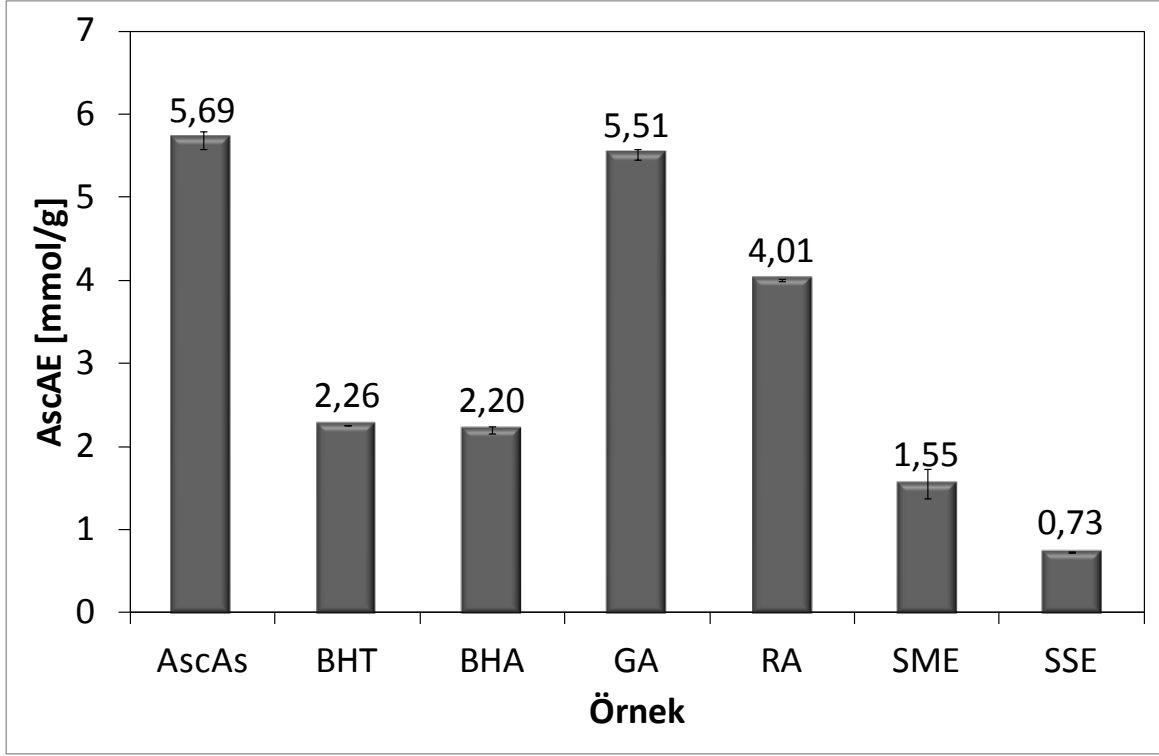
Bileşik	Ekstreler	
	SSE	SME
<i>p</i> -OH-benzoik asit	0.83 ± 0.013 ^{&}	0.69 ± 0.040
kaffeik asit	0.77 ± 0.001	0.97 ± 0.004
<i>o</i> -kumarik asit	0.90 ± 0.002	3.25 ± 0.240
rozmarinik asit	26.81 ± 0.047	66.94 ± 0.471
luteolin	0.22 ± 0.003	0.97 ± 0.031

*(SME), %70 metanol ekstresi; (SSE), su ekstresi; [&]mg/g, Ort ± SD

4.3. İndirgeme gücünün belirlenmesi

Maddelerin indirgeme güçleri ile antioksidan aktivite arasında genellikle doğrusal bir bağlantı vardır. Bu nedenle indirgeme kapasitesinin belirlenmesi o maddenin antioksidan aktivitesi hakkında bilgi verebilir. Bu amaçla *S. virgata* bitkisinden elde edilen ekstraların ve standartların demiri indirgeme kapasiteleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.3. de verilmiştir. Burada verilen sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

S. virgata'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen sulu metanol ve su ekstralarının hiçbirisinin demir(III) ü indirgeme gücü pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, gallik asit ve rosmarinik asit kadar yüksek bulunamamıştır (Şekil 4.3.). Sulu metanol ekstresinin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü istatistiksel olarak ($p < 0.05$) su ekstresinden daha yüksek olarak bulunmuştur.

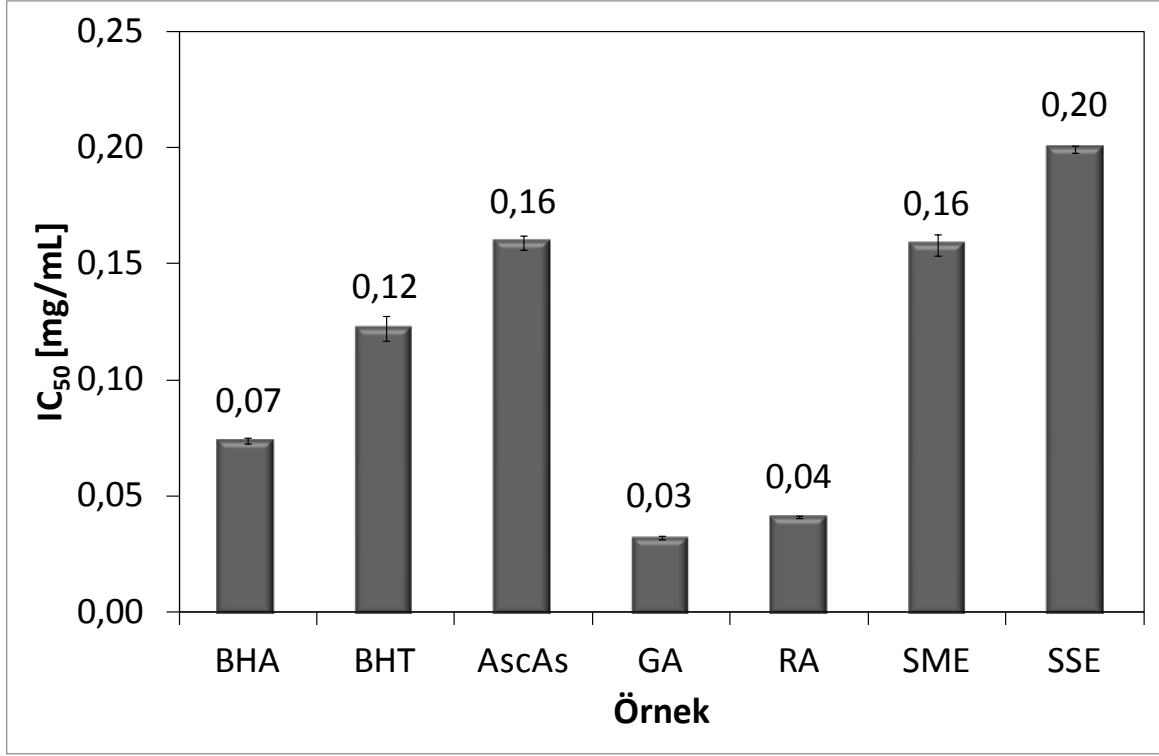


Şekil 4.3. : *S. virgata* ekstreleri ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü

4.4. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki tayini

Vücuttan zararlı ve hastalık yapıcı radikallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH[•] radikali kullanılmıştır. Bütün ekstreler DPPH[•] radikalini fizyolojik pH da konsantrasyona bağlı olarak süpürmüşlerdir. IC₅₀ değerleri, radikalın %50'sini süpürebilecek gerekli konsantrasyon olarak tanımlanır. Ekstrelerin IC₅₀ değerleri hazırlanan doğrusal olmayan eğriler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.4.'de verilmiştir.

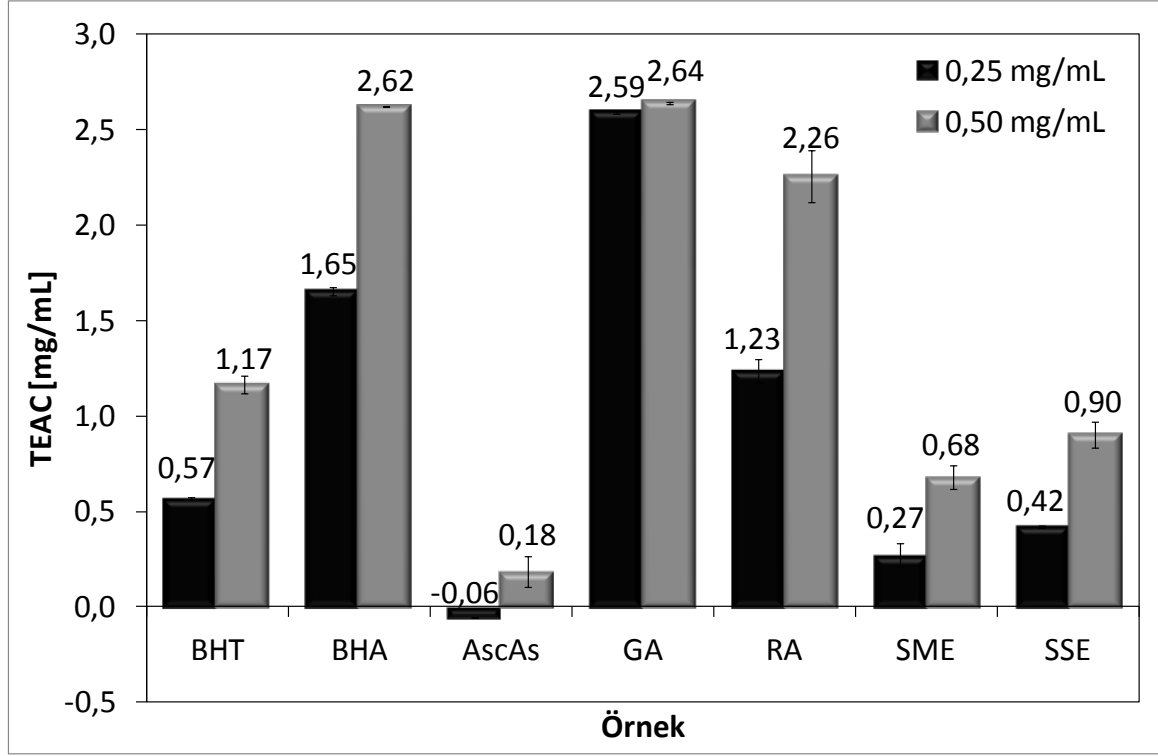
S. virgata ekstreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda her iki ekstrenin de fizyolojik pH da süpürücü etki gösterdikleri belirlenmiştir. Şekil 4.4.'e göre, *S. virgata* ekstrelerinden %70 metanol ekstresinin su ektresine göre daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, her iki ektre de pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, rosmarinik asit ve gallik asit kadar etkili bulunmamıştır.



Şekil 4.4. : *S. virgata* ekstreleri ve standartların DPPH• radikalini süpürücü aktiviteleri

4.5. 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS⁺) radikalinin süpürücü etki tayini

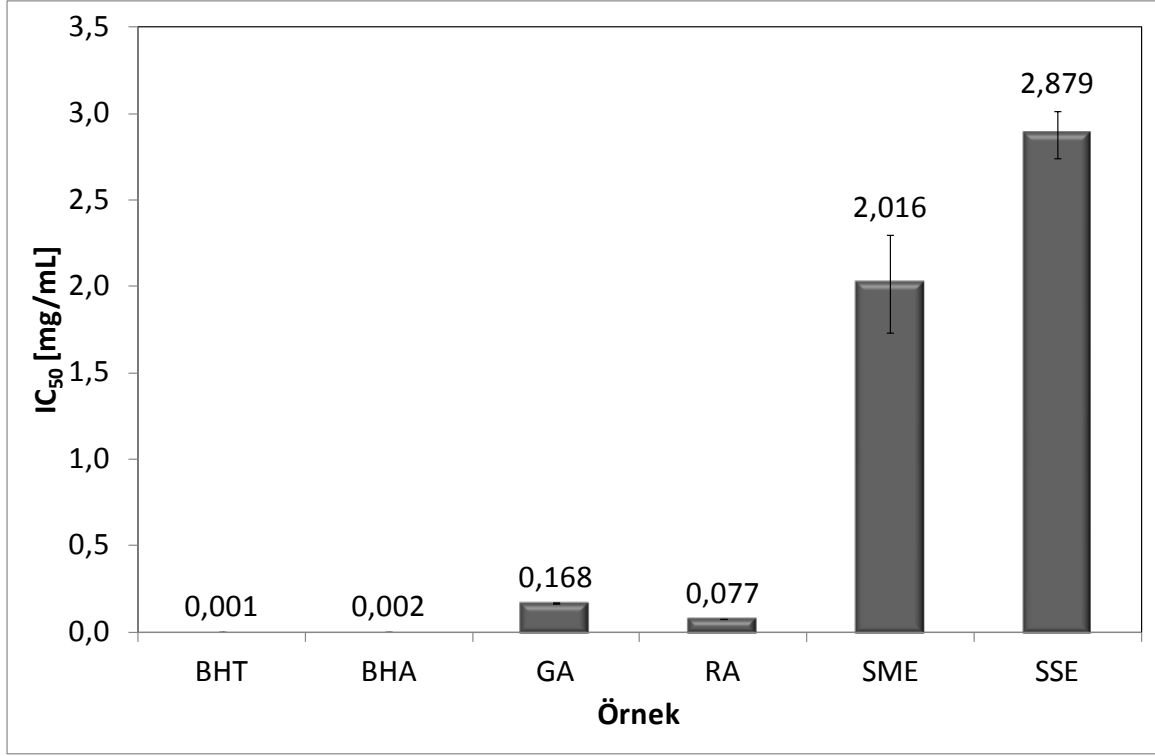
Serbest radikal süpürücü etki testlerinde genellikle DPPH• radikali kullanılmaktadır. Fakat bazen çözünürlük ve benzer spektral girişimler nedeniyle aynı radikal kullanılamamaktadır. Alternatif bir radikal olan ABTS⁺ azot merkezli oldukça stabil bir radikaldir. Bu nedenle ekstrelerin radikal süpürücü etkilerini onaylamak için ABTS radikal süpürücü etki testi de yapılmış ve sonuçlar Trolox'a eşdeğer olarak Şekil 4.5.' de verilmiştir. Ekstreler iki farklı dozda analiz edilmiştir. Şekil 4.5.'e göre su ektresinin metanol ekstrelerine göre daha aktif bulunmuştur. Tüm ekstre ve standartlarda etki konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde artış göstermiştir. Her iki ekstre de askorbik asitten daha aktif bulunmuştur.



Şekil 4.5. : *S. virgata* ekstreleri ve standartların ABTS⁺ radikalini süpürücü aktiviteleri

4.6. Askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu

Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin fosfolipitler biyolojik olarak önemli moleküllerdir ve hidroksil radikali kaynaklı bozulmaya açıktırlar. Ayrıca lipitlerin oksidatif bozulması yağlarca zengin ürünlerin acılaştırmasının da temelini oluşturur. Bu nedenle bu oksidatif hasarı engelleyici yeni doğal maddelerin bulunması önem kazanmıştır. Bovine-brain kaynaklı fosfolipit lipozomlarının askorbat-Fe(III)-katalizli hidroksil radikalli bozunmasında hidroksil radikalini süpürücü etki esasına göre fizyolojik pH da TBA-reaktif bileşiklerin formasyonunun inhibisyonu ölçülür. Şekil 4.6.' da görüldüğü gibi ekstreler kullanılan doğal ve sentetik standartlar kadar aktivite gösterememiştir. Metanol ekstresinin su ekstresine göre daha aktif olduğu bulunmuştur. Metanol ekstresinin ana bileşeni olan rosmarinik asit ise hidroksil radikallerini oldukça düşük konsantrasyonda (IC₅₀: 0,077 mg/mL) süpürmüş ve fosfolipitlerin bozunmasını engellemiştir.

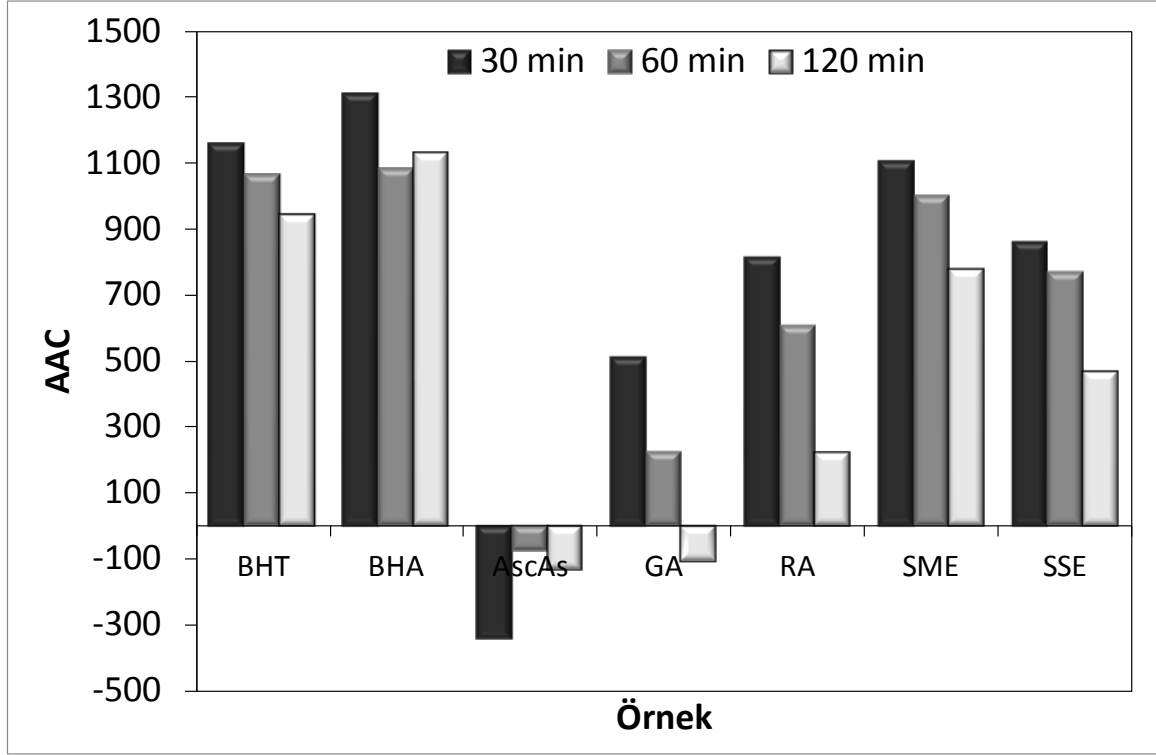


Şekil 4.6. : *S. virgata* ekstreleri ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu

4.7. β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini

Gıda lipitleri ve hücre membranları oksidatif ajanlarla kolaylıkla okside olabilen doymamış yağ asitleri, linoleik ve araşidonik asitleri içerirler. Bu nedenle doymamış yağ asitleri üzerinden yapılan oksidasyon deneyleri önem taşımaktadır. Beta-karoten/linoleik asit soldurma deneyi özellikle hücre duvarındaki ve gıdalardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun tanımlanmasında sıklıkla kullanılır. Bu çalışmada *S. virgata*'dan elde edilen metanol ve su ekstrelerinin β -karoten/linoleik asit soldurma deneyinde pozitif kontroller olan BHT, BHA ve askorbik asit ile ana bileşen olan rosmarinik asite karşı test edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.7.' de gösterilmiştir. Şekil 4.7.' de görüldüğü gibi en yüksek aktiviteyi BHA gösterirken askorbik asit ise prooksidan olarak etki etmiştir. Metanol ekstresi ise oksidasyonu hemen hemen BHT ile eşdeğer oranda engellemiş ve su ekstresinden daha fazla etki göstermiştir. Ana bileşen olan rosmarinik asit de oldukça yüksek oranda lipitlerin oksidasyonunu engellemiştir. Askorbik asitin prooksidan etkisi literatürde de belirtilmektedir. Apolar antioksidanlar lipit/hava ara yüzeyinde toplanırlar ve emülsiyonlarda su fazında bulunan askorbik asit gibi polar antioksidanlardan daha yüksek aktivite gösterirler

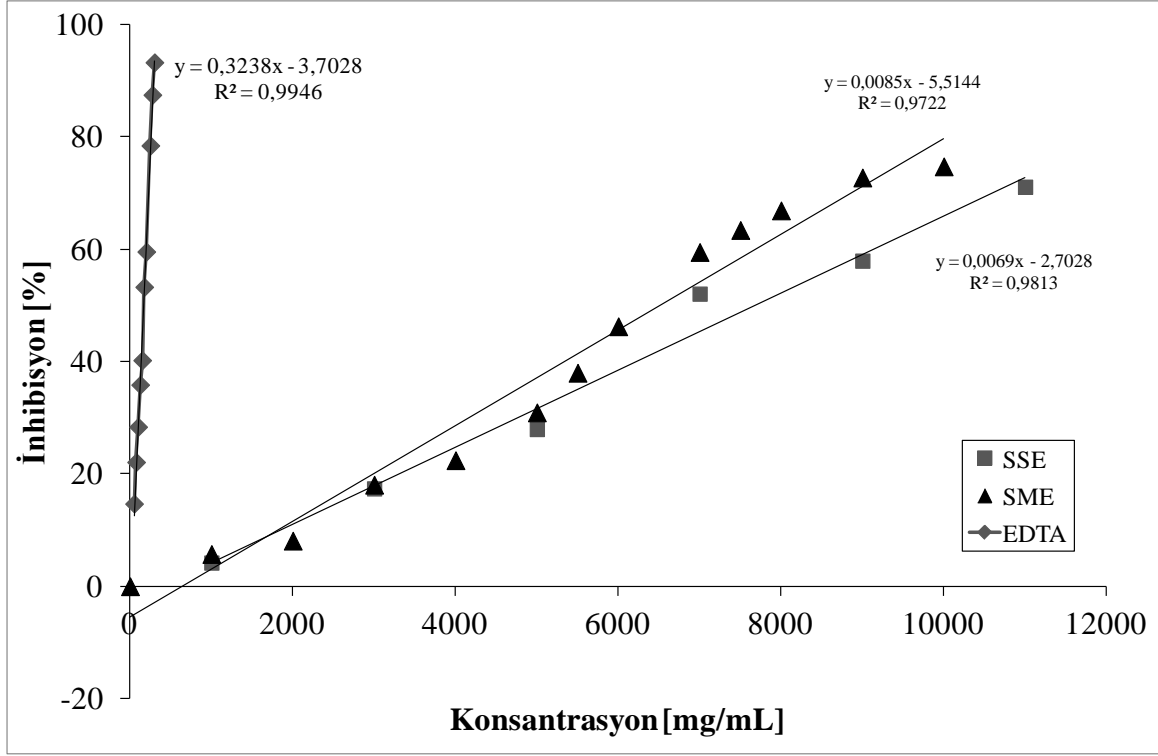
(Siddhuraju ve Becker 2003). Bu nedenle polar bileşik alan gallik asit daha apolar olan rosmarinik asite oranla daha az aktivite göstermiştir.



Şekil 4.7. : *S. virgata* ekstreleri ve standartların β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etkisi

4.8. Demir(II) şelat (kelat) aktivite

Gıdalar sık sık proses işlemleri sırasında geçiş özellikli metal kontaminasyonuna maruz kalırlar. İki değerlikli geçiş metal iyonları oksidatif prosesin katalizlenmesi, hidroksil radikallerinin formasyonu ve Fenton kimyası gibi hidroperoksit dekompozisyon reaksiyonları gibi önemli rol oynarlar (Halliwell, 1997). Bu prosesler demirin şelasyonu ve deaktivasyonu ile sonlandırılabilir. Bu nedenle, ekstrelerin demir(II) iyonlarının şelasyonuna etkileri incelendi ve Na_2EDTA ya eşdeğer olarak hesaplandı (mg Na_2EDTA /g ekstre). Sonuçlar Şekil 4.8.' de verilmiştir. Su ve metanol ekstreleri demir(II) iyonunun şelasyonu üzerine etki göstermişlerdir. Bu ekstreler içerisinde bulunan flavonoidler bu etkiden sorumlu bileşiklerdir. Flavonoidler yapılarındaki yan aromatik halka üzerindeki hidroksil grupları aracılığıyla demiri bağlayarak bu etkiyi göstermektedir. Her iki ekstre de EDTA kadar aktif bulunamamıştır.



Şekil 4.8. : *S. virgata* ekstreleri ve standartların demir(II) şelat aktivitesi

4.9. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Ekstrelerin antimikrobiyal etki deneyleri klinik olarak önemli patojenler olan *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *C. albicans* ve *C. glabrata* 'ya karşı yapılmıştır. Ekstreler 500 µg/mL konsantrasyonda uygulandıktan sonar elde edilen sonuçlar MİK (µg/mL) değerleri olarak Tablo 4.9.' da verilmiştir. Burada elde edilen sonuçlara göre su ekstresi hiçbir mikroorganizmaya karşı etki göstermezken alkol ekstresi ise sadece *S. aureus*'a karşı etkili olmuştur. Rozmarinik asit ise aynı dozlarda *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı orta derecede aktivite göstermiştir. Hiçbir ekstre ve standart madde *Candida* türlerine karşı aktif bulunmamıştır.

4.10. Sitotoksosite çalışması

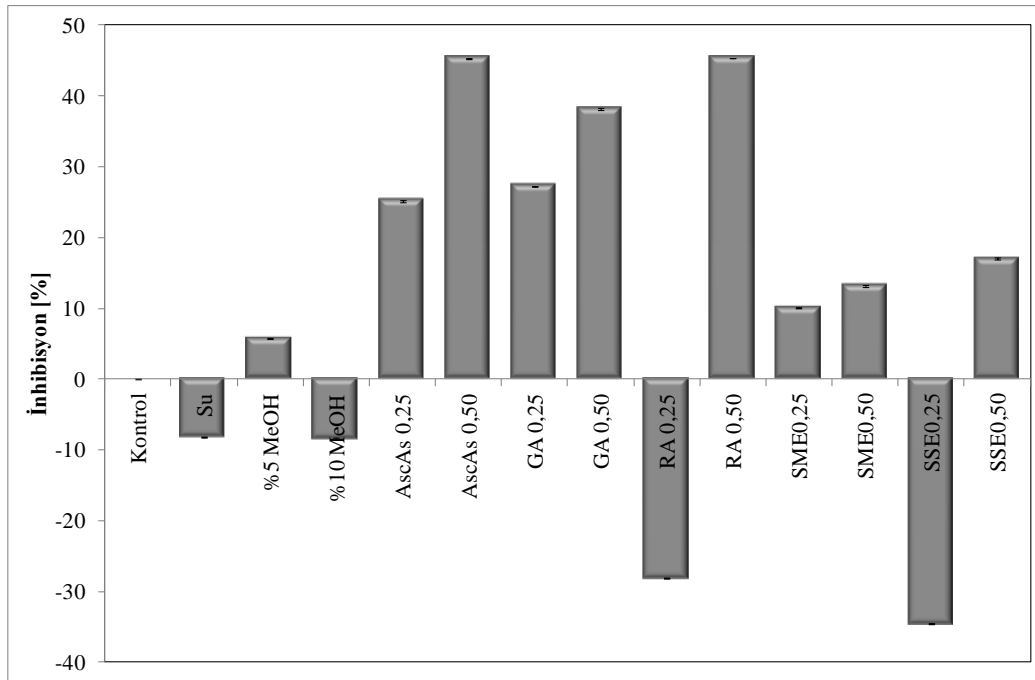
Sitotoksosite deneyleri ilaç endüstrisinde sıkça kullanılan deneylerdendir. Maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri hücre canlılığı deneyleri ile ölçülmektedir. Bu deneylerde ise hücre membranlarının farklı boylarla boyanması ile sayımlar yapılmaktadır. *S. virgata*'dan elde edilen su ve metanol ekstrelerinin sitotoksik özellikleri Jurkat (lösemi) hücrelerinde trypan mavisi canlılık deneyi kullanılarak ölçülmüştür. Bu deneyde pozitif

standartlar olarak hem sentetik hem de organik maddeler kullanılmıştır. Sonuçlar % inhibisyon olarak Şekil 4.10.' da gösterilmiştir. Ekstrelerin hücre canlılığı üzerine etkileri 0.25 ve 0.50 mg/mL dozlarda incelendiğinde metanol ekstralarının her iki dozda da etki gösterdiği, su ektresinin ise sadece yüksek dozda etkili olduğu belirlenmiştir. Su ektresi düşük dozlarda hücre canlılığının artmasına neden olmuştur. Su ektresi 0.50 mg/mL dozda diğer metanol ekstralarının daha yüksek aktivite göstermiştir. Standart maddelerden askorbik asit ve gallik asit her iki dozda da yüksek etki gösterirken ekstradaki ana bileşen olan rosmarinik asit ise yüksek dozda askorbik asite eşdeğer bir aktivite göstermiştir.

Tablo 4.9. : *Salvia virgata* ekstralarının antimikrobiyal etkileri

Mikroorganizma	MİK			
	SME	SSE	RA	GA
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	Nİ	Nİ	500	Nİ
<i>Escherichia coli</i>	Nİ	Nİ	Nİ	Nİ
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	Nİ	500	500
<i>Enterococcus faecalis</i>	Nİ	Nİ	500	500
<i>Candida albicans</i>	Nİ	Nİ	Nİ	Nİ
<i>Candida glabrata</i>	Nİ	Nİ	Nİ	Nİ

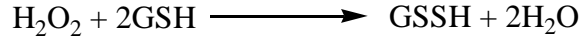
MİK, minimum inhibisyon konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$); Nİ, etki yok



Şekil 4.10. : *S. virgata* ekstralarının sitotoksik etkileri

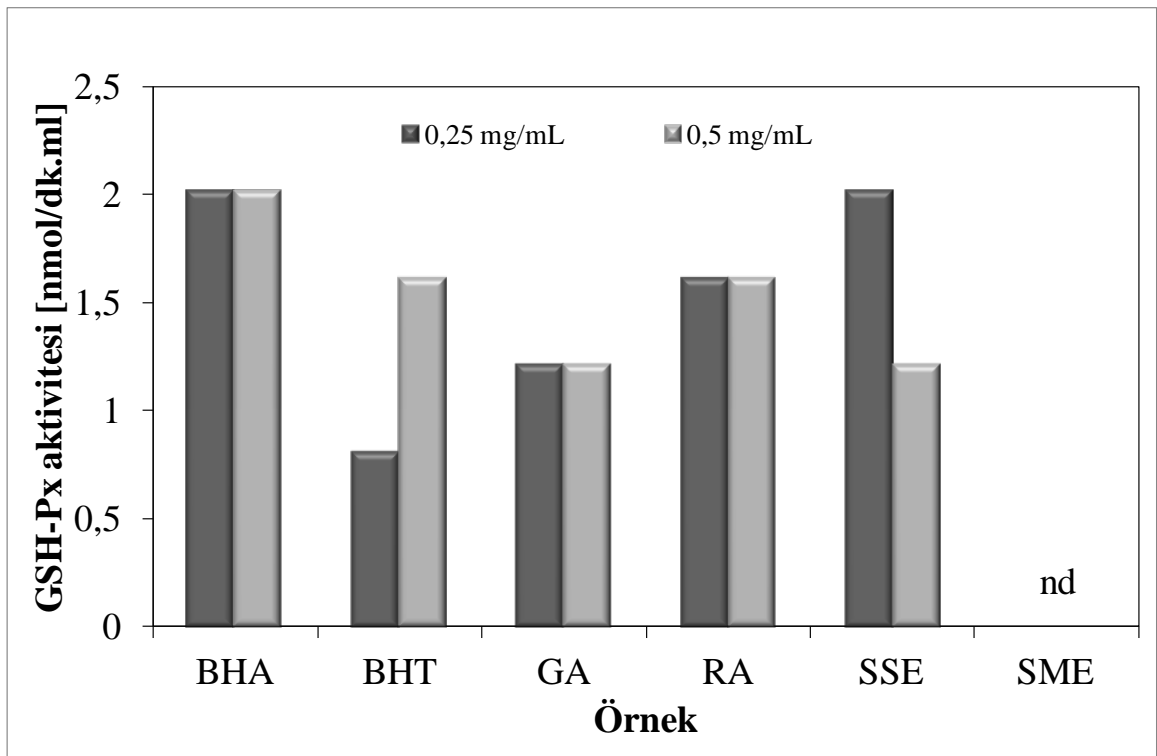
4.11. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi yapısında 4 selenyum atomu içeren, glutasyonun oksidasyonu ile hücre zarları için oksidatif etkili olan hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin suya ve alkollere indirgenmesini sağlayan, etkinliği için selenyuma ihtiyaç duyan, oksidoredüktaz sınıfından bir enzim.



Vücudun doğal antioksidan savunma mekanizması içerisinde yer alır. Bu enzimin aktivitesi selenyum, vitamin C ve E varlığında artar. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir. Lipitlerin ve dolayısıyla hücre zarının oksidasyonunun engellenmesi için önemli bir enzimdir (Göger 2006).

Salvia virgata ekstrelerinin Jurkat hücre serisi üzerinde GSH-Px enzim aktivitesi zaman karşı olarak 0.25 ve 0.50 mg/mL konsantrasyonlarda test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11.' de verilmiştir. Büyük değer yüksek aktiviteyi ifade etmektedir. Şekil 4.11.'e göre en yüksek aktiviteyi su ekstresi ve rozmarinik asit göstermiştir. Metanol ekstresi aktivite göstermemiştir.



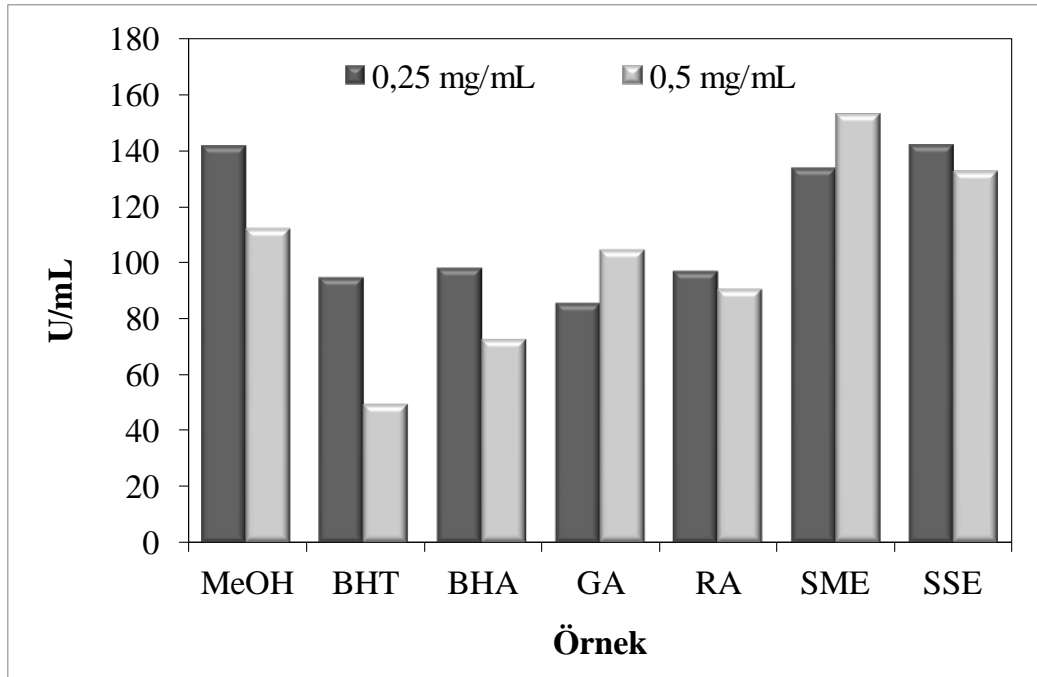
Şekil 4.11. : *S. virgata* ekstrelerinin GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.12. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi

Hücre membranlarında ve DNA üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak hasar yapan süperoksit anyon radikalının aerobik organizmalarda ortamdan uzaklaştırılmasının hayati önemi vardır. Süperoksit anyon radikalının organizmadan uzaklaştırılması işleminden sorumlu olan süperoksit dismutaz enzimidir. Süperoksit dismutaz enziminin 3 farklı tipi vardır: metal içeren süperoksit dismutaz enzimi (Fe-SOD), manganez içeren süperoksit dismutaz enzimi (Mn-SOD), bakır/çinko içeren süperoksit dismutaz enzimi (Cu,Zn-SOD) (Cheng ve ark 2006). Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit radikaline dönüştürerek etkisiz hale getirir (Bachmayer 2004).



Salvia virgata ekstrelerinin Jurkat hücre serisi üzerinde Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi 0.25 ve 0.50 mg/mL konsantrasyonlarda test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12’ de verilmiştir. Büyük değer yüksek aktiviteyi ifade etmektedir. Şekil 4.12’ ye göre her iki ekstre de yakın aktivite göstermiştir. Fakat metanol ekstresinde aktivite konsantrasyona bağlı olarak artarken, su ekstresinde azalmıştır. Gallik ve rozmarinik asit ektrelerden daha az aktif olarak bulunmuştur.



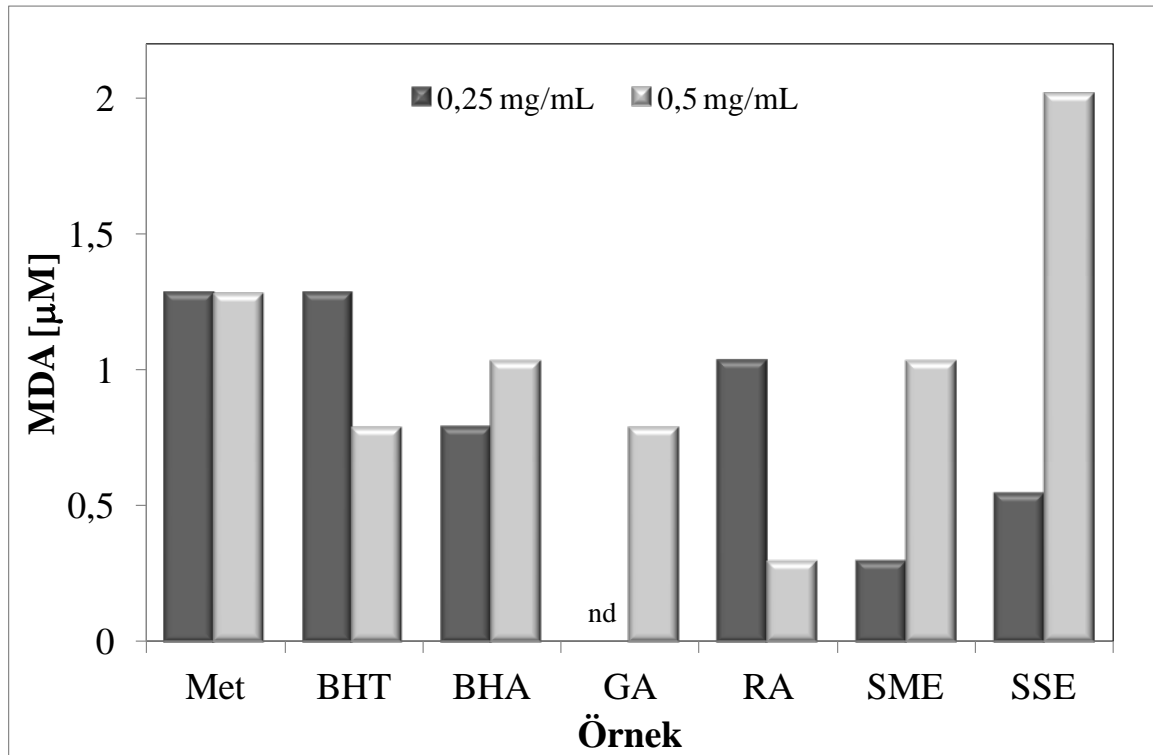
Şekil 4.12. : *S. virgata* ekstrelerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.13. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

Reaktif oksijen türleri (ROS) çoklu doymamış yağları degrade ederek malondialdehit (MDA) oluşmasına sebep olurlar. MDA reaktif bir aldehittir ve hücrelerde toksik strese neden olur. Bu nedenle bir aldehit olan MDA, organizmada oksidatif stresin düzeyinin belirlenmesinde bir biomarker olarak görev yapar.

MDA düzeyi tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile ölçülür. Bu reaksiyon sonucunda MDA ve tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri (TBARS) birlikte cevap verir. Bu bileşiklerin TBA ile verdikleri reaksiyon sonucu oluşan kırmızı rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenir (Göger 2006).

Salvia virgata ekstrelerinin Jurkat hücrelerinde oksidatif streşi nasıl etkilediği MDA düzeyinin ölçülmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen MDA miktarları Şekil 4.13.' de verilmiştir. Hem metanol hem de su ekstreleri düşük dozda (0.25 mg/mL) yüksek dozda (0.5 mg/mL) oranla daha aktif bulunmuştur. Su ekstresi 0.5 mg/mL dozda oksidatif streşi artırmış ve buna bağlı olarak MDA düzeyini yükseltmiştir. Rozmarinik asit ise 0.5 mg/mL dozda oksidatif streşi oldukça yüksek oranda azaltmıştır.



Şekil 4.13. : *S. virgata* ekstrelerinin MDA düzeyi üzerine etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Salvia Lamiaceae familyasının en yaygın cinslerinden birisidir ve pekçok ülkenin farmakopesinde yer almaktadır. Literatürde *Salvia* türleri ile yapılmış çok sayıda kimyasal ve aktivite çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmalar *Salvia* türlerinin içermiş oldukları maddelerin izolasyonu, yapı tayinleri ve hem bu maddelerin hem de ekstrelerin etki çalışmalarını kapsamaktadır (Adzet ve ark, 1988, Cuvelier ve ark 1994, Ho ve ark 2000, Weng ve Wang 2000, Gu ve Weng 2001, Lu ve Foo 2002, Miura ve ark 2002, Pizzale ve ark 2002, Santos-Gomes ve ark 2002, Matsingou ve ark 2003, Bors ve ark 2004, Miliauskas ve ark 2004, Koşar ve ark 2005a, Ai-li ve Chang-Hai 2006, Tepe ve ark 2005, Zhao ve ark 2006) . Ayrıca *Salvia* türleri ile ilgili olarak hem ülkemizde hem de dünyada yoğun olarak uçucu yağ çalışmaları da yapılmaktadır. Ülkemizdeki bu uçucu yağ çalışmalarını yoğun olarak Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalı gerçekleştirmektedir.

Bu tez kapsamında *S. virgata*'nın biyolojik aktiviteleri ve etkiden sorumlu fenolik bileşikler kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiştir. Bu amaçla bitkiden %70 metanol ve su ekstreleri hazırlanmıştır. Bu ekstreler üzerinde *in vitro* ve *in vivo* antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, sitotoksitesite deneyleri ve kalitatif ve kantitatif kompozisyon analizleri yapıldı.

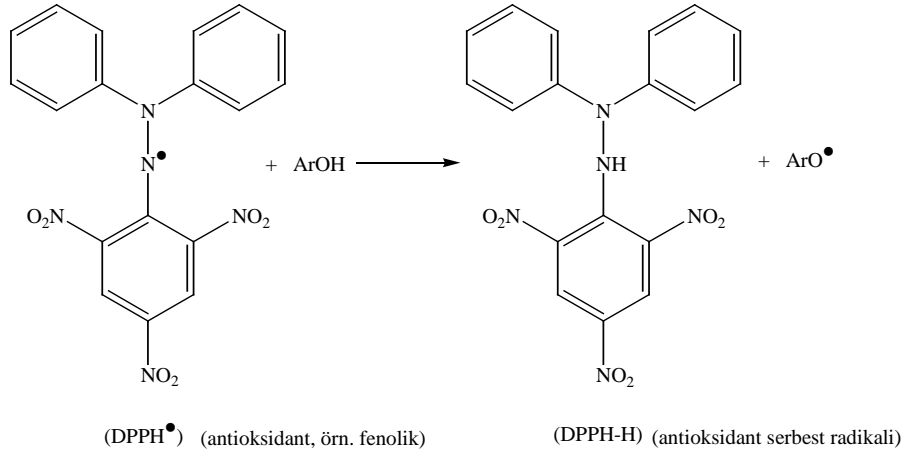
S. virgata'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin verimleri birbirlerine oldukça yakın (%25.94 SME, %24.99 SSE) bulunmuştur. *S. virgata*'nın özellikle Bursa civarında halk arasında kan kanserinde dekoksasyonu halinde kullanıldığı kaydedilmiştir. *S. virgata* ekstrelerinde toplam fenol, flavonoit ve flavonol içerikleri incelendiğinde fenolik bileşim bakımından metanol ekstresinin daha zengin olduğu tespit edilmiştir.

Ekstreler üzerinde yapılan YBSK analizleri sonucunda her iki ekstrede de tanımlanan fenolik bileşikler içerisinde rozmarinik asit ana madde olarak tespit edilmiştir. Rozmarinik asit miktarı metanol ekstresinde 66.94 ± 0.47 mg/g, su ekstresinde ise 26.81 ± 0.05 mg/g olarak bulunmuştur. Ayrıca ekstrelerde kafeik ve *o*-kumarik asit gibi hidroksisinnamik asitler de bulunmaktadır. Ekstrelerin içerisinde UV spektrumlarına göre flavonoit glikozitlerinin aglikonlara göre daha yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Ekstrelerde belirlenen luteolin miktarları metanol ekstresinde 0.97 ± 0.03 mg/g ve su ekstresinde 0.22 ± 0.00 mg/g olarak tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramalarında rozmarinik asitin *Salvia* türlerinde ana bileşen olarak bulunduğu ve antioksidan aktiviteden sorumlu bileşiğin de rozmarinik asit olduğu derlenmiştir. Ayrıca karnosik asit, karnosol ve türevlerinin de *Salvia* türlerinde değişen oranlarda bulunduğu ve aktiviteden sorumlu bileşikler arasına girdiği literatürde kayıtlıdır

(Cuvelier ve ark 1994, Adzet ve ark 1998, Lu ve Foo 2002, Miura ve ark 2002, Pizzale ve ark 2002, Matsingou ve ark 2003, Koşar ve ark 2004). Ayrıca *Salvia* türlerinde bulunan flavonoidlerden en yaygın olanlarının luteolin ve apigenin ve bunların glikozitleri oldukları ve bunlardan da luteolinin glikozitlerinin bulunma sıklığının apigenine göre daha fazla olduğu da bilinmektedir (Lu ve Foo 2002).

Ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasitesi hidrojen verme kapasiteleri olarak değerlendirilir (Yıldırım ve ark 2000). İndirgeme kapasitesi radikal zincir reaksiyonlarının başlangıç safhasında oldukça önemlidir (Yıldırım ve ark 2000). Literatürde, sulu ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasiteleri ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek korelasyon bulunmasına (Dorman ve ark 2003, 2004, Koşar ve ark 2005) rağmen, bunun her zaman doğru olmadığı kayıtlıdır (Yıldırım ve ark 2000). Ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü test edilmiştir. Sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmış (AscAE) ve bu değerler kullanılmıştır. AscAE değeri büyüdükçe aktivite de artmaktadır. *S. virgata* dan elde edilen metanol ekstresinin indirgeme kapasitesi 1.55 mmol/g AscAE, su ekstresinin ise 0.73 mmol/g AscAE olarak bulunmuştur. Ekstrelerin içinde ana bileşen olarak bulunan rosmarinik asitin indirgeme gücü ise 4.01 mmol/g AscAE olarak tespit edilmiştir. Fenolik madde içeriği daha zengin olan metanol ekstresinin demir(III)'ü indirgeme kapasitesi daha fazla olarak bulunmuştur. Yüksek aktiviteye sahip metanol ekstresi yine yüksek oranda rosmarinik asit içermektedir. Fenolik asitler ve flavonoidler doğal antioksidanlar olarak bilinirler. Fenolik asitler, özellikle hidroksisinnamatlar, antioksidan aktivitelerini hidrojen vererek gösterirler (Rice-Evans ve ark 1996, Gu ve Weng 2001). Hidroksisinnamatlar sınıfında yer alan rosmarinik asit ve türevleri, çok güçlü DPPH• radikal süpürücü bileşikler olarak bilinirler (Lu ve Foo 2002). Fenolik asitler ve flavonoidler polar çözücülerde çözünürler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. Demir(III)'ü indirgeme reaksiyonu ve DPPH• radikal süpürücü etki testleri polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle de bu bileşiklerce zengin fraksiyonlar bu deney sistemlerinde etkili olarak bulunmuşlardır.

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikali, 517 nm de maksimum absorban veren stabil bir radikaldir. Antioksidan özellikli maddeler tarafından elektron ve hidrojen atom transferi ile DPPH• radikalının hidrazin türevlerine indirgendiğinde absorban düşer (Şekil 5.1) (Bachmayer 2004).



Şekil 5.1. DPPH• radikali ile hidrojen verici fenolik bileşiklerin reaksiyon mekanizması

Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri fizyolojik pH da incelenmiş ve sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak (mg/mL) verilmiştir. IC₅₀ değeri küçüldükçe aktivite artmaktadır. *S. virgata* bitkisinden elde edilen metanol ekstresinin DPPH radikalini süpürücü etkisi (IC₅₀: 0.16 mg/mL) su ekstresine (IC₅₀: 0.20 mg/mL) göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Rosmarinik asitin IC₅₀ değeri ise 0.04 mg/mL olarak belirlenmiştir. Rosmarinik asitin radikal süpürücü etkisi BHA, BHT ve askorbik asitten daha yüksek olarak bulunmuştur. Metanol ekstresinin etkisi de askorbik asite eşdeğerdir. Buradan ana bileşik olan rosmarinik asit miktarı ile DPPH• radikalini süpürme etkisi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu anlaşılmaktadır. *Salvia* türleri doğal antioksidan kaynağı olarak bilinirler ve bu amaçla yaygın olarak kullanılırlar. Güçlü radikal süpürücü etkiden kafeik asit türevleri, karnosik asit, karnosol ve türevleri sorumlu olarak bilinmektedir (Lo ve Foo 2002, Pizzale ve ark 2002). Flavonoidler DPPH• radikal süpürücü etki bakımından daha zayıf etkilidirler. Ayrıca flavonoidlerde glikozit formlarının ve derecelerinin radikal süpürücü aktiviteyi düşürdüğü literatürde kayıtlıdır (Ho ve ark 2000, Lu ve Foo 2002). Ayrıca *S. officinalis* ile yapılan eş zamanlı YBSK-DPPH• türevlendirme yöntemiyle yapılan çalışmada rosmarinik asit ve karnosik asit ile türevlerinin güçlü DPPH• radikal süpürücü etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (Koşar ve ark 2004).

Ekstrelerin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkileri incelenmiştir. Su ekstresi her iki dozda da (0.25, 0.50 mg/mL) daha iyi süpürücü etki göstermiştir. Rosmarinik asit (TEAC 1.23-2.26 mg/mL) ise standart olarak kullanılan BHT'den (TEAC 0.57-1.17 mg/mL) daha aktif bulunmuştur.

Yağların oksidasyonu gıdalardaki oksidatif bozulmanın ve insan vücudundaki hücrel organellerin fizyolojik fonksiyonlarının kaybının en önemli nedenidir (Yamamoto ve Niki 1991). Potansiyel antioksidanlar olarak besin maddelerinin ve membran fosfolipitlerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi için en kullanışlı model sistemleri fosfolipitlerdir. Bu amaçla sentetik antioksidanlar serbest radikalleri uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Hidroksil radikali başta olmak üzere, fizyolojik olarak benzer reaktif oksijen türleri *in vivo* zincir reaksiyonlarında bozulmayı başlatır ve pek çok hastalığın oluşumunda rol oynar (Chatterjee ve Agarwal 1988).

Bu çalışmada demir(III) ve askorbik asit varlığında fosfolipit esaslı lipozomlar hızla hidroksil radikal kaynaklı peroksidasyona tabi tutulmuş ve malondialdehit ve benzer aldehitlerin teşekkülü sağlanmıştır. Oluşan bu reaktif aldehitler 2-tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sakularak oluşan pembe renk 532 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Oluşan renk şiddeti reaktif aldehit miktarı ile doğru orantılı olması nedeniyle lipit peroksidasyon miktarı ve dolayısıyla test maddelerinin antioksidan etkileri de bu şekilde tayin edilmiştir.

S. virgata'dan elde edilen her iki ekstre de 2-tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin (TBARS) oluşumunu engelleyerek belli oranda antioksidan etki göstermişlerdir. Her iki ekstrede de ana fenolik bileşik olan roozmarinik asit ise oldukça yüksek aktivite (IC_{50} 0.077 mg/mL) göstermiştir. Fenolik madde içeriği ile lipit peroksidasyonunu engelleyici etki arasında doğrusal bir orantı bulunmaktadır. Fenolik içeriği daha fazla olan metanol ekstresi daha aktif (IC_{50} 2.016 mg/mL) bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, ekstreler fosfolipitleri oksidasyona karşı hidroksil radikallerini lipit matriksinin içerisinde reaksiyona girmeden önce tutarak korumuşlardır. Bu nedenle ekstreler lipitçe zengin matriksi bulunan biyolojik membranlarda ve gıda ürünlerinde koruyucu olabilirler.

Hücre membranlarında bulunan lipitler linoleik asit ve araşidonik asit gibi oksidasyona oldukça müsait doymamış yağ asitleri bakımından zengindirler (Braca ve ark 2003, Liyana-Pathirana ve Shahidi 2006). Bu nedenle, bu tez kapsamında incelenen *Salvia* ekstrelerinin antioksidan etkileri taranırken doymamış yağ asitli deney ortamlarının kullanılması önemlidir. Bu amaçla en çok kullanılan deney modellerinden birisi β -karoten-linoleik asit beyazlama testidir (Koleva ve ark 2002). Bu emülsiyon bazlı sistemde, linoleik asitten hidrojen çıkması sonucu oluşan pentadienil serbest radikalının yüksek konjugasyona sahip olan β -karotene hücum etmesi sonucu reaksiyon emülsiyonunun renginin açılması esastır (Amarowicz ve ark 2004). Örneklerin β -karotenin renginin açılmasını inhibe etmesi ya da geciktirmesi serbest

radikal süpürücü etkiyi yani antioksidan etkiyi düşündürebilir (Liyana-Pathirana ve Shahidi 2006).

S. virgata ekstrelerinin β -karoten ve linoleik asitin birlikte oksidasyonu esasına dayanan oksidasyon deneylerinde en yüksek aktiviteyi metanol ekstresi göstermiştir. Su ekstresi ve rozmarinik asit ekstresi hemen hemen benzer etki sağlamışlardır. Askorbik asit ise bu deney modelinde prooksidan etki göstermiştir.

Gıdalar sıklıkla üretim prosesleri sırasında geçiş metal iyonları ile kontamine olurlar. Çift değerlikli metal iyonları oksidasyon proseslerinde önemli rol oynarlar (Fenton kimyası) (Halliwell, 1997). Bu prosesler demirin şelasyonu veya deaktivasyonu ile sonlandırılabilir. Bu nedenle ekstrelerin demir(II) iyonunun şelasyonu üzerine etkisi incelenmiş ve sonuçlar Na_2EDTA 'ya eşdeğer olarak hesaplanmıştır. *S. virgata* ekstrelerinden metanol ekstresinin su ekstresine göre demir(II) iyonlarını daha iyi etkisiz hale getirerek uzaklaştırdığını göstermiştir.

Salvia türleri ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında genellikle apolar fraksiyonların aktif olduğu bulunmuştur. *Salvia* cinsi Lamiaceae familyasına dahil olması nedeniyle uçucu yağ taşıyan bir cinstir. Bu apolar fraksiyonların etkili bulunması da bu nedendir. Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri kanıtlanmıştır. Bu çalışmada ise *S. virgata*'nın polar fraksiyonları çalışılmıştır. Yapılan antimikrobiyal etki deneylerinde yüksek aktivite gözlenmemesi de bu nedendir. Flavonoidlerin antimikrobiyal etkileri zayıftır. Yapılan çalışmalar sonucunda 6 mikroorganizma kültüründe su aktivitesi herhangi bir etki göstermemiştir. Metanol ekstresi de sadece *S. aureus*'a karşı orta derecede (MİK 500 $\mu\text{g/mL}$) etkili bulunmuştur.

S. virgata bitkisinin sulu ekstresi Balıkesir ve Bursa yörelerinde halk tarafında lösemiye karşı kullanılmaktadır. Bu çalışmada da bu nedenle hücre kültürü çalışmaları Jurkat (Kronik Myeloid Lösemi) hücre serisi üzerinde yapılmıştır. Ekstreler ve standart maddeler Jurkat hücre serilerine 0.25 ve 0.50 mg/mL dozlarda uygulanmış ve sitotoksosite sonuçları Alamar Blue boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen inhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde metanol ekstresi her iki konsantrasyonda da inhibisyon göstermiştir. Su ekstresi ise 0.5 mg/mL dozda metanol ekstresinden daha aktif bulunmuştur. Rozmarinik asit ise 0.5 mg/mL dozda yaklaşık %50 oranında inhibisyona neden olmuştur. Rozmarinik asit her iki ekstrede de ana bileşen olması nedeniyle sitotoksositeye bu maddenin neden olduğu düşünülebilir. Ayrıca su ekstresinin aktif bulunması da halkın kullanımına paralel bir sonuç olarak bulunmuştur.

Bilindiği gibi kanser, oksidatif stres ve otooksidasyon savunma sistemi arasında arasında doğrusal bir ilişki vardır. Oksidatif stresin düzeyinin ölçülmesinde de MDA önemli bir göstergedir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ise organizmada bulunan ve otooksidasyon savunma mekanizması içerisinde yer alan endojen antioksidanlardır. Bu sistemler üzerindeki etkilerin belirlenmesi ile maddelerin oksidatif stres ve dolayısıyla kanser üzerine etkileri hakkında da bilgi sahibi olunabilir.

S. virgata ektreleri ve standart maddelerin MDA, GSH-Px ve SOD düzeyleri üzerine olan etkileri 0.25 ve 0.50 mg/mL dozlarda denenmiştir. Bu denemeler sonucunda GSH-Px enzim aktivitesi üzerinde su ekstresi ve rozmarinik asit en yüksek etkiyi göstermişlerdir. Bu sonuçlar sitotoksikite sonuçları ile de uyum göstermektedir.

Hücre membranlarında ve DNA üzerinde çok önemli hasarlara neden olan süperoksit iyonlarının uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu nedenle bu uzaklaştırma mekanizmasından sorumlu olan enzim SOD'un aktivitesinin belirlenmesi de bu nedenle gereklidir. SOD enzim aktivitesi ölçümlerinde her iki ekstre de yakın aktivite göstermiştir. Fakat metanol ekstresinde aktivite konsantrasyona bağlı olarak artarken, su ekstresinde azalmıştır. Gallik ve rozmarinik asit ektrelerden daha az aktif olarak bulunmuştur.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) kanser oluşum sürecinde oldukça önemli bir yeri vardır. ROS başta lipitler olmak üzere pek çok molekülün oksidasyonunda rol oynarlar. Bu oksidasyon sürecinde de malondialdehit ve başka türevler meydana gelir. Bu türevlerin miktarının belirlenmesi bize ROS ve oksidatif stres miktarı hakkında bilgi verir. Bu amaçla çalışmamızda MDA miktarı tiyobarbitürik asit kullanılarak belirlenmiştir. Bu deney sonucunda hem metanol hem de su ektreleri 0.25 mg/mL dozda 0.5 mg/mL doza oranla daha aktif bulunmuştur. Su ekstresi 0.5 mg/mL dozda oksidatif stresi artırmış ve buna bağlı olarak MDA düzeyini yükseltmiştir. Rozmarinik asit ise 0.5 mg/mL dozda oksidatif stresi oldukça yüksek oranda azaltmıştır.

Sonuç olarak, *S. virgata* ektreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda ektrelerin fenolik bileşim bakımından zengin olduğu ve ana bileşenin rozmarinik asit olduğu tespit edilmiştir. Yapılan aktivite çalışmalarında rozmarinik asitin yüksek aktivite göstermesi nedeniyle etkiden sorumlu bileşiklerin başında geldiği düşünülmektedir. Halk arasında lösemi tedavisinde kullanılan *S. virgata* bitkisinin su ekstresinin Kronik Myeloid Lösemi hücresi olan Jurkat hücre serilerinde sitotoksik özellik göstermesi de bu kullanımı desteklemektedir. Bundan sonraki çalışmalarda su ekstresinin etki mekanizması ve etkiden sorumlu bileşiklerinin tespiti alanında çalışmalarımız devam edecektir.

6. KAYNAKLAR

ADZET, T., CANIGUERAL, S., IGLESIAS, J., *A Chromatographic Survey of Polyphenols from Salvia species, Biochemical Systematic Ecology*, **16**, 29-32 (1988).

AI, C.B. and LI, L.N., *Salvianolic acids D and E: Two new depsides from Salvia miltiorrhiza, Planta Medica*, **58**, 197–199 (1992).

AI-LI, J. and CHANG-HAI, W., *Antioxidant Properties of Naturel Components from Salvia Plebeia on Oxidative Stability of Ascidian Oil, Process Biochemistry* **41**,1111-1116 (2006).

AKKOL-KÜPELİ, E., GÖGER, F., KOŞAR, M., BAŞER, K.H.C., *Phenolic Composition and Biological Activities of Salvia halophila and Salvia virgata from Turkey, Food Chemistry*, **108**, 942-949 (2008).

AMAROWICZ, R., PEGG, R.B., RAHIMI-MOGHADDAM, P., BARL, B., WEIL, J.A. *Free-Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of Selected Plant Species from the Canadian Prairies, Food Chemistry*, **84**, 551–562 (2004).

ARUOMA, G. I., SPENCER, J.P.E., WARREN, Q.D., JENNER, P., BUTLER, P., HALLIWELL, B., *Characterization of Food Using Commercial Garlic Antioxidants, Illustrated and Food Chemistry*, **60**, 149-156 (1997)

BACHMAYER, O., *Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs, Yüksek Lisans Tezi*, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki, Finland, 2004.

BAILLY, F., QUEFFELEC, C., MBEMBA, G., MOUSCADETB, J.F., COTELLEA, P., *Synthesis and HIV-1 Integrase Inhibitory Activities of Caffeic Acid Dimers Derived from Salvia officinalis, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 5053–5056 (2005).

BARICEVIC, D. and BARTOL, T., *The Biological/Pharmacological Activity of the Salvia Genus, In. Sage*, Kintzios, S.E. (Ed.), pp.143-184, Harwood Academic Publishers, 2000.

BAŞER, K.H.C., *Aromatic Biodiversity Among the Flowering Plant Taxa of Turkey, Pure Appl. Chem.*, **74**, 527–545 (2002).

BAYTOP, A., *Türkiye’de Kullanılan Yabani ve Yetiştirilmiş Aromatik Bitkiler*, Doğa TU Eczacılık D.,**1**, 76-88, 1991.

BAYTOP, T., *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*, Türk Dil Kurumu Yayınları No: 578, Ankara, 1994.

BAYTOP, T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, Nobel Tıp Kitapevleri, İkinci Baskı, 1999.

BORS,W., MICHELL, C., STETTMAIER, K., LU, Y., FOO, L.Y., *Antioxidant Mechanism of Polyphenolic Caffeic Acid Oligomers, Constituents of Salvia officinalis*, *Biol Res*, **37**, 301-311 (2004).

BOZAN, B., ÖZTÜRK, N., KOŞAR, M., TUNALIER, Z., BAŞER, K.H.C., *Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Eight Salvia Species*, *Chemistry of Natural Compounds*, **38**, 198-200 (2002).

BRACA, A., POLITI, M., SANOGO, R., SANOU, H., MORELLI, I., PIZZA, C., et al., *Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated Sclerocarya birrea (Anacardiaceae) leaves*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6689–6695 (2003).

British Herbal Pharmacopoeia, *Salvia*, British Herbal Medicine Association, Great Britain, pp.185-186, 1983.

British Herbal Pharmacopoeia, Sage leaf, British Herbal Medicine Association, Great Britain, p.164, 1996.

CARTER, P., *Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine)*. *Analytical Biochemistry*, **40**, 450–458 (1971).

CHATTERJEE, S.N. and AGARWAL, S., *Liposomes as a Membrane Model for Study of Lipid Peroxidation*, *Free Radical Bioogy & Medicine*, **4**, 51-72 (1988).

CHENG, W., TUNG, Y.H., LIU, C.H., CHEN, J.C., *Molecular Cloning and Characterisation of Cytosolic Manganese Superoxide Dismutase (Cytmn-SOD) from the Giant Freshwater Prawn Macrobrachium rosenbergii*, *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 438-449 (2006).

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS), P.S.f.A.S.T., 16th Informational Supplement. CLSI M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.

CUVELIER, M.E., BERSET, C., RICHARD, H., *Antioxidant Constituents in sage (Salvia officinalis)*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 665-669 (1994).

DEANS, S.G. and SIMPSON, E.J.M., *Antioxidants from Salvia officinalis*, in Sage, Kintzios, S.E. (Ed.), pp. 185-192, Harwood Academic Publishers, 2000.

DELAMARE, A.P.L., MOSCHEN-PISTORELLO, I., ARTICO, L., ATTI-SERAFINI, L., ECHEVERRIGARAY, S., *Antibacterial Activity of the Essential Oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. Cultivated in South Brazil, Food Chemistry*, **100**, 603–608 (2007).

Deutsches Arzneibuch (DAB), *Salvia triloba folium*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Germany, 1999.

DING, M., YE, T.Z., ZHAO, G.R., YUAN, Y.J., GUO, Z.X., *Aqueous Extract of Salvia miltiorrhiza Attenuates Increased endothelial Permeability Induced by Tumor Necrosis Factor- α* , *International Immunopharmacology*, **5**, 1641–1651 (2005).

DORMAN, H. J. D., KOSAR, M., KAHLOS, K., HOLM, Y., & HILTUNEN, R., *Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from Mentha species, hybrids, varieties, and cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 4563–4569 (2003).

DORMAN, H.J.D., BACHMAYER, O., KOŞAR, M., HILTUNEN, R., *Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey, Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 762-770 (2004).

European Pharmacopoeia, *Sage leaf (Salvia officinalis)*, Third edition, Suppl. 2, Council of Europe, Strasbourg, France, p.847, 1999.

GÖGER, F., *Salvia virgata Jacq. ve S. halophila Hedge'nin Antioksidan Etkilerinin ve Bileşimlerinin Belirlenmesi*, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2006.

GU, L. and WENG, X. *Antioxidant Activity and Components of Salvia plebeia R.Br. – a Chinese herb, Food Chemistry*, **73**, 299-305 (2001).

GYAMFI, M. A., YONAMINE, M., & ANIYA, Y. *Free radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana, Thonningia sanguinea on experimentally induced liver injuries. General Pharmacology*, **32**, 661–667 (1999).

HALLIWELL, B., *Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. Advances in Pharmacology*, **38**, 3–20 (1997).

HAZNEDAROĞLU, M.Z., KARABAY, N.U., ZEYBEK, U., *Antibacterial Activity of Salvia tomentosa essential oil, Fitoterapia*, **72**, 829-831 (2001).

HEDGE, I.C., *Salvia L.*, in *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, P. H. Davis (Ed.), Vol. 7, 400-460, University Press, Edinburgh, 1982.

HO, C-T., WANG, M., WEI, G-J., HUANG, T-C., HUANG, M-T., *Chemistry and Antioxidative Factors in Rosemary and Sage, Biofactors*, **13**, 161-166 (2000).

KAMATOU, G.P.P., VILJOEN, A.M., BWALYA, A.B., VAN, Z.R.L., VUUREN, V., LOURENS A.C.U., BAŞER, K.H.C., DEMİRCİ, B., LINDSEY, K.L., STADEN, J.V.,

STEENKAMP, P., *The In Vitro Pharmacological Activities and A Chemical Investigation of Three South African Salvia Species*, *Journal of Ethnopharmacology*, **102**, 382–390 (2005).

KANG, H.S., CHUNG, H.Y., JUNG, J.H., KANG, S.S., CHOI, J.S., *Antioxidant effect of Salvia miltiorrhiza*, *Archives of Pharmacal Research*, **20**, 496–500, (1997).

KINTZIOS, S.E., *Sage*, III ve V, Harwood Academic Publishers, 2000.

KOLEVA, I.I., VAN BEEK, T.A., LINSSEN, J.P.H., DE GROOT, A., EVSTATIEVA, L.N., *Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods*, *Phytochemical Analysis*, **13**, 8–17 (2002).

KOŞAR, M., DORMAN, H.J.D., BAŞER, K.H.C., HILTUNEN, R. *An Improved HPLC Post-Column Methodology for the Identification of Free Radical Scavenging Phytochemicals in Complex Mixtures*, *Chromatographia*, **60**, 635-638 (2004).

KOŞAR, M., DORMAN, H.J.D., HILTUNEN, R. *Effect of an Acid Treatment on The Phytochemical and Antioxidant Characteristics of Extracts from Selected Lamiaceae Species*, *Food Chemistry*, **91**, 525-533 (2005).

KOŞAR, M., GÖGER, F., BAŞER, K.H.C., *In Vitro Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Salvia virgata Jacq. From Turkey*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2369-2374 (2008).

LIMA, C.F. CARVALHO, F., FERNANDES, E., BASTOS, M.L., SANTOS-GOMES, P.C., FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C., *Evaluation of Toxic/Protective Effects of The Essential Oil of Salvia officinalis on Freshly Isolated Rat Hepatocytes*, *Toxicology In Vitro*, **18**, 457–465 (2004).

LIN, Y.L., WU, C.H., LUO, M.H., HUANG, Y.J., WANG, C.N., SHIAO, M.S., HUANG, Y. T., *In Vitro Protective Effects of Salvianolic Acid B on Primary Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells*, *Journal of Ethnopharmacology*, **105**, 215–222 (2006).

LIYANA-PATHIRANA, C. M., & SHAHIDI, F., *Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (Triticum aestivum L.) and their milling fractions*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, 477–485 (2006).

LU, Y. and FOO, L.Y., *Antioxidant Activity of Polyphenols from Sage (Salvia officinalis)*, *Food Chemistry*, **75**, 197-202 (2001).

LU, Y. and FOO, L.Y., *Polyphenolics of Salvia*, *Phytochemistry*, **59**, 117–140 (2002).

MATSINGOU, T.C., PETRAKIS, N., KAPSOKEFALOU, M., SALIFOGLU, A., *Antioxidant Activity of Organic Extracts from Aqueous Infusions of Sage*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6696-6701 (2003).

MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R., VAN-BEEK, T.A., *Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts, Food Chemistry*, **85**, 231-237 (2004).

MIURA, K., KIKUZAKI, H., NAKATANI, N., *Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (Salvia officinalis L.) and Thyme (Thymus vulgaris L.) Measured by the oil Stability Index Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1845-1851 (2002).

MORIMOTO, S., GOTO, Y., SHOYAMA, Y., *Production of Lithospermic Acid B and Rosmarinic Acid in Callus Tissue and Regenerated Plantlets of Salvia miltiorrhiza, Journal of Natural Products*, **57**, 817–823 (1994).

NAKAZAWA, T. and OHSAWA, K., *Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats, Journal of Natural Products*, **61**, 993–996 (1998).

OOMAH, B. D., MAZZA, G. *Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1746–1750 (1996).

OYAIZU, M., *Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. Japanese Journal of Nutrition*, **40**, 307–315 (1986).

PEREIRA, P., TYSCA, D., OLIVEIRA, P., SILVA BRUM, L.C., NASCIMENTO, J.P., ARDENGHI, P., *Neurobehavioral and Genotoxic Aspects of Rosmarinic Acid, Pharmacological Research*, **52**,199–203 (2005).

PETERSENA, M. and SIMMONDS, M.S.J., *Molecules of Interest Rosmarinic acid, Phytochemistry*, **62**, 121–125 (2003).

PIZZALE, L., BORTOLOMEAZZI, R., VICHI, S., UBEREGGER, E., CONTE, L.S., *Antioxidant Activity of Sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and Oregano (Origanum onites and O. indercedens) Extracts Related to Their Phenolic Compound Content, Journal of Science Food Agriculture*, **82**, 1645-1651 (2002).

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. Free Radicals in Biology and Medicine*, **26**(9/10), 1231–1237 (1998).

REYNOLDS, J.E.F., *Sage, Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 31. edition, The Royal Pharmaceutical Society, p.1749, 1996.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., *Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, Free Radical Biology & Medicine*, **20**, 933-956 (1996).

RUIZ, M.R., BELTRAN, Y.G., MORA, S., VELIZ, G. D., VIANA, S.B., TORTORIELLO, J., RAMIREZ, G., *Antidepressant and Anxiolytic Effects of Hydroalcoholic Extract from Salvia elegans*, *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 53-58 (2006).

SANTOS-GOMES, P.C., SEABRA, R.M., ANDRADE P.B., FERNANDES-FERREIRA, M., *Phenolic Antioxidant Compounds Produced by In Vitro Shoots of Sage (Salvia officinalis L.)*, *Plant Science*, **162**, 981-987 (2002).

SIDDHURAJU, P., BECKER, K. *Studies on antioxidant activities of mucuna seed (Mucuna pruriens var. utilis) extract and various non-protein amino/imino acids through in vitro models*. *Journal of Science Food and Agriculture*, **83**, 1517–1524 (2003).

SINGLETON, V., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTO S, R., *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. In L. Packer (Ed.). *Oxidants and antioxidants, part A, Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). New York: Academic Press. (1999).

TEPE, B., DÖNMEZ, E., ÜNLÜ, M., CANDAN, F., DAFERERA, D., ÜNLÜ, G., POLISSIOU, M., SÖKMEN, A., *Antimicrobial And Antioxidative Activities of The Essential Oils and Methanol Extracts of Salvia cryptantha (Montbret et Aucher ex Benth.) and Salvia multicaulis (Vahl)*, *Food Chemistry*, **84**, 519-525, (2004).

TEPE, B., DAFERERA, D., SÖKMEN, A., SÖKMEN, M., POLISSIOU, M., *Antimicrobial and Antioxidant Activities of The Essential Oil and Various Extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae)*, *Food Chemistry*, **90**, 333-340 (2005).

THOMAS-BARBERAN, F.A. and WOLLENWEBER, E., *Flavonoid Aglycons from the Leaf Surfaces of Some Labiatae Species*, *Plant Systematics and Evolution*, **173**, 109-118 (1990).

TOPÇU, G., TAN, N., ULUBELEN, A., SUN, D., WATSON, W. H., *Terpenoids and Flavonoids From the Aerial Parts of Salvia candidissima*, *Phytochemistry*, **40**, 501-504 (1995).

TOPÇU, G., ULUBELEN, A., TIMOTHY, C., TAO-CHE, C., *Sesterterpenes and Other Constituents of Salvia yosgadensis*, *Phytochemistry*, **42**, 1089-1092 (1996)

ULUBELEN, A. and TUZLACI, E., *Flavonoids and Triterpenoids From Salvia euphratica and S. longipedicellata*, *Fitoterapia*, **61**, 185, (1990a). Wang ve ark 2000

WENG, X.C. and WANG, W., *Antioxidant Activity Compounds Isolated From Salvia plebeia*, *Food Chemistry*, **71**, 489-493 (2000).

VELİOĞLU, Y. S., MAZZA, G., OOMAH, B. D., *Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4113–4117 (1998).

YAMAMOTO, Y. and NIKI, E., *Role of Antioxidants in Lipid Peroxidation. In: Membrane Lipid Oxidation. Vol. 1*, pp. 285-301, Carmen Vigo-Pelfrey, 1991.

YILDIRIM, A., MAVİ, A., OKTAY, M., KARA, A.A., ALGUR, Ö.F., BİLALOĞLU, V., *Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (Tilia argentea Desf ex DC), Sage (Salvia triloba L.), and Black Tea (Camellia sinensis) Extracts, Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5030-5034 (2000).

ZHAO, G.R., XIANG, Z.J., YE, T.X., YUAN Y.J., GUO, Z.X., *Antioxidant Activities of Salvia miltiorrhiza and Panax notoginseng, Food Chemistry*, **99**, 767-774 (2006).