

EZGİ ERSOY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

ULUDAĞ'DA YETİŞEN ÜÇ *HYPERICUM* TÜRÜNÜN
KİMYASAL BİLEŞİKLERİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

EZGİ ERSOY

DANIŞMAN
PROF. DR. AFİFE MAT

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
FARMAKOGNOZİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Doktora Programında Doktora öğrencisi 2702120085 numaralı Ezgi ERSOY tarafından Prof.Dr.Afife MAT'ın danışmanlığında hazırlanan “**Uludağ’da Yetişen üç *Hypericum* Türünün Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri Üzerinde Araştırmalar**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 25/02/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı-Danışman
Prof.Dr.Afife MAT
İ.Ü.Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı



Jüri
Doç.Dr.Meryem Sedef ERDAL
İ.Ü.Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç.Dr. Ayhan ALTINTAŞ
Anadolu Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı



Jüri
Dr.Öğr.Üyesi Esra EROĞLU ÖZKAN
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı

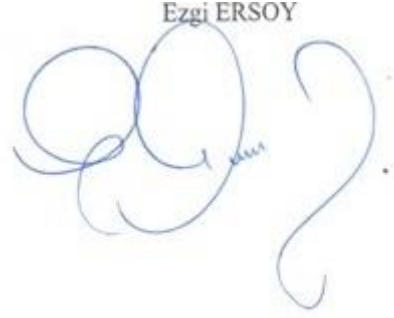


Jüri
Dr.Öğr.Üyesi.Vildan SEYHAN
Biruni Üniv.Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ezgi ERSOY



İTHAF

Beni ben yapan her şeyi borçlu olduğum babam, annem, kardeşim ve çok özlediğim babanneme...

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmasına başlamamdaki en büyük sebep, sadece akademik çalışmalarında değil, hayatın her alanında her zaman bana yol gösteren, her şeyiyle örnek aldığım hocama, Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı ve aynı zamanda tez danışmanım olan Prof. Dr. Afife Mat 'a sonsuz saygılarımla teşekkür ederim.

Bu tezde benim kadar emeği olan, hem hocam; artık hem de ablam, çok sevdiğim ve saydığım, benim için çok özel bir insana, Dr. Öğr. Üyesi Esra Eroğlu Özkan'a, bana yıllardır sabrettiği, ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olduğu ve beni desteklediği için binlerce kez teşekkür ederim.

Bitkilerimin teşhisinde ve botanik açıdan incelenmesinde yardımcı olan Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emine Akalın Uruşak ve Prof. Dr. Şükran Kültür'e teşekkür ederim.

Tezimin antimikrobiyal aktivite çalışmalarında yardımını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Emel Mataracı Kara'ya teşekkür ederim.

Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mehmet Boğa'ya, çalışmamın her aşamasında yardımcı olduğu için sonsuz teşekkür ederim.

Beni her zaman en çok destekleyen kişi olan ve sahip olduğum her şeyi borçlu olduğum babam Vedat Ersoy'a, beni özgür ve bağımsız bir birey olarak yetiştiren annem Fatma Ersoy'a, hayattaki en yakınım olan biricik kardeşim Memduh Efe Ersoy'a, hayatımda oldukları için nasıl teşekkür edeceğimi bilemesem de bu vesileyle teşekkür etmek isterim.

Birbirimizi tamamladığımıza inandığım canım arkadaşım Başak Cebe Şen'e, hep yanımda olan Zeynep Ersöz ve Bihter Sayan'a, ayrıca adını sayamayacağım tüm yakın arkadaşlarıma teşekkür ederim. Zorlandığım anlarda en büyük yardımcım her zaman arkadaşlarım oldu, çok şanslı olduğumu biliyor ve onları çok seviyorum. Birlikte nice elitliklere...

Bu çalışmaya başladığım günden itibaren bilgisinden faydalandığım, öncelikle *Hypericum* üzerine çalışmış olanlar olmak üzere, farmakognozi bilimine ve insanlığa katkıda bulunmuş tüm bilim insanlarına sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışmayı destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 58219



Hypericum perforatum / Uludağ – Bursa

Fotoğraflar: Dr. Öğr. Üyesi Hasan Şahin



Hypericum calycinum / Uludağ - Bursa



Hypericum confertum / Uludağ – Bursa

1. İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xvii
ÖZET	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Botanik Özellikler	4
2.1.1. Hypericaceae Familyası	4
2.1.2. <i>Hypericum</i> L. Cinsi	5
2.1.2.1. <i>Hypericum perforatum</i> L.....	11
2.1.2.2. <i>Hypericum calycinum</i> L.....	12
2.1.2.3. <i>Hypericum confertum</i> Choisy.....	13
2.2. Etimoloji.....	14
2.3. <i>Hypericum</i> Türlerinin Ekonomik Açıdan Önemi.....	15
2.4. Arazi Çalışmalarının Yapıldığı Uludağ Bölgesi'nin Özellikleri.....	17
2.5. Kimyasal Özellikler	19
2.5.1. Naftodiantron Türevi Bileşikler	22
2.5.2. Floroglusinol Türevi Bileşikler	25
2.5.3. Flavonoidler	34
2.5.4. Fenolik Asitler.....	38
2.5.5. Tanenler ve Proantosiyanidinler	41
2.5.6. Ksanton Bileşikleri.....	42
2.5.7. Uçucu Yağ Bileşikleri	44
2.6. Farmakolojik Etkiler	46

2.6.1. Antidepresan Etki.....	48
2.6.2. Yara İyileştirici Etki.....	54
2.6.3. Antimikrobiyal Etki	56
2.6.4. Antioksidan Etki	63
2.6.5. Sitotoksik Etki.....	66
2.6.6. Antiinflamatuvar Etki.....	68
2.6.7. Analjezik ve Antinosiseptif Etki	70
2.6.8. Premenstrual Sendrom Üzerine Etki.....	73
2.6.9. Menopoz Semptomları Üzerine Etki.....	74
2.6.10. Bağımlılık Üzerine Etki	76
2.6.11. Nörodejeneratif Hastalıklar Üzerine Etki	77
2.6.12. Diğer Etkiler.....	79
2.6.13. Farmakokinetik Özellikleri	82
2.6.14. Yan Etkileri ve Kontrendikasyonları	83
2.6.15. Gebelik ve Laktasyonda Kullanımı.....	85
2.6.16. İlaç Etkileşimleri	85
2.6.17. Toksisitesi	87
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	90
3.1. Materyal	90
3.2. Genel Metotlar	91
3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması.....	91
3.2.2. LC-MS/MS ile 37 Fitokimyasal Maddelerin Tanımlanması ve Kantitatif Analizi	91
3.2.2.1. LC-MS/MS Cihazı ve Kromatografik Şartlar	91
3.2.3. Antioksidan Aktivite Tayini.....	92
3.2.3.1. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	94
3.2.3.1.1. Toplam Fenolik İçeriklerinin Belirlenmesi	94
3.2.3.1.2. Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi	95
3.2.3.1.3. DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi.....	95
3.2.3.1.4. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi	96
3.2.3.1.5. CUPRAC Yöntemi	96

3.2.3.1.6. Metal Bağlama Yöntemi	97
3.2.4. Antiasetikolinesteraz ve Antibutirikolinesteraz Aktivite Tayinleri	97
3.2.4.1. Asetilkolinesteraz İnhibisyon Aktivite Testi	99
3.2.4.2. Butirikolinesteraz İnhibisyon Aktivite Testi	100
3.2.5. Antiüreaz ve Antitirozinaz Aktivite Tayinleri	100
3.2.5.1. Üreaz İnhibisyon Aktivite Testi	101
3.2.5.2. Tirozinaz İnhibisyon Aktivite Testi.....	102
3.2.6. Antikolajenaz, Antielastaz ve Antihiyaluronidaz Aktivite Tayinleri.....	102
3.2.6.1. Kolajenaz İnhibisyon Aktivite Testi.....	104
3.2.6.2. Elastaz İnhibisyon Aktivite Testi	104
3.2.6.3. Hyaluronidaz İnhibisyon Aktivite Testi	105
3.2.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	106
3.3. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	107
4. BULGULAR.....	108
4.1. LC-MS/MS ile 37 Fitokimyasal Maddenin Tanımlanması ve Kantitatif Analizi.....	108
4.1.1. LC-MS/MS Metod Validasyon Parametreleri	109
4.1.1.1. Doğrusallık (Linearite)	109
4.1.1.2. Gerçeklik ve Kesinlik	109
4.1.1.3. Dedeksiyon ve Tayin Alt Sınırları (LOD/LOQ).....	110
4.1.1.4. Bağlı Standart Belirsizlik (U^{95})	110
4.1.2. LC-MS/MS Analizine İlişkin Standart Kromatogramı ve Standart Olarak Alınan Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS Parametreleri.....	110
4.1.3. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin LC-MS/MS Analiz Sonuçları	114
4.2. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları.....	118
4.2.1. Toplam Fenolik Bileşik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini.....	118
4.2.2. DPPH Serbest Radikali Giderici Aktivite Sonuçları.....	119
4.2.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları.....	120
4.2.4. Metal Bağlama Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Sonuçları	120
4.2.5. CUPRAC Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	121

4.3. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin Antiasetilkolinesteraz ve Antibutirilkolinesteraz Aktivite Sonuçları	122
4.4. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin Antitirozinaz Aktivite Sonuçları	123
4.5. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin Antiüreaz Aktivite Sonuçları	124
4.6. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin Antikolajenaz Aktivite Sonuçları	125
4.7. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin Antielastaz Aktivite Sonuçları	126
4.8. <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin Antihiyaluronidaz Aktivite Sonuçları	127
4.9. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları	128
5. TARTIŞMA.....	129
KAYNAKLAR	149
ÖZGEÇMİŞ	193
TURNİTİN İNTİHAL RAPORU	194

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: IMS verilerine göre üç ayrı zaman periyodunda Avrupa’da tüm satış kanallarında satılan <i>Hypericum</i> içeren preparat sayısı (bin adet).....	16
Tablo 2-2: <i>Hypericum</i> Türlerinde Bulunan Bazı Kimyasal Bileşikler.....	20
Tablo 2-3: <i>Hypericum</i> Türlerinde Bulunan Bazı Floroglusinol Türevi Bileşikler.....	26
Tablo 4-1: Standart Olarak Alınan Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS Parametreleri....	112
Tablo 4-2: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin LC-MS/MS Analiz Sonuçları.....	116
Tablo 4-3: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarları.....	118
Tablo 4-4: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin DPPH Radikali Giderici Aktivite Deneyindeki IC ₅₀ Değerleri.....	119
Tablo 4-5: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin ABTS Katyon Radikali Giderici Aktivite Deneyindeki IC ₅₀ Değerleri.....	120
Tablo 4-6: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Metal Bağlama Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Deneyindeki IC ₅₀ Değerleri.....	121
Tablo 4-7: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin CUPRAC Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	121
Tablo 4-8: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antiasetilkolinesteraz ve Antibutirilkolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	122
Tablo 4-9: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antitirozinaz Aktivite Sonuçları.....	123
Tablo 4-10: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antiüreaz Aktivite Sonuçları.....	124

Tablo 4-11: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antikolajenaz Aktivite Sonuçları.....	125
Tablo 4-12: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antielastaz Aktivite Sonuçları.....	126
Tablo 4-13: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antihiyaluronidaz Aktivite Sonuçları.....	127
Tablo 4-14: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerine Ait Ekstrelerin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (MİK değeri).....	128
Tablo 5-1: <i>H. calycinum</i> , <i>H. confertum</i> ve <i>H. perforatum</i> Türlerinin LC-MS/MS ile Belirlenen Klorojenik Asit, Gallik Asit, Rutin, Kersitrin, İzokersitrin, P-kumarik Asit, Kafeik Asit, Rozmarinik Asit ve Protokateşik Asit İçerikleri (µg/g).....	132

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1-1: <i>Hypericum</i> L. Seksiyonları Arası İlişkiyi Gösteren Filogenetik Ağaç Şeması.....	7
Şekil 1-2: <i>Hypericum</i> L. Türlerinin Dünya Üzerindeki Yayılışı.....	10
Şekil 2-1: <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Naftodiantron Türevlerinin Açık Formülleri.....	24
Şekil 2-2: Hiperforin Biyosentez Reaksiyonu.....	29
Şekil 2-3: <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Floroglusinol Türevlerinin Açık Formülleri.....	31
Şekil 2-4: <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Flavonoit Bileşiklerinin Açık Formülleri.....	37
Şekil 2-5: <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Fenolik Asit Türevlerinin Açık Formülleri.....	40
Şekil 2-6: <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Proantosiyanidinlerin Açık Formülleri.....	42
Şekil 2-7: <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Ksanton Bileşiğinin Açık Formülü.....	44
Şekil 4-1: 37 Fitokimyasal Maddenin LC-MS/MS Metodu ile Taranmasına İlişkin Standart Kromatogramı.....	111
Şekil 4-2: <i>H. calycinum</i> Metanol Ekstresine Ait Kromatogram.....	115
Şekil 4-3: <i>H. confertum</i> Metanol Ekstresine Ait Kromatogram.....	115
Şekil 4-4: <i>H. perforatum</i> Metanol Ekstresine Ait Kromatogram.....	115
Şekil 5-1: Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin LC-MS/MS ile Belirlenen Kinik asit, Malik Asit ve Fumarik Asit İçeriklerini Gösteren Grafik.....	133
Şekil 5-2: Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin Pirokatekole Eşdeğer Toplam Fenolik Madde ve Kersetine Eşdeğer Toplam Flavonoit İçeriklerini Gösteren Grafik.....	135

Şekil 5-3: Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin DPPH Serbest Radikali Giderim ve ABTS Katyon Radikali Giderim Yöntemleriyle Yapılan Antioksidan Aktivite Tayinlerinde Elde Edilen IC ₅₀ Değerlerini Gösteren Grafik.....	136
Şekil 5-4: Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin CUPRAC Yöntemiyle Yapılan Antioksidan Aktivite Tayinlerine Göre Belirlenen Antioksidan Aktivitelerini Gösteren Grafik.....	137
Şekil 5-5: Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz Yüzde İnhibisyon Aktivitelerini Gösteren Grafik.....	140
Şekil 5-6: Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin Tirozinaz Enzim Yüzde İnhibisyon Aktivitesini Gösteren Grafik.....	141
Şekil 5-7: Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin Kolajenaz, Elastaz ve Hyaluronidaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi Tayini Sonucu Elde Edilen IC ₅₀ Değerlerini Gösteren Grafik.....	145

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A: Absorbans

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ABTS: 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]

AChE: Asetilkolinesteraz

AcI: Asetiltiyokolin iyodür

AD: Aktif değil

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

ATCC: American Type Culture Collection

BChE: Bütirilkolinesteraz

BHA: Bütillenmiş hidroksi anisol

BHT: Bütillenmiş hidroksi toluen

BPAP: Bisiklik poliprenil açılfloroglusinol

BuI: Bütiriltiyokolin iyodür

CFU: Colony-Forming Unit

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

cm: Santimetre

coA: Koenzim A

COX: Siklooksijenaz

CUPRAC: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi

DCHA: Disikloheksilamonyum

dk: Dakika

DMAPP: dimetilallilpirofosfat

DMSO: Dimetilsülfoksit

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

DTNB: 5,5-ditiyobis-(2-nitro benzoik asit)

EC: Effective Concentration

ED: Effective Dose

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EEG: Elektroensefalografi

EGCG: Epigallokateşin gallat

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ESCOP: European Scientific Cooperative on Phytotherapy

ESI: Elektrosprey iyonlaştırma

FALGPA: N-(3-[2-furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala

FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma

g: Gram

GABA: γ -aminobütirik asit

GAE: Gallic Acid Equivalent

h: Bitki içerisindeki madde miktarının % değeri

h: Hour

HCl: Hidroklorik asit

HCMV: Human Cytomegalovirus

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HMG: 3-hidroksi-3-metil-glutaril

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HSV: Herpes Simpleks Virüs

IC: Inhibition Concentration

ICD: International Classification of Diseases

IMS: Information Medical Statistics

ISTE: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu

i.p.: intraperitoneal

kg: kilogram

km: kilometre

L: Litre

LC: Liquid Chromatography

LC-MS: Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi

LC-MS/MS: Sıvı kromatografisi üçlü kuadrupol kütle spektrometresi

LDL: Low Density Lipoprotein

L-DOPA: 3,4-Dihidroksi-L- fenilalanin

LOD: Belirleme alt sınırı

LOO: Lipid peroksit radikalleri

LOQ: Tayin alt sınırı

LPO: Lipit peroksidaz

m/z: Kütle/yük oranı

m: metre

M: Molar

MAO: Monoamin Oksidaz

MCMV: Mouse cytomegalovirus

mg: Miligram

MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

mL: Mililitre

mM: Milimolar

mm: milimetre

MÖ: Milattan Önce

MPAP: Monosiklik Poliprenil Ailfloroglusinol

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MRSA: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

MS: Ktle spektrometresi

MS: Milattan Sonra

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid

ng: Nanogram

nm: Nanometre

NMDA: N-metil-D-aspartik asit

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

PBS: Phosphate Buffered Saline

PDT: Photodynamic Therapy

PMS: Premenstruel sendrom

PPAP: polisiklik poliprenil ailfloroglusinol

ppm: Parts per Million

PTZ: Pentilentetrazol

R[•]: Radikal

R²: Belirleme katsayısı

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

RSD: Bağıl standart sapma

RSD: Relative Standard Deviation

RT: Alıkonma zamanı

SANA: N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide

SOD: Süperoksit dismutaz

SSRI: Selective Serotonin Reuptake Inhibitors

TPA: Tetradekanoilforbol asetat

TRPC6: Transient Receptor Potential Cation Channel 6

U: Unit

U⁹⁵: Birleştirilmiş belirsizlik

UHPLC: Ultra Y¼ksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UV: Ultraviolet Visible

vb: ve benzeri

WHO: D¼nya Sağlık Örg¼t¼

YBSK: Y¼ksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

yy: Y¼zyıl

α -Toc: Alfa tokoferol

μ g: Mikrogram

μ L: Mikrolitre

μ M: Mikromolar

5-HTP: 5-Hidroksitriptofan

ÖZET

ERSOY, E. (2019). Uludağ'da Yetişen Üç *Hypericum* Türünün Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri Üzerinde Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Uludağ'dan toplanan üç *Hypericum* türü olan *Hypericum calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinin çiçekli topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstraktlarının LC-MS/MS cihazı ile kimyasal içeriği aydınlatılmıştır. Toplam fenolik bileşik ve flavonoit içerikleri sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. DPPH serbest radikali giderim, ABTS katyon radikali giderim, metal bağlama ve CUPRAC yöntemleri ile antioksidan aktivite tayini; asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, üreaz, tirozinaz, kolajenaz, elastaz, hyaluronidaz inhibisyon aktivite tayinleri ve antimikrobiyal aktivite tayini yapılmıştır.

Dokuz adet metabolit: *p*-kumarik asit, gallik asit, kinik asit, klorojenik asit, malik asit, protokateşik asit, rutin, kersitrin ve izokersitrin analiz edilen tüm türlerin bileşiminde tespit edilmiştir. İncelenen türler içinde en yüksek toplam fenolik bileşen içeren tür *H. calycinum*; toplam flavonoit miktarı en yüksek olan tür ise *H. confertum* türüdür. Bu çalışma sonucu elde edilen sonuçlar, *Hypericum* türlerinin antioksidan/radikal giderici bileşikler açısından iyi birer kaynak olduğunu doğrular niteliktedir. Her üç tür de iyi antioksidan aktivite göstermiştir. *H. calycinum*, zengin fenolik bileşik içeriğine bağlı olarak tüm antioksidan aktivite tayin çalışmalarında en etkili tür olarak bulunmuştur.

Üç türün enzim inhibisyon aktivitesi; asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, tirozinaz, üreaz, kolajenaz, elastaz ve hyaluronidaz enzimleri üzerinde test edilmiştir. *H. calycinum* türü en yüksek asetilkolinesteraz inhibisyonunu sağlarken; *H. perforatum* butirilkolinesteraz enzimine karşı en yüksek inhibisyonu sağlayan tür olmuştur. Her üç tür de tirozinaz, kolajenaz, elastaz ve hyaluronidaz inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Çalışılan türler arasında yalnızca *H. calycinum* düşük oranda antiüreaz aktivite göstermiş, diğer türler bu etkiyi göstermemiştir. Tüm türler *Staphylococcus epidermidis* suşuna karşı yüksek antibakteriyel ve *Candida albicans* suşuna karşı düşük antifungal aktivite sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum*, LC-MS/MS, Fenolik Bileşikler, Biyolojik Aktivite, Antioksidan Etki

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 58219

ABSTRACT

ERSOY, E. (2019). Investigations on Chemical Compounds and Biological Activities of Three *Hypericum* Species Growing in Uludağ. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Pharmacognosy, PhD Thesis, İstanbul.

In this study, chemical compositions of methanolic extracts prepared from flowered aerial parts of the following species collected from Uludağ, *Hypericum calycinum*, *H. confertum* and *H. perforatum* were investigated by LC-MS/MS. Total phenolic and total flavonoid contents were determined as pyrocatechol and quercetin equivalents, respectively. Antioxidant activities of the species were carried out by using DPPH free radical scavenging, ABTS cation radical scavenging, metal chelate and CUPRAC activity. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, urease, tyrosinase, collagenase, elastase, hyaluronidase inhibition and antimicrobial activity were also investigated.

Nine metabolites, *p*-coumaric acid, gallic acid, quinic acid, chlorogenic acid, malic acid, protocatechuic acid, rutin, quercitrin and isoquercitrin were identified in all analysed species. Among the species that were investigated, it was determined that *H. calycinum* has the highest total phenolic content whereas *H. confertum* has the highest flavonoid content. The biochemical results in this study confirm that these *Hypericum* species are a good source of antioxidant/radical scavenging compounds and all three species showed good antioxidant activity. *H. calycinum* appeared the most active in all antioxidant activity assays which is mainly due to its rich phenolic content.

Enzyme inhibition activity of the three species were tested against acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, tyrosinase, urease, collagenase, elastase and hyaluronidase enzymes. *H. calycinum* exerted the highest acetylcholinesterase inhibition, while *H. perforatum* had the best inhibition towards butyrylcholinesterase. All three species showed tyrosinase, collagenase, elastase and hyaluronidase inhibition activity. Among the species studied, only *H. calycinum* showed low antiurease activity, whereas the other species did not. High antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis* and lesser antifungal activity against *Candida albicans* were observed in all species.

Keywords: *Hypericum*, LC-MS/MS, Phenolic Compounds, Biological Activity, Antioxidant Effect

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 58219

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlığın var oluşundan bu yana hastalıkların tedavisinde bitkilerin kullanıldığı bilinmektedir. Yeni keşifler, onbinlerce yıl öncesinden günümüze kadar gelen Neandertal kalıntılarında bugün de tedavide kullanmakta olduğumuz bitki türlerinden izler bulunduğunu göstermektedir. Örneğin, 1991 yılında Alp Dağları'nda donmuş halde bulunan ve MÖ 5200 yıllarında yaşadığı tespit edilen “Buz Adam Ötzi”nin kalınbarsağında *Trichuris trichuria* parazitinin yumurtası bulunmuş, yine kalınbarsakta bu parazite karşı etkili bir kara yosunu olan *Neckera complanata* kalıntısına rastlanmış ve kendisini bu şekilde tedavi etmeye çalıştığı sonucuna varılmıştır (Oeggl ve ark. 2007). Günümüzde de bitkilerle tedavi, her geçen gün daha fazla ilgi uyandıran ve üzerinde yapılan bilimsel çalışmaların giderek arttığı bir alandır.

Bitkilerle tedavi denilince tüm dünyada akla gelen ilk bitkilerden olan *Hypericum* L. türleri; Hypericaceae familyasına ait, çok yıllık otsu veya çalımsı bitkilerdir. Dünyada şu an bilinen 500'den fazla *Hypericum* türü vardır (Crockett ve ark. 2011). Tüm dünyada en çok bilinen tür ise *Hypericum perforatum* türüdür. *H. perforatum*, Türkçe'de sarı kantaron, binbirdelik otu, kılıç otu, mayasıl otu, kan otu, koyunkıran gibi isimlerle bilinir (Baytop, 1999). İngilizce'de “Saint John's wort”, Almanca'da “Johanniskraut”, Fransızca “Herbe à mille trous”, İtalyanca “Erba di San Giovanni” diğer dillerde en çok kullanılan isimlerine örnektir. 24 Haziran Baptist St. John günü bitkinin çiçeklenme dönemine denk geldiği için ilk Hristiyanlar tarafından bu ismin verildiği düşünülmektedir.

H. perforatum, Hippocrates, Theophrastus, Dioscorides, Galenos ve Paracelsus gibi devirlerinin en önemli bilim insanlarının eserlerinde yer alan son derece önemli bir bitkidir. MS 1. yy'da yaşamış hekim Pedanius Dioscorides; antik çağın en önemli farmasötik kitapları arasında kabul edilen De Materia Medica'sında *H. perforatum* bitkisini şöyle tarif eder: Uzun boylu, çalı görünümünde bir bitkidir. Çiçekler parmaklar arasında ovulduğunda, insan kanına benzer kırmızı renkli bir sıvının açığa çıktığı görülür. Bundan dolayı bitki Androhaimon (insan kanı, [kan otu]) şeklinde isimlendirilmiştir. Dioscorides aynı eserinde *H. perforatum* türünün yara iyi edici, diüretik, analjezik ve antimalaryal etkilerinden bahseder (Istikoglou ve ark. 2010).

İnsanlık tarihi boyunca her zaman en çok bilinen ve tedavide en yaygın olarak kullanılan bitkilerden olan *H. perforatum*; ortaçağ boyunca kültürel anlamda da geleneklerin ve ritüellerin bir parçası haline gelmiştir. 24 Haziran Saint John Günü arefesinde, insanların evlerin ve kiliselerin kapılarına bu bitkinin yaprak ve çiçeklerinden yapılan süsler asarak kötü ruhlardan korunmaya çalıştığı bilinir. Ayrıca gece yatarken yastıklarının altına *H. perforatum* bitkisinin çiçekli dallarını yerleştirerek rüyalarında Baptist John tarafından bizzat kutsanmayı, bu şekilde tüm yıl ölümden ve diğer kötülüklerden korunmayı ummuşlardır (Istikoglou ve ark. 2010).

H. perforatum bitkisinin ilk çağlardan beri en çok bilinen etkisi yara iyi edici etkidir. Bitki, halk arasında yüzyıllardır gerek hayvanların, gerekse insanların yara ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır. 16. yy'ın en önemli bilim insanlarından ve modern tıbbın kurucularından kabul edilen İsviçreli hekim ve kimyager Paracelsus (1493-1541), *H. perforatum* bitkisinin kaynatılarak sterilize edildiği takdirde dahilen psikiyatrik rahatsızlıklarda kullanılabileceğini kayıt altına alan ilk kişidir. Paracelsus; öfke sorunu ve anksiyete problemi olan kişilere *H. perforatum* kullanmayı tavsiye etmiştir (Galeotti, 2017).

H. perforatum, 1618'de tedavi edici bir bitki olarak Londra Farmakopesi'nde yer almıştır. Dönemin ünlü botanikçisi Nicholas Culpeper (1616-1654)'in de çabalarıyla o yıllarda İngiltere'de oldukça popüler hale gelmiştir. Daha sonra İngiltere, Fransa ve Almanya gibi ülkelerden Amerika'ya göç eden kişiler bitkinin bu kıtada da bilinmesini sağlamışlar, bu dönemlerde antidepresan etkinliği tüm dünyada bilinir hale gelmiş ve bitki yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Saddique ve ark. 2010).

Hypericum L. cinsi bitkiler genellikle çok yıllıktır. En yaygın tür olan *H. perforatum* genel anlamda tetraploid ($n = 2x = 16$) bir bitki olmakla beraber diploid ve hekzaploid formları da mevcuttur (Robson ve Adams, 1968). Bitkinin çok eski zamanlarda *H. maculatum* Crantz ve *H. attenuatum* L. arasındaki spontan melezlenmenin sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Robson, 1981). Çiçekler parlak sarı olup ana ve yan dalların uç kısımlarında meydana gelir. Türkiye şartlarında mart ayında havaların ısınmaya başlamasıyla toprak üzerindeki bitkiler yeşermeye başlar. mayısta başlayan çiçeklenme haziranın ikinci yarısında en üst seviyeye ulaşır ve ağustosa kadar devam eder.

Yapılan birçok çalışma ile *H. perforatum* türünün kimyasal içeriği aydınlatılmıştır. Buna göre naftodiantron yapısındaki bileşikler (hiperisin, pseödohiperisin vb), floroglusinoller (hiperforin, adhiperforin vb), flavonoidler (hiperozit, rutin, kersetin vb), biflavonlar (biapigenin, amentoflavon), fenolik asitler (ferulik asit, kafeik asit vb), proantosiyanidinler, uçucu yağlar ve diğer bazı kimyasal bileşikler bulunmaktadır. Bu maddeler bitkinin sahip olduğu çeşitli etkilerden sorumludur (Hostettmann ve Wolfender, 2005).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2002 yılında *Hypericum* L. cinsi bitkileri tıbbi bitki olarak ilan etmiş ve *Hyperici herba* olarak monograflarında geniş bir yer vermiştir. Bu monograflarda yer alan etkiler arasında antidepresan etki, antibakteriyel etki, antiviral etki, protein kinaz – C inhibitör etki ve yara iyi edici etkisi vardır.

Hypericum L. türleri ülkemiz için de ayrı bir öneme sahiptir. Türkiye, kuzeyinde Avrupa - Sibirya Flora Bölgesi, batısı ve güneyinde Akdeniz Flora Bölgesi, iç ve doğu kısımlarda ise İran – Turan Floristik Bölgesi ile üç farklı tipte floraya sahip olması çok zengin bir bitki çeşitliliğini beraberinde getirmektedir. Dünya üzerinde 500’den fazla türü tespit edilen *Hypericum* L. cinsinin Türkiye’de 100’e yakın türü doğal olarak bulunmaktadır. *Hypericum* cinsi Türkiye’de 19 seksiyonda yaklaşık 100 takson ile temsil edilmektedir ve bunlar arasındaki 45 takson endemiktir (Özkan ve ark. 2013). Ülkemizde en çok çiçekli topraküstü kısımlarının zeytinyağı içinde güneş ışığında bırakılarak oluşan yağı antiseptik ve yara iyi edici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca %1’lik infüzyonunun da dahilen antispazmodik, kabız, yatıştırıcı ve kurt düşürücü etkisi nedeniyle halk arasında kullanımı vardır (Baytop, 1999).

2013 yılında dünya genelinde 1 milyar doları aşan bir pazar haline gelen *Hypericum* türleri üzerinde yapılan birçok çalışma mevcuttur ve her geçen gün yenileri yapılarak bileşimi ve farmakolojik etkileri aydınlatılmaya devam etmektedir. Bu çalışma Uludağ’da yetişen *Hypericum perforatum* L., *Hypericum calycinum* L. ve *Hypericum confertum* Choisy türleri üzerinde, kimyasal bileşiklerini ve biyolojik aktivitelerini aydınlatmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Özellikler

2.1.1. Hypericaceae Familyası

Linnaeus zamanından bu yana, bazı bilim insanları *Hypericum* L. cinsine ait bitkilerin Hypericaceae adlı ayrı bir familyaya ait olduğunu savunurken, genel görüş Clusiaceae (Guttiferae) familyasına ait alt bir cins olarak değerlendirilmesi gerektiği şeklinde olmuştur. Son yapılan moleküler düzeydeki filogenetik analizler ise Hypericaceae familyasının Clusiaceae (Guttiferae) familyasının diğer üyelerinden ayrı sınıflandırılması gereken bir familya olduğunu ve *Hypericum* L. cinsinin de bu familyaya ait olduğunu savunan hipotezi destekler niteliktedir (Crockett ve Robson, 2011).

Hypericaceae familyası toplam dokuz cinsten oluşur (Robson 1970; 1981):

- *Vismia* Vand (52 tür)
- *Harungana* Lamarck (50 tür)
- *Hypericum* L. (Yaklaşık 500 tür)
- *Lianthus* N. Robson (1 tür)
- *Triadenum* Rafinesque (6 tür)
- *Thornea* Breedlove & McClintock (2 tür)
- *Santomasia* N. Robson (1 tür)
- *Cratoxylum* Blume (6 tür)
- *Eliea* Cambess (1 tür)

Hypericaceae familyasına ait bitkiler; genellikle otsu, bazen çalimsı, bileşiminde hiperisin etken maddesi içeren siyah veya kırmızı renkli glandlar veya uçucu yağ içeren şeffaf glandlar taşıyan bitkilerdir. Yapraklar tam, karşılıklı, nadiren halka şeklinde dizilmiş. Sepaller genelde 5 adet olup tomurcukta imbrikat dizilişlidir. Petalleri 5 adet, serbest ve tomurcukta burulmuş şekildedir. Stamenler demetler halinde veya dağınık olabilir. Ovaryum eksensel veya yanal plasentalıdır, üst durumludur. Tohumlar endospermasızdır (Robson, 1968).

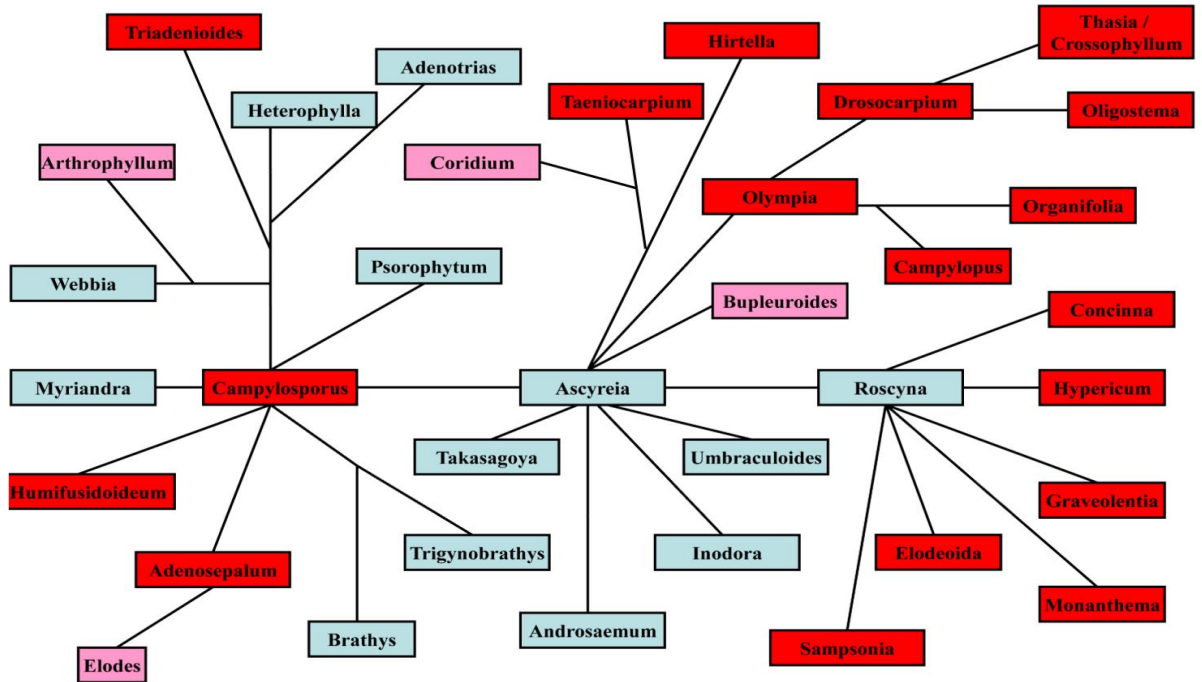
2.1.2. *Hypericum* L. Cinsi

Hypericum L. cinsinin yeryüzünde 500'den fazla türü saptanmıştır. İngiliz botanikçi Norman Keith Bonner Robson (d. 1928); 1977 ile 2012 yılları arasında *Hypericum* L. cinsini sınıflandırdığı monograflar yayımlamıştır. Robson bu sınıflandırmalarda morfolojik, coğrafik ve filogenetik özelliklerden yararlanmıştır. Bu çalışmalar günümüze dek sürdürülmüş ve sonuç olarak günümüzde *Hypericum* L. cinsine ait 30 seksiyon ve 6 alt seksiyon altında toplanmıştır. Bu seksiyon ve subseksiyonlar şu şekilde sıralanabilir:

1. *Campylosporus* Spach R. Keller – 10 tür (Robson, 1985: 178)
2. *Psorophytum* Spach Nyman - 1 tür (Robson, 1985: 202)
3. *Ascyreia* Choisy – 43 tür (Robson, 1985: 206; 2001: 49)
4. *Takasagoya* Y. Kimura N. Robson -5 tür (Robson, 1985: 288)
5. *Androsaemum* Duhamel Gordon – 4 tür (Robson, 1985: 297)
6. *Inodora* Stef. - 1 tür (Robson, 1985: 314)
- 6a. *Umbraculoides* N. Robson- 1 tür (Robson, 1985: 317)
7. *Roscyna* Spach R. Keller – 2 tür (Robson, 2001: 52)
8. *Bupleuroides* Stef. – 1 tür (Robson, 2001: 49)
9. *Hypericum* L. – 42 tür (Robson, 2002: 66)
1. *Hypericum* – 19 tür (Robson, 2002: 66)
1. *Hypericum* – 12 tür (Robson, 2002: 66)
2. *Senanensia* N. Robson – 7 tür (Robson, 2006: 28)

2. *Erecta* N. Robson – 23 tür (Robson, 2006: 42)
- 9a. *Concinna* N. Robson - 1 tür (Robson, 2001: 61)
- 9b. *Graveolentia* N. Robson – 9 tür (Robson, 2006: 79)
- 9c. *Sampsonia* N. Robson -2 tür (Robson, 2001: 63)
- 9d. *Elodeoida* N. Robson – 5 tür (Robson, 2001: 66)
- 9e. *Monanthema* N. Robson –7 tür (Robson, 2001: 75)
10. *Olympia* Spach Nyman – 4 tür (Robson, 2010a).
11. *Campylopus* Boiss. - 1 tür (Robson, 2010a).
12. *Origanifolia* Stef.- 13 tür (Robson, 2010a).
13. *Drosocarpium* Spach – 11 tür (Robson, 2010a).
14. *Oligostema* Boiss. Stef. - 6 tür (Robson, 2010a).
15. *Thasia* Boiss. – 1 tür (Robson, 2010).
16. *Crossophyllum* Spach –3 tür (Robson, 2010a).
17. *Hirtella* Stef. – 30 tür (Robson, 2010a).
1. *Stenadenium* N. Robson – 12 tür (Robson, 2010b).
2. *Platyadenium* N. Robson -18 tür (Robson, 2010b).
1. *Lydia* Sennikov – 5 tür (Robson, 2010b).
2. *Scabra* N. Robson – 3 tür (Robson, 2010b)
3. *Abbreviata* Semikov - 10 tür (Robson, 2010b)
18. *Taeniocarpium* Jaub. & Spach – 28 tür (Robson, 2010b)
19. *Coridium* Spach - 6 tür (Robson, 2010b)
20. *Myriandra* Spach– 29 tür (Robson, 1996: 92)
1. *Centrosperma* R. Keller – 14 tür (Robson, 1996: 94)
2. *Pseudobrathydium* R. Keller – 1 tür (Robson, 1996: 112)
3. *Suturosperma* R. Keller - 7 tür (Robson, 1996: 113)
4. *Brathydium* Spach R. Keller – 2 tür (Robson, 1996: 122)

5. *Ascyrum* (L.) N. Robson -5 tür (Robson, 1996: 124)
21. *Webbia* Spach R. Keller – 1 tür (Robson, 1996: 133)
22. *Arthrophyllum* Jaub. & Spach – 5 tür (Robson, 1996: 137)
23. *Triadenioides* Jaub. & Spach –5 tür (Robson, 1996: 141)
24. *Heterophylla* N. Robson –1 tür (Robson, 1996: 146)
25. *Adenotrias* Jaub. & Spach R. Keller – 3 tür (Robson, 1996: 147)
26. *Humifusoidium* R. Keller - 12 tür (Robson, 1996: 153)
27. *Adenosepalum* Spach - 25 tür (Robson, 1996: 170)
1. *Aethiopica* N. Robson - 7 tür (Robson, 1996: 172)
2. *Pubescentes* N. Robson - 6 tür (Robson, 1996: 181)
3. *Caprifolia* N. Robson – 3 tür (Robson, 1996: 189)
4. *Adenosepalum*- 9 tür (Robson, 1996: 193)
28. *Elodes* Adans. W. Koch – 1 tür (Robson, 1996: 208)



Şekil 1-1: *Hypericum* L. Seksiyonları Arası İlişkiyi Gösteren Filogenetik Ağaç Şeması
(Crockett ve Robson, 2011)

Hypericum L. cinsi; genel olarak tek yıllık veya çok yıllık, çalimsı ve otsu görünümlü bitkilerden oluşur. Bununla beraber, Afrika’da görülen *H. bequaertii* gibi odunsu gövdeye sahip türler de vardır. Çok yıllık bitkiler genelde daha nemli iklime sahip bölgelerde görülür (Crockett ve Robson, 2011).

Genelde tüysüz bitkilerdir. 11-12, 17-18 ve 27. seksiyonda yer alan türler ise kısa sert tüylü veya az çok yumuşak tüylü olabilmektedir. 27. seksiyondaki bazı türler ve 28. seksiyonda yer alan *H. elodes* ise uzun tüylere sahiptir (Robson, 1981).

Hypericum türlerinde koyu renkli veya şeffaf glandlar olmak üzere iki tip gland bulunur. İlk tip glandlar kırmızı veya siyah renkli olabilirler ve bu renkler içerdikleri naftodiantron grubu bileşikler olan hiperisin veya psödohiperisinden kaynaklanmaktadır. Bitkinin bu glandları içeren dokuları parmaklar arasında ezilirse kırmızı renkli bir madde açığa çıkar. Paracelsus 16. yy’ın başlarında bu maddeyi “Johannes-blut” (Baptist John’un kanı) olarak tanımlamış ve *H. perforatum* türünün bugün bütün dünyada en yaygın olarak bilinen ismi olan St. John’s Wort bu şekilde ortaya çıkmıştır (Robson 1977; Robson, 1968). İkinci tip şeffaf glandlar ise renksiz veya amber rengine yakın olabilmektedir. Bunlar uçucu yağlar ve hiperforin gibi fluoroglusinol türevi bileşikler içerirler (Ciccarelli ve ark. 2001a, 2001b).

Yapraklar neredeyse her zaman karşılıklı çapraz şekilde dizilmiştir. Yaprak şekilleri ovoid ve elongat olabildiği gibi düz yapraklı türler de vardır. Daha önce bahsedildiği gibi yapraklarda şeffaf veya koyu renkli glandlar bulunur.

Genellikle 4 veya 5 sepallidirler. 20. seksiyondaki bazı türler 3 sepalli olabilmektedir. Sepallerin büyüklükleri eşit olabilir veya bazı türlerde olmayabilir.

Petaller 5 adet olup genellikle sarı renklidir. Ancak az sayıda da olsa beyaz veya pembemsi renkli *H. albiflorum* veya turuncu - kırmızı renkli *H. capitatum* var. *capitatum* gibi türler de vardır. Sepaller gibi petallerin uzunluğu da eşit olabilir veya bazı türlerde eşit olmayabilir. Neredeyse tüm türlerde petallerde glandlar görülebilmektedir. Daha önce bahsedildiği üzere koyu renkli glandların hiperisin içerdiği düşünülmektedir, ancak bisantranon bileşikler gibi bazı diğer maddeler de kırmızı pigmentli olduğundan bazen istisnai durumlar ortaya çıkabilir. Örneğin *H. bupleuroides* ve *H. xylosteifolium* koyu kırmızı glandlara sahip olmalarına rağmen; bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda hiperisin veya psödohiperisin taşıdıklarına dair herhangi bir bulgu saptanmamıştır.

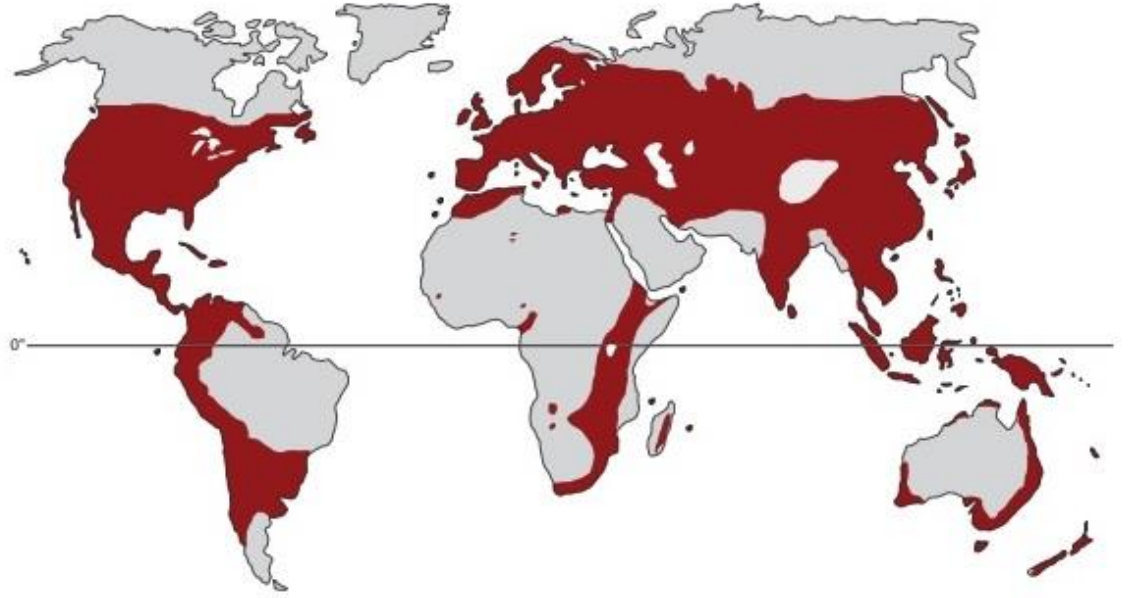
Stamenlerin sayısı 5'ten 200'e kadar değişebilmektedir. Bunlar demetler halinde bulunur. 4'lü veya 5'li stamen demetleri görülebilir. 20., 29. ve 30. seksiyonda yer alan bazı türlerde stamenler halka şeklinde dizilmiştir. Stamenler genelde kalıcıdır ve üzerlerinde glandlar bulunur.

Ovaryum 3-5 gözlü veya her plasentanın 2 veya daha çok ovül taşıdığı tek gözlü şekilde olabilmektedir. Meyveler, Hypericaceae familyasına ait bazı diğer türlerin aksine septisit kapsuladır. Olgun bitkide kapsula nadiren etlidir ve dış yüzeyinde glandlar bulunmaktadır. Bunlar genellikle şeffaf glandlar olup 13. seksiyonda yer alan bazı türlerde kırmızımsı siyah glandlara da rastlanabilir.

Tohumlar, 0,3-1,5 mm uzunluğunda, oldukça küçüktür. Sarı-kahverengi renkliden koyu mor-kahverengiye kadar farklı renklerde olabilir. Silindirik - ellipsoid şekillidirler.

Hypericum L. türlerinin kromozom sayıları (n) 7-16 arası olabilmektedir. *H. setosum* ve *H. cumulicola* ise $n=6$, dihaploid olarak istisna kabul edilebilirler. Çalımı görünümü olanlar içinde en yaygınları genellikle $n=9$ veya $n=10$ olan türlerdir. En yaygın tür olan *H. perforatum* türü $n = 16$ kromozomludur (Crockett ve Robson, 2011).

Hypericum türleri dünya genelinde yayılış göstermekle birlikte özellikle Kuzey Yarıküre'nin ılıman bölgelerinde bulunurlar. Ilıman bölgelerin nispeten daha soğuk yerlerinde yükseltisi daha az olan bölgelerde görülürken, sıcak ve tropik iklim kuşağında deniz seviyesinden oldukça yüksek alanlarda bu bitkilere rastlanmaktadır (Nürk, 2011).



Şekil 1-2: *Hypericum* L. Türlerinin Dünya Üzerindeki Yayılışı (Nürk, 2011)

2.1.2.1. *Hypericum perforatum* L.

Alem: Plantae

Şube: Spermaophyta

Alt şube: Angiospermae

Sınıf: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Alt sınıf: Dillendiae

Takım: Malpighiales

Familiya: Hypericaceae

Cins: *Hypericum* L.

Tür: *Hypericum perforatum* L.

9. seksiyon olan *Hypericum* L. seksiyonuna ait bir türdür.

Gövdesi 10-110 cm yüksekliğinde, dik, 2 çizgilidir. Dallar yükselici olabilir veya olmayabilir. Yapraklar 5-35 mm uzunluğunda, dar-ovat veya lanseolattan elipik-oblonga ve bazen şeritsi, nadiren oblanseolata kadar değişik şekillerde olabilir. Sapsız veya hemen hemen tepede saplı ve yüzeyi daima büyük saydam noktalıdır. Sepaller lanseolat-oblong veya eliptik, akut-akuminat, tam, siyah noktasız veya birkaç yüzeysel siyah noktalı. Petaller (5)-8-15 mm, kenarlarda birkaç siyah noktalı ve bazen yüzeysel siyah çizgili. Kapsula (4)-5-9 mm, ovoid-piramidal, sırtta salgı kanalları ve yanlarda glandlar bulunur (Robson, 1968).

Deniz seviyesinden 2500 m'ye kadar mezofitik bölgelerdeki kuru habitatlarda ve su yakınlarındaki başka bölgelerde bulunur (Davis, 1982). Çiçeklenme zamanı nisan-mayısta başlar ve ağustos-eylüle kadar devam eder.

Türkiye'de geniş yayılım göstermektedir.

2.1.2.2. *Hypericum calycinum* L.

Alem: Plantae

Şube: Spermaophyta

Alt şube: Angiospermae

Sınıf: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Alt sınıf: Dillendiae

Takım: Malpighiales

Familiya: Hypericaceae

Cins: *Hypericum* L.

Tür: *Hypericum calycinum* L.

3. seksiyon olan *Ascyreia* Choisy seksiyonuna ait bir türdür.

Gövdesi 20 - 60 cm uzunluğunda, sürünücü, çok dallı olmayan, yer yer siyah glandlar bulunduran ve tüysüz yapıdadır. Yaprakları 4,5-7 x 6,3-9,5 cm boyutunda, şekilleri oblong-eliptik bazen de ovattır. Yapraklarda bol miktarda salgı cepleri bulunur. Herdem yeşil bir bitkidir. Sepalleri değişken boyutlu olabilir, 1-2 cm boyutundadır. Devamlılık gösterirler, eşit değildirler, eliptik veya suborbiküler olabilirler. Glandlar küçük boyutludur ve yüzeyde az sayıda bulunurlar. Damarlanmalar vardır. Petaller 2,5-4,5 cm boyutunda belirgin, devamlılık gösteren asimetrik petallerdir. Stamenlerin kırmızımsı rengi göze çarpar. Siyah glandsız, stilus 3 parçalı, kapsüller 20 mm, ovoid şekillidir (Robson, 1968).

Çiçeklenme zamanı genelde Mayıs- ağustos arasındadır. İklim koşullarına göre 10. aya kadar uzayan çiçeklenme dönemi görülebilir.

$n = 10$ kromozomlu bir bitkidir.

Ağaçlık ve çalılık alanlarda gelişir. 30-1200 m'de görülebilir. Gölge bitkisidir. Asya'nın güneyinde ve doğusunda rastlanır. Türkiye'nin kuzeyinde yayılım gösterir.

2.1.2.3. *Hypericum confertum* Choisy

Alem: Plantae

Şube: Spermatophyta

Alt şube: Angiospermae

Sınıf: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Alt sınıf: Dillendia

Takım: Malpighiales

Familiya: Hypericaceae

Cins: *Hypericum* L.

Tür: *Hypericum confertum* Choisy

18. seksiyon olan *Taeniocarpium* Jaub. & Spach. seksiyonuna ait bir türdür.

Çok yıllık bitki. 10- 35 cm uzunluğunda, genel olarak kısmen yumuşak tüylü; nadiren tamamen tüsüzdür. Gövde 2 çizgili, kırmızı, eglandular (gland bulundurmaz), noduslar arası 5-30 mm, yaprakları geçerler. Yapraklar sapsız, donuk mavimsi olmayan yeşil renkte, genellikle kısa tüylü, nadiren tüsüz. Lamina 7-15(-20) × 1-5 mm, lanseolattan oblong-lineare doğru. Sepaller eşit, serbest, imbrikat değil, , 4-7 × 1-3 mm, lanseolattan oblong veya ovata, sivri veya yuvarlak olabilir. Petaller soluk sarı, hafif kırmızımsı veya kırmızı damarlı olabilir. Boyutları , 7-16 × 4-6 mm, sepallerin yaklaşık 2 katı kadar, obovattan elliptik-ovata doğru. Kenarlarında siyah glandlar vardır. Stamenler yaklaşık 40 adet, en uzun 7-9 mm, filamentler sarı renklidir, kırmızımsı filament bulunmaz. Ovaryum yaklaşık 3 x 2 mm, ovoid. Stiluslar 5-6 mm, ovaryumun yaklaşık iki katı kadardır. Kapsula 6-9 × 4-6 mm, ovoid. Tohumlar yaklaşık 2 mm boyutunda, kırmızımsı kahverengi, testa papillozudur (Robson, 1968). n = 9 kromozomlu bitkidir.

590-1930 m yükseklikte yetişir. Türkiye'nin batısı, Lübnan ve Kıbrıs'ta yayılış gösterir.

2.2. Etimoloji

Bazı sözlük bilimciler “*Hypericum*” kelimesinin hypo- (altında) veya hyper- (üstünde) ve ereikon (funda/fundalık) kelimelerinin birleşimiyle türetilen ve “fundalıkta yetişen bitki” anlamına gelen bir kelime olduğunu düşünmektedir (Robson, 2003). Yaygın kabul edilen hipotez ise kelimenin anlamının kullanılışından geldiğini savunmaktadır. Yunanca bir kelime olan υπερεικον (upereikon), antik Yunanlılar tarafından kötü ruhları uzaklaştırmak için yüksek yerlere asılan dini figürlere verilen isimdir (υπερ=yukarı, εικων=ikon). Nikander (Alexipharmaka V, 603) MÖ 2. yy’da bu isimden bahseden ilk kişidir. Bundan yaklaşık 250 yıl sonra Dioscorides *Materia Medica* adlı eserinde “*Hypericum*” kelimesini kullanır. Eserde örnek olarak *H. empetrifolium* türüne ait bir illüstrasyon da yer alır. Ege Bölgesi’nden uzakta *H. empetrifolium* türünün yetişmediği alanlarda ise *H. perforatum* türünün yine kötü ruhları kovmak için kutsal bir anlam yükleyerek dekorasyonda kullanıldığı bilinmektedir (Robson, 2003). Antik Yunan döneminde yaşayan insanların kötü ruhları kovmak amacıyla *Hypericum* türlerini tercih etmesinin nedeninin; o dönemde depresyon veya benzer ruhsal hastalıkların kötü yaratıkların hasta kişinin ruhunu ele geçirmesiyle oluştuğu düşünülmesi ve bu hastalıklara sahip kişilere *Hypericum* türlerinden verildiğinde rahatsızlıklarında iyileşme olduğu görülmesi üzerine kötü ruhları kovduğu inancının yaygınlaşması olduğu düşünülmektedir (Guiley, 1991; Jurk, 2005).

H. perforatum türünün İngilizce ismi olan Saint John’s Wort, bitkinin tüm dünyada en çok bilinen ve yaygın olarak kullanılan ismidir. Bitkinin çiçeklenme döneminin Baptist John Günü olarak bilinen 24 Haziran’a denk gelmesi nedeniyle onun ismiyle anıldığı düşünülmektedir. Bitkinin Fransızca’daki ismi olan “Herbe de la Saint-Jean”, Almanca’daki ismi olan “Johanniskraut”, İtalyanca’daki ismi olan “Erba di San Giovanni”, İspanyolca ismi olan “Hierba de San Juan” buradan gelmektedir (Robson, 2003).

H. perforatum türü Türkçe’de sarı kantaron, kılıç otu, kan otu, mayasıl otu, binbirdelik otu, kuzukıran, koyunkıran gibi isimlerle bilinir. Bunlardan en yaygın olarak bilineni “sarı kantaron”dur. Kantaron kelimesi dilimize Yunanca “κενταύρειον” (kentaúrion) kelimesinden gelir. Bu kelimenin kökeni ise “κενταύρος” (Kentaúros) kelimesidir ve Yunan mitolojisinde kısmen insan, kısmen at görünümlü efsanevi varlıklara verilen isimdir. Bu efsanevi varlıklardan biri olan Khiron, tıp bilgisiyle ünlü

olduğu için isim ona atfedilmiştir. Bitkinin sahip olduğu sarı petalleri de “sarı kantaron” olarak bilinmesini sağlamıştır.

2.3. *Hypericum* Türlerinin Ekonomik Açıdan Önemi

H. perforatum içeren müstahzarlar birçok ülkede gıda takviyesi olarak kabul edilmektedir ve bu ülkelerde ilaç ruhsatları yoktur. Avrupa’da ise hem gıda takviyesi hem de ruhsatlı ilaç olarak bulunan ürünler mevcuttur (Linde, 2009b). 2004 yılında Avrupa’da satılan bitkisel ürünlerin yaklaşık %13’ü *H. perforatum* ekstresi içeren ürünlerdir ve yalnızca Almanya’da bir yılda 70 milyon Euro’dan fazla ciro sağlamıştır (Bäcker ve ark. 2005; Crockett ve Robson, 2011). *Hypericum* üretiminde başı çeken ülke Almanya’dır. 2003 yılında Almanya’da 600 hektardan daha büyük bir arazide *Hypericum* türlerinin tarımının yapılmakta olduğu belirtilmiştir. Polonya ve İspanya’nın Mallorca şehri de *H. perforatum* üretiminde ilk sıralarda yer almaktadır (Gärber ve Schenk, 2004).

H. perforatum 2008 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nde toplam 8,2 milyon dolarlık satış rakamıyla en çok satılan bitkisel ürünler arasında yer almaktadır (American Botanical Council, 2009).

Hypericum cinsi pek çok bitkinin süs bitkisi olarak kullanılmak üzere de kültürü yapılmaktadır. Bunlara örnek olarak ABD, Avustralya ve Yeni Zelanda’da kültürü çokça yapılan *Hypericum moserianum* (*H. calycinum* x *H. patulum*), *H. hookerianum* ‘Charles Rogers’, *Hypericum* x ‘Hidcote’ (*Hypericum* x *cyathiflorum* ‘Gold Cup’ x *H. calycinum*). *H. perforatum*, *H. canariense* ve *H. androsaemum* sayılabilir (Lane, 1979; Zouhar, 2004; Dlugosch ve Parker, 2007; Groenteman ve ark. 2011).

Tablo 2-1: IMS Health (Information Medical Statistics) verilerine göre üç ayrı zaman periyodunda Avrupa’da tüm satış kanallarında satılan *Hypericum* içeren preparat sayısı (bin adet) (Linde, 2009b).

Ülkeler	4/2005–3/2006	4/2006–3/2007	4/2007–3/2008
Almanya	5,040	4,520	3,786
Rusya Federasyonu	2,092	2,299	2,198
Polonya	1,576	1,524	1,577
Fransa	423	473	528
Ukrayna	485	515	434
İsviçre	285	263	257
Diğer Avrupa Ülkeleri	904	842	804
Toplam	10,805	10,437	9,583

2.4. Arazi Çalışmalarının Yapıldığı Uludağ Bölgesi'nin Özellikleri

Uludağ, 2543 metrelik yükseltisiyle Marmara Bölgesi'nin en yüksek dağıdır. Daha eski dönemlerde Olympus Misius, Bithyninn Olympus ve Keşiş Dağı isimleriyle anılan dağa 1925 yılında bugünkü ismi olan “Uludağ” adı verilmiştir. Uludağ, İstanbul'un 250 km güneybatısında yer alan ve Marmara Bölgesi'nin en önemli illerinden biri olan Bursa sınırları içinde yer alır. Coğrafik olarak 39° 45' - 40° 10' kuzey enlemi ve 28° 58' - 29° 38' doğu boylamları arasında bulunmaktadır. Bursa şehri, Uludağ'ın kuzeybatı ayağında kurulmuştur.

Uludağ'ın kuzeyinde Sarıalan Yaylası, Kirazlı Yayla, Kadiyayla gibi yüksek platolar bulunmaktadır.

Bölgenin iklimi genel olarak ılımandır. Uludağ'da bulunan 3 meteoroloji istasyonu, Yeşilkonak (1025 m), Sarıalan (1620 m) ve Zirve (1920 m) istasyonlarıdır. Bu istasyonlardan sağlanan verilere göre, yıllık ortalama sıcaklık 10°C olup 2000-2500 m gibi yükseltilerde 3-4 °C'ye kadar düşer. yıllık ortalama yağış Yeşilkonak Bölgesi'nde 1180 mm, Sarıalan'da 1330 mm ve Zirve'de 1550 mm'dir. En fazla yağış aralık ayında, en az yağış ise ağustos ayında görülür.

Coğrafik izolasyon, iklim koşulları ve bölgenin Akdeniz ile Avrupa – Sibirya floristik bölgelerinin buluşma noktası oluşu gibi etmenler sayesinde Uludağ Bölgesi'nin kendine özgü ve oldukça zengin bir florası vardır. Tek bir yükselti şeklinde olmayıp bir dağ silsilesi şeklinde devam eden geniş bir alana sahip olması, çalılık alanlar, saf ya da karışık halde ormanlık alanlar, sulak ve nemli çayırliklar, turbalık alanlar, sarp ve açık kayalık alanlar gibi çok çeşitli habitatlara sahip olması, çok farklı tipte jeolojik yapıya (toprak ve ana kaya yapısı) ve buzul toprakları, buzul gölleri, buzul devrinden kalma kaya kitleleri gibi dünya üzerinde nadir görülen jeolojik oluşumlara sahip olması, çok sayıda endemik, lokal endemik, nadir ve tehlike altında bitki taksonunun yetiştiği bir alan olması gibi nedenlerle zengin Uludağ florası ülkemiz açısından çok büyük önem taşımaktadır (Daşkın, 2008).

Bölgede 350 – 700 m arası makiler görülür. Bu bölgenin florasını domine eden bitki *Castanea sativa* Miller. *Pseudomaquis* bitkisidir. Bunun dışında sıklıkla rastlanan bitkiler: *Pillyrea latifolia* L., *Cercis siliquastrum* L., *Juiperus oxycedrus* L., *Arbutus unedo* L, *Pistacia terebinthus* L., *Quercus infectoria* Olivier, *Fagus orientalis* Lipsky,

Carpinus betulus L., *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamp) Holmboe, *Daphne pontica* L. olarak sayılabilir.

750–1500 m bölgesinde en sık rastlanan bitkiler: özellikle 600 – 700 m seviyesinde yayılış gösteren *Fagus orientalis* Lipsky, daha yüksek bölgelerde ise *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe türü yaygındır. *Castanea sativa* Miller., *Carpinus betulus* L. and *Populus tremula* L türleri gibi farklı türler de ayrıca bu bölgede gözlemlenebilir.

1500–2100 m yükseltide, *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach ssp. *bornmuelleriana* (Matt.) Coode & Collenen en sık rastlanan bitkidir. Bu bölgede ayrıca *Fagus orientalis*, *Pinus nigra*, subsp. *pallasiana* türlerinden oluşan ormanlar bulunur. *Carpinus betulus*, *Juniperus communis* subsp. *nana* Syme, *Vaccinium myrtillus* L., *Salix caprea* L. ve *Daphne pontica* L. gibi çok sayıda farklı bitki de görülmektedir (Çetin, 1998).

2.5. Kimyasal Özellikler

Hypericum türlerinin içeriğinde birbirinden farklı ve kompleks yapıda birçok kimyasal bileşik bulunur. Özellikle en yaygın olarak kullanılan tür olan *H. perforatum* türünün kimyasal yapısının aydınlatılması için geçmişten günümüze çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda içeriğinde uçucu yağlar (α -pinen, sineol), antrakinon bileşikler, karotenoidler, kumarin, flavonoidler (hiperozit, rutin, kersetin), naftodiantron yapılı bileşikler (hiperisin, psödohiperisin), karbolik asitler, floroglusinol türevi bileşikler (hiperforin), ksanton bileşikler ve proantosiyandinler bulunduğu belirlenmiştir (Wichtl, 1994).

Tablo 2-2: *Hypericum* Türlerinde Bulunan Bazı Kimyasal Bileşikler

Fitokimyasal Sınıf	Kimyasal Bileşenler	Referans
Naftodiantronlar	Hiperisin ve psödohiperisin (%0,03–0,3), protohiperisin, protopsödohiperisin, izopsödohiperisin, siklopsödohiperisin	Nait-Si ve Fourneron, 2005 Saddiqe ve ark. 2010
Floroglusinoller	Hiperforin(%2,0–4,5), adhiperforin/psödohiperforin (%0,2–1,9), hiperfirin, adhiperfirin, furohiperforin, oksepahiperforin, hiroperoksikadiforin, aristoforin	Gartner ve ark. 2005 Patočka, 2003 Saddiqe ve ark. 2010 Tatsis ve ark. 2007
Flavonoitler (%2–4)	<u>Flavonol aglikonları</u> : kersetin, mirsetin, luteolin, kempferol, kateşin, epikateşin <u>Flavonol glikozitleri</u> : rutin, hiperozit, kersitrin, izokersitrin, astilbin, mikuelianin, kersetin 6-C-glukozit, kempferol 3-O-glukozit, kempferol 3-rutinozit, rutin-asetil	Barnes ve ark. 2001 Saddiqe ve ark. 2010 Silva ve ark. 2005 Tusevski ve ark. 2016
Biflavonlar	Amentoflavon (%0,01–0,05), I3,II8-biapigenin (%0,1–0,5), I6,II8-dikersetin	Saddiqe ve ark. 2010
Fenolik asitler	Klorojenik asit, Neoklorojenik asit, kafeik asit, gentisik asit, şikimik asit, p-kumarik asit, 3-Okumaroilkinikasit, ferulik asit, izoferulik asit, 3-feruloilkinik asit	Saddiqe ve ark. 2010 Silva ve ark. 2005 Tusevski ve ark. 2016

Tablo 2-2: *Hypericum* Türlerinde Bulunan Bazı Kimyasal Bileşikler (devamı)

Fitokimyasal Sınıf	Kimyasal Bileşenler	Referans
Proantosiyanidinler (%2–4)	Dimerik prosiyanidin B2 ve diğer dimerik, trimerik, tetramerikprosiyanidinler	Patocka, 2003
Uçucu yağlar (%0,05–0,9)	<u>Hidrokarbonlar</u> : n-oktan, 2-metiloktan, nonan, 3-metilnonan, dekan, 2-metildekan, dodekan, siklododekan, tridekan, undekan, 5-metilundekan <u>Monoterpenoidler</u> : p-simen, limonen, b-mirsen, b-osimen, afellandren, pinen, sabinen, terpinen, terpinolen, a-thujan, karvakrol, 1,8-sineol, geraniol, pulegon <u>Seskiterpenoidler</u> : a-amorfen, aromadendren, bisikloeskifellandren, b-burbonen, 1,4-kadinadien, kadinen, karyofillen, karyofillen oksit, a-sedren, akopaen, kubeben, b-elemen, farnesen, germakren-D, bimakalen, humulen, leden, a-longipinen, nerolidol, selinen, spatulenol, viridiflorol, ylangen, zingiberen	Barnes ve ark. 2001, Ghasemi Pirbalouti ve ark. 2014 Hosni ve ark. 2011
Ksantonlar (%0,01)	Kielkorin C, noratiriol, roeperanon, mangiferin, mangiferin C-prenil heksosit, 1,3,6,7-tetrahidroksiksanton, 1,3,7-trihidroksi-2-(2-hidroksi-3-metil-3-butenil)-ksanton, trihidroksi-1-metoksi C-prenil ksanton, 1,5-dihidroksi-2-metoksiksanton	Greeson ve ark. 2001 Saddiqe ve ark. 2010 Tusevski ve ark. 2016
Amino asitler (%0,01)	c-Amino butirik asit (%0,0007), sistein, glutamin, lösin, lizin, ornitin, prolin, treonin	Greeson ve ark. 2001
Doymuş alkoller	1-Dodekanol, 1-tetrakozanol, 1-hekzasozanol, 1-oktakozanol, 1-triakontanol	Brondz ve ark. 1983

2.5.1. Naftodiantron Türevi Bileşikler

Naftodiantron türevi bileşikler bitkinin yaprak, petal ve gövdesindeki siyah salgı organellerinde bulunan kırmızı renkli bileşiklerdir. Bu bileşikler üzerindeki ilk kimyasal çalışmalar 1830 yılında Buchner tarafından yapılmıştır. Buchner, bir naftodiantron bileşiği olan hiperisini bitkiden izole etmeyi başarmış ve “hypericumrot” olarak isimlendirmiştir. Hiperisinin keşfi, otlaklardaki *Hypericum* bitkilerinden çok miktarda tüketmiş olan bazı sığırların derilerinde gelişen bir fotosansibilite durumuyla oluşan hiperisizme neden olan maddeyi bulmak için yapılan çalışmalar sonucunda gerçekleştirilmiştir (Giese, 1980).

Bileşiğe hiperisin ismi 1911 yılında Cerny tarafından verilmiş, 1927 yılında ise yanlışlıkla antosiyanidinler sınıfına dahil edilmiştir. Bu yanlış daha sonra Brockmann ve arkadaşları tarafından 1942 yılında düzeltilmiş, molekül yapısı tamamen aydınlatılmış ve total sentezi açıklanmıştır. Bu keşiften sonra yapılan çalışmalarla bitkiden farklı hiperisin türevleri de izole edilmiştir (Brockmann ve ark. 1942; Bombardelli ve Morazzoni, 1995).

H. perforatum türünde total naftodiantron türevleri %0,05-0,3 oranında bulunur (ESCOP, 2003). Bitkide bulunan en önemli naftodiantron türevi bileşik hiperisindir. Kimyasal formülü $C_{30}H_{16}O_8$ olan hiperisinin temel halka yapısı antrakınon türevi bileşiklere benzese de, molekül çok daha kompleks bir aromatik sistem içermektedir. Antrakınonların üç halkalı yapısına karşılık hiperisinin yapısı sekiz halkalıdır. Bu halka yapısı tamamen aromatik olup her halkanın C atomu sp^2 hibritleşmesi yapmıştır.

Hiperisin, emodin-antranol türevi bir bileşiktir ve biyosentezi sırasında öncelikle 4, 4' bağıını taşımayan ve stabil olmayan moleküller olan protohiperisin ve psödoprotohiperisin meydana gelir (Dewick, 2003). Daha stabil bileşikler olan hiperisin ve psödohiperisine dönüşmeleri ise ışık etkisiyle gerçekleşir (Delaey ve ark. 1999).

Hiperisinin, *Hypericum* türlerinde bir çeşit caydırıcı allokimyasal madde olarak, bitkiyi zararlı böceklerden korumak amacıyla sentezlendiği düşünülmektedir. Çok az sayıda böcek fiziksel veya biyokimyasal olarak hiperisin içeren bitkilerle beslenebilecek şekilde evrimleşmeyi başarabilmiştir. Bu durum hiperisinin bitkiyi zararlı

mikroorganizmalardan koruma açısından önemli bir bileşik olduğunu göstermektedir (Giese, 1980).

Hiperisin ve psödohiperisin, *Hypericum* türlerinin çok önemli birtakım farmakolojik etkilerinden sorumlu maddelerdir. Kurutulmuş bitki içerisinde toplam %0,1-0,15 oranında hiperisin ve psödohiperisin bulunmaktadır. Ayrıca bitkinin kimyasal bileşiminde hiperisin biyosentezinin öncü maddelerinden olan izohiperisin, protohiperisin, protopsödohiperisin; ayrıca psödohiperisinin oksidasyon ürünü olduğu düşünülen siklopsödohiperisin de bulunmaktadır. Standardize alkollü ekstrede yaklaşık %0,15 oranında hiperisin vardır (Barnes ve ark. 2007).

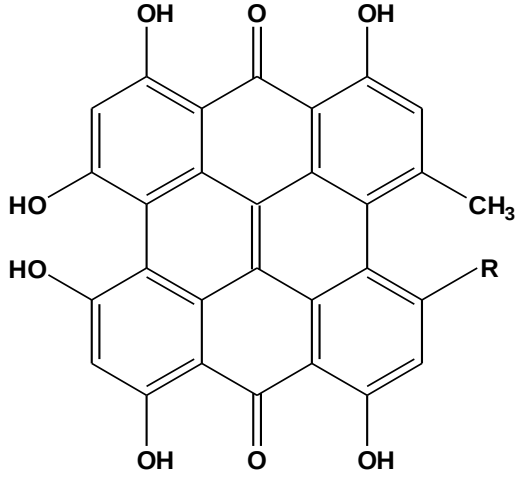
Yapılan araştırmalar, *Hypericum* cinsine ait bitkiler dışında hiperisin ve psödohiperisin taşıyan bitkinin, yine Hypericaceae familyasına ait *Harungana madagascariensis* Lamarck et Poiret olduğunu göstermektedir. Bu bileşikler bitkinin yapraklarında bulunur. (Fisel ve ark. 1966; Hölzl ve Petersen, 2003).

Hiperisinin antiviral etkiye sahip olduğu yapılan bazı *in vitro* ve *in vivo* deneylerle kanıtlanmıştır. Bu durum, edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS) tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir molekül olarak değerlendirilmesi nedeniyle hiperisinin büyük ilgi çekmesine neden olmuştur. Ancak klinik deneyler yüksek dozlarda alındığında dahi hiperisinin AIDS üzerinde böyle bir etkisinin olduğunu henüz doğrulamamaktadır. Hiperisinin antiviral aktivitesini aydınlatmak amacıyla hala birçok *in vivo* çalışma yapılmaktadır (Meruelo ve ark. 1988; Jacobson ve ark. 2001).

Doğada bulunan maddeler arasında en güçlü fotosensibilizan etkinlik gösteren maddenin hiperisin olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan ve hiperisinin çok yönlü fotodinamik aktivitesini açıklayan birçok *in vitro* çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar, hiperisinin ışıkla aktive olduğunda protein kinaz C enzimini ve büyüme faktör tarafından stimüle edilen bazı diğer protein kinazları inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca süperoksit dismutaz aktivitesini artırır, hücrel glutatyon seviyesini azaltır, membran lipid peroksidasyonunu indükler ve mitokondriyal fonksiyonların zayıflamasına neden olur (Utsumi ve ark. 1995; Hadjur ve ark. 1996; Chaloupha ve ark. 1999).

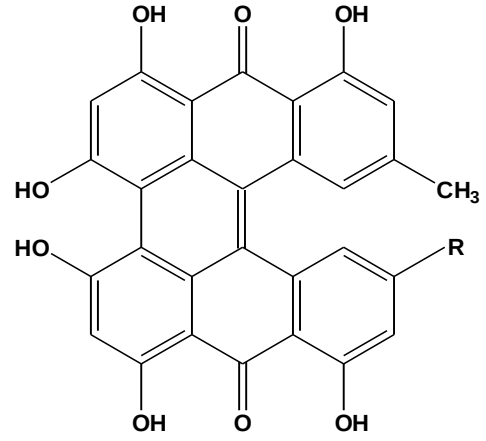
Hiperisin güçlü fotosensibilizan özelliğinden dolayı kanser tedavisinde etkili olan antitümoral fotodinamik terapide kullanılabilecek potansiyel bir madde olarak değerlendirilmekte ve bu amaçla yapılan çalışmalar devam etmektedir.

Şekil 2-1: *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Naftodiantron Türevlerinin Açık Formülleri



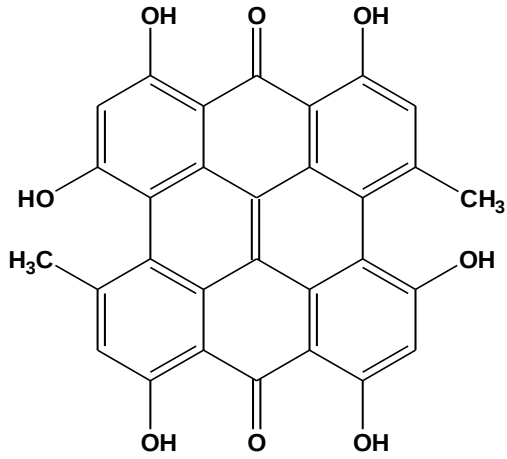
Hiperisin $R = CH_3$

Psödohiperisin $R = CH_2OH$

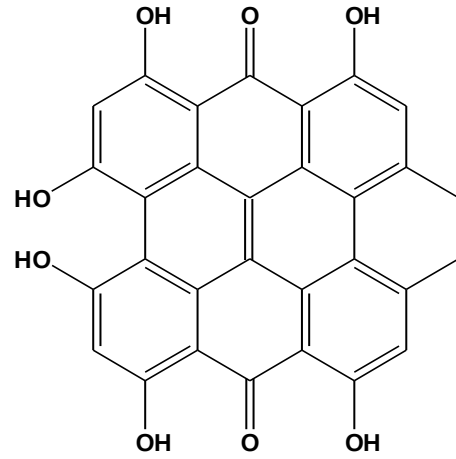


Protohiperisin $R = CH_3$

Psödoprotohiperisin $R = CH_2OH$



İzohiperisin



Siklopsödohiperisin

2.5.2. Floroglusinol Türevi Bileşikler

Floroglusinol türevi bileşikler ikincil metabolitlerdir. Dünya üzerinde birçok farklı bitkinin, deniz canlısının ve mikroorganizmanın bileşiminde bulunmaktadır. Oldukça farklı bir molekül yapıları vardır ve bulundukları bitkilerde bazı çeşitli çok güçlü biyolojik aktivitelerden sorumludurlar. Floroglusinol türevi yaklaşık 1000 kadar molekülün yapısı aydınlatılmıştır, yapılan çalışmalar sonucu bu sayı her yıl artmaktadır (Singh ve Bharate, 2006).

Çok sayıda floroglusinol bileşiğinin mevcut olması ve bunların da yapısal olarak çok farklı çeşitlerinin bulunması nedeniyle net bir sınıflandırma sistemi oluşturmak çok kolay değildir. Bu amaçla yapılan iki büyük çalışmanın ilki bu grup bileşiklerin sadece bitkilerde değil; diğer bazı organizmalarda da bulunduğunu göstermektedir. (Singh ve Bharate, 2006). Diğer çalışma ise yalnızca *Hypericum* bitkilerinden izole edilen floroglusinol bileşiklerine odaklanmıştır (Schmidt ve Heilmann, 2013). Sadece *Hypericum* türlerinde bulunan bileşikler dahi çok farklı yapılara sahip olduğundan sınıflandırılmaları oldukça zordur.

Temel olarak bileşikler mono-, bi-, tri-, tetramerik vb. olarak ayrılırlar. Ayrıca monosiklik, bisiklik ve polisiklik türevler de vardır (MPAPlar – monosiklik poliprenil açılfloroglusinoller; BPAPlar –bisiklik poliprenil açılfloroglusinoller; PPAPlar – polisiklik poliprenil açılfloroglusinoller). İzopren ve geranil zincirli moleküller siklizasyon ile orto- veya para- pozisyonlarında halkalı yapı oluşturarak beş halkalı (furan) veya altı halkalı (piran) türevlerini meydana getirirler. Hatta epoksi ve hemiasetal floroglusinol türevleri bile mevcuttur. Ayrıca bu türevlerin birleşerek kompleks tek bir bileşik halinde bulunduğu moleküller de vardır.

Tablo 2-3: *Hypericum* Türlerinde Bulunan Bazı Floroglusinol Türevi Bileşikler

Tür Adı	İçerdiği Floroglusinol Bileşiği	Referans
<i>H. erectum</i>	Otogirin, Otogiron, Erektion A, Erektion B, Erektion C	Moon, 2010
<i>H. erectum</i>	Erekton A ve B	An ve ark. 2002
<i>H. polyanthemum</i>	Uliginosin B	Cargnin ve ark. 2010
<i>H. brasiliense</i>	Japonisin A, Uliginosin B İzouliginosin B	Franca, 2009; Leal ve ark. 2010
<i>H. ascyron</i>	Tomoeon A-H	Hashida ve ark. 2008
<i>H. japonicum</i>	4,6-Dimetil1-O-[A-L-Ramnopiranozil-(1->6)-B-D-Glukopiranozil]	Wang ve ark. 2008
<i>H. japonicum</i>	Flaveson, Sarotralin Sarotralen B	Hu ve ark. 2000
<i>H. japonicum</i>	Sarotialen A, Sarotralen B Sarotalin G	Peng ve ark. 2006
<i>H. empetrifolium</i>	3-Geranil-1-(2'-Metilpropanoil)Floroglusinol 3-Geranil-1-(2'-Metilbutanoil)Floroglusinol	Crockett ve ark. 2008
<i>H. annulatum</i> subsp. <i>annulatum</i>	Hiperatomarin	Momekov ve ark. 2008

Tablo 2-3: *Hypericum* Türlerinde Bulunan Bazı Floroglusinol Türevi Bileşikler (Devamı)

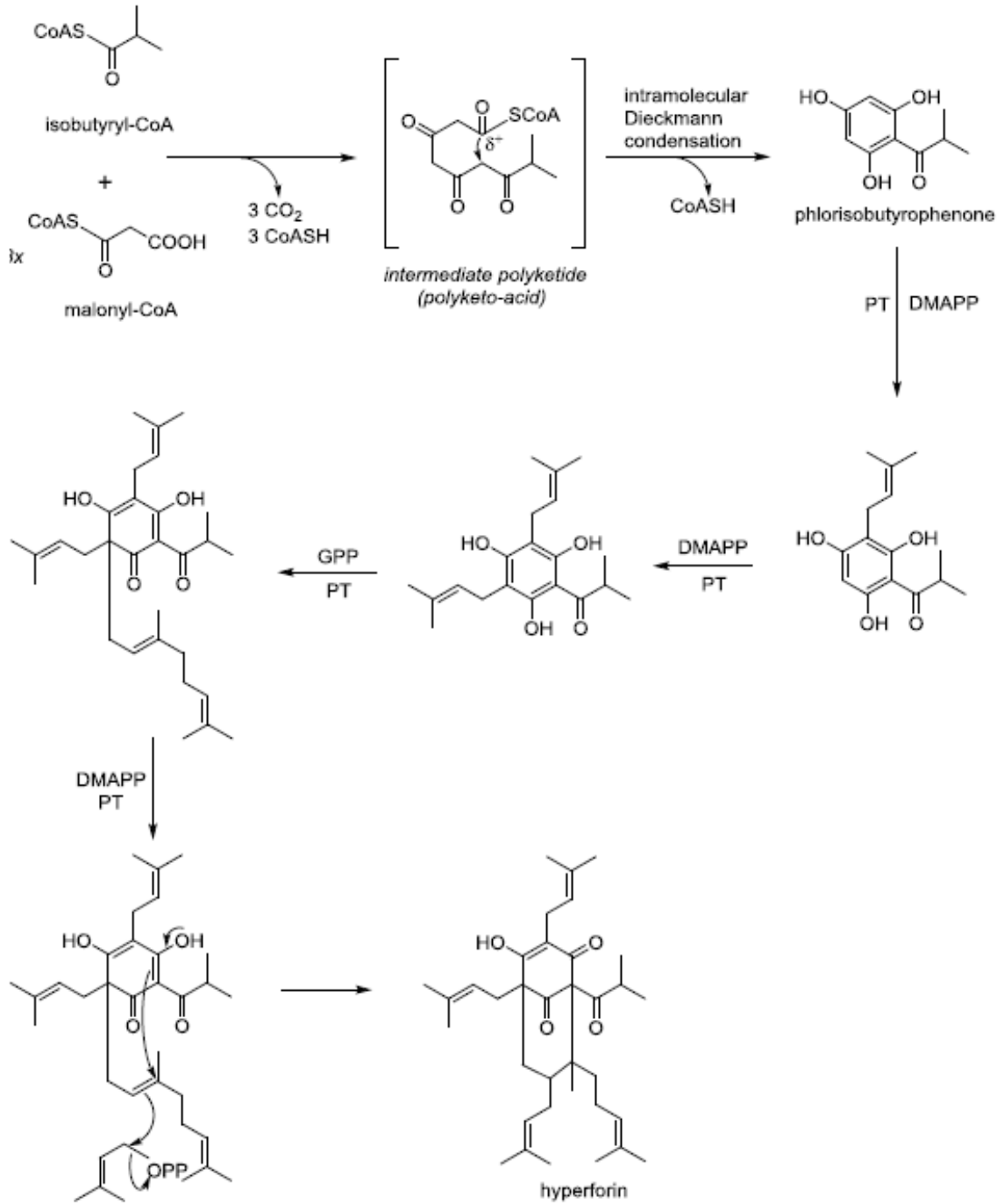
Tür Adı	İçerdiği Floroglusinol Bileşiği	Referans
<i>H. pseudopetiolum</i> var. <i>kusianum</i>	Petiolin A-C	Tanaka ve ark. 2008a
<i>H. perfoliatum</i>	Hiperfoliatin	Do Rego ve ark. 2007
<i>H. jovis</i>	Hiperjovinol A ve B	Athanasias ve ark. 2004
<i>H. sampsonii</i>	2,4,6-Trihidroksibenzofenon; 2,4,6- Trihidroksibenzofenon-4- O-Geranil Eter; 2,4,6-Trihidroksibenzofenon-3-C- Geranil Eter; Sampsonion D ve H Hipersampson A-F	Lin ve Wu, 2003
<i>H. atomarium</i> subsp. <i>degenii</i>	Hiperatomarin	Savikin-Fodulovic ve ark. 2003
<i>H. papuanum</i>	Papuaforin A-E, Hiperquinon A-B Hiperpapuano İalibinon A-E	Winkelmann ve ark. 2001
<i>H. brasiliense</i>	Hiperbrasilol B ve C, İzohiperbrasilol B	Rocha ve ark. 1996

Bitkinin içerdği fluoroglusinol bileşiğinin yapısal farklılıkları bitkinin biyolojik aktivitesini belirler ve kemotaksonomik sınıflandırmada bu farklılıklardan yararlanılır. Norman Robson, *Hypericum* türü bitkileri sınıflandırırken içerdikleri floroglusinol bileşiklerini de dikkate almıştır (Robson 1977; Robson 2002). Örneğin; 14. ve 15. seksiyondaki türler sadece monosiklik O- glukozit türevi floroglusinoller içerirken; 10. seksiyonda yer alan türler yalnızca o-prenil veya geranil türevi; 13. seksiyondaki türler ise henüz tanımlanmamış birtakım polisiklik bileşikler içermektedir.

Hypericum türlerinin çiçeklerinde ve olgun meyvelerinde bulunan, tanımlanmış 300'den fazla floroglusinol türevi bileşik mevcuttur (Schmidt ve Heilmann, 2013). Hiperforin bu bileşikler içinde en önemli olanıdır ve antibakteriyel özelliği nedeniyle ilk kez Rus bilim insanı Gurevich ve arkadaşları tarafından 1971 yılında keşfedilmiştir (Gurevich ve ark. 1971).

Hiperforin molekülünün yapısı ve fizyokimyasal özellikleri üzerinde 1975'ten beri birçok çalışma yapılmıştır ve temel molekül yapısı maddenin kimyasal bozunmasından yola çıkılarak aydınlatılabilmektedir. Ayrıca bitkide hiperforinden çok daha az miktarda bulunan, yine floroglusinol yapısında adhiperforin adlı bir bileşik izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. (Kraus ve ark. 2003). Adhiperforin, hiperforin homologu bir maddedir ve *H. perforatum* bitkisinde bulunan diğer floroglusinol türevi bileşiktir.

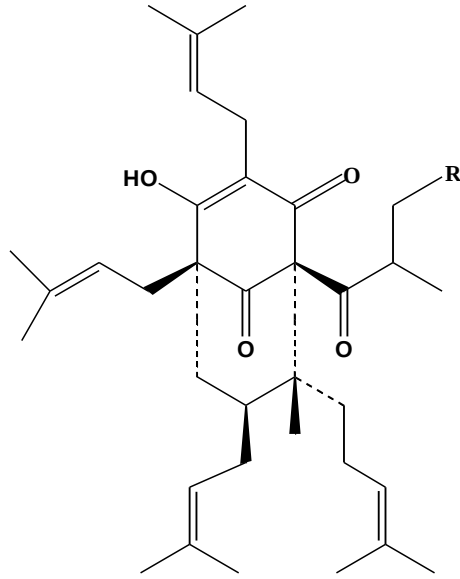
Hiperforinin biyosentez tepkimesi tam olarak aydınlatılmış olmamakla birlikte, bu amaçla yapılan çalışmalar sonucunda bir tepkime modeli oluşturulmuştur ve sentezin bu şekilde gerçekleştiği kabul görmektedir. Floroglusinol türevi bileşikler asetat-malonat yolağıyla oluşan poliketid yapılı bileşiklerdir. Tepkime CoA ile aktifleşmiş aromatik veya alifatik asidin (asetil-CoA, propiyonil-CoA, butiril-CoA, izobutiril-CoA, 2-metilbutiril-CoA), üç molekül malonil-CoA ile reaksiyona girmesiyle başlar (Avato, 2005). Burada oluşan dekarboksilat Claisen kondensasyonu poliketid sentaz isimli bir enzim tarafından katalize edilir. Oluşan poliketid ara ürününün molekül içi Dieckmann kondensasyonu ile düz zincirli halinden halkalı yapıya dönüşmesiyle floroglusinolün genel yapısı ortaya çıkar. Bunun ardından pireniltansferaz enzimiyle dimetilallilpirofosfat (DMAPP) molekülle tepkimeye girer ve hiperforin bileşiği meydana gelir (Beerhues, 2006; Klingauf ve ark. 2005; Dakanali ve Theodorakis, 2011).



Şekil 2-2: Hiperforin Biyosentez Reaksiyonu (Beerhues, 2006), modifiye edilmiştir. (Klingauf ve ark. 2005; Dakanalı ve Theodorakis, 2011).

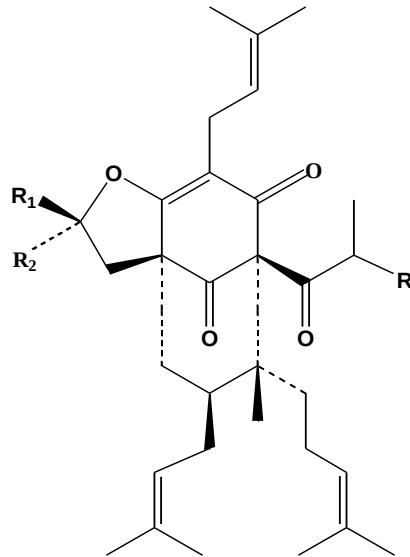
Hiperforin *H. perforatum* bitkisinin yapraklarında ve çiçeklerinde kuru ağırlıklarının yaklaşık %5'i oranında bulunur. Ancak, kimyasal olarak stabil bir molekül olmamasından dolayı, bitki uygun koşullarda kurutulmadığında içerdiği hiperforin miktarı ciddi oranda azalabilmektedir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle yapılan analizler ticari olarak piyasada bulunan kuru ekstre örneklerinde hiperforin içeriğinin %1,18-6,54 arasında değiştiğini göstermektedir (Bergonzi ve ark. 2001). Hiperforin ısıya ve ışığa oldukça duyarlı bir moleküldür, bu nedenle bitkinin sıcaktan ve ışıktan oldukça iyi korunması gerekmektedir (Bilia ve ark. 2001).

Ayrıca hiperforinin izole edilmesi amacıyla yapılan bazı çalışmalar sırasında İtalyan bilim insanı Luisella Verotta tarafından bitkiden çok düşük oranlarda farklı floroglusinol türevleri de izole edilmiştir. Bu bileşiklerin hiperforinin sentezi aşamasında oluşan oksidasyon ürünleri ve türevleri veya artefaktlar olduğu konusunda tartışmalar devam etmektedir. Bitkide bulunan bu türevler furohiperforin (=ortofoforin), deoksifurohiperforin, deoksihidroperoksifurohiperforin, furoadhiperforin, oksepahiperforin ve 8-hidroksihiperforin-8,1-hemiasetal olarak adlandırılmaktadır (Zanoli, 2004; Hostettmann ve Wolfender, 2005). Tatsis ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada *H. perforatum* türünden hiperforin ve adhiperforin sentezinin öncü maddeleri olduğu düşünülen iki yeni floroglusinol türevi molekül izole edilmiş, bunlar hiperfirin ve adhiperfirin olarak adlandırılmışlardır (Tatsis ve ark. 2007).



Hiperforin **R = H**

Adhiperforin **R = CH₃**



Deoksifurohiperforin **R = CH₃ R₁ = H R₂ = H**

Şekil 2-3: *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Floroglusinol Türevlerinin Açık Formülleri

H. erectum Thunb. türünden elde edilen floroglusinol türevleri olan otogirin ve otogiron moleküllerinin antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin koagülasyon mekanizmasında rol oynayan tromboksan A2 ve lökotrien D3 üzerinde inhibitör etkilerinin olduğu saptanmıştır (Tada ve ark. 1991). Aynı türden 2016 yılında Lu ve arkadaşları altı yeni floroglusinol türevi bileşik izole etmişlerdir. Bunlar adotogirinin ve erekrisin A-E olarak isimlendirilmişlerdir (Lu ve ark. 2016).

H. sikokumontanum türünden iki monomerik floroglusinol türevi bileşik izole edilmiş, bunlara takaneol A ve takaneol B isimleri verilmiştir (Tanaka ve ark. 2008b).

H. calycinum türünden izole edilen monomerik floroglusinol türevi bir bileşik olan, 1-(3,5-dihidroksi-1-((3-metilbut-2-enil)oksi)fenil)-2-metil-1-metilbutan-1-on bileşiğinin *Cladosporium cucumerinum* suşu üzerinde antifungal ve *Plasmodium falciparum* suşu üzerinde antimalaryal etkisinin olduğu saptanmıştır (Decosterd ve ark. 1991). Decosterd ve arkadaşları ayrıca *H. monogynum* türünden hiperkalin A isimli bir floroglusinol türevi bileşik elde etmiştir (Decosterd ve ark. 1989).

H. polyanthemum türünden elde edilen bazı floroglusinol türevi bileşikler, 6-izobutiril-5,7-dimetoksi-2,2-dimetil-benzopiran, 7-hidroksi-6-izobutiril-5-metoksi-2,2-dimetil-benzopiran ve 5-hidroksi-6-izobutiril-7-metoksi-2,2-dimetil-benzopiran'dır (Ferraz ve ark. 2001). Bu üç bileşiğin NCIH460 büyük hücreli akciğer karsinoma, HT-29 kolorektal karsinoma, U373 MF glioblastoma astrositoma hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesinin olduğu belirlenmiştir (Ferraz ve ark. 2005).

H. roeperianum türünden elde edilen floroglusinol türevi bileşik olan kiperkumin E bileşiğinin anti-stafilokok aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tala ve ark. 2015). Ayrıca yine aynı türden madeleinol A ve B, empetriferdinol, empetrikarinol A ve B, 3-geranil-2,4,6-trihidroksibenzofenon, 3-geranil-1-(2'-metilpropanoil)-floroglusinol ve 3-geranil-1-(2'-metilbutanoil)-floroglusinol adlı sekiz yeni floroglusinol türevi izole edilmiştir (Fobofou ve ark. 2015).

H. scabrum türünden, hiperibrin A ve B (Gao ve ark. 2016a) ve hiperskabronlar H-I (Gao ve ark. 2016b) bileşikleri izole edilmiştir. Hiperibrin A ve hiperskabron I'nın nöroprotektif ve hepatoprotektif etkiye sahip bileşikler olduğu tespit edilmiştir.

H. andinum türünden andinin A isimli dimerik açılfloroglusinol türevi bir bileşik elde edilmiş ve bu bileşiğin, 3 mg/kg dozda farelerde antidepresan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ccana-Ccapatinta ve ark. 2014).

H. laricifolium türünden hiperlarisifolin adı verilen dimerik açılfloroglusinol türevi bileşik izole edilmiştir (Ccana-Ccapatinta ve von Poser, 2015).

H. austrobrasiliense türünden üç yeni dimerik açılfloroglusinol türevi bileşik izole edilmiştir. Austrobrasilol A, austrobrasilol B ve izoaustrobrasilol B adı verilen bileşiklerin fareler üzerinde antinosiseptif aktivite gösterdiği saptanmıştır (Bridi ve ark. 2016).

H. perforatum ekstrelerinin antidepresan aktivitesini saptamak için geçmişten günümüze yapılan birçok farmakolojik çalışma, hiperforinin antidepresan aktivite üzerinde en büyük rolü oynayan madde olduğunu göstermektedir. Hiperforin molekülünün kendisi veya hiperforince zengin CO₂ ekstresiyle yapılan ön çalışmalar antidepresan etkinin gerçekten de floroglusinol türevi bileşiklerden kaynaklandığını ispatlar niteliktedir. Bu çalışmalarda, hiperforin saf halde veya daha stabil olan disikloheksilamonyum (DCHA) tuzu halinde kullanılmıştır. (Butterweck ve ark. 2003; Chatterjee ve ark. 1998).

Yeni keşfedilen floroglusinol bileşiklerinin neredeyse tamamı üzerinde biyolojik ve farmakolojik etkilerini saptamak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Buna göre antidepresan etki dışında başka etkilerin de floroglusinol türevlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bilinen bazı etkiler; antiproliferatif etki (Schmidt ve ark. 2012; Pinhatti ve ark. 2013; Sun ve ark. 2014) sitotoksik etki (Chen ve ark. 2011; Liu ve ark. 2013), antinosiseptif etki (Stolz ve ark. 2014) antioksidatif etki (Sun ve ark. 2014), larvisidal etki (Mitsopoulou ve ark. 2014), antianjiogenik etki (Schmidt, 2013), antimikrobiyal etki (Tanaka ve ark. 2011), anti-enflamatuar etki (Crockett ve ark. 2008), analjezik etki (Stolz ve ark. 2016), antiviral etki (Hu ve ark. 2016), nöroprotektif etki (Gao ve ark. 2016), antifungal etki (Tanaka ve ark. 2008a), siklooksijenaz-1 ve siklooksijenaz-2 inhibisyonu (Henry ve ark. 2009) olarak sıralanabilir.

2.5.3. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerin sekonder metabolitlerinin önemli bir sınıfıdır. Bitkilerde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Renkli bileşikler oldukları için, bitkiye renk vererek polen taşıyıcılar için cazip hale getirme görevleri vardır. Yapraklarda ise, bitkiyi bazı patojen mantarlardan ve UV-B radyasyondan korurlar. Ayrıca flavonoidler, enerji transferinde, fotosensibilizasyon reaksiyonlarında, bitki büyüme hormonlarının kontrolünde ve fotosentezde de rol almaktadır. İki fenil halkası ve bir hetero halkadan oluşan bu bileşikler, hetero halkanın farklı yükseltgenme derecelerine göre flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanonoller, flavon-3-oller, flavon-3,4-dioller, antosiyanidinler, auronlar gibi çeşitli alt sınıflara ayrılmıştır (Cushnie ve Lamb, 2005).

Hypericum türleri genellikle ana flavonoid bileşiklerinden kersetin ve glikozitlerini içermektedir. Bu bileşiklerden kersetin-3-galaktozid majör flavonoid olarak bitkiden izole edildiğinde ilk olarak “hiperisin” olarak adlandırılmış, bu yanlış adlandırma Sprecher tarafından düzeltilmiş ve kersetin-3-galaktozid daha sonra “hiperozid” olarak adlandırılmıştır. Bitki içeriğinde yaygın olarak bulunan diğer kersetin glikozitleri, kersetin-3-O-ramnozid (kersitrin), kersetin-3-O-glikozid (izokersitrin) ve kersetin-3-O-rutinozid (rutin) olarak belirlenmiştir. Dihidrokersetin, luteolin, kempferol ve mirsetin ise *Hypericum* türlerinden izole edilen minör flavonoid aglikonlarını oluşturmaktadır.

H. perforatum türünün kimyasal bileşiminde %1,6 rutin, %0,9 hiperozid ve %0,3 izokersitrin olmak üzere yaklaşık %2-4 oranında flavonoid bileşikleri ile %0,05-0,01 oranında amentoflavon (I3', II8 biapigenin) ve %0,1-0,5 oranında I3, II8 biapigenin bulunmaktadır (Hostettmann ve Wolfender, 2005).

Napoli ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı güncel bir çalışmada toplam 11 adet *Hypericum* türünün (*H. aegypticum*, *H. perforatum*, *H. calycinum*, *H. hircinum*, *H. androsaemum*, *H. hirsutum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. pubescens*, *H. tetrapterum*, *H. patulum*) içerdikleri flavon bileşikleri araştırılmış ve kateşin, kersetin-3-O-rutinozid, kersetin-3-O-galaktozid, kersetin-3-O-glukozid, kersetin-3-O-ramnozid ve kersetin içerdikleri tespit edilmiştir. Bunlardan sadece *H. perforatum* türünde bu bileşiklere ek olarak mirsetin-3-O-ramnozid de bulunmaktadır (Napoli ve ark. 2018).

Tocci ve arkadaşlarının 2018 yılında yayımlanan çalışmasına göre, kersetin ve kersetin glukozitleri *H. montanum* türünde 5,21 mg/g; *H. hircinum* subsp. *Majus*

türünde 9,4 mg/g oranında bulunmaktadır. *H. perforatum* türünde kersetin-3-O-ramnozid oranı 132,9 µg/g'dır. Kersetin-3-glukuronit de *H. hircinum* subsp. *majus* (28,8 µg/g) ve *H. perforatum* türlerinde tespit edilmiştir (Tocci ve ark. 2018).

Mathioudaki ve arkadaşları 2018 yılında Girit adasına ait endemik bir tür olan *Hypericum kelleri* Bald ile bir çalışma yürütmüşlerdir. Kersetin, avikularin ve I3,II8-biapigenin içerdiğini tespit etmişlerdir (Mathioudaki ve ark. 2018).

H. wightianum ile yapılan bir çalışmada bilinen flavon bileşiklerinin yanında yeni bir flavon bileşiği izole edilmiş ve wigtianin olarak isimlendirilmiştir (Tao ve Wu, 2004).

Diaz ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışma sonucunda *H. canariense* türünden suda çözünebilen beş yeni flavon glikoziti, kersetin-3-glukopiranuronat ve bunun poliasetat türevleri izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Diaz ve ark. 2010).

H. ternum türünün flavonoit bileşikleri üzerine yapılan bir çalışmada *Hypericum* türlerinin bilinen flavonoitlerinin dışında guajaverin bileşiği tanımlanmıştır (Pinhatti ve ark. 2010).

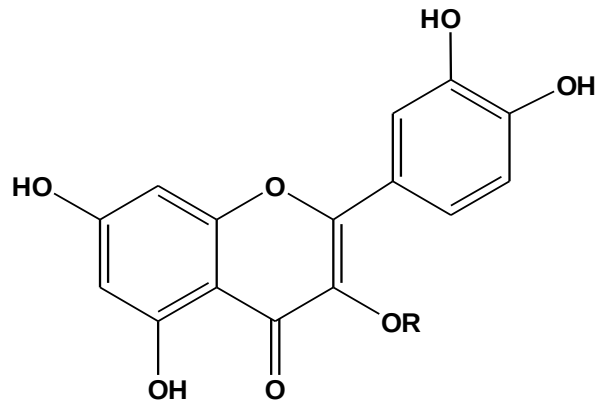
Farklı *Hypericum* türlerinden yeni bileşiklerin izole edildiği ve tanımlandığı çalışmalar dışında bilinen flavonlar ve türevlerinin elde edildiği çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Çakır ve arkadaşlarının 2003 yılında yürüttüğü bir çalışmada *H. hyssopifolium* türünde I3, II8-biapigenin, kersetin, kersetin-3-O- α -arabinofuranozit, kersetin-3-O- β -D-galaktopiranozit ve kersetin-3-O- β -D-galaktopiranozit-7-O- β -D-glukopiranozit olmak üzere bilinen beş flavon bileşiği tanımlanmıştır (Çakır ve ark. 2003).

H. calycinum türünden rutin, kersetin, kersitrin, hiperozit, izokersitrin, mikuelianin (kersetin-3-O- β -D-glukopiranozit) ve I3, II8-biapigenin izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Kırmızıbekmez ve ark. 2009).

H. triquetrifolium ile yapılan bir çalışmada rutin, hiperozit, apigenin-7-O-glukozit, kempferol, kersitrin, kersetin ve amentoflavon izole edilmiştir (Çırak ve ark. 2011). *H. richerii* türü ile yapılan bir çalışma sonucu kersetin, izokersitrin, mirsetin-3-O-glukozit ve I3, II8-biapigenin elde edilmiştir (Zdunic ve ark. 2011).

H. perforatum türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen farklı ekstraktlar ile birçok çalışma yapılmıştır. Metanol ekstresi ile yapılan bir çalışmada rutin, mikuelianin, hiperozit, kersitrin elde edilmiştir (Kırmızıbekmez ve ark. 2008). Orčić ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yürütülen başka bir çalışmada bu bileşiklere ilave olarak kersetin, I3, II8-biapigenin, amentoflavon (I3', II8 biapigenin) izole edilmiştir (Orčić ve ark. 2011).

Tatsis ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada yine metanol ekstresinden, bu bileşiklere ek olarak astilbin [2(R):3(R)-taksifolin-3- α -L-ramnopiranozit] izole edilmiştir (Tatsis ve ark. 2007).



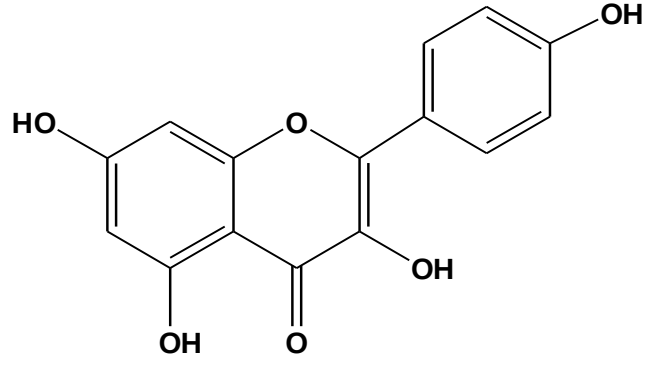
Rutin: R = Ramnoglukozit

Hiperozit: R = Galaktozit

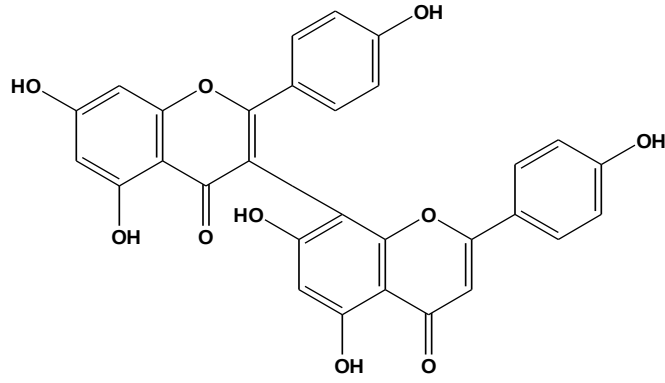
İzokersitrin: R = Glukozit

Kersitrin: R = Ramnozit

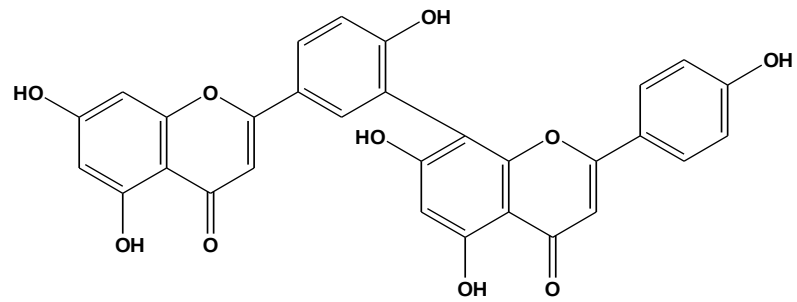
Kersetin: R = H



Kempferol



I3, II8 – biapigenin



Amentoflavon (I3', II8 – biapigenin)

Şekil 2-4: *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Flavonoit Bileşiklerinin Açık Formülleri

Paulke ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *H. perforatum* türünün sahip olduğu antidepresan etki üzerinde flavonoit bileşiklerinin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla deney hayvanlarının kullanıldığı farklı davranışsal deneyler yapılmıştır. Rutin ve izoramnetinin, *H. perforatum* ekstresinde hiperforin ile birlikte antidepresan etkiye yaptığı katkı incelenmiş, aynı zamanda bu bileşiklerin farmakokinetik özellikleri de araştırılmıştır (Paulke ve ark. 2008). Bu amaçla 2005 yılında Schulz ve arkadaşlarının insan plazmasında *H. perforatum* flavonoitlerinin farmakokinetik profilini belirlemek için yaptığı bir çalışma daha vardır (Schulz ve ark. 2005).

Celep ve arkadaşlarının 2017 yılında yayımlanan çalışması *H. perforatum* türünün insan sindirim sistemi içerisinde aldığı yol ile flavon bileşiklerinin miktarındaki değişimi göstermek amacıyla yapılmıştır. Buna göre; sindirime uğramamış 1 g kuru ekstrede kersetine eşit flavonoit miktarı $52,04 \pm 0,94$ mg iken; midede sindirime uğradıktan sonra $49,77 \pm 1,01$ mg; intestinal hücrelerde $63,69 \pm 0,87$ mg; kolonu terk ettiğinde ise $111,61 \pm 3,20$ mg'dir (Celep ve ark. 2017).

Antidepresan etki üzerinde flavonoit bileşiklerinin rolünü saptamak için yapılan deneyler, *H. perforatum* ekstresinin antidepresan etkisinin ekstrede hem hiperforin, hem de flavonoit bileşiklerinin bulunduğu durumlarda arttığını göstermektedir. Bu durum antidepresan etki üzerinde flavonoit bileşiklerinin de katkısı olduğunu ispatlamaktadır.

2.5.4. Fenolik Asitler

Hypericum türlerinin bileşiminde çeşitli fenolik asitler bulunmaktadır. Özellikle en çok bilinen ve en yaygın olarak kullanılan tür olan *H. perforatum* türünün içeriğinde bulunan fenolik asitlerin yapısının aydınlatılmasıyla ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur.

Jürgenliemk ve Nahrstedt'in 2002 yılında *H. perforatum* bitkisinin toplam fenolik bileşiklerini araştırmak amacıyla yaptığı çalışmalar sonucu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle 22 adet fenolik bileşik tespit edilmiştir. Bunlardan fenolik asit olarak neoklorojenik asit (3-O-[E]-kafeoilkinik asit), protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit), kriptoklorojenik asit (4-O-[E]-kafeoilkinik asit), 3-O-[E]-p-

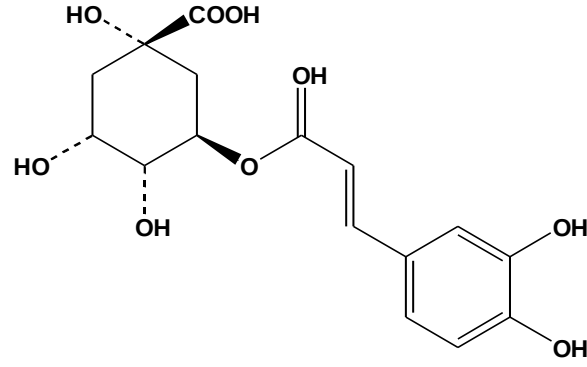
kumaroilkinik asit, 3-O-[Z]-p-kumaroilkinik asit saptanmıştır (Jürgenliemk ve Nahrstedt, 2002).

Tatsis ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada 3-O-kumaroilkinik asit, Zhang ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada ise 3-O kafeoilkinik asit ve türevleri *H. perforatum* türünden izole edilmiştir (Tatsis ve ark. 2007; Zhang ve ark. 2011).

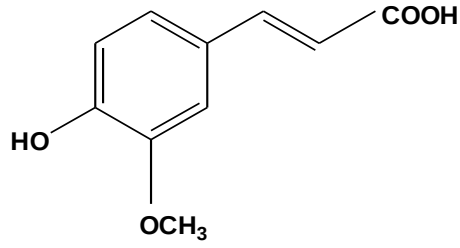
H. richeri itürü ile yapılan bir çalışma sonucu ise mirsetin-3-O-kafeoilkinik asit ve mirsetin-5-O-kafeoilkinikasit elde edilmiştir (Zdunic ve ark. 2011).

Tusevski tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışma sonucu *H. perforatum* bitkisinin köklerinde kinik asit, klorojenik asit, 3-p-kumaroilkinik asit ve 3-feruloilkinik asit bulunduğu belirlenmiştir (Tusevski ve ark. 2018).

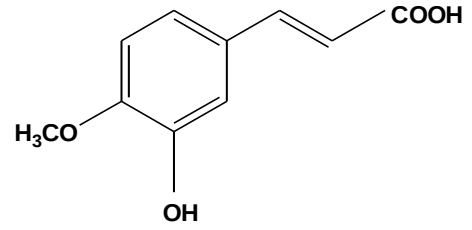
Tocci ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu çalışma ise fenolik bileşik içeriklerine göre bazı *Hypericum* türlerini sınıflandırmayı amaçlamıştır. Bu çalışmaya göre *H. cardonae* türünde bulunan fenolik asitler; sinnamik asit, 3,5-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit, gallik asit, 2,6-dihidroksibenzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asittir. *H. cuatrecasii* türünde bulunan fenolik asitler; 3,5-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit, gallik asit, 2,6-dihidroksibenzoik asit, neoklorojenik asit, sinnamik asit, *p*-hidroksibenzoik asittir. *H. myricariifolium* türünde *H. cuatrecasii* türüyle aynı fenolik asitler bulunmaktadır: 3,5-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit, gallik asit, 2,6-dihidroksibenzoik asit, neoklorojenik asit, sinnamik asit, *p*-hidroksibenzoik asit. *H. humboldtianum* türünde 3,5-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit, gallik asit, 2,6-dihidroksibenzoik asit, neoklorojenik asit, sinnamik asit bulunmaktadır. *H. carinosum* türünde bulunan fenolik asitler; kafeik asit, 3,5-dihidroksibenzoik asit, 2,6-dihidroksibenzoik asit, sinnamik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asittir. *H. laricifolium* türü sinnamik asit, 3,5-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit, gallik asit, 2,6-dihidroksibenzoik asit, neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asit içermektedir. *H. garciae* türünde ise 3,5-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit, sinnamik asit, neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asit bulunmaktadır (Tocci ve ark. 2018).



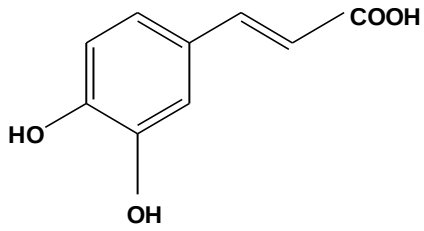
Klorojenik asit



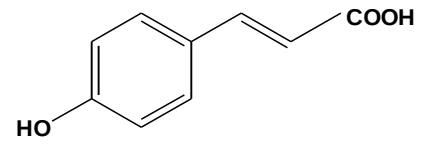
Ferulik asit



İzoferulik asik



Kafeik asit

*p*-kumarik asit

Şekil 2-5: *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Başlıca Fenolik Asit Türevlerinin Açık Formülleri

2.5.5. Tanenler ve Proantosiyanidinler

Tanenler insan ve hayvan sağığı üzerinde olumlu etkileri olan azotsuz polifenolik bileşiklerdir (Ruiz-Aguilar ve ark. 2004). Bitkide tanen üretimi, bitkinin genetik yapısına, fizyolojik ihtiyaçlarına ve evrimsel olarak gelişen savunma ihtiyaçlarına bağılı olarak meydana gelmektedir (Bryant, Reichardt ve ark. 1992).

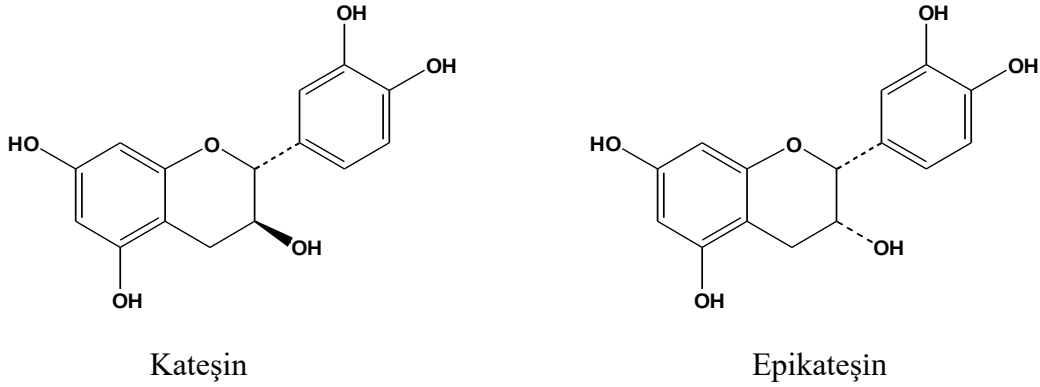
Kondanse tanen bileşiklerinin *Hypericum* türlerindeki varlığı 1925'te Podoko tarafından belirlenmiş ve ilerleyen yıllarda da bu alandaki çalışmalarla daha detaylı bilgi edinmek mümkün olmuştur. Bitkide proantosiyanidinler kuru ağırlığın yaklaşık %12'sini oluşturmaktadır (Melzer ve ark. 1991). Proantosiyanidin karışımında kateşin ve epikateşin türevleri yer almaktadır.

Hypericum türlerinde kondanse tanen bileşikleri sıklıkla ve yüksek oranda (%16'ya kadar) bulunur (Kartnig ve ark. 1989).

H. perforatum türünün kimyasal bileşiminde kondanse tanenlerin varlığı 1925 yılında saptanmış, 1953 yılında Neuwald ve Hagenström tarafından bitkinin sürgünlerinde %3,8, yapraklarında %12,4 ve çiçeklerinde %16,2 oranında bulunduğu belirlenmiştir (Ernst, 2003).

Tanenlerin antifungal, antibakteriyel ve antiviral etkili bileşikler oldukları yapılan birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Ayrıca tanen molekülleri mutajen maddelerin mutajenik etkisini azaltırlar ve antikarsinojenik özellikli bileşiklerdir. Tanenlerin bu özelliğı antioksidan olmalarıyla açıklanır (Chung ve ark. 1998).

Dall'Agnol ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışma ile *H. caprifoliatum*, *H. connatum*, *H. polyanthemum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* ve *H. carinatum* türlerinin içerdiği tanen oranı belirlenmiş ve bunların antimikrobiyal etki üzerindeki rolleri araştırılmıştır. Buna göre en yüksek oranda tanen içeren tür %16,7 ile *H. ternum* türüdür. İçerdikleri tanen oranlarına göre çoktan aza doğru *H. connatum* (%11,5); *H. carinatum* (%9,1); *H. polyanthemum* (%6,7); *H. caprifoliatum* (%6,4); ve *H. myrianthum* (%5,1) olarak sıralanır. Tanenler her ne kadar antimikrobiyal etkileri bilinen bileşikler olsa da, bu çalışmaya göre *S. aureus* üzerinde en az antimikrobiyal etkiye sahip tür *H. ternum* türüdür (Dall'Agnol ve ark. 2003).



Şekil 2-6: *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Proantosiyanidinlerin Açık Formülleri

2.5.6. Ksanton Bileşikleri

Ksanton bileşikleri dibenzo- γ -piron iskeletine sahip heterosiklik bileşiklerdir. Özellikle Hypericaceae ve Gentianaceae familyalarına ait türlerde ksanton bileşiklerine rastlanır. Ayrıca bazı mantar ve likenlerin yapısında da bulunabilirler.

Ksantonların biyosentezi ilk kez *Centaurium erythraea* ve daha sonra da *H. androsaemum* bitkilerinin hücre kültürleriyle yapılan araştırmalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar ksanton biyosentezi için iki alternatif yolak olduğunu göstermektedir. *C. erythraea* bitkisinin yapısında bulunan benzofenon sentez enzimi bir molekül 3-hidroksibenzoil-CoA ile üç molekül malonil-CoA'nın kondensasyonunu sağlayarak 2,3'',4,6-tetrahidroksibenzofenon oluşmasını sağlar. Ksanton sentaz enzimi de bu noktada devreye girerek bunu 1,3,5-trihidroksiksantona dönüştürür (Beerhues, 1996).

H. androsaemum türünde bulunan benzofenon sentaz enzimi ise başlangıç substratı olarak benzoil-CoA'yı tercih eder. Üç molekül malonil-CoA ile bir molekül benzoil-CoA tepkimeye girerek kondensasyonla 2,4,6-trihidroksibenzofenonu oluşturur. Daha sonra benzofenon 3'-hidroksilaz enzimiyle bu 2,3',4,6-tetrahidroksibenzofenona dönüştürülür. Bu molekül ise 1,3,7-trihidroksiksantona dönüşür. 1,3,5- ve 1,3,7-trihidroksiksanton bileşikleri bitkideki daha kompleks yapılı ksanton bileşiklerinin preküsörleridir (Schmidt ve ark. 1997).

H. perforatum türünün toprak üstü kısımlarında nadiren ksanton bileşiklerine rastlanır. Ksantonlarca zengin olan kısım kök kısmıdır. Kitanov ve Nedialkov'un 1998 yılında yaptığı bir çalışmada *H. perforatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarında mangiferin tespit edilmiştir (Kitanov ve Medialkov, 1998). Bunun dışında yapılan çalışmalarda ksanton bileşiklerine bitkinin köklerinde rastlanmıştır. Buna göre köklerde bazı bulunan ksanton bileşikleri şu şekildedir:

- Kielkorin (Nielsen ve Arends, 1978; Crockett ve ark. 2011),
- 1,3,6,7-tetrahidroksiksanton (Spärgberg ve ark. 1993),
- 1,3,5-trihidroksiksanton (Murunganandam ve ark. 2000),
- 1-hidroksi-3,5-dimetoksiksanton (Murunganandam ve ark. 2000),
- Paksanton (Tocci ve ark. 2018),
- 5-O-metil-2-deprenilreediaksanton B (Crockett ve ark. 2011),
- 1,7-dihidroksiksanton (Tocci ve ark. 2018),
- 4,6-dihidroksi-2,3-dimetoksiksanton (Crockett ve ark. 2011).

Ksanton bileşiklerinin bilinen farmakolojik aktiviteleri ise şöyle sıralanabilir:

- Antifungal, Antibakteriyel, Antiviral Etki: Pirenil grubu taşıyan ksanton bileşikleri özellikle antimikrobiyal etkileriyle ön plana çıkar. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ve *Micrococcus luteus* türlerine karşı etkili oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir Ayrıca bazı basit oksijenli ksantonlar ve bazı ksantolignoid bileşikleri de antimikrobiyal etkiye sahiptir (Fotie ve Bohle, 2006).

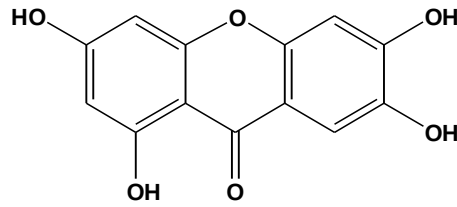
- Antimalaryal Etki: Hidroksiksantonlar antimalaryal etkili bileşiklerdir. Bu etkiyi plazmodyumların korunma amacıyla ürettikleri kristal yapılı hemozoin adlı yapıyı inhibe ederek gösterirler (Fotie ve Bohle, 2006).

- Anti-Enflamatuvar Etki: Bazı hidroksiksantonların anti-enflamatuvar etkiyi hücre adhezyon moleküllerini inhibe ederek arttırdıkları belirlenmiştir (Madan ve ark. 2002).

- Antioksidan Etki: Diğer fenolik bileşikler gibi ksantonlar da antioksidan etkili bileşiklerdir. Özellikle pirenil grubu taşıyan ksantonların antioksidan aktiviteleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Fotie ve Bohle, 2006).

- Enzim İnhibitör Etki: Birçok farklı ksanton bileşiğinin insan patolojisiyle alakalı oldukça önemli birçok enzimi inhibe edici etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. En önemli aktivitelerden biri monoaminoksidaz (MAO) inhibitör etkidir. 1,6-dihidroksiksanton ve 1,3,6-trihidroksiksanton MAO inhibitörü bileşiklerdir (Ohishi ve ark. 2000).

- Vasküler Aktivite: ksantonlar ve ksanton türevi bileşiklerin iskemik kalp hastalığı, ateroskleroz, hipertansiyon ve tromboz gibi bazı önemli kardiyovasküler hastalıklara karşı olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu etki, antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-platelet ve antitrombotik etkiden kaynaklıdır (Jiang ve ark. 2004).



1, 3, 6, 7 – tetrahidroksiksanton

Şekil 2-7: *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşiminde Bulunan Ksanton Bileşiğinin Açık Formülü

2.5.7. Uçucu Yağ Bileşikleri

Hypericum türlerinin uçucu yağı terpenoidlerle birlikte genellikle alifatik bileşikler (2-metiloktan, n-nonan, n-dekan, n-tetradekanol vb) taşır. *H. perforatum* türünün ve diğer türlerin uçucu yağ içeriğinin büyük kısmını terpenoidler oluşturur (Barnes ve ark. 2001). Mathis ve Ourisson adlı bilim insanları 1964 yılında yaptıkları çalışmalarla *H. perforatum* türünün içeriğinin, majör komponent olarak monoterpen bileşikleri içeren diğer türlerin aksine seskiterpen ağırlıklı olduğunu iddia etmişlerdir. Güncel çalışmalar ise özellikle Hindistan ve Türkiye’de doğal olarak yetişen *H. perforatum* bitkilerinin içeriğinde en fazla olarak bir monoterpen olan α -pinen (>%60) bulunduğunu göstermektedir (Weyerstahl ve ark. 1995; Çakır ve ark. 1997). Sırbistan ve Fransa gibi bazı diğer ülkelerde yetişen *H. perforatum* türüyle yapılan çalışmalarda ise uçucu yağ içeriğinde en fazla oranda karyofilen bulunduğu saptanmıştır (Gudzic ve ark. 2001; Mathis ve Ourisson, 1964).

2003 yılında Litvanya’da yapılan bir çalışmada ise ülkede yayılış gösteren *H. perforatum* türünün uçucu yağında ana komponent β -karyofilen veya karyofilen oksit olarak bulunmuştur (Mockute ve ark. 2003).

2017 yılında Yüce-Babacan ve arkadaşlarının Türkiye’de *H. uniglandulosum* Hausskn. ex Bornm. ve *H. lydium* Boiss ile uçucu yağ bileşenlerini araştırmak üzere yaptığı çalışma sonucunda bitkilerin uçucu yağlarındaki ana komponent α -pinen olarak bulunmuştur. *H. uniglandulosum* türünde ikinci sırada %19,2 ile undekan bulunmaktadır. *H. lydium* türünde undekan miktarı çok daha düşüktür (%1,7). *H. lydium* türünde ikinci sırada yer alan ana komponent ise β -pinendir (%19,2). β -pinen, *H. uniglandulosum* türünde %2,2 oranında bulunmaktadır (Yüce-Babacan ve ark. 2017).

Majör ve karakteristik bir komponent olarak α -pinen içeren diğer türler de mevcuttur. Bunlar; *H. hircinum*, *H. perfoliatum*, *H. hyssopifolium*, *H. heterophyllum*, *H. forrestii*, *H. apricum* türleridir (Bertoli ve ark. 2000; Couladis ve ark. 2001; Çakır ve ark. 2004; Demirci ve ark. 2005; Bağcı ve Yüce, 2010).

H. myrianthum, *H. scabrum* ve *H. dogonbdanicum* türlerinde α -pinen ve β -pinen yaygın olarak bulunmaktadır (Ferraz ve ark. 2005; Javidnia ve ark. 2008).

Özellikle *Drosanthe* seksiyonunda yer alan *Hypericum* türlerinin uçucu yağında α -pinenin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu söylenebilir (Yüce, 2009).

Yine 2003 yılında Bertoli ve arkadaşlarının İtalya’nın Calabria bölgesinde yetişen *H. triquetrifolium* Turra türüyle yaptığı bir çalışmaya göre uçucu yağın içerdiği majör komponentler; n-nonan (yapraklarda: %8, çiçeklerde: %15), β -pinen (yaprak: %8, çiçek: %4), α -pinen (yaprak: %13, çiçek: %10), mirsen (yaprak: %16, çiçek: %5), β -karyofilen (yaprak: %5, çiçek: %11), germakren-D (yaprak: %10, çiçek: %13), sabinen (yaprak: %13, çiçek: %3) ve karyofilen oksit (yaprak: %5, çiçek: %12) olarak bulunmuştur (Bertoli ve ark. 2003).

2.6. Farmakolojik Etkiler

Hypericum türleri yüzyıllardır tedavide kullanılan birçok önemli farmakolojik etkiye sahip bitkilerdir. En bilinen tür olan *H. perforatum* bitkisi halk arasında çok eski zamanlardan bu yana oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. İngiliz botanikçi John Gerard (1545–1612), 1597’de yazmış olduğu eserinde *H. perforatum* bitkisinden şöyle bahsetmektedir: “Bu bitkinin yapraklarını, çiçeklerini ve tohumlarını zeytinyağı dolu bir şişeye koyup birkaç hafta güneş ışığında bekletirseniz kan renginde bir yağ oluşur. Bu yağ, derin yaralar için paha biçilmez bir ilaçtır” (Saddique ve ark. 2010).

H. perforatum türünün ruhsal bozukluklarda kullanımı da oldukça eskiye dayanmaktadır. Amerikalı botanikçi Charles Frederick Millspaugh (1854–1923), “Amerika’nın Tıbbi Bitkileri” adlı eserinde bitkiden hazırlanan tentürün mani durumunda, histeri ve hipokondriyaziste kullanıldığını belirtmiştir. İngiliz herbalist Sophie Emma Magdalene Grieve (1858-1941) ise 1931’de yazdığı kitabında bitkinin depresyon belirtilerini hafiflettiğinden bahsetmektedir (Brenner ve ark. 2000). *Hypericum* türlerinin bu ve bunun gibi çeşitli farmakolojik etkilerine dair birçok çalışma yapılmış olup günümüzde de bu çalışmalar devam etmektedir.

Çok eski zamanlardan beri tedavide rol oynayan bir bitki olmasının sonucu olarak pek çok farklı şekilde hazırlanarak kullanılabilir. Çiçeklenme evresindeki taze bitki veya kurutulmuş gövde kısımları (*Hyperici herba*) genelde temel materyal olarak kullanılır. Kullanılan bitkinin nerede yetiştiği, bu bölgenin iklimi, toplanma zamanı, kurutma işlemi gibi etmenler drog kalitesine doğrudan etki eder. Bundan dolayı, üreticiler hem doğal olarak yetişen bitki, hem de kültür bitkisinin bir karışımını kullanmayı tercih etmektedir. Taze bitkiden homeopatide kullanılan tentürler, bitkinin preslenmesiyle elde edilen bitki suları veya yağları hazırlanır (Gaedcke, 2003).

Günümüzde *H. perforatum* ekstresi içeren ürünler en çok depresyon tedavisinde kullanılmaktadır. Depresyon tedavisinde kullanılan fitofarmasötiklerin çoğu gibi *Hypericum* ekstreleri de son derece komplike ve ileri ekstraksiyon aşamalarından geçerek hazırlanmaktadır. Bu şekilde hazırlanan ekstrelerden elde edilen kuru materyal ile çeşitli yağlar, diğer sıvı ekstreler veya çaylar da üretilmektedir. ESCOP monografları *H. perforatum* bitkisinin hidroalkolik ekstre ve tentürlerinin hafif şiddetteki depresif bozukluklar veya hafif ile orta arası şiddetteki depresif bozukluklarda kullanıldığını belirtmektedir. Tüm dünyada geçerli olan ICD (International Classification of Diseases

– Uluslararası Hastalık Sınıflandırma Sistemi) kodlarına göre *H. perforatum* ekstrelerinin kullanılabileceği hastalıklar: F32.0 (Hafif depresif nöbet), F32.1 (Orta depresif nöbet), F33.0 (Yineleyen depresif bozukluk, şimdiki nöbet hafif şiddetli), F33.1 (Yineleyen depresif bozukluk, şimdiki nöbet orta şiddetli) olarak tanımlanmıştır.

Bitkinin geleneksel kullanım alanları ise çok daha geniştir. 1984 yılında Almanya Sağlık Bakanlığı tarafından hazırlanan Komisyon E monograflarında *H. perforatum* ekstresinin psiko-vejetatif bozukluklarda, depresif bozukluklarda, anksiyete ve/veya ajitasyon durumlarında, bazı somatoform bozukluklarda, nöroastenide ve uyum bozukluklarında kullanıldığı belirtilmektedir. Yağ bazlı preparatlar dispepsi şikayetlerinde tercih edilmektedir. Haricen ise yaraları iyi etmede, miyaljide ve yanıklarda kullanılmaktadır. Taze haldeki bitkinin kurutulmadan ufalanarak alkol ile ekstre edilmesiyle homeopatik tentür elde edilir. Bu tentür damla halinde, veya tablet ya da enjektabl sıvıların bileşimine girerek kullanılmaktadır. Taze haldeki bitki ufalandıktan sonra zeytinyağı veya bir başka yağ ile güneş ışığında bekletilirse kırmızı renkli bir yağ oluşur. Bu yağ haricen direkt olarak kullanılabildiği gibi merhemlere karıştırılarak veya kapsül halinde kullanılabilir. Yine taze bitkinin preslenmesiyle oluşan bitki suyu da direkt olarak kullanılmaktadır. Taze haldeki bitkinin kurutulmasıyla kuru drog elde edilir. Bu kuru haldeki bitki önce toz hale getirilir ve bu haliyle Almanya’da bazı eczanelerde satılmaktadır. Standardize olmayan bu kuru toz çay yapımında da kullanılmaktadır. Toz haldeki kuru drogun alkol ile ekstraksiyonu sonucu oluşan sıvı ekstre bu şekilde veya bazı damlaların, merhemlerin veya tentürlerin bileşimine girmektedir. Alkol ekstresinin yoğunlaştırılması ve sonrasında liyofilizatör ile kuru toz haline getirilmesi ile oluşan ürün, standardizasyon aşamasının ardından tablet veya kapsüllerin bileşimine girerek dahilen kullanılmaktadır (Linde, 2008).

Birçok ülkede *H. perforatum* içeren preparatlar gıda takviyesi olarak satılmaktadır. Avrupa Birliği üyesi ülkelerde ise hem gıda takviyesi, hem de Sağlık Bakanlığı’ndan onaylı ilaç olarak satılan ürünler mevcuttur. 2006 yılında Almanya’da 28 farklı ilaç firmasının ürettiği 40 ayrı müstahzarın depresyon tedavisinde kullanılmak üzere piyasada bulunduğu belirtilmektedir. Bunların çoğu standardize kuru ekstre içeren kapsül, tablet veya kaplı tablet şeklinde piyasaya sunulmuştur. Bu ürünler 80 ila 1,700 mg arası değişen miktarda ekstre içermektedir ve sadece eczanede satılmaktadır. Genel olarak ise terapötik etki için gereken 500-1,200 mg arası ekstre içeren ürünlere

rastlanmaktadır. Ekstrelerin büyük çoğunluğu (%50-80) etanol ekstresi olup az miktarda metanolla yapılmış ekstre içeren ürün de bulunmaktadır. Bunlara ek olarak aynı sene eczane dışında satılan 80 kadar ürün tespit edilmiştir (Linde, 2008).

Hypericum türlerinin farmakolojik etkileri ve bu etkilerle ilgili yapılan bazı çalışmalar şu şekildedir:

2.6.1. Antidepresan Etki

Depresyon, günümüzde en sık rastlanan psikiyatrik rahatsızlıktır. Ortalama dört yetiştikenden biri yaşam süresi boyunca en az bir kez depresyonla karşı karşıya gelmektedir. Yapılan araştırmalar bu oranın kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Depresyon görülme sıklığının yaşı ilerlemiş kişilerde giderek artmakta olduğu gözlemlendiği gibi, genç yaştaki kişiler arasında da özellikle nevroitik ve reaktif depresyonun artış gösterdiği belirtilmiştir (Sommer, 1991).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre yaklaşık 450 milyon kişi, yani dünya nüfusunun %10 kadarı hayatlarının bir veya birden çok evresinde farklı nedenlerle depresyona yakalanmaktadır. Bu oranın 2020'de %15'e yükseleceği düşünülmektedir. Buna göre depresyonun, 2020 yılında morbidite nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıkların ardından ikinci sırada yer alacağı tahmin edilmektedir (DSÖ, 2007).

Depresyon belirtileri arasında depresif duygudurum, genel bir yorgunluk hali veya çabuk yorulma şikayetiyle birlikte kişinin yaptığı aktivitelerde azalma, değişik etkinliklere duyulan ilginin kaybolması, konsantrasyonda azalma, suçluluk ve/veya değersizlik hissi, geleceğe dair kötümser düşüncelerde artış, kişinin kendine güveni ve özsaygısında azalma, kilo kaybı, uyku düzeninin değişmesi, libidoda azalma, iştah azalması ve kilo kaybı gibi durumlar yer almaktadır.

Trisiklik antidepresanlar, monoamin oksidaz inhibitörleri, lityum gibi sentetik ilaçlar; ağızda kuruluk, odaklanmada zorluk, yorgunluk hissi, uyku bozuklukları, konstipasyon, hipotansiyon, bulantı, baş dönmesi ve baş ağrısı gibi pek çok yan etkiye neden olduğundan; tedaviye başlanan hastalarda özellikle ilk 14 gün içinde dozun hekim tarafından azaltıldığı ve bu nedenle terapötik dozun verilemediği veya hastaların hekim kontrolünde ya da hekimden bağımsız olarak ilacı tamamen bıraktıkları belirlenmiştir. Ayrıca araç kullanımıyla ilgili uyarılar, ilaçların alkolle etkileşmesi gibi

durumlar nedeniyle hastalar normal hayat düzenlerinde değişiklik yapmak zorunda kaldıklarından sentetik antidepresanları kullanma konusunda tereddütler yaşamaktadır (Albrecht ve ark. 1994; Borchers, 1994). Depresyon genellikle uzun dönem tedavi gerektiren bir hastalık olduğundan, ilaca karşı gelişen tolerans ve olası bir toksisite durumu da daha önemli hale gelmektedir.

Sentetik antidepresan ilaçların yan etkileri nedeniyle yaşanan sorunlar hekimleri antidepresan etkili bitkisel ürünlere yönlendirmektedir. *H. perforatum*; hafif ve orta şiddetteki depresyon tedavisinde sentetik antidepresanlar kadar etkili ve yan etki açısından onlara kıyasla daha güvenli bir bitki olduğu çeşitli çalışmalarla desteklendiğinden beri depresyon tedavisinde öne çıkmaktadır.

Son yapılan bazı klinik çalışmalar, *H. perforatum* bitkisinin depresif bozuklukların kısa dönem tedavisinde plaseboda daha etkili olduğunu ve sentetik antidepresanların birçoğuyla aynı etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Linde ve ark. 2005; 2008). *H. perforatum* ve içeriğinde bulunan hiperforin maddesinin serotonin, noradrenalin, dopamin, glutamat ve γ -aminobutirik asit gibi bazı nörotransmitterlerin geri alımını inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Di Carlo ve ark. 2001; Capasso ve ark. 2003).

H. perforatum türünün antidepresan etkisiyle ilgili oldukça fazla sayıda bilimsel çalışma mevcut olmasına karşın, etki mekanizmasıyla ilgili hala soru işaretleri vardır. İçeriğinde bulunan hiperforin, hiperisin ve psödohiperisin ile bazı flavonoidlerin antidepresan etkiyle ilgili olduğuna dair veriler bulunmakta, bundan dolayı da farklı kimyasal yapıdaki bileşiklerin ve farklı mekanizmaların bu etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Butterweck, 2003; Calapai ve ark. 2001). Hiperforin bileşiğinin, saf halde uygulandığında deneysel hayvan modellerinde antidepresan aktivite gösterdiğine dair bir çalışma bulunmaktadır (Gambarana ve ark. 2001).

Bitki, daha önce de belirtildiği üzere nörotransmitterlerin geri alımını inhibe etmekte ve sinaptik aralıktaki nörotransmitter konsantrasyonunu arttırmaktadır. Adenozin, GABA ve glutamat reseptörlerine afinitesi vardır (Rolli ve ark. 1995). Aynı zamanda zayıf bir monoaminoksidaz (MAO) inhibitörüdür. Suzuki ve arkadaşları MAO inhibisyonundan sorumlu maddenin hiperisin olduğunu savunmuş, ancak daha sonra Demisch ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar bunun yalnızca hiperisinden değil, total ekstreden kaynaklanan bir etki olduğunu ortaya koymuştur. Thiede ve Walper ise MAO

inhibisyonundan sorumlu maddeleri kersetin, luteolin ve kempferol olarak belirlemiş, dolayısıyla bu etkinin flavonoidlerden kaynaklandığını kanıtlamıştır. Sonuç olarak MAO inhibitörü etki kanıtlanmış, ancak daha önce de belirtildiği gibi bu etki zayıf olduğu için ekstrenin antidepresan etkisinin buna bağlanamayacağı ifade edilmiştir (Demisch ve ark. 1989; Thiede ve Walper, 1994).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda *H. perforatum* ekstresinin farelerin frontal korteksindeki beta-adrenerjik reseptörlerin sayısını ve aktivitesini azalttığı; serotonin reseptörlerini ve bunların aktivitesini ise arttırdığı görülmüş ve bunun da beynin depresyonla alakalı bölümlerindeki nörotransmitter konsantrasyonunda değişime neden olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, *H. perforatum* ekstresinin hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı üzerinde bazı olumlu etkilerinin olduğu, bu aksdaki bozukluklar majör depresif bozukluğa yol açabildiğinden, antidepresan etkinin buna bağlanabileceğine dair iddia son zamanlarda fare beyni üzerinde yapılan bazı deneylere rağmen henüz kanıtlanamamıştır. Çalışmalar *H. perforatum* ekstresinin fare beynindeki kortizol ve kortikosteroid konsantrasyonunda değişime neden olduğunu göstermiş, fakat hipotalamus-hipofiz-adrenal aksında herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Franklin ve ark. 2004; Frost ve ark. 2003).

Schulte-Lobbert ve arkadaşları ise yaptıkları bazı çalışmalar sonucu serotonin geri alım inhibisyonundan sorumlu bileşiğin hiperforin olduğunu, hiperforinin aynı zamanda dopamin, noradrenalin, GABA ve L-glutamat geri alımını inhibe edici etkisi olduğunu belirtmiştir (Schulte-Lobbert ve ark. 2004). Bunun dışında antidepresan etki mekanizmasının aydınlatılmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen diğer bulgulara göre; *H. perforatum* ekstrelerinin fare beynindeki mezolimbik bölgelerdeki opioid sistemler üzerinde direkt veya indirekt yollardan etkisinin olduğu da tespit edilmiştir (Chen ve ark. 2003).

H. perforatum bitkisinin içeriğinde bulunan fitokimyasalların birlikte sinerjistik bir etki ile antidepresan aktiviteyi güçlendirdiği düşünülmektedir (Williamson, 2001). 2006'da yapılan bir çalışmada bitkinin bileşiminde bulunan bir flavonoid bileşiği olan rutin yokluğunda antidepresan etkide azalma meydana geldiği gösterilmiş ve bu duruma kanıt olarak sunulmuştur. (Wurglics ve Schubert-Zsilavecz, 2006). Ne var ki, özellikle majör etkiye sahip *H. perforatum* bileşiklerinin kan-beyin bariyerini geçememesi çalışmaları sınırlandırmakta ve maksimum antidepresan aktivite için

gereken optimum fitokimyasal madde içeriğinin tam olarak saptanması ve buna göre standardizasyon yapılabilmesini zorlaştırmaktadır (Cott, 2010).

2008 yılında Linde, Berner ve Kriston tarafından yapılan Cochrane meta analiz çalışması *H. perforatum* ile yapılan antidepresan aktivite çalışmaları ile ilgili detaylı bilgi veren geniş kapsamlı bir çalışmadır. Bu çalışmada *H. perforatum* bitkisinin plasebo ve selektif serotonin geri alım inhibitörleri karşısında etkili olup olmadığı ve aynı zamanda standart antidepresanlara göre yan etkisinin daha az olup olmadığı araştırılmış ve çalışma sonuçları değerlendirilmiştir. Toplamda 5489 hastanın katıldığı 29 klinik deney bu çalışmaya dahil edilmiştir. *H. perforatum* bitkisinin plasebo ile karşılaştırıldığı 18, sentetik antidepresanlar ile karşılaştırıldığı ise toplam 17 çalışma incelenmiştir. Buna göre, majör depresif bozukluğa sahip hastalarda *H. perforatum* ekstresinin plaseboya göre kesin olarak daha etkili olduğu; standart sentetik antidepresanlarla benzer etkiye sahip olduğu ve bunlara göre daha az yan etkiye neden olduğu tespit edilmiştir. Cochrane Analizi'nde aynı zamanda Almanca konuşulan ülkelerde yapılan çalışmalarda *H. perforatum* ekstresinin etkinliğinin diğer çalışmalara göre daha yüksek bulunduğu belirtilmiş ve bu durumun daha detaylı incelemeye değer olduğu da eklenmiştir (Linde ve ark. 2008).

2009 yılında Rahimi, Nikfar ve Abdollahi isimli bilim insanları bir başka meta analiz çalışması gerçekleştirmiştir. Bu çalışma da Cochrane gibi *H. perforatum* ekstresinin plaseboya göre daha etkili, selektif serotonin geri alım inhibitörleriyle yaklaşık aynı etkiye sahip ve daha az yan etkili olduğunu savunmaktadır. Diğer yandan *H. perforatum* bitkisinin içeriğindeki kimyasal bileşiklerin birçok ilaç etken maddesiyle etkileşim potansiyeli bulunduğundan muhtemelen bir uzman gözetiminde kullanılması gerektiğini de belirtmektedir (Rahimi ve ark. 2009).

Bir diğer meta analiz çalışması 2017 yılında Xiang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Sonuçlar yine Cochrane Analizi'ni destekler niteliktedir. Genel olarak standardize %0,3 hiperisin ve %2-5 hiperforin içeren WS 5570, WS 5572, ZE 117, STW3, STW3-VI, LoHyp-57 ve LI-160 patentli *H. perforatum* ekstreleri ile sentetik antidepresanlar ve plasebonun karşılaştırıldığı çalışmalar değerlendirilmiş, yine aynı şekilde ekstrelerin plaseboya göre etkili olduğu, sentetik antidepresanlarla yaklaşık aynı etkiye sahip ve daha az yan etkili olduğu sonucuna varıldığı belirtilmiştir (Xiang ve ark. 2017).

2005 yılında yapılan bir çalışma, majör depresif bozukluk yaşayan toplam 251 hastaya gruplar halinde 6 hafta boyunca 900 mg/gün *H. perforatum* WS 5570 patentli ekstresi, 20 mg/gün paroksetin ve plasebo uygulanmış, *H. perforatum* ekstresinin paroksetine ve plaseboya göre daha etkili olduğuna dair sonuçlar edinilmiştir (Szegedi ve ark. 2005) . Başka bir çalışma yine major depresif bozukluktan şikâyetçi olan 135 hasta ile yürütülmüş, yine 900 mg/gün ekstrenin günde 20 mg fluoksetinle benzer etkiye olduğunu göstermiştir (Fava ve ark. 2005). Buna rağmen günümüzde *H. perforatum* ekstresi daha çok hafif ve orta şiddetli depresyon tedavisinde tercih edilmektedir.

2002 yılında Behnke ve arkadaşları tarafından Danimarka’da yürütülen bir çalışmada 18-73 yaş arası hafif ve orta şiddetli depresyon hastası toplam 70 kişi 35’er kişilik randomize iki grup olarak ayrılmış, bir gruba Calmigen isimli *H. perforatum* preparatı (300 mg/gün) ve diğerine fluoksetin (40 mg/gün) uygulanmıştır. 6 haftalık tedavinin ardından *H. perforatum* preparatı uygulanan hastaların %38’i, fluoksetin kullanan hastaların ise %45’inde depresyon belirtilerinin birçoğunda azalma meydana gelmiştir (Behnke, 2002).

Yine 2002 yılında Brenner ve arkadaşları tarafından Amerika Birleşik Devletleri’nde *H. perforatum* LI 60 patentli ekstresinin sertralin ile karşılaştırıldığı bir başka çalışma yürütülmüştür. Hastalara ilk hafta 600 mg/gün *H. perforatum* ekstresi içeren tablet uygulanmış, daha sonra 900 mg/gün’e çıkarılmıştır. Sertralin dozu ise ilk hafta 50 mg/gün, daha sonra 75 mg/gün olarak uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonunda kullanılan *H. perforatum* ekstresinin sertralin kadar etkili olduğu ve onun kadar iyi tolere edildiği belirlenmiştir (Brenner ve ark. 2002).

Majör depresif bozukluk yaşayan çocuk ve genç hastaların tedavisinde *H. perforatum* kullanımı ile ilgili de bazı çalışmalar mevcuttur. 17 yaş altındaki hastalarla yapılan iki çalışma umut verici sonuçlar sunsa da, iki çalışmada da plasebo ile karşılaştırılma yapılmamış olması ve randomize deneyler olmamaları nedeniyle bu çalışmalara göre kullanımları henüz uygun bulunmamaktadır (Findling ve ark. 2003; Simeon ve ark. 2005).

H. perforatum bitkisinin yan etki açısından güvenlik profili incelendiğinde sentetik antidepresanlara göre oldukça güvenilir olduğu söylenebilir. Yapılan çalışmalar tümüyle değerlendirildiğinde toplam 35562 hastada yan etki görülme oranı %0 - 5,7 olarak bulunmaktadır (Knuppel ve Linde, 2004). 2006 yılında Schulz tarafından yapılan

çalışmada da toplam 34834 hasta ile gerçekleştirilen 16 adet çalışma değerlendirilmiş ve *H. perforatum* bitkisinin yan etkilerinden şikâyetçi olan hasta oranı %0,1 - 2,4 olarak tespit edilmiştir (Schulz, 2006). Bu durum sentetik antidepresanlara göre yan etkilerinin oldukça az sayıda ve nadir görülür olduğunu ispatlamaktadır. Bu yan etkiler genellikle geçici bazı dermatolojik veya gastrointestinal yan etkilerdir. Bunların yanı sıra dikkat edilmesi gereken bir durum serotonin sendromu ihtimalidir. *H. perforatum* kullanımıyla oluşan serotonin sendromuna bazı vaka sunumlarında rastlanmaktadır. Ayrıca bazı çalışmalar, *H. perforatum* ekstresi kullanan kişilerde nadiren de olsa mani ve psikoz durumlarının oluşabileceğini de göstermektedir. Yine de özetle, *H. perforatum* bitkisinin sentetik antidepresanlara yakın, hatta bazı çalışmalarda daha yüksek antidepresan etkinlik gösterdiği, buna karşın çok daha az yan etkiye neden olduğu söylenebilmektedir.

H. perforatum yan etki açısından oldukça güvenli kabul edilmekle beraber, ilaç etkileşimleri oldukça fazla olan bir bitkidir. Özellikle yüksek dozda hiperforin içeren ekstreler sitokrom P-450 (CYP) 3A4 enzim indüksiyonu yapabildiğinden birçok ilaçla etkileşim potansiyeli oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada günde 10 mg hiperforin içeren ekstrenin uygulanması durumunda CYP3A4 enziminin indüklendiği, günde 4 mg gibi nispeten düşük bir doza geçildiğinde ise bu etkinin kaybolduğu belirtilmiştir (Izzo, 2004). Bu durum birçok ilacın plazma konsantrasyonunda değişikliğe neden olduğundan dikkat edilmesi gereken bir husustur. *H. perforatum* ile ilaç etkileşimleri daha detaylı olarak ayrı bir başlıkta ele alınacaktır.

H. perforatum türünden başka türlerle yapılan antidepresan aktivite çalışmaları da mevcuttur. 2016 yılında Zhou ve arkadaşlarının *H. uralum* ile yaptığı çalışmada bitkinin kimyasal içeriğinde yer alan Uralodin A isimli maddenin günde 13 mg/kg ve 26 mg/kg dozlarda uygulanması sonucu farelerle yürütülen zorunlu yüzme testi ve kuyruktan asma testleri sonucunda antidepresan etkinin varlığı tespit edilmiştir (Zhou ve ark. 2016).

Ramalhete ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yürütülen bir başka çalışmada ise Portekiz’de yetişen *H. androseamum*, *H. foliosum* ve *H. perforatum* türlerinin antidepresan etkinliği fluoksetinle karşılaştırmalı ve *in vivo* olarak araştırılmıştır. *H. foliosum* türünün fare kuyruktan asma deneyine göre antidepresan etkinliği diğer türlere göre yüksek bulunmuştur (Ramalhete ve ark. 2015).

2.6.2. Yara İyileştirici Etki

Yara, vücut yapılarının bütünlüğünün bozulması üzerine ortaya çıkan doku kaybıdır. Bir yaranın iyileşmesi hücrel, fizyolojik ve biyokimyasal birçok farklı olayın gerçekleşmesi sonucunda yeni dokunun oluşmasıyla gerçekleşir. Yara iyileşmesi; yaklaşık 3 gün süren eksudatif veya enflamatuvar faz, yaklaşık 10 gün süren proliferatif faz ve tamamlanması iki yılı bulabilen rejeneratif faz olmak üzere üç ana fazdan oluşur. İyileşme doğal bir süreçtir ve organizma kendi kendini onarma becerisine sahiptir; fakat uzun sürede gerçekleşmesi ve bu süreçte enfeksiyon riskinin oldukça yüksek olması bu süreci hızlandıracak tedavi yöntemleri ihtiyacını doğurmaktadır. Yara iyileştirici maddeler, antik çağlardan beri bu nedenle her zaman çok büyük öneme sahip olmuştur. İyileşme süresini kısalttıkları için antibiyotik gibi ilaçların kullanım süresini de kısaltarak, bunlara karşı gelişen direnç ve olası yan etkileri gibi durumları önlemektedirler (Lazarus ve ark. 1994).

Hypericum türleri, özellikle de en yaygın olarak kullanılan *H. perforatum*, yara iyi edici etkisi yaklaşık 2000 yıldır bilinen ve halk arasında kullanılmakta olan bitkilerdir. Çiçekli topraküstü kısımlar tentür veya yağ halinde yanıklara ve yaralara uygulanmaktadır (Süntar ve ark. 2010). Yara iyi edici etkinin bitkinin fibroblastları uyarması ve kolajen yapımının buna bağlı olarak artmasıyla oluştuğu saptanmıştır (Öztürk ve ark. 2007). Aynı zamanda antibakteriyel etkiye sahip olmasının da yara iyi edici etkisinde rolü olduğu düşünülmektedir (Upton, 1997).

H. perforatum ekstrelerinin yalnız başına veya bazı bitki ekstreleriyle kombine halde topikal olarak kullanımında gösterdiği yara iyileştirici aktivite genellikle fareler üzerinde denenmiştir (Prisăcaru ve ark. 2013; Sayar ve ark. 2014; Kıyan ve ark. 2015). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar da mevcuttur (Süntar ve ark. 2010; Mainetti ve Carnevalli 2013; Wolfle ve ark. 2014). Bunun yanında *in vitro* olarak NIH3T3 fibroblast hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar vardır (Dikmen ve ark. 2011; Hostanska ve ark. 2012). 2017 yılında ise İtalya’da ilk kez atlar üzerinde bir çalışma yapılmıştır (Elisabetta ve ark. 2017).

Mukherjee ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış olduğu çalışmada Hindistan’ın Nilgiris bölgesinden toplanan *H. patulum* türünün yapraklarıyla hazırlanan metanol

ekstresini içeren merhemler ile nitrofurazon içeren merhemlerin yara iyi edici etkisini karşılaştırmak amacıyla *in vivo* deneyler yapılmıştır. Metanol ekstresini %5 ve %10 oranında içeren merhemler kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda ekstre içeren merhem uygulandığı grupta iyileşmenin standart ilaçla aynı sürede ve düşük konsantrasyonlu ekstreye göre daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır (Mukherjee ve ark. 2000).

Rao ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptığı başka bir çalışmada fareler üzerinde *H. perforatum* ve *Calendula officinalis* türleriyle hazırlanan tentürler uygulanmış, iki bitkinin de yara iyileştirici aktivitesi tespit edilmekle beraber, *H. perforatum* tentürünün aktivitesinin *C. officinalis* tentürüne göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Rao ve ark. 1991).

Süntar ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan *in vivo* yara iyi edici aktivite çalışmasında etanol ekstreleri hazırlanan *H. perforatum* ve *H. scabrum* türleri ile çalışılmış, *H. scabrum* ekstresinin yara iyileştirici etkisinin bulunmadığı saptanmıştır. *H. perforatum* ise etkili bulunmuş, bunun üzerine ekstre fraksiyonlandırılmış, bu fraksiyonlardan en yüksek yara iyileştirici etkiye sahip olanın etil asetat ekstresi olduğu tespit edilmiştir. Bu etkiden sorumlu bileşiklerin naftodiantron ve flavon bileşikleri olduğu ve bunların sinerjik etki gösterdiği düşünülmüştür (Süntar ve ark. 2010).

Bir diğer çalışma tavuk embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde *H. perforatum* etanol ekstresinin *Centella asiatica* ekstresi ve dekspantenol ile karşılaştırmalı olarak yara iyileştirici etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Buna göre, tıpkı *C. asiatica* gibi *H. perforatum* ekstresinin de kolajen üretiminde artış meydana getirerek yara iyileştirme özelliği olduğu saptanmıştır (Öztürk ve ark. 2007).

H. perforatum türünün atlar üzerindeki yara iyi edici etkisi 2017 yılında Sicilya'da yapılan çalışma ile denenmiştir. Bitkinin geleneksel yönetime göre zeytinyağı içerisinde 40 gün güneş ışığında bekletilerek elde edilen yağı ile yapılan çalışmada, yağın uygulandığı yaralarda diğerlerine göre iyileşme süresinin kısaldığı ve bu sürenin sonunda tamamen iyileşmiş oldukları belirtilmiştir (Elisabetta ve ark. 2017).

Yadollah-Damavandi ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada *H. perforatum* hidroalkolik ekstresi %2 karboksimetilselüloz ile jel haline getirilmiş ve diyabetik farelerin yaralarında denenmiştir. Buna göre jelin uygulandığı yaralı deriden

alınan örnek hücreler ile kontrol grubundan alınanlar karşılaştırılmış ve jelin uygulandığı hücrelerde fibroblast sayısının ve kolajen miktarının diğerine göre yüksek olduğu saptanmıştır (Yadollah-Damavandi ve ark. 2015).

H. perforatum türünün iki alt türü olan *H. perforatum* ssp. *perforatum* ve *H. perforatum* ssp. *veronense* ile yapılan çalışmada, *Centella asiatica* ile karşılaştırmalı olarak yara iyi edici aktiviteyi belirlemek için, NIH3T3 fibroblast hücreleri bitki ekstraktlarıyla inkübe edilmiştir. Daha sonra çeşitli mikroskopik metodlarla hücrelerdeki değişim ve kolajen miktarındaki artış gözlenmiş, buna göre her iki türün de fibroblastlar ve kolajen yüzdesi üzerinde olumlu değişime neden olduğu, *H. perforatum* ssp. *perforatum* türünün *H. perforatum* ssp. *veronense* türüne göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Dikmen ve ark. 2011).

Bir diğer çalışma 2007 yılında *H. perforatum* hidroalkolik ekstresi ile tavşanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. %2, %5 ve %10 (s/s) konsantrasyonlarda hazırlanan ekstre baz olarak kullanılan eucerin ile karıştırılarak merhem haline getirilmiş, standart olarak da yine eucerin bazında %1’lik fenitoin merhemi kullanılmıştır. Buna göre; tavşanlardaki tüm yaralar toplam 21 günde tamamen iyileşmiş, fenitoin uygulanan grupta iyileşme toplam 15 günde tamamlanırken, *H. perforatum* ekstresi uygulanan grupta en düşük konsantrasyon olan %2’lik konsantrasyonda toplam 14; %5’lik konsantrasyonda 15 ve %10’luk konsantrasyonda 16 günde iyileşme tamamlanmıştır. Buna göre %2 konsantrasyonda ekstre içeren merhem fenitoine ve diğer konsantrasyonlardaki *H. perforatum* merhemlerine göre daha etkili bulunmuştur (Hemmati ve ark. 2007).

2.6.3. Antimikrobiyal Etki

Anibakteriyel Etki

H. perforatum türünün antik çağlardan bu yana yara iyileştirici olarak kullanılması anibakteriyel etkisiyle ilişkilendirilmektedir. Ortaçağ’da doktorların ameliyat yaralarını ve enfekte yaraları *H. perforatum* yağı ile tedavi ettiği bilinmektedir. Rusya’da *H. perforatum* bitkisinden elde edilen “Novoimanin” ve “İmanın” isimli ilaçlar uzun yıllardır antibakteriyel olarak hekimler tarafında reçete edilmektedir. Bu ilaçların *in vivo* ve *in vitro* testlerle *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarında

sulfanilamide göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Derbentseva ve Robinovich, 1968; Aizenman, 1969).

Peeva-Naumovska adlı bilim insanı, 2010 yılında *H. perforatum* yağının %30, %40 ve %50'lik konsantrasyonlarda lipofilik merhem formülasyonlarını geliştirmiştir. Hem dermal, hem de vajinal kullanıma uygun bu merhemlerin *Streptococcus pyogenes*, *S. viridans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Moraxella catarrhalis* ve suşlarına karşı gösterdiği antibakteriyel etki değerlendirilmiştir. Buna göre vajina florasının doğal bir bileşeni olan *L. acidophilus* dışında tüm suşlara karşı etkili olduğu bulunmuştur. Formülasyondaki *H. perforatum* yağının miktarı arttıkça antibakteriyel etkinin de arttığı tespit edilmiştir (Peeva-Naumovska, 2010).

H. perforatum bitkisinden hazırlanan ekstrelerin dekoksiyona göre *Staphylococcus*, *Shigellae* ve *Escherichia coli* suşlarında daha etkili olduğu ve aynı zamanda Gram-pozitif bakterilerde Gram-negatif bakterilere göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Avato ve ark. 2004; Mazandarani ve ark. 2007). Özellikle *H. perforatum* türünün metanol ekstresinin Gram-pozitif bakterilerde etkinliği maksimumdur ve MİK değeri 50 µg/mL olarak bulunmuştur (Avato ve ark. 2004, Saddique ve ark. 2010).

Vajs ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı bir çalışmada ilk olarak *H. perforatum* türünden bazı floroglusinol türevi bileşiklerin izolasyonu yapılmıştır. Hiperforin, furohiperforin, furoadhiperforin, furohiperforin A, piranohiperforin, deoksihiperforin gibi bileşiklerin agar difüzyon yöntemiyle Gram-pozitif olan *S. aureus*, *Bacillus subtilis* ve Gram-negatif olarak da *E. coli* suşlarına karşı antibakteriyel etkinliğinin değerlendirildiği çalışmada; furohipeforin A adlı bileşiğin *S. aureus* suşuna karşı etkili olduğu saptanmıştır. Diğer suşlara karşı antibakteriyel etki bulunamamıştır (Vajs ve ark. 2003).

1999 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada *H. perforatum* türünden hazırlanan butanol ve kloroform ekstrelerinin *Helicobacter pylori* suşlarına karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Yeşilada ve ark. 1999).

H. perforatum türünün çay halinde kullanımı olduğu gibi bu çayın antibakteriyel etkinliği ile ilgili yapılan çalışmalar da vardır. 2001 yılında Reichling ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *H. perforatum* ile hazırlanan çayların su ile seyreltilmiş halde özellikle metisiline karşı dirençli *S. aureus* (MRSA) suşuna karşı etkili olduğu

saptanmıştır. Aynı zamanda diğer Gram-pozitif bakterilere karşı da etkili olduğu belirtilmiştir (Reichling ve ark. 2001).

2002 yılında Meral ve Karabay'ın yapmış olduğu çalışmada *H. perforatum* metanol ekstresinin 1000 µg/mL konsantrasyonda hem Gram-pozitif; (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 65381/P, *S. epidermidis* ATCC 12228 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) hem de Gram-negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Echerichia coli* ATCC 29998 ve *E. coli* ATCC 8737) suşlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Meral ve Karabay, 2002).

Molochko ve arkadaşları tarafından 1990 yılında *H. perforatum* bitkisinin *Staphylococcus* suşlarına karşı farklı çözücü kombinasyonlarıyla hazırlanan ekstrelerinin karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Su/alkol/glisерol, su/alkol, alkol/glisерol çözücü kombinasyonlarıyla hazırlanan ekstreler, derilerinde piyoenflamatuvar enfeksiyon gelişmiş kişilerden alınan örneklerden izole edilen *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* suşlarına karşı test edilmiş ve su/alkol/glisерol ekstresinin etkinliği en yüksek olarak bulunmuştur (Molochko ve ark. 1990).

Güney İtalya'da yapılan bir çalışmada farklı etnobotanik kullanımları olan 104 bitki türünden hazırlanan toplam 168 ekstrenin MRSA (ATCC 33593) suşları üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. *H. perforatum* ekstrelerinin MİK değeri 256 µg/mL ve IC₅₀ değeri 128 µg/mL olarak bulunmuştur (Quave ve ark. 2008).

Avcı ve Gergeroğlu'nun 2018 yılında yaptığı çalışmada *H. perforatum* ekstresi ile amoksisilinin antibakteriyel etkinliği karşılaştırılmış, ekstre *S. aureus* suşunda amoksisiline göre %227; *P. aeruginosa* suşunda ise %141 oranında daha etkili bulunmuştur. Daha sonra *H. perforatum* ekstresi ile çeşitli polimerlerden elektro-eğirme metoduyla nanolifler oluşturulmuş ve bunların mikroorganizmalarla mücadelede inovatif ve çevre dostu çok önemli potansiyel bir alternatif oldukları belirtilmiştir (Avcı ve Gergeroğlu, 2018).

2017 yılında Kolombiya'da yapılan bir çalışmada *Hypericum myricariifolium* Hieron, *Hypericum mexicanum* L. ve *Hypericum juniperinum* Kunth. türlerinin kuru yapraklarıyla hazırlanan etanol ekstresi ile hem ekstrelerin, hem de bu ekstrelerden hazırlanan hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının *S. aureus* (ATCC 29213), *S. epidermidis* (ATCC 1228) ve *E. coli* (ATCC 8739) suşlarına karşı

anibakteriyel etkinliği araştırılmıştır. Buna göre *H. juniperinum* ekstresinin Gram-pozitif suşlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. *H. mexicanum* türünün total ekstresinin *S. epidermidis* suşuna karşı MİK değeri 0,05 mg/mL olarak bulunmuş, hekzan ekstresi ise 0,001 mg/mL MİK değeri ile en etkili fraksiyon olarak belirtilmiştir (Plazas Gonzalez, 2017).

Hypericum japonicum türüyle yapılan bir çalışmada bitkinin içeriğinde yer alan antibakteriyel etkili dimerik açılfloroglusinol türevi dokuz farklı bileşiğin *E. coli* (ATCC 11775), *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539), *S. aureus* (ATCC 25922) ve *E. faecalis* (ATCC 10541) suşlarına karşı sefotaksim sodyum ile karşılıklı olarak etkinliği test edilmiştir. Buna göre, bu çalışma sırasında ilk kez keşfedilen dört bileşiğin (Hiperjaponikol A-D), 0,8–3,4 μ M MİK değerleriyle tüm suşlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Li ve ark. 2018).

H. mexicanum L. ekstreleri kullanılarak antibakteriyel sabunlar hazırlanmış ve bunların etkinliği ile ilgili 2017 yılında bir çalışma yapılmıştır. Disk difüzyon metoduyla yapılan çalışmada *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı %0,1 ve %0,2 konsantrasyonlarda hazırlanan hem katı, hem de sıvı sabunların aktivitesi test edilmiştir. Hem ekstre, hem de her iki konsantrasyonda hazırlanan sıvı sabun *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı etkilidir. *S. aureus* suşuna karşı hem ekstre, hem katı hem de sıvı sabunlar; *S. epidermidis* suşuna karşı ise %0,2'lik konsantrasyondaki sıvı sabun etkili olarak bulunmuştur (Corzo-Barragán ve Gaitán-Vaca, 2017).

H. hookerianum türünün antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada bitkinin metanol, aseton ve kloroform ekstrelerinin 100-400 μ g/mL olarak hazırlanan farklı konsantrasyonları 100 μ g/mL konsantrasyondaki tetrasiklinle karşılaştırmalı olarak *Pseudomonas cepacia* (NCIM 2106), *B. subtilis* (NCIM 2039), *B. megaterium* (NCIM 2087), *B. coagulans* (NCIM 2323), *S. aureus* (NCIM 2492), *E. coli* (NCIM 2345) suşlarına karşı test edilmiştir. Bitkinin metanol ekstresinin tüm suşlara karşı etkinliğinin en yüksek olduğu saptanmıştır (Mukherjee ve ark. 2000).

Antifungal Etki

Bitkilerde meydana gelen fungal enfeksiyonları kontrol altına almak için benzimidazoller, aromatik hidrokarbonlar ve sterol biyosentez inhibitörleri gibi antifungal etkili kimyasal maddeler tercih edilmektedir. Ancak, mantar suşlarının bunlara karşı direnç geliştirmesi giderek daha yüksek konsantrasyonda kullanılmalarını gerektirmiştir (Brent ve Hollomon, 1998). Bu durum da bitkilerde toksik maddelerin birikiminin artmasına neden olmakta ve çevre sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bitkilerde olduğu gibi hayvanlarda ve insanlarda da mantar enfeksiyonlarının kimyasal maddelerle tedavi edilmeye çalışılması yan etki ve toksisite açısından çeşitli sorunlar yarattığından, antifungal etkili bitkisel maddelerin kullanımının artırılması amacıyla bu bitkiler üzerinde yürütülen çalışmalara ağırlık verilmiştir.

Khosa ve Bhatia tarafından 1982 yılında *H. perforatum* bitkisinin uçucu yağı ve alkollü ekstresinin antifungal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada; *Aspergillus flavus*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Curvularia lunata* ve *Fusarium vasiinfectum* suşlarına karşı antifungal etkisinin olduğu saptanmıştır. *M. gypseum* ve *T. rubrum* suşlarına karşı MİK değeri 10 mg/mL, diğer suşlara karşı ise 6 mg/mL olarak bulunmuştur (Khosa ve Bhatia, 1982).

2009 yılında Maskovic ve Solujic tarafından yürütülen bir çalışma ile *H. perforatum* etanol ekstresinin *P. canescens* ve *F. oxysporum* suşlarına karşı antifungal etkisi belirlenmiştir. Her iki suşa karşı MİK değeri 10 mg/mL olarak bulunmuştur. Mikroskopik metodlar yardımıyla yapılan değerlendirmeye göre; *P. canescens* suşundaki spor miktarı 104 CFU/mL ‘den, 40 CFU/mL’ye düşmüştür yani %62’lik bir azalma söz konusudur. *F. oxysporum* suşunda ise spor miktarı 100 CFU/mL’den 24 CFU/mL’ye düşmüş ve %72’lik bir azalma meydana gelmiştir. Ekstre konsantrasyonu arttıkça bu oranın yükseldiği görülmüştür (Maskovic ve Solujic, 2009).

Erzurum bölgesinden toplanan *H. linarioides* Bosse türüyle hem uçucu yağı hem de ekstrelerinin antifungal potansiyelini belirlemek amacıyla ülkemizde yapılan bir çalışma mevcuttur. Buna göre uçucu yağın *A. solani*, *F. oxysporium* ve *F. solani* suşları üzerinde fungustatik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bitkinin aseton ve metanol ekstrelerinin bazı fitopatojenik suşların üremesinde ciddi bir inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür (Çakır ve ark. 2003).

Güney Brezilya’da yetişen *H. ternum*, *H. myrianthum*, *H. piriai*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum* ve *H. polyanthemum* türlerinin antifungal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, *C. albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *A. fumigatus* (ATCC 26934), *A. flavus* (ATCC 9170), *A. niger* (ATCC 9029), *Microsporum canis* (C 112), *M. gypseum* (C 115), *Epidermophyton floccosum* (C 114), *Tricophyton rubrum* (C113), *T. mentagrophytes* (ATCC 9972) suşlarına karşı bitkilerin antifungal aktivitesine bakılmıştır. Yapılan deneyler sonucu en belirgin antifungal aktiviteyi *H. ternum* türünün petrol eteri ve kloroform ekstralarının gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, tüm suşlara karşı etkili olan bu ekstraların özellikle insanlarda ciddi sağlık sorunlarına, hatta bazı durumlarda mortaliteye yol açan kandida enfeksiyonlarına karşı kullanılabileceği belirtilmiştir (Fenner ve ark. 2005).

Türkiye’de endemik bir tür olan *H. havvae* A. Güner bitkisinin *C. albicans* (ATCC 10231), *C. tropicalis* (ATCC 13808), *Meyerozyma guilliermondii* (ATCC 6260), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112) ve *Cryptococcus laurentii* (34142) suşlarına karşı antifungal etkisi araştırılmış; bitkinin yaprak ve kök ekstralarında ayrı ayrı antifungal aktivite tespit edilmiştir. Yaprak ve kök ekstralarının birlikte kullanılması durumunda ise antifungal etkinin arttığı belirtilmiştir (Dülger, 2014).

H. carinatum Griseb türünün flukonazol ile birlikte sinerjik antifungal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bitkinin iki farklı lipofilik fraksiyonun flukonazolün MİK değerini azalttığı saptanmıştır. Bu durum, flukonazole dirençli enfeksiyonlarda bitkinin flukonazolle kombine halde kullanılmasıyla olumlu sonuçlar alınabileceğini göstermektedir (Meirelles ve ark. 2017).

Antiviral Etki

H. perforatum bitkisinin bileşiminde bulunan hiperisin ve psödohiperisinin antiviral etkili bileşikler olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kubin ve ark. 2005). Antiviral aktiviteden sorumlu başlıca bileşik olan hiperisin, yapılan *in vitro* çalışmalarla birçok virüs suşuna karşı etkili bulunmuştur. Hiperisinin antiviral etkisi ışığa bağımlı reaksiyonlar sonucu gerçekleştiğinden ışık faktörü aktivitede önemli rol oynar.

Cinsel yolla bulaşan hastalıklar tüm dünyada birçok kişiyi etkilemekte ve halk sağlığı açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. HIV ve HSV virüslerine karşı etkili sentetik ilaçların çok ciddi yan etki profilleri bulunmaktadır. Hiperisinin her iki suşa karşı etkili olduğu saptanmıştır (Lavie ve ark. 1995). Cohen ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı çalışmada hiperisinin genital *Herpes simplex-2* virüsüne karşı 1 mg/mL konsantrasyondaki ED₅₀ değeri 0,0039 mg/mL olarak saptanmıştır (Cohen ve ark. 1996).

H. perforatum ekstresinin flavonoit ve kateşin bileşikler taşıyan fraksiyonlarının influenza virüsüne karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum hiperisin ve psöodohiperisin dışında bu flavonoitlerin de antiviral aktiviteye katkısı olduğunu göstermektedir (Wood ve ark. 1990).

Hiperisinin ayrıca fare sitomegalovirüsü (MCMV), Sindbis virüsü ve Hepatit C virüsüne karşı etkili olduğu belirtilmiştir (Barnes ve ark. 2001). Buna karşın, Jacobson ve arkadaşlarının 2001 yılında kronik Hepatit C hastası kişilerle yürüttüğü çalışmada 12 hastaya günde 0,05 mg/kg ve 7 hastaya günde 0,10 mg/kg toplam 8 hafta boyunca hiperisin uygulanmış ve Hepatit C virüsüne karşı herhangi bir aktivite bulunamamıştır. Bu ve bunun gibi bazı çalışmalar daha detaylı incelendiğinde hiperisinin aktivitesinde ışık faktörünün çok büyük rol oynadığı, ışıktan yoksunluk durumunda hiperisinin antiviral etkisinin bulunmadığı görülmektedir. Ayrıca yüksek doz hiperisin uygulamalarında hastalarda fototoksisite görülmektedir. Bu nedenler viral enfeksiyonlarda hiperisin kullanımını sınırlamaktadır (Jacobson ve ark. 2001).

Hiperisinin antiviral etkisinin ışığa bağımlı olduğunu kanıtlayan başka bir çalışma, yeterli ışığın sağlandığı takdirde aktivitenin 100 kata kadar arttığını göstermektedir. Bu etkinin mekanizması şöyle açıklanmıştır: Işıklı ortamda, hiperisin 0,73 gibi bir değerle kuantum verimi oldukça yüksek bir singlet oksijen molekülü oluşturabilmektedir. Bazı çalışmalar antiviral etkinin bu singlet oksijen molekülünün üretimine bağlı olduğunu belirtmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise antiviral aktivitenin süperoksit anyon ve hiperisinyum iyonlarının oluşumunu içeren daha kompleks bir süreç sonucu oluştuğunu ve singlet oksijen molekülünden bağımsız olduğunu göstermiştir. Meruelo ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, hiperisinin HIV kapsid proteini olan p24'te belirli birtakım değişiklikler meydana getirdiğini ve bu şekilde virüse karşı aktivite gösterdiğini kanıtlamaktadır (Carpenter ve ark. 1994). Bu ve

bunun gibi araştırmalar hiperisinin farklı virüsler üzerindeki antiviral etkisinin farklı ve kompleks mekanizmalar ile gerçekleştiğini göstermektedir.

2.6.4. Antioksidan Etki

Dış orbitalinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran atom veya moleküller serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundururlar. Bundan dolayı kararsız yapıdadırlar ve başka maddelerle tepkimeye girerek kararlı duruma geçme eğilimindedirler. Serbest radikallerin oksijen kaynaklı olanlarına reaktif oksijen türleri (ROT), nitrojen kaynaklı olanlarına ise reaktif nitrojen türleri (RNT) denilmektedir. Reaktif oksijen türlerine örnek olarak süperoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil, ($OH^{\bullet}$) peroksil ($ROO^{\bullet}$), alkoksil ($RO^{\bullet}$) ve gibi maddeler verilebilir. Bu reaktif oksijen türleri mutajendirler ve başta kanser olmak üzere, Alzheimer, AIDS gibi birçok ciddi hastalığa neden olmaktadırlar (Gioti ve ark. 2007; 2009).

Serbest radikallerin lipid peroksidasyonu yaptığı bilinmektedir. Hücre ve hücre içi organel membranlarının yapısında bulunan lipitlerle reaksiyona giren serbest radikaller, lipid peroksidasyonu ile membranın akışkanlığını ve geçirgenliğini bozabilmekte ve reaksiyonlar sonucu çok miktarda toksik yan ürün meydana gelmektedir. Bunun gibi durumlar sonucu ortaya çıkan biyolojik moleküllerin oksidatif hasarı, insan vücudunda birçok dejeneratif ve patolojik süreç başlatır. Yaşlanma bu süreçler sonucu meydana gelen bir olgudur. Aynı zamanda koroner kalp hastalığı, ateroskleroz ve romatizma gibi hastalıklar da oksidatif hasar sonucu oluşurlar (Halliwell, 1999).

Oksidatif hasarı önlemede etkili olan moleküllere antioksidanlar denir. Antioksidan etkili maddelerin vücuda alınmasıyla oksidatif hasar sonucu meydana gelen hastalıkların önlenmesi veya iyileştirilmesinin mümkün olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Özellikle doğal kökenli antioksidanlar son dönemde dikkat çekmektedir (Singh ve Downing, 1995).

Hypericum türleri içerdikleri çok sayıda farklı fenolik bileşiklerden dolayı antioksidan etkiye sahiptir.

H. perforatum türünün flavonoit içeriği açısından zengin ekstresinin serbest radikal giderici etkisinin değerlendirilmesi için Zou ve arkadaşları tarafından 2004 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, ekstrenin güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Zou ve ark. 2004).

Silva ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış olduğu çalışmada *H. perforatum* bitkisinin total etanol ekstresi ve bileşenlerinin antioksidan aktivitesi incelenmiş, flavonoitlerden kersetin ve luteolinin en etkili serbest radikal gidericiler; hiperozit ve klorojenik asidin etkili peroksit radikal süpürücüler oldukları saptanmıştır (Silva ve ark. 2008).

Mir ve arkadaşları tarafından 2016 yılında kültürü yapılarak elde edilen *H. perforatum* bitkisinin *in vitro* olarak serbest radikal giderici etkisinin araştırıldığı çalışmada ortaya çıkan sonuçlara göre, etkinin konsantrasyonla doğru orantılı olduğu saptanmıştır. İndol asetik asit ve 6-Benzilaminopürin ile hazırlanan ekstrenin kuvvetli hidroksil ve süperoksit anyon giderici etkili olduğu belirlenmiştir. Bu ekstrenin aynı zamanda lipid peroksidasyonunu da önlediği belirtilmiştir (Mir ve ark. 2016).

2018 yılında Gitea ve arkadaşları tarafından Romanya’da yürütülen çalışmada Transilvanya’nın kuzeybatısında bulunan çeşitli bölgelerden toplanan *H. perforatum* L., *H. maculatum* Cr., *H. hirsutum* L., *H. tetrapterum* Fr türlerinin polifenolik bileşikler ve hiperisin içeriği ile antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. *H. maculatum* ve *H. perforatum* FRAP yöntemine göre en yüksek antioksidan aktivite gösteren türler olarak belirlenmiştir (Gitea ve ark. 2018).

2013 yılında Fathi ve Ebrahimzadeh tarafından *H. perforatum* türünün antioksidan ve serbest radikal giderici etkilerini incelemek üzere yapılan çalışmada bitkinin metanol ekstresinin uygulanan farklı metodların tümüne göre bu etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucu saptanan nitrik oksit giderici aktivitenin bitkinin sahip olduğu antienflamatuvar etkiden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Fathi ve Ebrahimzadeh, 2013).

H. perforatum türünün fenolik içeriğini ve antioksidan özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan başka bir çalışmada DPPH (en düşük IC₅₀ değeri 0,52 µg/mL), ve FRAP (en yüksek redüksiyon kapasitesi: 104 mg Fe ekivalanı/g) metodlarına göre aktivite saptanmıştır. Nitrik oksit giderici (6,11 µg/mL), süperoksit giderici (1,86

$\mu\text{g/mL}$) ve lipid peroksidasyon inhibe edici ($0,0079 \mu\text{g/mL}$ etkisinin olduğu belirlenmiştir (Orčić ve ark. 2011).

H. perforatum ve *H. calycinum* türleriyle yapılan başka bir çalışmada DPPH metoduna göre *H. calycinum* türünün etkinliğinin $50,61 \pm 2,8$ inhibisyon oranıyla, $44,85 \pm 1,8$ oranında inhibisyon gösteren *H. perforatum* türüne göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun nedeninin *H. calycinum* türünün toplam fenolik bileşik içeriğinin ($313,94 \text{ mg}$ gallik asit ekivalanı/ 100 g) *H. perforatum* türünden daha yüksek olmasıyla ($308,83 \text{ mg}$ gallik asit ekivalanı/ 100 g) açıklanmaktadır (Öztürk ve Kıyan, 2016).

2018 yılında İtalya’da yapılan bir çalışmada Sicilya’da yetişen 11 farklı *Hypericum* türünün (*H. perforatum* L., *H. calycinum* L., *H. aegypticum* L., *H. androsaemum* L., *H. patulum* Thunb., *H. perforatum* L., *H. pubescens* Boiss., *H. tetrapterum* Fr., *H. hircinum* L., *H. hirsutum* L., *H. montanum* L.). antioksidan özellikleri değerlendirmiştir. Türlerin hepsinde antioksidan ve serbest radikal giderici aktivite saptandığı belirtilmiştir. Folin-Ciocalteu yöntemine göre en etkili türler sırasıyla *H. perforatum*, *H. androsaemum*, *H. tetrapterum* ve *H. calycinum* türleridir (Napoli ve ark. 2018).

Yine 2018 yılında Eroğlu Özkan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *H. neurocalycinum* ve *H. malatyanum* türlerinin antioksidan aktiveleri incelenmiştir. *H. neurocalycinum* türünün, *H. malatyanum* türüne göre DPPH serbest radikal giderici (EC_{50} değeri: $2,49 \pm 0,09 \text{ mg/mL}$) süperoksit anyon giderici (EC_{50} değeri: $0,613 \pm 0,05 \text{ mg/mL}$), ve lipid peroksidasyon inhibe edici (EC_{50} değeri: $2,49 \pm 0,09 \text{ mg/mL}$) etkisi daha yüksek bulunmuştur. Aktivitedeki bu farklılığın *H. neurocalycinum* türündeki antioksidan etkili rutin, kersetin, kempferol gibi flavonoit bileşiklerinin diğer türe göre daha yüksek miktarda bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Eroğlu Özkan ve ark. 2018).

H. tomentosum subsp. *pubescens* butanol ekstresinin Folin–Ciocalteu yöntemiyle antioksidan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada piknogenol, E vitamini ve rutin ile karşılaştırıldığında ekstrenin standartlara göre daha yüksek etkinlikte olduğu belirlenmiştir (Bouratoua ve ark. 2016).

H. perforatum L. türünün antioksidan etkisi üzerine yapılan bir çalışma bitkinin kloroform-metanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivite gösterdiğini

saptamıştır. Bitkinin kloroform ekstresi ise antioksidan aktivite göstermemiştir (Del Monte ve ark. 2014).

H. hircinum L. türü ile yapılan bir çalışmada bitkinin etanol ekstresi ve toplam altı fraksiyonu üzerinde antioksidan aktivite deneyleri yapılmıştır. Buna göre ekstrenin ve fraksiyonların etkinliğinin birbirine yakın ve oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Mandrone ve ark. 2015).

2.6.5. Sitotoksik Etki

Işığın tedavi edici özellikleri binlerce yıldır bilinmekle beraber, fotodinamik terapi (PDT) kavramının geliştirilmesi geçtiğimiz yüzyılda başlamıştır. PDT için temel olarak, fotosensibilizan bir madde, bir ışık kaynağı ve serbest oksijen molekülü gerekir. Fotosensibilizan maddenin tümör hücrelerinde birikim yapabilen, lokal veya sistemik yoldan hastaya verilebilen özellikte olması önemlidir. PDT kavramı ilk kez, 1960 yılında Mayo Clinic'te çalışan Lipson ve Schwartz'ın, hematoporfirinin asetik asit ve sülfürik asiti belli oranlarda içeren bir karışımını ameliyat sırasında enjekte edip floresans ışıkla aktive etmesi ve bu şekilde neoplastik lezyonların net bir şekilde görülebilmesi için kullanmaya başlamasıyla ortaya çıkmıştır. Bu hematoporfirin karışımı daha sonra Photofrin® adıyla uzun süre fotodinamik terapide kullanılmıştır, ancak uzun vadede ciddi fototoksisiteden sorumlu olduğundan yeni ajanların geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Dougherty ve ark. 1998).

Fotodinamik terapi, bir fotosensibilizan ajan ve görünür dalga boyundaki ışığın tümör hücreleri tarafından absorbe edilmesi sonucu sitotoksik etkili serbest oksijen türlerinin oluşumu ve bunun da irreversibl hücre hasarına neden olması esasına dayanır. Fotodinamik terapi, günümüzde klinik onkolojide kullanımı giderek yaygınlaşan bir tedavi yöntemidir ve baş-boyun kanserleri, beyin tümörleri, akciğer, pankreas, intraperitoneal boşluktaki kanserler, meme, prostat, cilt, akciğer ve pankreas kanserinde kullanılabilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

Hypericum türlerinde doğal olarak bulunan hiperisin, fotosensibilizan bir maddedir. Bu özelliğinden dolayı son yıllarda kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir molekül olduğu düşünülmekte ve bu amaçla *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışmaya konu olmaktadır. Yapılan çalışmalar hiperisinin kanser hücrelerinde fototoksisite oluşturduğunu ve olumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Hiperisin; uyarılmış triplet haldeki yüksek quantum verimi nedeniyle sahip olduğu yüksek fotooksidasyon kabiliyeti, singlet oksijen molekülü ve süperoksit anyon gibi serbest radikaller üretebilmesi, tümör dokusunda birikmesi ve ışıkla aktive olamadığı karanlık ortamda sıfır veya çok düşük toksisiteye neden olması ile PDT’de kullanılabilecek bir fotosensibilizan ajan olmaya çok uygun bir moleküldür. Lipofilik bir molekül olması nedeniyle mitokondri, lipozom, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı gibi organellerin membranında birikmektedir. Hücre tipi, hücre içindeki lokalizasyon, ortamdaki hiperisin konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve ışık kaynağıyla ilgili faktörler, hiperisinin kullanıldığı PDT’lerde aktiviteyi etkileyen önemli faktörlerdir (Kucharova ve ark. 2015).

2008 yılında Hashida ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *H. ascyron* bitkisinden tomoeon A-H olarak isimlendirilen 8 floroglusinol türevi bileşik izole edilmiş ve bu bileşiklerin insan kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir. Doksorubisinle karşılaştırılmalı olarak yapılan çalışmada, MTT Testi sonuçlarına göre tomoeon F bileşiği sentetik ilaca göre daha etkili bulunmuştur (Hashida ve ark. 2008).

Couladis ve arkadaşlarının 2002 yılında kolon ve karaciğer kanser hücreleri üzerine beş farklı *Hypericum* türünün sitotoksik etkilerinin incelendiği çalışmaya göre, *H. triquetrifolium* ve *H. empetrifolium* türlerinin her iki hücre hattında yüksek sitotoksik etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Couladis ve ark. 2002).

2015 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından *H. henryi* türünden hiperhenon A-F olmak üzere altı yeni disiklik açılfloroglusinol türevi ve bunların bilinen 12 adet analogu izole edilmiş ve insan kanser hücrelerindeki sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir. Buna göre bileşiklerin IC₅₀ değerleri 1,3-8,8 mM arasında bulunmuş ve yüksek etkinlik tespit edilmiştir (Zhang ve ark. 2015).

H. scabrum türünün sitotoksik aktivitesinin ve apoptoz indüklemeye etkisinin incelendiği bir çalışmada bitki ekstresinin diklorometan ve petrol eteri fraksiyonlarının sitotoksik etkisi olduğu belirlenmiştir. Metanol fraksiyonunun herhangi bir sitotoksik aktivite göstermediği not edilmiş, ancak metanol ekstresinin ve petrol eteri fraksiyonunun apoptoz indüklemeye kabiliyetinin olduğu tespit edilmiştir (Hamzeloo-Moghadam ve ark. 2015).

H. roeperianum türünden izole edilen on yeni bileşiğin antikanser etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yeni keşfedilen açılfloroflusinol türevi bileşiklerin zayıf sitotoksik aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir (Fobofou ve ark. 2015).

H. attenuatum türünden izole edilen iki yeni açılfloroglusinol türevi olan attenuatumion G ve attenuatumion H bileşiklerinin sitotoksik aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, attenuatumion H bileşiğinin IC₅₀ değeri 9,11 mM olarak bulunmuş ve orta derecede sitotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Zhou ve ark. 2014).

2018 yılında Sarrou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *H. perforatum* türünün sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. 0,01- 100 µg/mL arasında farklı konsantrasyonlardaki ekstrelerle intestinal kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmada yalnız 100 µg/mL konsantrasyondaki ekstrede sitotoksik etki saptandığı belirtilmiştir (Sarrou ve ark. 2018).

2006 yılında Stavropoulos ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *H. perforatum* ekstresinin polar metanol fraksiyonunun PDT’de kullanılan Photofrin® maddesine karşı gösterdiği belirgin sitotoksik etkinlik, selektif lokalizasyon, doğada bulunabilmesi, hazırlanış maliyetinin düşük olması gibi özelliklerle daha iyi bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Stavropoulos ve ark. 2006).

Nedialkov ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada *H.elegans* türünden izole edilen elegafenol ve 7-epi-klusianon bileşikleri ile Hodgkin lenfoma, insan lenfoid doku kanseri ve eritro myeloblastoid lösemi üzerinde MTT ile yapılan aktivite çalışmaları ile olumlu sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Nedialkov ve ark. 2011).

2.6.6. Antienflamatuar Etki

Enflamasyon; kan damarlarının ve lökositlerin rol oynadığı, virüs veya bakteri gibi mikroorganizmaların veya toksinlerin hücrelere zarar vermesinin önlenmesi ya da çeşitli hasarlar sonucu oluşan nekrotik dokuların uzaklaştırılmasına yönelik, organizmanın devamlılığı için geliştirilmiş kompleks bir olaydır. Temelde organizmayı koruyucu bir özelliği vardır. Enflamasyon normal bir fizyolojik yanıttır, fakat devam etmesi halinde dokularda ciddi zedelenmelere yol açabilir.

Antik çağlardan bu yana enflamasyonun tedavi edilmesinde bitkilerden yararlanılması son derece sık rastlanılan bir durum olmuştur. *Hypericum* türlerinin çok

uzun yıllardır yara, yanık ve egzama tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Son yıllarda bu bitkilerin antienflamatuar etkilerinin ve etki mekanizmasının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

2006 yılında Sanchez-Mateo ve arkadaşlarının Tenerife bölgesinden topladıkları *H. reflexum* türü ile yaptıkları çalışmada, bitkinin metanol ekstresinin ve bu ekstrenin kloroform ve butanol fraksiyonlarının kulak ödeminde azalma meydana getirdiği saptanmıştır (Sanchez-Mateo ve ark. 2006).

Hohmann ve arkadaşları tarafından 2015 yılında oral yoldan aşırı doz parasetamol uygulanarak hepatotoksisite, enflamasyon ve oksidatif stres meydana getirilen farelere *H. perforatum* ekstresinin oral olarak verilmesiyle hem enflamasyonun hem de karaciğer hasarının gerilediği tespit edilmiştir (Hohmann ve ark. 2015).

H. perforatum türünün antienflamatuar etkinliğinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, fluoksetin ve etodolakla karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Karagenin nedenli pençe ödemi oluşturulan farelere 50, 100, ve 300 mg/kg ekstre uygulandığında ödemde sırasıyla %53,7, %61,3 ve %75,3 oranında inhibisyon sağlandığı tespit edilmiştir (Abdel-Salam, 2005).

Sosa ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada *H. perforatum* bitkisinin hidroalkolik ekstresi, lipofilik ekstresi ve etilasetat fraksiyonu; ayrıca hiperisin, adhiperforin, amentoflavon, hiperozit, izokersitrin ve hiperforin disikloheksilamonyum (DHCA) tuzunun topikal antienflamatuar etkinlikleri değerlendirilmiştir. Farelerde kulak ödemi üzerinde yapılan deneylerde lipofilik ekstrenin en etkili olduğu, daha sonra sırasıyla etilasetat fraksiyonu ve hidroalkolik ekstrenin etkili olduğu belirtilmiştir. Amentoflavon, hiperisin, hiperforin DHCA tuzu ve adhiperforin indometazine göre daha etkili; izokersitrin ve hiperozit ise indometazinden daha az antienflamatuar etkili bulunmuştur (Sosa ve ark. 2007).

2002 yılında Raso ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada karagenin nedenli pençe ödemi oluşturulan farelerde yüksek dozda (günde 100 mg/kg) *H. perforatum* uygulanan farelerde bitkinin, lipopolisakkaritlerin modülasyonu, interferon- γ indüklü siklooksijenaz-2 (COX-2) ve nitrik oksit sentaz inhibisyonu yaparak enflamasyonda azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir (Raso ve ark. 2002).

H. perforatum türünün antienflamatuar etkinliğinin araştırıldığı başka bir çalışmada standardize %50 su-etanol ekstresinin karagenin nedenli pençe ödemi geliştirilen farelerde günlük 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozda oral yoldan uygulanmasıyla her iki dozda da antienflamatuar etki sağlandığı belirtilmiştir (Kumar ve ark. 2001).

Rabanal ve arkadaşlarının 2005 yılında yürüttüğü bir çalışmada Tenerife bölgesinden toplanan *H. canariense* ve *H. glandulosum* türleriyle hazırlanan infüzyon, metanol ekstresi ve bunun fraksiyonlarının, tetradekanoilforbol asetat (TPA) nedenli kulak ödemi oluşturulan fareler üzerindeki antienflamatuar etkinlikleri incelenmiştir. Buna göre bitkilerin infüzyonlarının ve *H. canariense* metanol ekstresi su fraksiyonunun dışındaki tüm ekstreler ödemde önemli ölçüde azalma meydana getirmiştir (Rabanal ve ark. 2005).

Erzincan - Kelkit bölgesinden toplanan *H. scabroides* türü ile yapılan bir çalışmada karagenin nedenli fare pençe ödemi üzerinde standart madde olarak diklofenak kullanılarak bir dizi deney yapılmıştır. Buna göre bitkinin metanol ekstresinin belirgin antienflamatuar etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (Mansour ve ark. 2014).

Crockett ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışmada *H. empetrifolium* türünden izole edilen iki adet yeni floroglusinol türevi bileşiğin antienflamatuar etkinliği incelenmiştir. 3-geranil-1-(20-metilpropanoil)floroglusinol ve 3-geranil-1-(20-metilbutanoil) floroglusinol adı verilen bileşiklerin yapılan *in vitro* deneylerle COX-1 ve COX-2 inhibitörü etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Crockett ve ark. 2008).

H. oblongifolium türüyle karagenin nedenli pençe ödemi geliştirilen fareler üzerinde yapılan çalışmada günde 100, 200 ve 300 mg/kg metanol ekstresi uygulanan farelerde belirgin antienflamatuar etki saptanmıştır (Raziq ve ark. 2016).

2.6.7. Analjezik ve Antinosiseptif Etki

Ağrı, her insanın çeşitli zamanlarda çeşitli nedenlerle yaşadığı hoş olmayan bir deneyimdir ve bu nedenle analjezik etkili ilaçlar her dönemde en yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Sentetik analjeziklerin tolerans ve yan etki sorunları bitkisel kökenli analjeziklerin tercih edilmesine neden olmaktadır.

H. perforatum bitkisinin siyatik ağrılarının giderilmesinde kullanılabileceği ilk kez Dioscorides tarafından rapor edilmiştir (Gunther, 1968). Antik çağlardan beri geleneksel olarak miyalji, siyatik, doku ve sinir harabiyeti durumlarında *H. perforatum* bitkisinden hazırlanan formülasyonların kullanıldığı bilinmektedir (Bombardelli ve Marazzoni, 1995; Barnes ve ark. 2001). Bitkinin analjezik ve antinosiseptif etkinliğinin ve etki mekanizmasının belirlenmesi ile ilgili yapılan birçok çalışma mevcuttur.

Son yıllarda *H. perforatum* bitkisinin antinosiseptif etkisinden sorumlu bileşikleri belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bitkinin başlıca hiperforin gibi floroglusinol bileşikleri içeren kloroform fraksiyonu, hiperisin içeren metanol fraksiyonu ve flavonoit bileşiklerince zengin bir başka fraksiyonunun farelerde antinosiseptif etki gösterdiği tespit edilmiştir (Galeotti ve ark. 2010a, 2010b). Hiperisin ve hiperforin yalnız başlarına uygulandıklarında da benzer etkinlik gözlemlendiğinden etkinin bu iki molekülden kaynaklandığı; flavonoitlerin antinosiseptif etkinliğinin ise sahip oldukları antienflamatuar etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir (Tedeschi ve ark. 2003). Flavonoitlerin antinosiseptif etkinliğinin ayrı ayrı değerlendirildiği daha detaylı çalışmalar da mevcuttur. Buna göre mirsitrin, kersitrin ve rutin aktivite gösterirken; bitkide bulunan ana flavonoit bileşiklerinden olan kersetin ve amentoflavon gibi moleküller farklı konsantrasyonlarda herhangi bir analjezik etki sağlamamaktadır. Elde edilen bu sonuçların bitkinin antinosiseptif etkisinden sorumlu bileşiklerin hiperisin ve hiperforin olduğu düşüncesini destekler nitelikte olduğu belirtilmiştir (Meotti ve ark. 2006; Galeotti ve ark. 2010a).

H. perforatum kuru ekstre, metanol, etanol ve kloroform ekstralarının sıçan ve farelerde oral olarak uygulandıklarında akut termal ve kimyasal ağrı eşiğini yükselttiklerini gösteren çalışmalar vardır. Doza bağımlı çalışmalar standardize *H. perforatum* ekstralarının (%0,3 hiperisin; %4-5 hiperforin) farelerle yapılan sıcak plaka testi (Kumar ve ark. 2001a, 2001b; Abdel-Salam, 2005; Galeotti ve ark. 2010a), kuyruk çekme testi (Kumar ve ark. 2001a; 2001b) gibi analjezik aktivite deneylerine göre termal antinosiseptif etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. *H. perforatum* bitkisi ayrıca asetik asit indüklü abdominal konstrüksiyonları inhibe etme özelliği göstermektedir (Bukhari ve ark. 2004; Galeotti ve ark. 2010a)

Deney hayvanlarının bir pençesine küçük hacimlerde formalin enjekte edilmesi ve alınan yanıtın kaydedilmesi esasına dayanarak analjezik etkinliğin

değerlendirilmesini sağlayan formalin testinde yanıt iki aşamada gelir: İlk aşamada periferik nörosseptörler kimyasala doğrudan yanıt verirken, ikinci aşama periferik ve santral sensitizasyonu içeren enflamasyona bir cevap niteliğindedir. *H. perforatum* hem periferik hem de santral antinosiseptif mekanizmalarla bu iki aşamada da antinosiseptif etki göstermektedir. Kuru ekstre aynı zamanda uzun etkili bir antinosisepsiyon sağlamaktadır, oral uygulamadan 2 saat sonra hala etkinin varlığından söz edilebilmektedir (Abdel-Salam, 2005; Galeotti ve ark. 2010a).

H. perforatum türünün ağrı üzerine rahatlatıcı etkisi insan deneyleri ile de kanıtlanmıştır. *H. perforatum*, *Allium sativum*, *Verbascum thapsus* ve *Calendula officinalis* bitkilerinden oluşan kombine bir kulak damlası uygulanan akut otitis media'lı çocuklarda ağrının azaldığı rapor edilmiştir (Sarrell ve ark. 2003).

Herpes kaynaklı deri lezyonu bulunan 149 hasta üzerinde yapılan prospektif, randomize ve kontrollü klinik deneylerde, hastalara bakır sülfat ve *H. perforatum* ekstresi içeren bir formülasyon topikal olarak uygulanmış ve akut ağrıda azalma meydana getirdiği belirtilmiştir (Clewell ve ark. 2012)

Mainetti ve Carnevali'nin 2013 yılında yaptığı bir çalışmada pediatrik yanık yaralarına *H. perforatum* yağı uygulanmasıyla hastalarda ağrı şikâyetinin azaldığı saptanmıştır (Mainetti ve Carnevali, 2013).

2010 yılında yapılan randomize, çift kör klinik deneylerde sezaryen operasyonu geçiren 144 kadın hastaya *H. perforatum* içeren krem uygulandığında ağrı seviyelerinde belirgin miktarda azalma olduğu rapor edilmiştir (Samadi ve ark. 2010).

Son dönemlerde yapılan bazı klinik çalışmalar *H. perforatum* bitkisinin nöropatik ağrı durumunda kullanılabileceğine dair sonuçlar vermektedir. Kronik konstriksiyon hasarı oluşturulan farelerde standardize *H. perforatum* kuru ekstresinin (%0,32 hiperisin; %0,42 hiperforin) antihiperalezik etkisinin olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda kemoterapötik bir ajan olan oksaliptatin, antiretroviral bir ilaç olan zalsitabin gibi nörotoksikasyon yapan ilaçlardan kaynaklı nöropatik ağrıların azaltılmasında da başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalar oral yoldan düşük dozda (sıçanlarda günde 30-60 mg/kg; farelerde günde 5 mg/kg) uygulanan *H. perforatum* ekstresinin uzun etkili bir analjezi sağladığını da göstermektedir. Uygulamadan yaklaşık 180 dakika sonra dahi analjezik etki tespit edilmiştir (Galeotti ve ark. 2010b; Sanna ve ark. 2016).

2017 yılında sunulan bir vaka olgusunda trigeminal nevralji öykülü 53 yaşındaki İspanyol kadın hasta *H. perforatum* bitkisinin homeopatik bir preparatını (dilaltında çözünen 5 pellet 6 C, 3X/gün) kullanmış, bunun dışında herhangi bir tedavi görmediği rapor edilen hastanın ağrılarının tamamen yok olduğu belirtilmiştir. Hasta homeopatik preparatı kullanmayı bıraktığında ağrı yeniden başlamıştır (Assiri ve ark. 2017). Bitkinin trigeminal nevraljide kullanımı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada *H. grandifolium* türünün metanol ekstresi ve çeşitli fraksiyonların analjezik etkinliği değerlendirilmiş, metanol ekstresinin ve kloroform fraksiyonunun periferik ve santral analjezik etki gösterdiği belirlenmiştir (Bonkanka ve ark. 2011).

2.6.8. Premenstrual Sendrom Üzerine Etki

Premenstrual sendrom (PMS) kavramı ilk kez 1931’de Dr. Robert Frank tarafından tanımlanmıştır. Yayımladığı bir dizi vaka raporunda, bazı kadınların menstruasyondan birkaç gün öncesinde çeşitli duygusal semptomlar yaşadığı, halihazırda var olan diğer fiziksel şikayetlerinde artış olduğu ve genel durumlarının kötüleştiği bu tabloya PMS adını vermiştir.

PMS durumunda belirtiler menstruasyonun başlamasından önceki hafta görülür, menstruasyonun başlamasıyla tüm belirtilerde iyileşme fark edilir ve menstruasyon döneminin bitmesinden sonraki haftada belirtilerin tümü veya en az biri kaybolur. Bu belirtiler; ani mod değişiklikleri, genel bir kızgınlık hali, depresif düşünceler, umutsuzluk hissi, anksiyete, kapana kısılmış hissetme, günlük aktivitelere duyulan ilginin azalması, konsantrasyon bozukluğu, uykusuzluk veya aşırı uyuma, iştahta değişimler (çok yeme veya az yeme) gibi emosyonel belirtiler veya göğüslerde gerginlik, eklem ya da kas ağrısı gibi fiziksel belirtiler olabilir (Yonkers ve Simoni, 2018).

PMS bazı kişilerde yaşam kalitesini düşürmekte ve yaklaşık %5’inde tedavi gerektiren ciddi bir sorun haline gelebilmektedir. Bu durumlarda ilaç tedavisi gerekebilir ve ilaç olarak da PMS tedavisinde etkinliği kanıtlanan selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) tercih edilmektedir (Yonkers ve Simoni, 2018). Dolayısıyla SSRI olduğu bilinen *Hypericum* türleri PMS tedavisinde çok büyük önem kazanmıştır ve etkinliğinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur.

PMS belirtileri gösteren gönüllü 96 kadın üzerinde yapılan bir çalışmada, standardize 900 µg hiperisin içeren 300 mg *H. perforatum* ekstresi günde 1 tablet olarak iki menstrual döngü boyunca oral yoldan uygulanmış ve hastaların tümünde belirtilerde %50 oranında azalma görülmüştür (Stevinson ve Ernst, 2000).

Ghazanfarpour ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yürütülen bir çalışmada en az altı aydır PMS belirtileri yaşayan 170 kadın hasta randomize iki gruba ayrılmış ve bir gruba günde iki kez 680 µg hiperisin içeren tablet, diğer gruba ise günde iki kez plasebo olarak sadece selüloz içeren tablet verilmiştir. 8 haftalık uygulamanın ardından hiperisin içeren tablet uygulanan gruptaki hastalarda görülen belirtilerde %40 azalma olduğu rapor edilmiştir (Ghazanfarpour ve ark. 2011).

2010 yılında Canning ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada orta derecede PMS teşhisi konulan 18-45 yaş aralığındaki 36 kadın hastanın 18'ine standardize %0,18-3,38 hiperforin içeren *H. perforatum* (900 mg/gün) tableti, diğer 18'ine ise plasebo tablet verilmiştir. İki menstrual döngü boyunca yürütülen çalışmada *H. perforatum* ekstresi içeren tablet uygulanan hastaların hem fiziksel hem de davranışsal belirtilerde azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Canning ve ark. 2010).

2.6.9. Menopoz Semptomları Üzerine Etki

H. perforatum ekstrelerinin depresyon, anksiyete ve uyku bozukluklarındaki kullanımı, menopozla alakalı olarak bu sıkıntıları yaşayan kişilerde önerilebilecek potansiyel bir ürün olabileceğini düşündürmüş ve son dönemlerde bu amaçla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Sıçanların santral sinir sisteminin mezolimbik bölgelerinde dopamin sistemleri üzerinde etki gösterdiği belirlenen *H. perforatum*, bu etki mekanizması nedeniyle özellikle sıcak basması şikayetinde olumlu etki göstermektedir. Dopaminin vücut sıcaklığı düzenleme üzerine etkisi bilinmekte ve bu nedenle dopamin agonisti ürünlerin sıcak basması şikâyetinin kontrol altına alınmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Barros ve ark. 2004). Ayrıca *H. perforatum* ekstrelerinin β-adrenoreseptörler üzerindeki down-regulasyon etkisinin de bu etki üzerinde rolü vardır. Yükselmiş beyin noradrenalin seviyeleri sıcak basmasına neden olabilmekte ve bu nedenle noradrenerjik aktivitenin inhibisyonu bu durum üzerinde olumlu etki yaratmaktadır (Kientsch ve ark. 2001).

Menopoz sıkıntıları yaşayan 43 ve 65 yaş arası 111 kadına *H. perforatum* LI 160 ekstresi günde 405-675 mg dozda 12 hafta boyunca uygulanmış, depresif mod, gerginlik, anksiyete bozukluğu, konsantrasyon bozukluğu, uygu düzensizliği gibi psikolojik; sıcak basması, palpasyon, baş ağrısı gibi psikosomatik semptomların tümünde iyileşme olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kadınların tümünde cinsel istekliliğin arttığı gözlemlenmiştir. Fakat bu çalışma kontrol grubu olmaksızın yapılan bir gözlemlenme çalışması olduğundan daha detaylı testlere ihtiyaç duyulmaktadır (Kelsey ve ark. 1982).

H. perforatum ile menopoz şikayetlerinde kullanımı olan *Cimicifuga racemosa* ekstrelerinin kombine halde kullanımıyla ilgili yapılan bazı çalışmalar umut verici sonuçlar sunmaktadır. Çift kör, plasebo kontrollü olarak yapılan bir çalışmada menopoz şikayetleri yaşayan 301 kadına Remifemin Plus® (standardize 0,25 mg hiperisine eş 245-350 mg *H. perforatum* ekstresi ve 1 mg triterpen glikozite eş *C. racemosa* ekstresi) adlı ürün günde 2 tablet olarak 8 hafta boyunca uygulanmıştır. Buna göre ekstre içeren tablet uygulanan kadınların %50'sinde şikayetlerde azalma olduğu belirtilmiştir. Plasebo uygulanan grupta bu oran %19,6'dır (Uebelhack ve ark. 2006).

Aynı ürünle yapılan başka bir çift kör randomize çalışma 179 kadınla 6 hafta boyunca yürütülmüş ve anksiyete, depresif mod, gerginlik gibi psikovejetatif sıkıntılarda belirgin bir iyileşme olduğu tespit edilmiştir. Plasebo uygulanan grupta bu bu etki görülmemiştir (Boblitz ve ark. 2000).

Yine aynı ürünle 12 hafta boyunca 812 kadın üzerinde yürütülen bir çalışmada kadınların %90'ında özellikle sıcak basması gibi psikovejetatif şikâyetlerde azalma olduğu; %82'sinin tedavi sonuçlarını çok iyi veya iyi olarak değerlendirdiği belirtilmiş ve bu durum 176 doktor tarafından onaylanmıştır (Gerhard ve ark. 1995).

Gynoplus® isimli bir diğer kombine preparat (1 mg triterpen glikozitine eş 0,0364 mL *C. racemosa* rizom ekstresi, 0,25 mg hiperisine eş 84 mg kuru *H. perforatum* ekstresi) klimakterik semptomlar yaşayan 89 kadına 12 hafta boyunca uygulanmış ve özellikle sıcak basması şikâyetinde plaseboya göre belirgin olumlu sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Chung ve ark. 2007).

2.6.10. Bağımlılık Üzerine Etki

H. perforatum türünün çalışmalarla kanıtlanmış antidepresan etkisinden dolayı başta alkol bağımlılığı olmak üzere farklı bağımlılık durumlarında tedavi için potansiyel bir ajan olduğu düşünülmüş ve bu amaçla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar *H. perforatum* bitkisinin bağımlılık tedavisinde kullanılabileceği fikrini destekler niteliktedir.

H. perforatum ve etanol arasında herhangi bir etkileşim olmadığı bilinmektedir (Greenson ve ark. 2001). *H. perforatum* bitkisinin kandaki etanol seviyesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı, aynı zamanda sağlıklı kişilerde alkolle birlikte alındığında kognitif-motor performansta herhangi bir değişikliğe neden olmadığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Schmidt ve Sommer, 1993). *H. perforatum* ekstrelerinin etanol yoksunluk sendromları üzerindeki inhibitör etkisi iki mekanizmayla açıklanmaktadır: İlk açıklama, bu aktivitenin bitkinin sahip olduğu serotonerjik özelliklerden, 5-HTP geri alımını azaltıcı etkisinden ve MAO inhibitörü etkisinden kaynaklandığı şeklindedir (Perovic ve Müller, 1995; Bennett ve ark. 1998; Calapai ve ark.1999). Birçok çalışma, etanol yoksunluk sendromları yaşayan sıçanlarda bahsedilen serotonerjik etkilere sahip bir sentetik antidepresan olan fluoksetinin yararlı olduğunu göstermektedir. *H. perforatum* ekstreleri de aynı mekanizmayla bu konuda yararlı rol oynamaktadır. Bir diğer açıklama, *H. perforatum* ekstrelerinin nitrikoksit sentaz (NOS) enzimine karşı inhibitör etkisinin aktiviteye katkı sağladığı şeklindedir. NOS enzimi, L-arjinin prekürsörlüğünde nitrik oksit (NO) üretimini gerçekleştiren bir enzimdir. Bağımlılık ve yoksunluk sendromuyla alakalı birçok tepkimenin NO ile ilgili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. NOS inhibitörlerinin yoksunluk sendromunda olumlu etkilerinin olduğu da klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır (Uzbay ve Oglesby, 2001).

H. perforatum ekstresinin etanol yoksunluk sendromu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 15 gün boyunca %7,2 (h/h) etanol verilen sıçanlara daha sonra 25-200 mg/kg ekstre serum fizyolojikle karıştırılarak intraperitoneal yoldan enjekte edilmiştir. Etanol yoksunluk semptomlarının başlamasının ardından her ikinci, dördüncü ve altıncı saat başında sıçanlar 5'er dakika boyunca gözlemlenmiş, lokomotor hiperaktivite, stereotip yoksunluk davranışları ve tremorlar değerlendirilmiştir. Buna göre, *H. perforatum* ekstresi verilen sıçanlarda doza bağlı olarak belirtilerin azaldığı,

özellikle 50 ve 100 mg/kg dozda belirgin bir yoksunluk semptomu azaltıcı etkinin görüldüğü belirtilmiştir (Coşkun ve ark. 2006).

8 gün boyunca eroin verilerek bağımlı hale getirilen sıçanlara *H. perforatum* ekstrelerinin oral yoldan uygulanarak yoksunluk semptomlarındaki değişimin değerlendirildiği bir çalışmada, ekstreler sıçanlara günde iki kez 20 mg/kg dozda veya naloksandan 90 dakika önce olmak üzere günde bir kez aynı dozda verilmiştir. Hidroetanol ve etanol ekstreleri verilen sıçanlarda abdominal konstrüksiyonun ve yoksunluğa bağlı diyarenin azaldığı, su ekstrelerinin böyle bir etkiye neden olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçların opioid bağımlılığı tedavisinde fiziksel yoksunluk semptomlarının azaltılması amacıyla *H. perforatum* kullanılabileceğine işaret ettiği belirtilmiştir (Subhan ve ark. 2008).

H. perforatum türünün nikotin bağımlılığında yoksunluk sendromları üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. 14 gün boyunca günde dört kez 2 mg/kg nikotin enjekte edilerek bağımlılık geliştirilen farelere, son nikotin enjeksiyonundan hemen sonra oral yoldan 125-500 mg/kg olmak üzere değişen dozlarda *H. perforatum* ekstresi uygulanmıştır. Sonuç olarak tüm farelerde yoksunluğa bağlı gelişen lokomotor aktivitenin azaldığı, maksimum etkinin ise 500 mg/kg dozda ekstre uygulanan farelerde görüldüğü saptanmıştır (Catania ve ark. 2003).

H. perforatum ekstrelerinin morfin yoksunluk sendromunda morfine bağımlı sıçanlar üzerindeki etkilerinin klonidin ile karşılıklı olarak değerlendirildiği bir çalışmaya göre, 0,4 mL/200g dozda, klonidin *H. perforatum* ekstresine göre daha etkili bulunmuş; 0,8 mL/200g dozda, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamış; 1,2 mL/200 g dozda ise *H. perforatum* ekstresi klonidine göre anlamlı derecede daha etkili bulunmuştur (Feily ve Abbasi, 2009).

2.6.11. Nörodejeneratif Hastalıklar Üzerine Etki

Nörodejeneratif hastalıklar, özellikle insan beynindeki nöronları etkileyen, tedavisi günümüzde mümkün olmayan, ilerleyici hastalıklardır. Beklenen ortalama yaşam süresi arttıkça toplumda nörodejeneratif hastalık görülme sıklığı da artmaktadır; fakat sadece yaşa bağlı olarak değil, genetik faktörlerin etkisiyle de ortaya çıkabilirler.

En yaygın olarak rastlanan ve en çok bilinen nörodejeneratif hastalıklar; Alzheimer, Parkinson, Huntington sendromu, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) olarak sayılabilir. Bunun dışında birçok nörodejeneratif hastalık da mevcuttur.

Hypericum türlerinin nörodejeneratif hastalıklarda kullanımıyla ilgili birçok çalışma vardır. Nörodejeneratif hastalıklar çok ciddi sonuçları olan ve tedavisi olmayan hastalıklar olduğu için elde edilen olumlu sonuçlar tüm dünyada ilgiyle takip edilmektedir.

H. perforatum bileşiminde bulunan hiperforinin yapılan çalışmalarla nörotransmitter geri alım inhibitörü etkisinin olduğu, hücre içi sodyum ve kalsiyum seviyelerini arttırdığı, geçici reseptör protein kanonik kanal 6 (TRPC6)'yı aktive ettiği ve N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör antagonisti olduğu belirlenmiştir. Bu mekanizmalar nörodejeneratif hastalıklarda önleyici olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yapılan bir diğer *in vitro* çalışmada hiperforinin amiloid- β plaklarını parçalama özelliği olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç hiperforinin özellikle Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabileceğini göstermesi açısından son derece önemlidir (Griffith ve ark. 2016).

Hiperforince zengin standardize *H. perforatum* ekstresinin Parkinson hastalığı üzerindeki etkilerinin değerlendirdiği bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada sıçanlara rotenon uygulanarak nörotoksisite meydana getirilmiş, daha sonra iki gruba ayrılan sıçanlardan ilk gruba %6 hiperforin içeren ekstre, diğer gruba ise %0,2 hiperforin içeren ekstre günde 4 mg/kg i.p. olarak uygulanmıştır. Buna göre, hiperforince zengin ekstre uygulanan grupta sinir harabiyetinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Gómez del Rio ve ark. 2013).

H. perforatum bitkisinden kersetin, kempferol ve biapigeninin izole edilerek bu maddelerin Parkinson hastalığı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, mitokondriyal membrana hasar vererek hastalığın mekanizmasında rol oynayan α -synuclein maddesinin birikimini azaltarak olumlu etki gösterdiği bildirilmiştir (Vieira ve ark. 2011).

Kraus ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir çalışmada *H. perforatum* ekstresinin mikrogliyal aktivasyonu arttırdığı, aynı zamanda amiloid- β birikimine bağlı toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (Kraus ve ark. 2007).

Yapılan bir çalışma ise yarısentetik bir hiperforin türevi olan tetrahidrohiperforinin Alzheimer hastalığı geliştirilen transgenik fare modellerinde nöroprotektif etkilerinin olduğu ve hastalığa bağlı hafıza kaybını önlediği saptanmıştır. Bu etkinin hücre membranındaki TRPC3/6/7 kanal reseptörlerine agonist etkisiyle olduğu belirtilmiştir (Montecinos-Oliva ve ark. 2015)

Tetrahidrohiperforinin hücre içinde Ca^{+2} konsantrasyonunu artırarak daha güçlü sinaptik cevaplar sağlanmasına neden olduğunu, bunun da amiloid- β oligomerlerden kaynaklanan dejenerasyonu önlediği belirtilmiştir (Ittner ve Götz, 2011; Nussbaum ve ark. 2013).

H. scabrum türünden izole edilen polisiklik açılfloroglusinol türevi bileşiklerin glutamat indüklü toksisite meydana getirilen beyin SK-N-SH hücrelerinde 10 μ M konsantrasyonda belirgin nöroprotektif etkilerinin olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur (Gao ve ark. 2016).

H. uralum türünden izole edilen hiperuralon C ve D bileşiklerinin Ellman metoduyla asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada bileşiklerin orta derecede inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2015b).

2.6.12. Diğer Etkiler

Hypericum türlerinin yukarıda bahsedilenler dışında yapılan aktivite çalışmaları ve bu çalışmalar neticesinde saptanan başka birtakım önemli etkileri de mevcuttur.

H. scabrum türünün antikonvülsan etkinliğinin ve muhtemel etki mekanizmasının açıklandığı bir çalışmada sulu ekstrenin, pentilentetrazol (PTZ) ve pikrotoksin ile konvülsiyon oluşturulan farelerde günde 125/500 mg/kg, i.p. uygulanmasıyla PTZ indüklü konvülsiyon oluşturulanlarda belirgin antikonvülsan etki gözlenmiştir. 500 mg/kg i.p. ekstre uygulanan grupta mortalite %100 oranında önlenmiş olup pikrotoksin uygulanan farelerde de antikonvülsan etki sağlanmıştır. Etki mekanizmasının GABA ve/veya nitrik oksit yolak üzerinden gerçekleştiği belirtilmiştir (Ebrahimzadeh ve ark. 2013).

H. perforatum türünün anksiyolitik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bitkinin total ekstresinin, protohiperisin gibi bitkiden izole edilen bazı bileşiklerin ve hiperisin

ile psödohiperisin içeren fraksiyonunun anksiyolitik aktivitesi sıçanlar üzerinde aydınlık-karanlık kutusu testi ile değerlendirilmiştir. Buna göre, *H. perforatum* total ekstresinin lokomotor aktiviteyi arttırdığı ve anksiyolitik etki sağladığı, buna karşılık saf haldeki maddelerin herhangi bir anksiyolitik etkiye neden olmadığı tespit edilmiştir. Elektrofizyolojik testler ile etki mekanizması üzerinde yapılan çalışmalar hiperisinin GABA-aktif klorür akımlarını azalttığını, psödohiperisinin ise tam tersi etki yaptığını göstermiştir. Diğer yandan hem hiperisinin hem de psödohiperisinin N-metil-D-aspartat aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Vandenbogaerde ve ark. 2000).

H. perforatum türünün sıçanlar üzerindeki anksiyolitik aktivitesini araştıran bir diğer çalışmada, günde 62,5-500 mg/kg *H. perforatum* LI 160 (standardize %0,28 naftodiantron ve %3,2 hiperforin içeren ekstre) ekstresi ile yapılan yükseltilmiş artı labirent testi, kedi kokusu testi ve aydınlık-karanlık kutusu testleri ile anksiyolitik aktivite değerlendirmesi yapılmıştır. 125 mg/kg dozda uygulanan ekstrenin yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyolitik etki sağladığı görülmüştür. Kedi kokusu testinde herhangi bir etki görülmemiş, aydınlık-karanlık kutusu testinde ise ekstre standart olarak kullanılan imipramine (günde 15 mg/kg) benzer aktivite göstermiştir (Flausino ve ark. 2002).

Yine *H. perforatum* türünün anksiyolitik etkinliğinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada %50'lik etanol ekstresi ile; yükseltilmiş sıfır labirent testi, yükseltilmiş artı labirent testi ve sosyal iletişim testi ile ekstrenin sıçanlar üzerindeki anksiyolitik etkisine bakılmıştır. Buna göre günde 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozda ekstrenin oral yoldan uygulandığı sıçanlarda belirgin anksiyolitik etki saptanmıştır (Kumar ve ark. 2000).

İngiliz Bitkisel İlaç Farmakopesi *H. perforatum* bitkisini sedatif bitkiler listesine almıştır. *H. perforatum* LI 160 ekstresiyle yaş ortalaması 59,8 olan 12 gönüllü üzerinde çift kör, plasebo kontrollü bir çalışma yürütülmüş; ekstre verilen kişilerde EEG analizi yapıldığında derin uykuya daha kolay geçtikleri görülmüştür. Fakat uyku süresi ve ani uyanmalar gibi durumlar üzerinde ise herhangi bir etki tespit edilememesi, *H. perforatum* bitkisinin uyku üzerindeki etkisinin anksiyolitik veya antidepresan etkisine bağlı olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir (Schulz, 1994).

H. oblongifolium Wall türünün köklerinden izole edilen ksanton bileşiklerinin antiülser etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, hiperikarin C, hiperilidin D ve 3,4-dihidroksi-5-metoksiksanton olmak üzere üç yeni ksanton bileşiği keşfedilmiş, 3,4-

dihidroksi-5-metoksiksanton bileşiğinin güçlü üreaz inhibitör etkinliğinin olduğu, hiperikori D bileşiğinin ise orta derecede üreaz inhibisyonu yaptığı ve bu etkiden dolayı, bu moleküllerin antiülser etkinliğinin olduğu belirlenmiştir (Ali ve ark. 2014).

H. hircinum L. türünün antioksidan ve antikolajenaz etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, ekstrenin *in vitro* kolajenaz aktivitesi üzerinde inhibitör etkisinin olduğu saptanmış ve IC₅₀ değeri 156 µg/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca fraksiyonların da ayrı ayrı kolajenaz inhibitör etkinliğine bakılmış ve flavonol bileşiklerince zengin fraksiyonların en yüksek inhibisyon sağladığı belirlenmiştir. Bu çalışmalar doku yıkımında büyük rol oynayan matriks metalloproteinaz enzimlerini inhibe edici etkisi bulunan yeni bir bileşik kaynağının bulunması açısından çok önemlidir ve yaşlanma karşıtı ürünlerin bileşimine katıldığında olumlu sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir (Mandrone ve ark. 2015).

H. origanifolium Willd türünün deri yaşlanmasını önleyici etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, bitkinin etanol ekstresinin antikolajenaz, anti elastaz ve antiyaluronidaz etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla bir dizi *in vitro* deney yapılmıştır. Ekstre maksimum inhibitör aktiviteyi kolajenaz enzimi üzerinde göstermiştir. Antikolajenaz aktivitesi antiyaluronidaz aktivitesine göre on kat fazla bulunmuştur. 1000 µg/mL konsantrasyonda antikolajenaz aktivite değeri %79,39; antiyaluronidaz aktivite değeri %7,6 ve antielastaz aktivite değeri %56 olarak tespit edilmiştir (Boran, 2018).

Hiperforinin antianjiogenik etkinliğinin olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Anjiogenesis, damar oluşumundan önceki aşamada endotel hücrelerinin kümelenmesi ile kapillerlerin dallanıp genişlemesi olarak tanımlanabilir. Anjiogenesis, yaraların iyileşmesi ve üreme gibi durumlarda yaşamsal önemi olan bir kavramdır, ancak tümör metastazında da rolü vardır. Anjiogenesis ile tümör etrafında oluşan damarlanma tümörün beslenmesine ve dolayısıyla progresyon ve metastazına neden olmaktadır. Hiperforinin; *in vitro* deneylerde nötrofil ve monosit kemotaksisini, *in vivo* deneylerde ise kemokin indüklü anjiogenesisi azalttığı belirlenmiştir (Lorusso ve ark. 2009). Başka bir çalışma ile bir hiperforin türevi olan oktahidrohiperforinin hiperforine göre etkinliğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Martinez-Poveda ve ark. 2010).

H. perforatum türünün antiobezite ve antihiperlipidemik etkileri üzerine yapılan çalışmalar da vardır. Zou ve arkadaşlarının 2005 yılında yürüttüğü çalışmada 16 hafta boyunca kolesterolce zengin diyetle beslenen sıçanlara flavonoidce zengin *H.*

perforatum ekstresi uygulandığında serum toplam kolesterol ve trigliserit seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada günde 100 mg/kg ve 200 mg/kg ekstre normal diyetle beslenen normal kilolu sıçanlar, yüksek yağlı diyetle beslenen obez sıçanlar ve fruktozla beslenen sıçanlara 15 gün boyunca oral yoldan uygulanmıştır. Buna göre her üç grupta da total kolesterol ve LDL değerlerinin ve insülin direncinin azaldığı, kilo alımının ise durduğu gözlemlenmiştir. Bu etki en çok normal diyetle beslenen normal kilolu sıçanlarda, daha sonra yüksek yağlı diyetle beslenenlerde ve en az da fruktozla beslenen sıçanlarda görülmüştür (Husain ve ark. 2011).

Günümüzde tüm dünyada büyük bir sorun haline gelen ve en yaygın hastalıklardan biri olan diyabetes mellitusa karşı *H. perforatum* ekstrelerinin ve bitkiden izole edilen bileşiklerinin etkinliğini gösteren bazı çalışmalar da yapılmıştır. 15 gün boyunca *H. perforatum* etil asetat ekstresi 50,100 ve 200 mg/kg oral yoldan uygulanan diyabetik sıçanlarda kan glukoz seviyelerinde belirgin bir azalma olduğu, uygulanan doz miktarı arttıkça glukoz seviyesindeki düşüşün de arttığı rapor edilmiştir (Arokiyaraj ve ark. 2011). Bir diğer çalışmada streptozotosin ile diyabetik yapılan sıçanlara 45 gün boyunca oral yoldan uygulanan rutin serum glukoz düzeyinde ve glikozillenmiş hemoglobin seviyesinde azalmaya, insülin, C-peptid, hemoglobin ve protein seviyelerinde ise artışa neden olduğu belirtilmiştir (Kamalakkannan ve Prince, 2006).

2.6.13. Farmakokinetik Özellikleri

H. perforatum LI 160 ekstresinde hiperisin ve türevlerinin farmakokinetik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, sağlıklı erkek gönüllülere günde bir kez 160, 300, 900 ve 1800 mg ekstre oral yoldan uygulanmıştır. Plazma pik konsantrasyonları ilk üç doz için 1,5 ng/mL; 7,5 ng/mL ve 14,2 ng/mL olarak bulunmuştur. Hiperisin için plazma pik konsantrasyonu 2,0-2,6 saat; psödohiperisin için 0,4-0,6 saat sonra gerçekleşmiştir. Hiperisinin eliminasyon yarı ömrü 24,8-26,5 saat olarak bulunmuştur (Biber ve ark. 1998). Bu sürenin uzunluğunun nedeni, hiperisinin albumin ve lipoproteinlere karşı afinitesinin yüksek olmasıyla açıklanır (Bianchi ve ark. 1997).

Hiperisinin biyoyararlanımı yaklaşık %14'tür (Upton, 1997).

Hiperisin ve psödohiperisinin farmakokinetik profilinin belirlenmesi amacıyla yapılan başka bir çalışmada, *H. perforatum* LI 160 ekstresi 13 sağlıklı gönüllüde oral

yoldan uygulanmıştır. Hiperisin plazma pik konsantrasyonları 250 mg için 1,3 mg/L; 750 mg için 7,2 mg/L ve 1500 mg için 16,6 mg/L olarak bulunmuştur. Psödohiperisin plazma pik konsantrasyonları ise aynı dozlar için sırasıyla 3,4 mg/L; 12,1 mg/L ve 29,7 mg/L olarak tespit edilmiştir. 750 mg hiperisin için absorpsiyon yarı ömür 0,6 saat; dağılım yarı ömür 6,0 saat ve eliminasyon yarı ömür 43,1 saat olarak; 1578 mg psödohiperisin için ise absorpsiyon yarı ömür 1,3 saat; dağılım yarı ömür 1,4 saat ve eliminasyon yarı ömür 24,8 saat olarak saptanmıştır. Yüksek dozlarda dahi ekstrenin iyi tolere edilebilir olduğu belirtilmiştir (Staffeldt ve ark. 1994).

H. perforatum WS 5572 ekstresinin 300 mg (14,8 mg hiperforin) oral yoldan alınmasıyla, hiperforin plazma pik konsantrasyonunun 150 ng/mL olduğu ve uygulamadan 3,5 saat sonra bu değere ulaşıldığı bildirilmiştir. Eliminasyon yarı ömrü 9 saat olarak bulunmuştur (Staffeldt ve ark. 1994)

H. perforatum ekstreleri, düşük biyoyararlanım değerlerine ve kan-beyin bariyerini aşma kapasitelerinin oldukça düşük olmasına karşın genellikle 4-6 haftalık bir tedavi sonucu hastalarda terapötik fayda meydana gelmektedir. (Bennett ve ark. 1998). Daha iyi farmakokinetik profile sahip olan konvansiyonel antidepresanların da terapötik etki görülebilmesi için aynı süre kullanılması gerektiği unutulmamalıdır (Woelk, 2000). Dolayısıyla bu farmakokinetik profilin tedavi süresi üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadığı görülmektedir.

2.6.14. Yan Etkileri ve Kontrendikasyonları

Yapılan çalışmaların *H. perforatum* ekstrelerinin iyi tolere edilebilir olduğunu göstermesine karşın; bulantı, kızarıklık, huzursuzluk, yorgunluk ve fotosensibilite gibi yan etkilerin görüldüğü de rapor edilmiştir. Bu yan etkilerin genellikle naftodiantron grubu bileşiklerden (hiperisin ve psödohiperisin) kaynaklandığı düşünülmektedir ve tavsiye edilen dozdan yüksek dozda alıma bağlı olarak geliştikleri kanıtlanmıştır (Rodríguez-Landa ve Contreras, 2003; Schulz, 2006).

H. perforatum kaynaklı ciddi fototoksiste reaksiyonları son derece nadir olarak meydana gelmekle birlikte, kullanan hastalara fotosensibiliteyi arttırdığı muhakkak belirtilmelidir. Bugüne kadar *H. perforatum* kullanımına bağlı olarak ciddi fotoalerjik reaksiyon yaşadığı rapor edilen hasta sayısı ikidir (Schulz, 2006).

3250 hasta ile yapılan bir çalışmada en sık rastlanan yan etki gastrointestinal semptomlar (%0,6), alerjik reaksiyonlar (%0,5) ve yorgunluk (%0,4) olarak belirtilmiştir (Woelk ve ark. 1994).

De Smet ve Nolen tarafından 1996 yılında yürütülen ve 23 çalışmanın incelendiği bir meta analiz çalışmasında *H. perforatum* preparatları kullanan hastalardan %19,8'inin yan etki bildirdiği saptanmıştır. Buna karşılık standart antidepresan kullanan hastaların %35,9 yan etki bildirdiği görülmektedir. Yan etki nedeniyle tedaviyi bırakan hasta oranı ise *H. perforatum* için % 4, standart antidepresanlar için ise %7,7 olarak bulunmuştur (De Smet ve Nolen, 1996).

Knüppel ve Linde tarafından 2004 yılında yapılan bir diğer çalışmada toplam 35562 hasta ile yapılan çalışmalarda rapor edilen yan etkiler ile yan etki profili incelenmiştir. Buna göre en sık rastlanan yan etkiler sırasıyla baş ağrısı, deride eritem, anksiyete, bulantı, dispepsi, istenmeyen gebelik, taşikardi ve fotosensibilite reaksiyonları olarak saptanmıştır. *H. perforatum* preparatlarının iyi tolere edilebilir ve güvenli olduğu; fakat mutlaka bir uzman denetiminde kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Knüppel ve Linde, 2004).

Plasebo ile karşılaştırmalı olarak *H. perforatum* ekstrelerinin yan etki görülme sıklıklarının değerlendirildiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, toplam 72 hastadan oluşan grubun ilk yarısına 900 mg/gün ekstre (2,70 mg/gün hiperisin) oral yoldan 6 hafta boyunca uygulanmış; diğer yarısına plasebo verilmiş ve plasebo grubunda yan etki bildiren 2 hastaya karşılık ekstre uygulanan grupta 1 hasta yan etki bildirmiştir (Hansgen ve ark. 1994). Bir diğer çalışmada, 6 hafta boyunca günde 220 mg ekstre (1,10 mg hiperisin) ve plasebo uygulanan 97 hastadan ekstre kullananların hiçbiri yan etki bildirmezken, plasebo grubunda 1 kişi yan etki bildirmiştir (Witte ve ark. 1995).

H. perforatum ekstreleri ile SSRI'ların yan etki profillerinin kıyaslandığı bazı çalışmalar değerlendirildiğinde, toplam 815 hastanın ekstre uygulanan 411'inde yan etki bildiren kişi sayısı 186; SSRI uygulanan 404 kişide ise 200'dür (Knüppel ve Linde, 2004).

2.6.15. Gebelik ve Laktasyonda Kullanımı

Gebelikte *H. perforatum* içeren ürünler kullanan kişilere dair bazı vaka raporları mevcut olmakla birlikte, gebelikte ve laktasyonda güvenle kullanılabileceğini kanıtlamak için yeterli veri henüz bulunmamaktadır. Farelere gebelikten önce ve gebelik boyunca *H. perforatum* uygulanan bir çalışmada herhangi belirgin bir olumsuz etki görülmemiştir. Postpartum depresyon nedeniyle laktasyon süresince *H. perforatum* ekstresi içeren ürün kullanan bir kadının anne sütünden alınan örnekte ekstre bileşenlerinden sadece hiperforin tespit edilmiş, anne ve bebeğin sağlığıyla ilgili herhangi olumsuz bir durumun oluşmadığı belirtilmiştir. (Grush ve ark. 1998; Rayburn ve ark. 2001; Klier ve ark. 2002).

Kolding ve arkadaşları 2015 yılında gebelikte *H. perforatum* kullanımı üzerine bir çalışma yapmış, bu çalışmada gebelikte *H. perforatum* kullanan 38 kadın ile toplam 90128 kadın gebelik süresi, erken doğum, yenidoğan ağırlığı, malformasyonlar ve Apgar skoru (renk, kalp hızı, refleksler, kas tonusu, solunum) açısından karşılaştırılmıştır. Buna göre erken doğum açısından iki grup arasında anlamlı bir fark oluşmamakla beraber *H. perforatum* kullanan kadınların çocuklarında diğer gruba göre daha fazla malformasyon meydana gelmiştir (*H. perforatum* kullanan grupta %8,1; kontrol grubunda %3,3). Toplumda genel malformasyon oranının da %3-5 olduğu düşünülürse bu oran nispeten yüksek bulunmuş, fakat *H. perforatum* kullanan gebe sayısı az olduğu için genelleme yapmanın doğru olamayacağı ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak verilerin yetersiz olması nedeniyle gebelik ve laktasyonda *H. perforatum* kullanımı önerilmemektedir (Kolding ve ark. 2015).

2.6.16. İlaç Etkileşimleri

H. perforatum, enzimler üzerinde sahip olduğu indüksiyon veya inhibisyon etkisiyle Sitokrom P-450 (CYP-450) karaciğer enzim yolağı ile metabolize olan ilaçların terapötik plazma konsantrasyonunu değiştirebilir. Bazı farmakokinetik çalışmalar CYP 3A/3A4 enzimi üzerine indüksiyon; CYP 2C9 ve 2D6 enzimleri üzerinde ise inhibisyon yaptığını göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile CYP 3A4 enzimini akut olarak inhibe ettiği, fakat tekrarlayan uygulamalar sonucu aynı enzimi indüklediği belirlenmiştir. Bu alanda farklı enzimler üzerinde yapılan farmakokinetik çalışmalar da devam etmektedir (Hammerness ve ark. 2003).

Karbamazepin (CYP 3A4) ile 8 sağlıklı gönüllü üzerinde yapılan 2 haftalık çalışma sonucu belirgin bir ilaç etkileşimi tespit edilmemiştir (Burstein ve ark. 2000).

Siklosporin (CYP 3A4) ile birlikte kullandığında 30 böbrek nakilli hastanın plazma siklosporin seviyesinde ciddi düşüş meydana getirdiği görülmüştür. *H. perforatum* ekstresi içeren ürün kesildikten sonra hastaların siklosporin seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Bunun dışında da böbrek nakilli hastalarda *H. perforatum* ile birlikte kullanıldığında siklosporin seviyelerinin düştüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur (Breidenbach ve ark. 2000). Kalp naklinden dolayı siklosporin kullanan iki hastada *H. perforatum* kullanımının ardından siklosporin seviyelerindeki düşüşle beraber akut transplant rejeksiyonu görülmüştür (Ruschitzka ve ark. 2000). Bunların yanı sıra 63 yaşındaki karaciğer nakilli hastada *H. perforatum* kullanımına bağlı akut rejeksiyon geliştiğini gösteren bir vaka raporu da vardır. Siklosporin seviyelerindeki bu değişimin mekanizmasının Sitokrom-P enzimleri üzerine etkinin dışında bir diğer nedeninin de P-glikoprotein ilaç pompasındaki indüksiyon etkisinin olduğu düşünülmektedir (Broelsch ve ark. 2000).

Etinilestradiol, desogestrel ve oral kontraseptifler (CYP 3A4) ile *H. perforatum* içeren ürünler kullanıldığında kanama meydana geldiğini gösteren sekiz farklı vaka raporu mevcuttur (Yue ve ark. 2000). Ayrıca istenmeyen gebelik durumunun görüldüğüne dair İsveç ve İngiltere’den farklı vaka örnekleri rapor edilmiştir (Schwarz, 2003).

Hepatik hidroksimetil glutaril koenzim A (HMG CoA) redüktaz inhibitörleri (statinler) (CYP 3A4) ile birlikte *H. perforatum* kullanıldığında simvastatin ve metabolitlerinin plazma konsantrasyonlarında belirgin miktarda düşüş olduğunu gösteren bir çalışma vardır (Sugimoto ve ark. 2001).

Midazolam (CYP 3A4) ve nifedipin (CYP 3A4) ile birlikte *H. perforatum* kullanıldığında bu ilaçların serum plazma konsantrasyon düzeylerinde düşüşe neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Smith ve ark. 2001).

Varfarin (CYP 2C9) ile birlikte kullanıldığında varfarinin etkinliğinde azalma meydana getirdiğini gösteren 7 adet vaka raporu bulunmaktadır (Yue ve ark. 2000).

H. perforatum – SSRİ etkileşimleriyle alakalı çok sayıda çalışma mevcuttur. Özellikle serotonin sendromu görülen bir vaka bu açıdan önemlidir. 61 yaşındaki

sağlıklı bir kadın, günde 600 mg *H. perforatum* ekstresini bırakmasından 3 gün sonra 20 mg paroksetin içeren bir tablet kullanmış; hipertansif, diaforetik ve huzursuz bir halde hastaneye kaldırıldığında kreatin kinaz seviyesi 1024 U/L olarak ölçülmüş ve serotonin sendromu teşhisiyle tedavi altına alınmıştır (Waksman ve ark. 2000). Bunun dışında SSRI kullanan hastalarda tedaviye *H. perforatum* eklenmesiyle gelişen mani vakalarını gösteren bazı vaka raporları da mevcuttur (Fahmi, 2002; Spinella, 2002).

Anesteziye kullanılan ilaçlar ile *H. perforatum* kullanımında bazı etkileşimler görülebilmektedir. Bu durum operasyona hazırlanan hastaların *H. perforatum* ekstresi içeren ürünleri kesmesi gerektiğini göstermesi açısından önemlidir. Operasyondan önce 6 ay kadar süreyle düzenli olarak *H. perforatum* ekstresi kullanan 23 yaşındaki sağlıklı bir kadın hastanın cerrahi bir operasyon için anestezi uygulandığı sırada kardiyovasküler kollaps yaşadığı bir vaka raporu vardır. Aynı hastaya *H. perforatum* kullanmaya başlamadan iki yıl önce genel anestezi uygulandığında herhangi bir sorun yaşanmadığı da raporda yer almaktadır (Crowe, 2002).

H. perforatum bitkisinin zayıf MAO inhibitör etkisi olduğu bilinmekte ve bu durumun diğer MAO inhibitörü ilaçlarla etkileşim sonucu bu ilaçların etkilerini arttırabileceği düşünülmektedir. Bir vaka raporunda 41 yaşındaki sağlıklı bir erkeğin bir miktar peynir ve kırmızı şarap tükettikten sonra *H. perforatum* ekstresi içeren bir tablet kullanmasıyla tansiyonunun 201/140'a yükseldiği ve delirium tablosuyla beraber hastaneye getirildiği belirtilmektedir (Patel, 2002).

2.6.17. Toksisitesi

H. perforatum LI 160 ekstresi ile yapılan bir toksikolojik çalışmada fare ve sıçanlarda 5000 mg/kg doz ve üzerinde herhangi bir toksisite görülmediği rapor edilmiştir. Ayrıca sıçanlar ve köpekler üzerinde yürütülen uzun dönem toksisite çalışmaları sonucu kilo kaybı gibi spesifik olmayan bazı belirtiler dışında herhangi bir toksisite görülmediği belirtilmektedir (Leuschner, 1996). Yapılan çok sayıdaki *in vitro* ve *in vivo* deneyler, *H. perforatum* bitkisinin belirgin bir mutajenik etkiye neden olmadığını da göstermektedir (Greenson ve ark. 2001). Bakterilerle yapılan bir çalışmada ise bitkinin *S. typhimurium* üzerinde genotoksik etkisinin olduğu görülmüş ve bu etkinin içeriğinde bulunan kersetinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Schimmer ve ark. 1988).

Fotosansibilite ve Fototoksosite

Fototoksosite, belirli bazı fotoreaktif moleküllerin deride bulunması durumunda ışığa maruziyetle ortaya çıkan deri reaksiyonudur. Fotosansibilizan maddenin ışığı absorblayarak bu enerjiyi komşu moleküle veya oksijene aktararak reaktif türler oluşturmasıyla ortaya çıkan fototoksosite, hücrel yapılarda hasar meydana getirmektedir. Fototoksosite durumunda ortaya çıkan ilk klinik semptomlar, derinin güneş ışığı gören bölgelerinde yanma hissi ve eritem oluşumudur. Bu reaksiyon çok hızlı şekilde oluşur ve deride blisterler oluşturacak kadar ciddi olabilir. Ayrıca deride hiperpigmentasyon da oluşabilmekte ve bu durum kalıcı olabilmektedir. Hiperisin, daha önce de detaylı şekilde bahsedildiği üzere, *Hypericum* türlerinde bulunan fotoaktif aromatik diantrakinon bileşiğidir. Hiperisin kaynaklı fotosensibilizasyon ilk kez 1900'lerin başında, otlayan *Hypericum* türlerini tüketen hayvanlarda rapor edilmiş ve bu duruma "hiperisizm" adı verilmiştir. Hiperisizmde ışığa maruz kalındığında deride hızlıca eritem geliştiği, bazı durumlarda blisterlerin ve ödemin oluştuğu, çok nadir durumlarda ise etkilenen ciltte nekroz oluştuğu bildirilmektedir. Hiperisine bağlı fototoksosite hem sistemik hem de topikal yoldan uygulama ile gerçekleşmektedir ve fototoksosite açısından en etkili form, hiperisin asetat ester formudur. (Boiy ve ark. 2007).

İnsanlarda da bazı reversibl fotosansibilite reaksiyonlarının görüldüğüne dair vaka raporları vardır. 3 yıl boyunca günde 240 mg *H. perforatum* ekstresi kullanan bir hastanın derisinde fotosansibilite kaynaklı kaşıntılı eritemli lezyonlar oluşmuştur. Başka bir vaka raporunda, günde 333 mg *H. perforatum* ekstresi kullanan hastada 4. günün sonunda deride yanma hissiyle beraber eritemli döküntüler oluştuğu belirtilmiştir (Golcsch ve ark. 1997). Lane-Brown 'ın 2000 yılında yayımladığı üç vakadan oluşan raporda *H. perforatum* ekstresini oral ve topikal yoldan kullanan hastalarda güneşe maruziyet ve ultraviyole B ışını etkisiyle bullöz eritem ve foliküler deri lezyonları oluştuğu bildirilmektedir (Lane-Brown, 2000).

HIV virüsü ile enfekte olmuş hastalarda intravenöz ve oral hiperisin kullanımıyla ilgili faz I çalışmalarında 23 hastadan 11'inde fototoksositeye bağlı ciddi kutanöz reaksiyonlar oluşmuştur (Gulick ve ark. 1999). Ayrıca *H. perforatum* ekstresi uygulanan toplam 19 hepatit C'li hastanın 14'ünde çeşitli fotosansibilite reaksiyonlarının oluştuğuna dair bir rapor vardır (Jacobson ve ark. 2001).

Brockmöller ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bir defa 900-3600 mg hiperisin içeren *H. perforatum* ekstresi uygulanan gönüllülerde fotosensibilite ve total plazma *H. perforatum* konsantrasyonu arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 15 günden fazla günde 1800 mg hiperisin alan kişilerde ise belirgin bir güneş ve Ultraviyole-A hassasiyeti olduğu bildirilmiştir (Brockmöller ve ark. 1997). Başka bir çalışmada hiperisin ve güneşe maruziyetle oluşan fototoksisitenin sadece yüksek konsantrasyonlarda hiperisin alındığında meydana geldiği saptanmıştır (Bernd ve ark. 1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Hypericum perforatum L. örnekleri 12.07.2014 tarihinde Bursa, Osmangazi, Uludağ yolu, Dobruca-Odunluk yol ayrımında, sol tepelerden 400 m yükseklikten toplanmıştır (ISTE 116001).

Hypericum calycinum L. örnekleri 13.07.2014 tarihinde Bursa, Osmangazi, Uludağ zirve yolu, yol kenarlarından, 810 m yükseklikten toplanmıştır (ISTE 116002).

Hypericum confertum Choisy örnekleri 13.07.2014 tarihinde Bursa, Osmangazi, Uludağ, Sarı Alan yolu, yol kenarlarından 1700 m yükseklikten toplanmıştır (ISTE 116003).

Bütün örnekler Ezgi ERSOY ve Dr. Öğr. Üyesi Esra EROĞLU ÖZKAN tarafından toplanmış, oda ısısında gölgede kurutulmuş ve değirmende toz edilmiştir.

3.2. Genel Metotlar

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması

10 g toz haldeki drog, 100 mL metanol ile oda ısısında ve ışıktan korunarak 3 gün maserasyona bırakıldı. Bu işlem aynı drog ile 1 defa daha tekrar edildi. Maserat 45°C'yi geçmeyen ısıda rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı. -80°C'de donduruldu ve liyofilize edildi. Droglardan bu şekilde hazırlanan ekstreler -20°C'de saklandı (Trovato ve ark. 2001; Rabanal ve ark. 2005; Radulovic ve ark. 2007; European Pharmacopoeia, 2008).

3.2.2. LC-MS/MS ile 37 Fitokimyasal Maddenin Tanımlanması ve Kantitatif Analizi

LC-MS/MS ile 37 fitokimyasal maddenin tanımlanması ve kantitatif analizi Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Standart olarak; vanilik asit, rozmarinik asit, sinnamik asit, salisilik asit, 4-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, protokateşik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, gallik asit, kafeik asit, sinapinik asit, sirinjik asit, pirokatekol, kersetin, rutin, fisetin, hesperetin, naringenin, kamferol, krisin, hesperidin, likiritigenin, luteolin, izokersitrin, roifolin, mirisetin, kersitrin, apigenin, apigetrin, nikotiflorin, kinik asit, malik asit, fumarik asit, vanilin ve kumarin standart olarak kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan diğer maddeler metanol, formik asit, ultra saf su ve amonyum formattır. Kullanılan tüm kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

3.2.2.1. LC-MS/MS Cihazı ve Kromatografik Şartlar

37 fitokimyasal maddenin kalitatif ve kantitatif analizleri için kullanılan LC-MS/MS sistemi iki adet üçlü kuadropol kütle spektrometre cihazından oluşan bir sistemdir. Bu cihazlar; Shimadzu Neexera model Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı ile Shimadzu LC-MS 8040 model üçlü kuadropol kütle spektrometre cihazlarıdır. Sıvı kromatografi sistemi için LC-30 AD model gradient pompa, degazer olarak DGU-20A3R model degazer, kolon fırını olarak CTO-10ASvp

model kolon fırını ve oto örnekleyicisi olarak da SIL-30AC model oto örnekleyici kullanılmıştır. Kromatografik ayırım, Agilent Poroshell 120 (EC-C18 2,7 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm) kolonda gerçekleşmektedir. Analiz işlemi sırasında kolon fırının sıcaklığı 40 °C olacak şekilde ayarlanmaktadır. Elüsyon gradiyentinde hareketli faz A için ultrasaf su, hareketli faz B için ise metanol kullanılmıştır. Ayrıca daha iyi bir kromatografik ayırım sağlamak ve iyonlaştırmayı kolaylaştırmak amacıyla iki faza da 5 mM amonyum format ve %0,15 formik asit ilave edilmiştir. Ekstrelerin içindeki bileşiklerin ayırımının optimum şekilde gerçekleşebilmesi için birçok deneme yapılmış ve UHPLC için en uygun gradient profili 20-100% B (0-25 dk), 100% B (25-35 dk), 20% B (35-45 dk) olacak şekilde belirlenmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,5 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 2 μL olarak ayarlanmıştır.

Üçlü kuadropol kütle spektrometre sisteminde hem negatif hem de pozitif modda çalışabilen bir ESI (elektrosprey iyonlaştırma) kaynağı yer almaktadır. LC-ESI-MS/MS verilerinin işlenmesi için LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonya) yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım cihazda kayıtlıdır. Ekstre içindeki bileşiklerin kantitatif tayini için cihaz MRM (multiple reaction monitoring) modunda çalıştırılmış ve moleküler (parent) iyonlar, biri kalitatif diğeri kantitatif amaçlı kullanılmak üzere, bir veya iki parçalanma ürünü (product ions) ile kombine edilmiştir. Kütle spektrometresinde ara yüz (interface) sıcaklığı 350 °C olarak belirlenmiştir. Bunun dışında optimizasyon için DL sıcaklığı 250 °C, heat block sıcaklığı 400 °C, nebulizer gaz (N_2) akışı 3 L/dk ve kurutma gazı akışı 15 L/dk olarak ayarlanmıştır.

3.2.3. Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivite tayini için yapılan çalışmalarda; Folin-Ciocalteu reaktifi (Fosfotungstik-fosfomolibdik asit + CuSO_4 (FCR)), pirokatekol, DPPH (1,1'-Difenil-2-pikrilhidrazil), α -tokoferol, sodyum karbonat (Na_2CO_3), kersetin, potasyum asetat (CH_3COOK), sodyumbikarbonat, BHT (bütillenmiş hidroksi toluen), bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), alüminyum nitrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$), amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat), potasyum peroksi disülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve %80'lik etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Antioksidan aktivite araştırmalarına kullanılan tüm çözeliler ve hazırlanışları ise şu şekildedir:

Toplam Fenolik Madde Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 2'lik Na_2CO_3 (Sodyum karbonat) çözeltisi: 2 g Na_2CO_3 tartılarak 100 mL'lik balon jojeye konuldu ve bir miktar ultra saf su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO_4): Hazır olarak satın alınmış ve bu şekilde kullanılmıştır.

- 100 ppm Pirokatekol çözeltisi: 10 mg pirokatekol tartıldı ve 100 mL suda çözüldü.

Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (Alüminyum nitrat) çözeltisi: 1,76 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ tartılarak bir miktar ultra saf su ile çözüldü. Daha sonra toplam hacim 10 mL olacak şekilde ultra saf su eklendi.

- 1 M CH_3COOK (Potasyum asetat) çözeltisi: 0,9615 g CH_3COOK tartılarak bir miktar ultra saf su ile çözüldü. Daha sonra toplam hacim 10 mL olacak şekilde ultra saf su eklendi.

- 1000 ppm Kersetin çözeltisi: 25,8 mg kersetin tartıldı ve 25 mL etil alkolde çözüldü.

DPPH Serbest Radikali Giderici Aktivite Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- 0,1 mM DPPH çözeltisi: 4 mg DPPH tartıldı ve 100 mL etanolde çözüldü.

- 1000 ppm BHT (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisi: 10 mg BHT tartıldı ve 10 mL etanolde çözüldü. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlanmıştır.

- 1000 ppm BHA (2- *t*-bütil-4-hidroksianisol) çözeltisi: 10 mg BHA tartıldı ve 10 mL etanolde çözüldü. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlanmıştır.

- 1000 ppm α -Tokoferol çözeltisi: % 97'lik 10,31 mg α -tokoferol tartıldı ve 10 mL etanolde çözüldü. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlanmıştır.

ABTS Katyon Radikali Giderici Aktivite Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

• 7 mM ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) katyon radikali çözeltisi: 19,2 mg ABTS tartıldı ve 5 mL suda çözöldü. Üzerine 3,3 mg $K_2S_2O_8$ ilave edilerek karıştırıldı. Karanlık ortamda oda sıcaklığında yaklaşık 12-16 saat beklendikten sonra çözelti seyreltilerek absorpsiyonu ~ 0.70 olacak şekilde ayarlandı ve bu şekilde kullanıldı.

Standart madde olarak kullanılacak olan BHT, BHA ve α -Tokoferol çözeltileri DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiiler kısmında anlatıldığı şekilde hazırlandı.

CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- 10 mM $CuCl_2$ çözeltisi: 42,62 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ tartıldı ve 25 mL suda çözöldü.
- 1 M NH_4OAc tamponu çözeltisi: 1,927 g NH_4OAc tartılarak 25 mL suda çözöldü, çalışma başlamadan önce pH= 7'ye ayarlandı.
- 7,5 mM Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi: 76,6 mg neokuproin tartıldı ve 50 mL % 96'lık etanolde çözöldü.

3.2.3.1. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstralarının DPPH serbest radikal giderici, ABTS katyon radikal giderici, CUPRAC (Bakır II indirgeme antioksidan) yöntemi ve metal bağlama yöntemleri ile antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.2.3.1.1. Toplam Fenolik İçeriklerinin Belirlenmesi

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton, 1977). 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 μL alınarak hacimleri distile su ile 184 μL 'ye tamamlandı. Bitkilerin metanol ekstralarının 1000 ppm konsantrasyonda çözeltiileri hazırlandı. 1 mg ekstre içeren örnek çözeltiilerinden 4 μL alındı, distile su ile 184 μL ' ye tamamlandı. Pirokatekol çözeltiileri ve örneklere 4 μL

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 12 µL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında bekletildi ve örneklerin absorbensları 760 nm'de okundu.

3.2.3.1.2. Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi (Moreno ve ark. 2000). 1000 ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 192 µL'ye tamamlandı. 4 µL 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 4 µL %10'luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de mikropilaka reader ile absorbensları okundu. Aynı şekilde Bitkilerin metanol ekstrelerinin tek konsantrasyonda (1000 ppm) hazırlanan çözeltilerinin de absorbens değerleri okundu.

3.2.3.1.3. DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstrelerinin serbest radikal giderim aktiviteleri; Blois'in geliştirdiği yöntemle göre 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). *Hypericum* türlerinin metanol ekstrelerinin 10 mg'ı 10 mL metanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden dört farklı hacimde (2, 5, 10 ve 20 µL) alınarak bu çözeltiler metanol ilavesiyle 40 µL'ye tamamlandı ve her birine hazırlanan 0,1 mM konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 160 µL hacimde eklendi. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra absorbensları 517 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçüm sonucunda elde edilen bu absorbens değerleri üzerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı.

Örneklerin absorbens değerleri kontrole karşı değerlendirilmiştir. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart madde olarak α -TOC ve BHT kullanılmıştır.

3.2.3.1.4. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstrelerinin ABTS kasyon radikal giderici aktiviteleri Re ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Re ve ark. 1999). *Hypericum* türlerinin metanol ekstrelerinin 10 mg'ı 10 mL metanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden dört farklı hacimde (2, 5, 10 ve 20 μ L) alınarak her biri metanol ilavesiyle 40 μ L'ye tamamlandı. Daha sonra üzerlerine hazırlanan 7 mM konsantrasyondaki ABTS kasyon radikali çözeltisinden 160 μ L eklendi. Karanlık ortamda 6 dakika bekletilerek tepkimenin gerçekleşmesinden sonra 734 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirilmiştir. ABTS kasyon radikal giderici aktivite (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart olarak BHT ve α -TOC kullanılmıştır.

3.2.3.1.5. CUPRAC Yöntemi

CUPRAC yönteminde, örneklerde antioksidan etkili bileşikler bulunması durumunda Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, turuncu-sarı renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm'de absorbansı ölçülür.

CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktivite tayini için Apak ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre, örnek ve standart çözeltilerinin üzerine son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100 μ g/mL olacak şekilde Cu (II), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)

ve NH₄OAc tamponu eklendi ve 1 saat beklendikten sonra 450 nm’de absorbans ölçüldü (Apak ve ark. 2004).

Örneklerin absorbans değerleri standartlara karşı değerlendirilmiştir. Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart madde olarak α -TOC ve BHT kullanılmıştır.

3.2.3.1.6. Metal Bağlama Yöntemi

Ferrozin, Fe⁺² ile nicel olarak kırmızı renkli kompleksler oluşturmaktadır. Analiz örneği antioksidan özellik gösteriyorsa kelat yapıcı ajan olarak davranır, bunun sonucunda ferrozin-Fe⁺² kompleksinin bozulmasıyla kırmızı renk açılmaktadır.

Metal bağlama yöntemi ile antioksidan aktivite Fe(II)-Ferrozin metoduna göre belirlenmiştir. Ekstrelerin 1 mM konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 μ L alınarak distile su ilavesi ile hacimleri 188 μ L’ye tamamlandı. Daha sonra üzerlerine 4 μ L 2 mM’lık Fe(II) ve 8 μ L 5 mM’lık ferrozin reaktifleri eklendi. 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 562 nm’de absorbansları okundu.

Metal bağlama aktivitesi (% İnhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Kolak et al. 2006):

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart olarak EDTA kullanılmıştır.

3.2.4. Antiasetilkolinesteraz ve Antibutirilkolinesteraz Aktivite Tayinleri

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstrelerinin asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda kimyasal madde olarak, asetiltiyokolin iyodür (Acl), bütiriltiyokolin iyodür (BuI), asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, DTNB (5,5’-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit), sodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na₂HPO₄.2H₂O), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH₂PO₄.2H₂O), sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve standart

madde olarak galantamin kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Bu deneyler için kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları ise şu şekildedir:

- 0,1 M NaH_2PO_4 çözeltisi: 1,56 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 100 mL distile suda çözüldü.
- 0,1 M Na_2HPO_4 çözeltisi: 3,556 g Na_2HPO_4 tartıldı ve 200 mL distile suda çözüldü.
- 0,1 M pH=8 Tampon çözeltisi: 94,7 mL Na_2HPO_4 ve 5,3 mL NaH_2PO_4 çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.
- 0,1 M pH=7 Tampon çözeltisi: NaH_2PO_4 çözeltisinden 3,9 mL ve Na_2HPO_4 çözeltisinden 6,1 mL alındıktan sonra 10 mL distile su eklenerek hazırlandı.
- 5 mM DTNB (5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)) çözeltisi: İlk olarak 16 mg 5,5-ditiyobis(2-nitro benzoik asit) (DTNB) tartılarak 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldü. Diğer yandan 7,5 mg NaHCO_3 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra bu iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ilave edilerek 4 mL'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce 4 mL pH=8 tampon çözeltisi eklendi.
- 7,1 mM Asetiltiyokolin iyodür çözeltisi: 32,8 mg AcI tartıldıktan sonra, 8 mL distile su ilave edildi. Kullanılmadan önce 8 mL pH=8 tampon çözeltisi eklenerek hacmi 16 mL'ye tamamlandı.
- 0,79 mM Butiriltiyokolin iyodür çözeltisi: 4 mg BuI tartıldıktan sonra, 8 mL distile su ilave edildi. Kullanılmadan önce 8 mL pH=8 tampon çözeltisi eklenerek hacmi 16 mL'ye tamamlandı.
- Asetilkolinesteraz enzim çözeltisinin hazırlanması: 1,17 mg (498,3498 U) asetilkolinesteraz enzimi alınarak 5 mL, pH=8 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra her birinin hacmi 1'er mL olacak şekilde beş bölüme ayrıldı. Bu şekilde her biri için 99,66996 U/mL konsantrasyon sağlandı. Hazırlanan 1 mL'lik bu stok çözeltiler de 125 μL 'lik 8 eşit bölüme ayrıldı ve 0,09966996 U/ μL konsantrasyon sağlandı. 125 μL 'lik enzim çözeltisine 460 μL hacimde pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi (0,021297 U/ μL). 585 μL hacimdeki bu çözelti 25 μL 'ik küçük eppendorf tüplerine alınarak daha sonra

kullanılmak üzere derin dondurucuya kaldırıldı. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisi ilavesiyle 2150 µL hacme tamamlandı ($2,476 \times 10^{-4}$ U/µL).

- Butirilkolinesteraz enzim çözeltisinin hazırlanması: 1 mg (11,4 U) butirilkolinesteraz enzimi alınarak 5 mL, pH=8 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra ($2,28$ U/mL) bu çözeltiden 300 µL hacimde stok çözeltiler oluşturularak küçük şişelere dolduruldu ve sonra kullanılmak üzere derin dondurucuya kaldırıldı ($0,00228$ U/µL). Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisi ilavesiye 1850 µL hacme tamamlandı. ($3,1813 \times 10^{-4}$ U/µL).

- 4000 ppm Galantamin (standart madde) çözeltisi: 2,3 mg galantamin tartılarak 2 mL etanolde çözüldü.

3.2.4.1. Asetilkolinesteraz İnhibisyon Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesinin tayini için Ellman Yöntemi'ne göre enzim olarak asetilkolinesteraz, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Sarı renkli 5-tiyo-2nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de mikropilaka okuyucu ile ölçülmektedir. Deney için mikropilakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH=8), ekstrelerin metanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Hazırlanan çözelti 10 dakika süre ile 25°C'de inkübasyona bırakıldı. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve 20 µL substrat AcI (asetiltiyokolin iyodür) eklendi. Mikropilaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorban okundu (Ellman ve ark. 1961).

Antiasetilkolinesteraz aktivite (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart madde olarak galantamin kullanılmıştır.

3.2.4.2. Butirilkolinesteraz İnhibisyon Aktivite Testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak butirilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de mikrolaka okuyucu ile ölçülmektedir. Mikrolakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH=8), ekstrelerin metanol içinde 4 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltilisinden 20 µL konuldu. Hazırlanan çözelti 10 dakika süre ile 25°C'de inkübasyona bırakıldı. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (butiriltiyokolin iyodür) ilave edildi. Mikrolaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu.

Antibutirilkolinesteraz aktivite (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart madde olarak galantamin kullanılmıştır.

3.2.5. Antiüreaz ve Antitirozinaz Aktivite Tayinleri

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstrelerinin antiüreaz ve antitirozinaz aktivite tayinlerinde; üreaz enzimi, tirozinaz enzimi, sodyumhipoklorit (NaOCl), sodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na₂HPO₄.2H₂O), sodyum hidroksit (NaOH), fenol, sodyumnitropruside, sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH₂PO₄.2H₂O), L-DOPA, kojik asit, tiyoüre, ve üre kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler ve hazırlanışları ise şu şekildedir:

- 0,1 M NaH₂PO₄ çözeltisi: 1,560 g NaH₂PO₄ tartıldıktan sonra 100 mL distile suda çözülde.

- 0,1 M Na₂HPO₄ çözeltisi: 3,556 g Na₂HPO₄ tartıldıktan sonra 200 mL distile suda çözülde.

- 0,01 M pH=8,2 Tampon çözeltisi: Na₂HPO₄ çözeltisinden 96 mL ve NaH₂PO₄ çözeltisinden 4 mL alındıktan sonra bu karışıma 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

•0,05 M pH=6,8 Tampon çözeltisi: Na_2HPO_4 çözeltisinden 49 mL ve NaH_2PO_4 çözeltisinden 51 mL alındıktan sonra bu karışıma 100 mL distile su eklenerek hazırlandı. Daha sonra çözelti yarı yarıya seyreltilti. Kullanılmadan önce pH kontrol edildi.

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

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

•0,1M Üre çözeltisi: 60 mg üre tartıldıktan sonra bir miktar distile suda çözüldü ve pH=8,2 tampon çözeltisi ile hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

•8,5 mM L-DOPA çözeltisi: 8,4 mg L-DOPA tartıldıktan sonra 5 mL distile suda çözüldü.

•Üreaz enzim çözeltisinin hazırlanması: 1 mg (21 U) üreaz enzimi alınarak 1 mL pH=8,2 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra her biri 50 μL 'lik hacimlerde 20 eşit bölüme ayrıldı. Bu çözeltiler daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuya kaldırıldı. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8,2 tampon çözeltisiyle 2000-3000 μL 'ye tamamlandı.

•Tirozinaz enzim çözeltisinin hazırlanması: 1 mg Tirozinaz enzimi alınarak 0,25 mL pH=6,8 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra her biri 50 μL 'lik hacimlerde 5 eşit bölüme ayrıldı. Bu çözeltiler daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuya kaldırıldı. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=6,8 tampon çözeltisiyle 2000-3000 μL 'ye tamamlandı.

•Tiyüre (standart madde) çözeltisi: 1 mg tiyüre tartılarak 1 mL etanolde çözüldü.

•Kojik asit (standart madde) çözeltisi: 1 mg kojik asit tartılarak 1 mL etanolde çözüldü

3.2.5.1. Üreaz İnhibisyon Aktivite Testi

Üreaz inhibisyon aktivitesi için Hina ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre, enzim olarak üreaz enzimi, substrat olarak ise üre kullanılmaktadır (Hina ve ark. 2015). Mikroplakadaki kuyucuklara önce metanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 25 µL konuldu daha sonra substrat olarak 50 µL üre ilave edildi. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 630 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 15 dakika süre ile 30°C’de inkübasyona bırakıldı. 15 dakika sonra bu çözeltinin üzerine 45 µL fenol reaktifi ve 70 µL alkali reaktif ilave edildi. 20 dk inkübasyondan sonra 630 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu.

Antiüreaz aktivite (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart olarak tiyoüre kullanılmıştır.

3.2.5.2. Tirozinaz İnhibisyon Aktivite Testi

Tirozinaz inhibisyon aktivitesi için Hearing ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre, enzim olarak tirozinaz enzimi, substrat olarak ise L-DOPA kullanılmaktadır (Hearing ve ark. 1987). Mikroplakadaki kuyucuklara 150 µL fosfat tamponu (pH=6,8), ekstrelerin metanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden de 20 µL konuldu. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 3 dakika boyunca karıştırıldı 475 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 10 dakika süre ile 37°C’de inkübasyona bırakıldı. 10 dakika sonra 20 µL substrat (L-DOPA) ilave edildi. Tekrar 10 dakika 37°C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra 475 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu.

Antitirozinaz aktivite (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart olarak kojik asit kullanılmıştır.

3.2.6. Antikolajenaz, Antielastaz ve Antihiyaluronidaz Aktivite Tayinleri

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstraktlarının antikolajenaz aktivite tayininde; tricine, kalsiyum klorür (CaCl_2), sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH), standart madde olarak epigallokateşin gallat (EGCG), N-(3-[2-furil]akrilolil)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), *Clostridium histolyticum*'dan elde edilmiş kolajenaz enzimi kullanılmıştır. Antielastaz aktivite tayini için; 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (Tris), hidroklorik asit (HCl), N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (SANA), domuz pankreasından elde edilmiş elastaz enzimi, standart olarak epigallokateşin gallat (EGCG) ve antihiyaluronidaz aktivite tayini için de 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (Tris), hidroklorik asit (HCl), setilpiridinyum klorür, sığır testislerinden elde edilmiş hyaluronidaz enzimi, hyaluronik asit sodyum tuzu ve standart madde olarak tannik asit kullanılmıştır. Kullanılan tüm kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler ve hazırlanışları ise şu şekildedir:

- 0,05 M Tricine çözeltisi: 4,48 g tricine tartılarak 0,5 L distile suda çözöldü.
- 0,01 M CaCl_2 çözeltisi: 1,11 g CaCl_2 tartılarak 1 L distile suda çözöldü.
- 4,4 M NaCl çözeltisi: 23,376 g NaCl tartılarak 1 L distile suda çözöldü.
- 1 M NaOH çözeltisi: 3,99 g NaOH tartılarak 0,1 L distile suda çözöldü.
- pH 7,5 tricine Tampon çözeltisi: Hazırlanan tricine çözeltisinden 200 mL, CaCl_2 çözeltisinden 20 mL ve NaCl çözeltisinden 180 mL hacimde alınarak karıştırıldı. Damla damla NaOH ilavesiyle pH=7,5 değeri sağlandı.
- Kolajenaz enzim çözeltisi: 1 mg *C. histolyticum* kolajenaz enzimi (ChC) (1,1 U/ml) tartılıp 113,6 mL tampon çözeltide çözöldü.
- 1 mM FALGPA (Substrat) çözeltisi: 4,8 mg substrat tartılarak 10 mL tampon çözeltide çözöldü.

•EGCG çözeltisi: Standart olarak kullanılacak 1 mg EGCG 10 mL etanolde çözüldü. Ekstrelerden de ayrı ayrı 1'er mg tartılarak 10 mL etanolde çözülerek konsantrasyonu 100 mg/mL olan çözeltiler hazırlandı.

•50 mM pH=7 tris tampon çözeltisi: 1,2114 g tris tartılarak 0,2 L distile suda çözüldü ve daha sonra d HCl ile pH=7 sağlandı.

•Hyaluronik asit (substrat) çözeltisi: 5 mg hyaluronik asit sodyum tuzu 12,5 mL tris tamponunda çözüldü.

•Hyaluronidaz enzim çözeltisi: 5,7 mg hyaluronidaz enzimi 5 mL tris tampon çözeltisinde çözüldü.

•%10'luk setilpridinyum çözeltisinin hazırlanması: 10 mg setilpridinyum tartılarak 100 mL distile suda çözüldü.

•pH=8,0 Tris tampon çözeltisi: 4,85 g tris tartılarak 0,2 L distile suda çözüldü. Damla damla dHCl ilavesiyle pH=8,0 sağlandı.

• SANA (Substrat) çözeltisi: 5 mg SANA tartılarak 1,8 mL tris tampon çözeltisinde çözüldü.

3.2.6.1. Kolajenaz İnhibisyon Aktivite Testi

Hypericum ekstrelerinin antikalajenaz aktivitesinin ölçümü için kolajenaz enzimi kaynağı olarak *C. histolyticum*, substrat olarak N-[3-(2-furil)-akriloil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) kullanılmaktadır. Enzim pH=7,5'te trisin tamponunda çözündürülerek 1,1 U/mL konsantrasyon sağlandı. Substrat da aynı tamponda 1 mM konsantrasyonda çözündürüldü. Ekstreler reaksiyonu başlatacak olan substrat eklenmeden önce 15 dakikalığına tampon çözeltide kolajenaz enzimiyle inkübe edildi. Toplam hacmi 150 µL olan son reaksiyon karışımı; trisin tamponu, 0,8 mM FALGPA, 0,1 ünite ChC ve 25 µL test ekstresi içermektedir. Negatif kontroller etanol ile yapıldı. Substratın eklenmesinden hemen sonra mikropilaka ELISA okuyucuya yerleştirildi ve 340 nm'de absorbans okundu. Pozitif kontroller için EGCG, 250 mM (0,115 mg/mL) kullanıldı.

3.2.6.2. Elastaz İnhibisyon Aktivite Testi

Hypericum ekstrelerinin antielastaz aktivitesinin ölçümü için enzim kaynağı olarak domuz pankreasından elde edilmiş olan elastaz, substrat olarak N-Suksinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (SANA) kullanılmaktadır. Enzim pH 8,0'da 0,2 mM Tris-HCl tamponunda çözündürülerek 3,33 mg/mL konsantrasyon sağlandı. Substrat da yine aynı tampon çözeltisinde 1,6 mM konsantrasyonda çözündürüldü. Bitki ekstreleri substrat ilavesinden önce 20 dakikalığına 25 °C'de enzimle inkübe edildi. Toplam hacmi 80 µL olan son reaksiyon karışımı, tris-HCl tampon çözeltisi, 10 µL enzim, 10 µL substrat çözeltisi ve 10 µL ekstre içermektedir. Negatif kontroller etanolle yapıldı. Substratın eklenmesinden hemen sonra mikropilaka ELISA okuyucuya yerleştirildi ve 410 nm'de absorbans okundu. Pozitif kontroller için EGCG, 250 mM (0,115 mg/mL) kullanıldı.

Hem antikolajenaz hem de antielastaz aktivite tayininde hesaplar şu şekilde yapılmıştır:

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

A: Absorbans

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart olarak EGCG kullanılmıştır.

3.2.6.3. Hyaluronidaz İnhibisyon Aktivite Testi

Hypericum ekstrelerinin antihyaluronidaz aktivitesinin ölçümü için hyaluronidazın setilpiridinyum klorür ile çöktürülmesine dayanan oldukça hassas bir spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Enzim kaynağı olarak sığır testisinden elde edilen hyaluronidaz, substrat olarak hyaluronik asit soydum tuzu kullanılmıştır. Enzim pH = 7,0'da 50 mM Tris-HCl tamponunda çözündürülerek 800 U/mL konsantrasyon sağlandı. Substrat da yine aynı tampon çözeltisinde 0,4 mg/mL konsantrasyonda çözündürüldü. Bitki ekstreleri önce 1 saatliğine 37°C'de enzimle inkübe edildi. Daha sonra %10'luk setilpiridinyum çözeltisinden ilave edildi ve 1 saat daha 25°C'de inkübasyon yapıldı. Toplam hacmi 110 µL olan son reaksiyon karışımı, 70 µL tris-HCl tampon çözeltisi, 10 µL enzim, 10 µL substrat çözeltisi, 10 µL %10'luk setilpiridinyum çözeltisi ve 10 µL ekstre içermektedir. Negatif kontroller etanolle yapıldı. Mikropilaka ELISA okuyucuya yerleştirildikten sonra 415 nm'de absorbans okundu. Pozitif kontroller için tannik asisin 1,1 mg/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanıldı.

Enzim aktivitesi, hyaluronik asidin setilpiridinyum klorür çökeltisindeki parçalanmamış miktarının 415 nm’de gösterdiği absorbansın ölçülmesiyle belirlenmiştir.

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

A: Absorbans

Hesaplamalar:

i) parçalanmamış olan hyaluronik asidin 415 nm’deki absorbansı yüzde cinsinden belirlendi.

ii) % enzim aktivitesi = (%100) – {hyaluronik asidin 415 nm’deki absorbansı + enzim / hyaluronik asidin 415 nm’deki absorbansı x 100}

iii) Bu absorbans ile bitki ekstresinin 415 nm’deki absorbansı karşılaştırıldı.

Her bir örnek için üç paralel çalışma yapılmıştır. Standart olarak tannik asit kullanılmıştır.

3.2.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Bölüm 3.2.1.’de anlatıldığı şekilde hazırlanan *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testinde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterleri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2000a). Ekstrelerin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 14153’e karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır. Ekstrelerin *Candida albicans* ATCC 10231’e karşı antifungal aktivitesi ise yine CLSI kriterleri doğrultusunda dilüsyon yöntemiyle saptanmıştır (CLSI, 2000b). Çalışmada kullanılan bakterilerin inokulumu Mueller-Hinton Broth (Difco, Detroid, USA) besiyerindeki 4-6h’lik kültüründen 5x10⁵ kob/mL (koloni oluşturan birim), *Candida albicans* ATCC10231 için ise RPMI-1640 (Sigma) besiyerindeki 24h’lik kültüründen 0,5-2,5x10³ kob/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Ekim yapılmış mikropalaklar bakteriler için 35°C’de 18-24h, *Candida albicans* ATCC 10231 için ise 35°C’de 48h inkübe edilmiştir. Gözle görülür üremenin olmadığı en düşük madde konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir.

3.3. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler

ELISA Okuyucu (Thermo Scientific Multiskan Go Microplate Reader)

Rotavapor (Buchi, Vakum kontrol ünitesi V-850, Vakum pompası V-700, Rotasyon ünitesi R-210, Su banyosu B-491)

Liyofilizatör (Labconco Freeze Dry System LYPH-LOCK6)

LC-MS/MS (Shimadzu 8040 Model)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208)

Otomatik pipetler (Eppendorf, 10-100 µL 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL)

Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya)

1cm'lik cam küvetler

Armudi cam balonlar

Ayırma hunileri (1 L'lik)

Değirmen (Moulinex Moulinette S)

Hassas terazi (Ohaus PA214C)

Üstten kefeli terazi (Precisa XB2200C)

Deiyonize su cihazı (Millipore Elix10)

Vortex (Dragonlab MX-S)

Tanklar

Isıtcılı manyetik karıştırıcı (Thermo Electron Corporation, Forma Orbital Shaker)

Magnetler

pH metre (Hanna Instruments Microprocessor pH Meter)

İnkübatör (Nüve)

Ultrasonik banyo

Balon jojeler (10, 25, 50, 100 mL)

Su banyosu (Thermomix BU)

Masa tipi soğutuculu santrifüj (Heraeus-Megafuge 1.OR)

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, Uludağ'dan toplanan üç *Hypericum* türü olan *H. perforatum*, *H. calycinum* ve *H. confertum* bitkilerinin çiçekli toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstralarının LC-MS/MS cihazı ile sekonder metabolit profilleri çıkarıldı. Toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. Antioksidan aktivite tayinleri; DPPH serbest radikali giderim, ABTS katyon radikali giderim, metal bağlama yöntemi ve CUPRAC yöntemleriyle yapıldı. Bazı enzimler üzerine inhibitör etkilerini saptamak amacıyla antielastaz, antihyaluronidaz, antikolajenaz, antiasetilkinesteraz, anibutirilkolineraz, antitirozinaz ve antiüreaz aktivite tayinleri yapıldı. Ayrıca ekstraların çeşitli suşlara karşı antimikrobiyal aktivite tayini yapıldı.

4.1. LC-MS/MS ile 37 Fitokimyasal Maddenin Tanımlanması ve Kantitatif Analizi

Tez çalışmasının bu kısmında, Yılmaz ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre, çalışılan *H. calycinum*, *H. perforatum* ve *H. confertum* türlerinin LC-MS/MS cihazı ile toprak üstü kısımlarının metanol ekstralarının sekonder metabolit profilleri çıkarıldı. LC-MS/MS çalışmasında 37 adet fitokimyasal standart maddenin kalitatif ve kantitatif analizi için çok geniş kapsamlı bir metot hazırlanarak validasyon çalışmaları yapıldı (Yılmaz ve ark. 2018).

LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler (alıkonma zamanı (RT), ana (parent) iyonlar, standart bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), belirleme katsayısı (R^2), bağıl standart sapma (RSD), dedeksiyon ve tayin alt sınırları (LOD/LOQ ($\mu\text{g/L}$)), 95% güven seviyesinde bağıl standart belirsizlik ($k=2$) (U (%)) Tablo 4.1'de verilmiştir.

LC-MS/MS metodunda kullanılan kimyasallar ve sınıfları şunlardır:

- Fenolik asitler (15 adet): *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kafeik asit, protokateşik asit, vanilik asit, pirokatekol, salisilik asit, sirinjik asit, 4-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, rozmarinik asit, sinnamik asit, sinapinik asit, ferulik asit, gallik asit.

- Flavonoitler (17 adet): fisetin, hesperetin, nikotiflorin, naringenin, rutin, kersetin, nikotiflorin, kamferol, roifolin, mirisetin, kersitrin, luteolin, apigenin, likiritigenin, krisin, apigetrin, hesperidin, izokersitrin.
- Fenolik olmayan organik asitler (3 adet): fumarik asit, kinik asit, malik asit.
- Fenolik aldehit (1 adet): vanilin.
- Benzopiran (1 adet): kumarin

4.1.1. LC-MS/MS Metot Validasyon Parametreleri

Metodun performans özellikleri standart çözeltiler, standart ekleme (katkı) yapılmış ve yapılmamış numunelere uygulanarak belirlenmiştir. Bu amaçla metot validasyonu kapsamında doğrusallık (linearite), geri kazanım, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik), dedeksiyon (LOD) ve tayin (LOQ) alt sınırları ile bağlı standart belirsizlik ($U= 95\%$ güven seviyesinde ($k=2$)) parametreleri değerlendirilmiştir. Validasyon çalışmalarına ilişkin parametreler Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

4.1.1.1. Doğrusallık (Linearite)

37 adet fitokimyasal standart maddenin kalitatif ve kantitatif analizini gerçekleştirmek amacıyla gruplandırma yapılmış ve 5 farklı konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. LC-MS/MS metodundaki standartların lineer aralığının belirlenmesi için 3 tekrarlı ve 5 noktalı kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

4.1.1.2. Gerçeklik ve Kesinlik

Metodun gerçeklik ve kesinlik çalışmaları, seçilen bir *Hypericum* türünün metanol ekstresine aynı günde altı kez ve farklı günler içerisinde (3 farklı günde) altışar kez üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta ve yüksek olmak üzere) her standardın kalibrasyonuna göre standart ekleme yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı gün ve farklı günlerde yapılan çalışmalar sonucunda, gerçeklik ve kesinliği belirlemek üzere geri kazanım ve % RSD değerleri bulunmuştur.

4.1.1.3. Dedeksiyon ve Tayin Alt Sınırları (LOD/LOQ)

LC-MS/MS metodunda kullanılan standartların dedeksiyon (LOD) ve tayin (LOQ) alt sınırlarının tespit edilmesinde etken madde içermeyen bir ekstreden hazırlanan 10 eş örneğe standardın sinyal verdiği en düşük konsantrasyonda standart ekleme yapılarak cihaza enjekte edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır:

$$\text{LOD} = \text{Ortalama} + 3 \times \text{Standart Sapma}$$

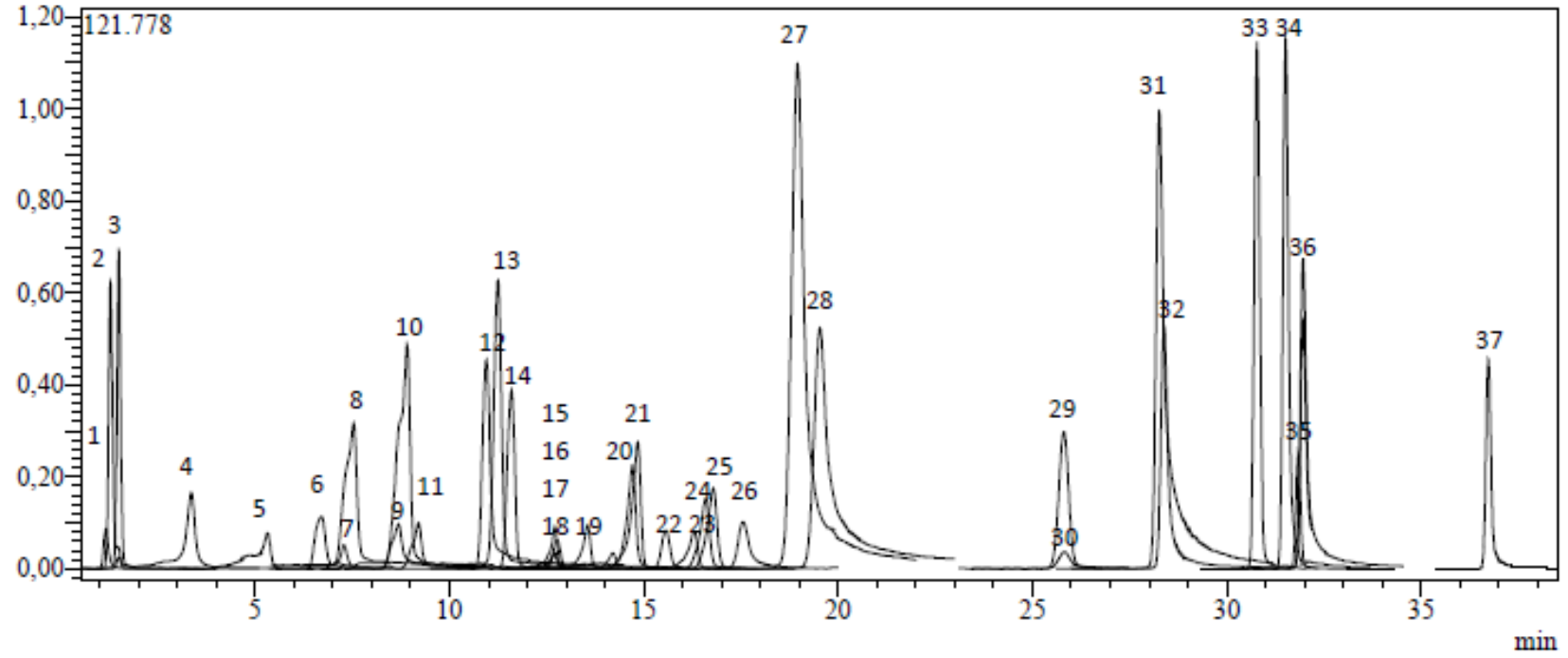
$$\text{LOQ} = \text{Ortalama} + 10 \times \text{Standart Sapma}$$

4.1.1.4. Bağlı Standart Belirsizlik (U^{95})

Standart bağlı belirsizlik, EURACHEM Guide'a göre gerçeklik (geri kazanım) ve kesinlik çalışmalarıyla belirlenmiştir (EURACHEM CITAC Guide 2004).

4.1.2. LC-MS/MS Analizine İlişkin Standart Kromatogramı ve Standart Olarak Alınan Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS Parametreleri

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstratlarının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin standart kromatogramı Şekil 4-1'de ve standart olarak alınan fenolik bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri Tablo 4-1'de verilmiştir:



Şekil 4-1: 37 fitokimyasal maddenin LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin standart kromatogramı

Tablo 4-1: Standart Olarak Alınan Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS Parametreleri

NO	Bileşikler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Kalibrasyon Denklemi	R ^{2c}	RSD% ^d		Lineerite Aralığı (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Geri Kazanım (%)		U ^f
								Aynı Gün	Farklı Günler			Aynı Gün	Farklı Günler	
1	Kumarin	17,40	147,05	91,0-103,2	Poz	y=33,64x-89700	0,994	0,01306	0,01239	1000-20000	208,4/228,4	0,99947	1,00081	0,0237
2	Hesperidin	12,67	610,90	303,1-465,1	Poz	y=1340,27x-43769	0,998	0,00945	0,01126	25-1000	3,4/4,2	1,01733	1,01263	0,0262
3	p-Kumarik asit	11,53	162,95	119,3-93,3	Neg	y=3199,20x+13002	0,992	0,01820	0,01727	25-1000	7,3/9,1	1,00617	1,01224	0,0516
4	o-kumarik asit	15,45	162,95	119,4-93,3	Neg	y=1219,34x-10915	0,999	0,02730	0,02566	25-1000	24,4/31,1	0,98344	0,99061	0,0513
5	Gallik asit	3,00	168,85	125,2-79,2	Neg	y=226,76x+38152	0,998	0,01601	0,01443	250-10000	95,5/106,9	1,00004	1,00454	0,0282
6	Kafeik asit	8,80	178,95	135,2-134,3	Neg	y=3963,32x+178156	0,998	0,01454	0,01469	25-1000	18,4/22,4	1,00917	0,98826	0,0354
7	Vanilik asit	8,57	166,90	152,3-108,3	Neg	y=35,84x-12097	0,999	0,00528	0,00619	1000-20000	122,2/139,7	1,00093	1,04095	0,0508
8	Salisilik asit	11,16	136,95	93,3-65,3	Neg	y=5286,26x+309192	0,989	0,01016	0,01242	25-1000	5,0/6,5	1,00989	0,99013	0,0329
9	Kinik asit	1,13	190,95	85,3-93,3	Neg	y=41,06x+10671	0,996	0,00259	0,00274	250-10000	75,8/79,4	1,00288	0,98778	0,0082
10	4-OH-benzoik asit	7,39	136,95	93,3-65,3	Neg	y=409,03x+112079	0,998	0,01284	0,01538	250-10000	33,2/38,1	0,99662	1,00058	0,0289
11	Ferulik asit	12,62	192,95	178,3	Neg	y=80,45x-31782	0,997	0,00708	0,00619	250-10000	36,6/42,0	0,99987	1,00289	0,0494
12	Klorojenik asit	7,13	353,15	191,2	Neg	y=781,36x-18697	0,998	0,00058	0,00076	25-1000	6,2/8,1	1,00806	0,99965	0,0069
13	Rozmarinik asit	14,54	359,00	161,2-197,2	Neg	y=909,67x-201692	0,994	0,02014	0,01751	100-5000	6,6/8,8	0,99206	1,03431	0,0713
14	Protokateşik asit	4,93	152,95	108,3	Neg	y=297,75x+30590	0,995	0,01236	0,01296	100-5000	28,2/31,4	0,99404	1,01070	0,0411
15	Sinamik asit	25,61	147,00	103,15-77,3	Neg	y=9,06x-12403	0,996	0,00648	0,00816	5000-20000	821,8/859,7	1,00051	0,99927	0,0143
16	Sinapinik asit	12,66	222,95	208,3-149,2	Neg	y=141,96x-73294	0,992	0,01446	0,01517	250-10000	78,7/86,1	1,00164	0,99962	0,0281
17	Fumarik asit	1,48	115,00	71,4	Neg	y=64,99x-11592	0,997	0,00536	0,00460	100-5000	28,1/34,5	0,99748	0,99867	0,0124
18	Vanilin	10,87	151,00	136,3-92,2	Neg	y=446,10x+70934	0,998	0,00696	0,00793	250-10000	44,3/53,1	0,99679	0,99611	0,0280
19	Pirokatekol	6,48	109,00	108,35-91,3	Neg	y=30,61x+14735	0,996	0,01313	0,01339	1000-20000	261,1/278,4	0,99987	0,99936	0,0235
20	Malik asit	1,23	133,00	115,2-71,3	Neg	y=316,95x-42041	0,999	0,00477	0,00527	250-10000	55,3/67,5	1,01266	0,99836	0,0113

Tablo 4-1: Standart Olarak Alınan Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS Parametreleri

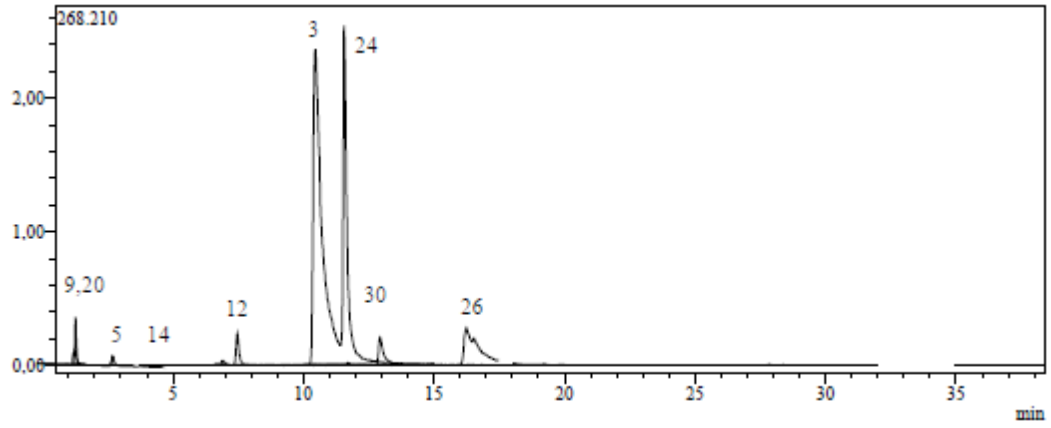
NO	Bileşikler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Kalibrasyon Denklemi	R ^{2c}	RSD% ^d		Lineerite Aralığı (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Geri Kazanım (%)		U ^f
								Aynı Gün	Farklı günler			Aynı Gün	Farklı günler	
21	Sirinjik asit	9,02	196,95	182,2-167,3	Neg	y=42,33x-52547	0,996	0,01049	0,01345	1000-20000	212,5/233,3	0,99922	0,99977	0,0238
22	Hesperetin	31,76	300,95	164,2-136,2	Neg	y=876,67x+48916	0,997	0,03209	0,02605	25-1000	5,6/6,9	0,98850	0,99435	0,0562
23	Naringenin	30,68	270,95	151,2-119,3	Neg	y=4315,1x+178410	0,995	0,02054	0,02019	25-1000	5,4/6,4	0,99883	1,01002	0,0521
24	Rutin	12,61	609,05	300,1-271,1	Neg	y=561,91x-16879	0,997	0,00473	0,00624	25-1000	5,5/6,5	1,00994	0,98017	0,0159
25	Kersetin	28,17	300,90	151,2-179,2	Neg	y=1198,48x+480562	0,990	0,01589	0,01360	100-5000	23,3/28,9	0,98470	1,00103	0,0543
26	Kersitrin	16,41	447,15	301,1-255,1	Neg	y=339,39x+38910	0,999	0,01528	0,02320	100-5000	22,0/25,2	0,99726	1,00620	2,0079
27	Apigenin	31,43	268,95	117,3-151,2	Neg	y=4548,36x+295252	0,990	0,02304	0,02204	25-1000	5,4/6,3	1,01444	1,01331	0,0650
28	Krisin	36,65	252,95	143,3-119,4	Neg	y=2032,13x+95593	0,993	0,00490	0,00630	25-1000	5,4/6,2	1,00338	1,00437	2,0083
29	Likiritigenin	25,62	254,95	119,3-135,1	Neg	y=2384,96x+59141	0,996	0,01849	0,01738	25-1000	5,5/6,6	1,00333	0,99957	0,0341
30	İzokersitrin	13,42	463,00	300,1-271,1	Neg	y=803,23x+4981	0,999	0,00682	0,00515	25-1000	5,4/6,3	1,00594	1,00722	0,0133
31	Apigetrin	16,59	431,00	268,2-239,2	Neg	y=1775,55x+91121	0,993	0,01797	0,01607	25-1000	5,4/6,1	1,01394	1,00419	0,0597
32	Roifolin	16,11	577,05	269,2-211,1	Neg	y=237,15x+11887	0,999	0,00747	0,01528	100-5000	23,1/27,9	1,01046	1,01739	0,0941
33	Nikotiflorin	14,68	593,05	285,1-255,2	Neg	y=498,38x+79274	0,991	0,00737	0,00875	100-5000	22,4/25,5	1,02558	1,00970	0,0276
34	Fisetin	19,30	284,95	135,2-121,3		y=547,46x+274791	0,991	0,00557	0,00820	250-10000	54,4/61,4	0,99877	1,00031	0,0148
35	Luteolin	28,27	284,75	133,2-151,2	Neg	y=3272,65x+150557	0,997	0,00575	0,00696	25-1000	5,4/6,5	1,00772	0,99524	0,0174
36	Mirisetin	18,72	317,00	179,2-151,3	Neg	y=583,55x+205727	0,999	0,00652	0,00711	250-10000	53,2/57,2	0,99982	1,00042	0,0126
37	Kamferol	31,88	284,75	255,1-117,3	Neg	y=26,29x+87558	0,992	0,01436	0,01070	1000-20000	206,6/214,3	0,99971	0,99851	0,0209

4.1.3. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin LC-MS/MS Analiz Sonuçları

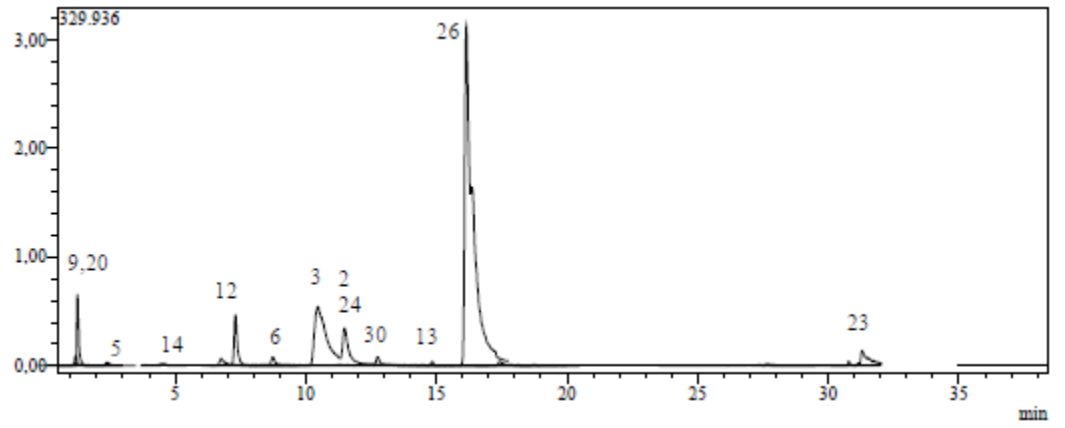
H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinin çiçekli toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktlarının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramlar aşağıda verilmiştir (*H. calycinum* için Şekil 4-2, *H. confertum* için Şekil 4-3, *H. perforatum* için Şekil 4-4).

Türlerin LC-MS/MS metodu ile yapılan analiz sonucu belirlenen 37 fitokimyasal içerikleri ise Tablo 4-2’de verilmiştir.

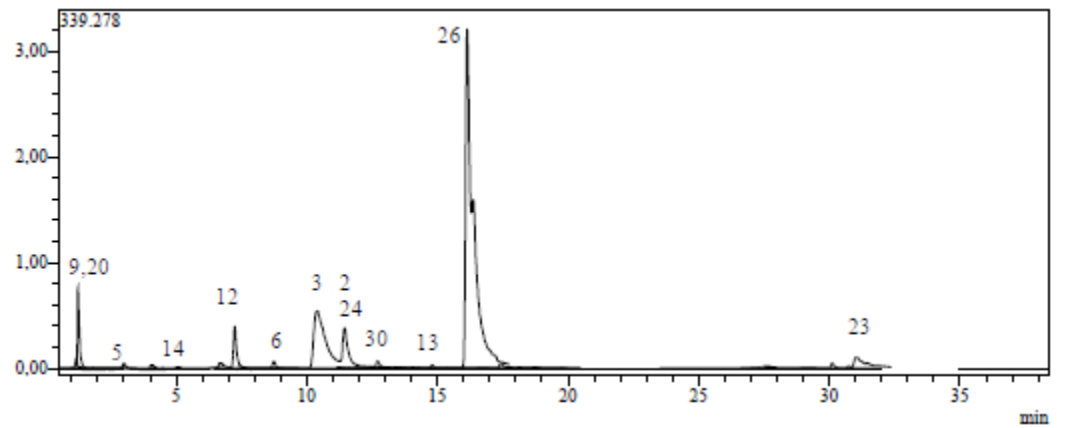
Şekil 4-2: *H. calycinum* metanol ekstresine ait kromatogram



Şekil 4-3: *H. confertum* metanol ekstresine ait kromatogram



Şekil 4-4: *H. perforatum* metanol ekstresine ait kromatogram



Tablo 4-2: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin LC-MS/MS Analiz Sonuçları

NO	Bileşikler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Miktarlar (µg/g)		
						<i>H. calycinum</i>	<i>H. confertum</i>	<i>H. perforatum</i>
1	Kumarin	17,40	147,05	91,0-103,2	Poz	---	---	---
2	Hesperidin	12,67	610,90	303,1-465,1	Poz	---	8,45±0,002	2,69±0,0007
3	p-Kumarik asit	11,53	162,95	119,3-93,3	Neg	3,18±0,002	10,7±0,006	9,19±0,005
4	o-kumarik asit	15,45	162,95	119,4-93,3	Neg	---	---	---
5	Gallik asit	3,00	168,85	125,2-79,2	Neg	88,97±0,025	49,57±0,014	45,15±0,013
6	Kafeik asit	8,80	178,95	135,2-134,3	Neg	---	5,4±0,002	4,01±0,001
7	Vanilik asit	8,57	166,90	152,3-108,3	Neg	---	---	---
8	Salisilik asit	11,16	136,95	93,3-65,3	Neg	---	---	---
9	Kinik asit	1,13	190,95	85,3-93,3	Neg	885,50±0,073	534,02±0,044	512,12±0,042
10	4-OH-benzoik asit	7,39	136,95	93,3-65,3	Neg	---	---	---
11	Ferulik asit	12,62	192,95	178,3	Neg	---	---	---
12	Klorojenik asit	7,13	353,15	191,2	Neg	2595,15±0,179	905,09±0,062	871,69±0,060
13	Rozmarinik asit	14,54	359,00	161,2-197,2	Neg	---	14,37±0,010	15,94±0,011
14	Protokateşik asit	4,93	152,95	108,3	Neg	14,52±0,006	8,65±0,004	6,13±0,003
15	Sinamik asit	25,61	147,00	103,15-77,3	Neg	---	---	---
16	Sinapinik asit	12,66	222,95	208,3-149,2	Neg	---	---	---
17	Fumarik asit	1,48	115,00	71,4	Neg	---	---	---
18	Vanilin	10,87	151,00	136,3-92,2	Neg	---	---	---
19	Pirokatekol	6,48	109,00	108,35-91,3	Neg	---	---	---
20	Malik asit	1,23	133,00	115,2-71,3	Neg	314,96±0,036	792,17±0,089	925,91±0,105

Tablo 4-2: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin LC-MS/MS Analiz Sonuçları (devam)

NO	Bileşikler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Miktarlar (µg/g)		
						<i>H. calycinum</i>	<i>H. confertum</i>	<i>H. perforatum</i>
21	Sirinjik asit	9,02	196,95	182,2-167,3	Neg	---	---	---
22	Hesperetin	31,76	300,95	164,2-136,2	Neg	---	---	---
23	Naringenin	30,68	270,95	151,2-119,3	Neg	---	3,53±0,002	4,64±0,002
24	Rutin	12,61	609,05	300,1-271,1	Neg	212,61±0,034	45,81±0,007	48,7±0,008
25	Kersetin	28,17	300,90	151,2-179,2	Neg	---	---	---
26	Kersitrin	16,41	447,15	301,1-255,1	Neg	1805,9±0,98	1101,04±0,598	636,33±0,345
27	Apigenin	31,43	268,95	117,3-151,2	Neg	---	---	---
28	Krisin	36,65	252,95	143,3-119,4	Neg	---	---	---
29	Likiritigenin	25,62	254,95	119,3-135,1	Neg	---	---	---
30	İzokersitrin	13,42	463,00	300,1-271,1	Neg	346,16±0,046	2729,98±0,363	2628,76±0,349
31	Apigetrin	16,59	431,00	268,2-239,2	Neg	---	---	---
32	Roifolin	16,11	577,05	269,2-211,1	Neg	---	---	---
33	Nikotiflorin	4,68	593,05	285,1-255,2	Neg	---	---	---
34	Fisetin	9,30	284,95	135,2-121,3	Neg	---	---	---
35	Luteolin	8,27	284,75	133,2-151,2	Neg	---	---	---
36	Mirisetin	8,72	317,00	179,2-151,3	Neg	---	---	---
37	Kamferol	1,88	284,75	255,1-117,3	Neg	---	---	---

4.2. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

4.2.1. Toplam Fenolik Bileşik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinin metanol ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. Sonuçlar Tablo 4-3'te verilmiştir:

Tablo 4-3: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarları^a

Örnekler	Toplam Fenolik Miktarı (µg pirokatekole eşdeğer)/mg Ekstre ^b	Toplam Flavonoit Miktarı (µg kersetine eşdeğer)/mg Ekstre ^c
<i>H. calycinum</i>	141,12±2,40	60,87±2,04
<i>H. confertum</i>	106,70±1,84	70,61±0,51
<i>H. perforatum</i>	90,40±1,28	62,49±0,77

^a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

^b: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik. $y=0,0276x + 0,0416$ $R^2=0.9987$

^c: Kersetine eşdeğer flavonoit içerik $y=0,0277x + 0,0434$ $R^2=0.9992$

4.2.2. DPPH Serbest Radikali Giderici Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinin çiçekli toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstralarının DPPH serbest radikali giderici etkileri aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4-4):

Tablo 4-4: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin DPPH Radikali Giderici Aktivite Deneyindeki IC₅₀ Değerleri

Örnekler	DPPH Serbest
	Radikalı Giderici Aktivite Sonuçları
	IC ₅₀ değerleri (µg/mL)
<i>H. calycinum</i>	10,05±0,20
<i>H. confertum</i>	23,32±0,75
<i>H. perforatum</i>	29,35±1,04
BHA	7,88±0,20
α-TOC	16,30±0,79
BHT	58,86±0,50

4.2.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden elde edilen metanol ekstralarının ABTS katyon radikali giderici etkileri aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4-5):

Tablo 4-5: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin ABTS Katyon Radikali Giderici Aktivite Deneyindeki IC₅₀ Değerleri

Örnekler	ABTS Katyon
	Radikali Giderim
	Aktivitesi Sonuçları
	IC ₅₀ değerleri (µg/mL)
<i>H. calycinum</i>	6,00±0,16
<i>H. confertum</i>	9,42±0,13
<i>H. perforatum</i>	9,01±0,19
BHA	2,74±0,03
α-TOC	10,20±0,05
BHT	3,16±0,06

4.2.4. Metal Bağlama Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden elde edilen metanol ekstralarının metal bağlama yöntemi ile antioksidan aktivite sonuçları aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4-6):

Tablo 4-6: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Metal Bağlama Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Deneyindeki IC₅₀ Değerleri

Örnekler	Metal Bağlama
	Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Sonuçları
IC ₅₀ değerleri (µg/mL)	
<i>H. calycinum</i>	286,58±1,54
<i>H. confertum</i>	>1000
<i>H. perforatum</i>	>1000
EDTA	44,65±0,43

4.2.5. CUPRAC Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden hazırlanan ekstrelerin CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) belirlenmiştir. Standart olarak BHT, BHA ve α-tokoferol kullanılmıştır.

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden elde edilen metanol ekstrelerinin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktivite sonuçları aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4-7):

Tablo 4-7: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin CUPRAC Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Sonuçları:

Örnekler	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100µg/mL
<i>H. calycinum</i>	0,424±0,025	0,888±0,057	1,621±0,062	2,697±0,082
<i>H. confertum</i>	0,428±0,069	0,695±0,016	1,204±0,060	2,041±0,055
<i>H. perforatum</i>	0,396±0,011	0,666±0,071	1,133±0,020	1,851±0,076
BHT	0,944±0,035	2,108±0,094	3,169±0,119	3,990±0,000
BHA	1,148±0,136	2,420±0,006	3,913±0,023	3,990±0,000
TOC	0,388±0,041	0,770±0,009	1,478±0,028	2,601±0,070

4.3. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin Antiasetilkinesteraz ve Antibutirilkolinesteraz Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden hazırlanan ekstrelerin antiasetilkinesteraz ve antibutirilkolinesteraz aktiviteleri asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) enzimlerinin inhibisyonu ile belirlenmiştir. Sonuçlar aşağıda sunulmuştur (Tablo 4-8):

Tablo 4-8: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antiasetilkinesteraz ve Antibutirilkolinesteraz Aktivite Sonuçları^a

Örnekler	AChE (%İnhibisyon)	BChE (%İnhibisyon)
<i>H. calycinum</i>	45,33±1,54	64,75±0,71
<i>H. perforatum</i>	38,89±1,07	82,50±1,41
<i>H. confertum</i>	32,61±1,08	76,08±1,26
Galantamin*	83,31±0,09	81,33±1,04

^a 200µg/mL

* Standart madde

4.4. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin Antitirozinaz Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden hazırlanan ekstrelerin antitirozinaz aktiviteleri tirozinaz enziminin inhibisyonu ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-9'da sunulmuştur.

Tablo 4-9: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antitirozinaz Aktivite Sonuçları^a

Örnekler	Tirozinaz (%İnhibisyon)
<i>H. calycinum</i>	54,30±0,49
<i>H. perforatum</i>	48,22±0,38
<i>H. confertum</i>	40,92±0,21
Kojik asit*	95,05±0,37

^a 200µg/mL

*Standart madde

4.5. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin Antiüreaz Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden hazırlanan ekstrelerin antiüreaz aktiviteleri üreaz enziminin inhibisyonu ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-10'da sunulmuştur.

Tablo 4-10: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antiüreaz Aktivite Sonuçları^a

Örnekler	Üreaz (%İnhibisyon)
<i>H. calycinum</i>	19,44±0,29
<i>H. perforatum</i>	AD
<i>H. confertum</i>	AD
Tiyoüre*	98,37±0,40

^a 200µg/mL

* Standart madde

AD: Aktif değil

4.6. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin Antikolajenaz Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden hazırlanan metanol ekstrelerinin antikolajenaz aktiviteleri kolajenaz enziminin inhibisyonu ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-11’de sunulmuştur:

Tablo 4-11: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antikolajenaz Aktivite Sonuçları

Örnekler	Kolajenaz İnhibisyon IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)
<i>H. calycinum</i>	51,24±1,33
<i>H. confertum</i>	63,01±0,24
<i>H. perforatum</i>	61,53±0,40
EGCG*	43,47±1,82

* Standart madde

4.7. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin Antielastaz Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden hazırlanan ekstrelerin antielastaz aktiviteleri elastaz enziminin inhibisyonu ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-12’de sunulmuştur:

Tablo 4-12: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antielastaz Aktivite Sonuçları

Örnekler	Elastaz İnhibisyon IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)
<i>H. calycinum</i>	55,77±1,32
<i>H. perforatum</i>	61,67±0,76
<i>H. confertum</i>	64,76±0,55
EGCG*	70,47±0,89

* Standart madde

4.8. *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinin Antihiyaluronidaz Aktivite Sonuçları

H. calycinum, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinden hazırlanan ekstrelerin antihiyaluronidaz aktiviteleri hyaluronidaz enziminin inhibisyonu ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-13'te sunulmuştur

Tablo 4-13: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Antihiyaluronidaz Aktivite Sonuçları

Örnekler	Hyaluronidaz İnhibisyon IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)
<i>H. calycinum</i>	22,17±0,02
<i>H. perforatum</i>	36,55±0,11
<i>H. confertum</i>	37,30±1,49
Tannik Asit*	30,49±0,08

*Standart madde

4.9. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları

Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan metanol ekstreleri ile *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 14153 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite tayini yapılmıştır. Aynı ekstrelerde; *Candida albicans* ATCC 10231 suşuna karşı antifungal aktivite tayini yapılmıştır. Gözle görülür üremenin olmadığı en düşük madde konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir.

Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan ekstrelerin suşlara karşı gösterdiği antimikrobiyal aktiviteye ait sonuçlar aşağıda tablolar halinde verilmiştir.

Tablo 4-14: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* Türlerine Ait Ekstrelerin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (MİK değeri)

Mikroorganizma	<i>H. calycinum</i> ekstresi µg/mL	<i>H. confertum</i> ekstresi µg/mL	<i>H. perforatum</i> ekstresi µg/mL	Referans Maddeler µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	---	---	---	Sefuroksim-Na 1,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	9,76	19,53	19,53	Sefuroksim 9,8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	---	---	---	Sefuroksim-Na 4,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	---	---	---	Sefuroksim-Na 4,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	---	---	---	Seftazidim 2,4
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	---	---	---	Sefuroksim-Na 2,4
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	312,5	312,5	312,5	Klortrimazol 4,9

5. TARTIŞMA

Hypericum türleri, içerdikleri çok sayıdaki kompleks yapılı sekonder metabolitler nedeniyle birçok farmakolojik etkiye sahip son derece önemli bitkilerdir. *H. perforatum* türü, dünya çapında en yaygın olarak bulunan ve yapılan birçok çalışma ile kimyasal içeriği ve biyolojik etkileri en iyi aydınlatılmış türdür. *Hypericum* türleriyle ilgili 2012 yılında mevcut olan yaklaşık 2500 çalışmanın 950'si *H. perforatum* türü üzerine yapılmıştır. Özellikle 90'lı yılların başından beri hem kimyasal bileşimleri, hem de biyolojik aktiviteleriyle ilgili yürütülen çalışmaların sonucunda elde edilen olumlu sonuçlar neticesinde *Hypericum* türleri tüm dünyada son derece önem kazanmıştır. (Nürk, 2012).

Bu doktora tez çalışmasında Uludağ'dan toplanan üç *Hypericum* türü olan *Hypericum calycinum*, *Hypericum confertum* ve *Hypericum perforatum* bitkilerinin çiçekli toprak üstü kısımlarından metanol ekstraktları hazırlanarak, kimyasal içerikleri 37 fitokimyasalın (15 fenolik asit, 17 flavonoid, 3 fenolik olmayan organik asit, 1 fenolik aldehit ve 1 benzopiran) standart olarak kullanıldığı LC-MS/MS metoduyla aydınlatılmıştır.

Türlerin içerdiği toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. Antioksidan aktivite tayinleri; DPPH serbest radikali giderim, ABTS katyon radikali giderim, metal bağlama ve CUPRAC yöntemleri ile yapılmıştır. Ayrıca Ellman metodu ile asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibisyon aktivite tayinleri yapılmış; bunun yanı sıra kolajenaz, hyaluronidaz, elastaz, tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyon aktiviteleri de farklı metotlarla tayin edilmiştir.

Ekstrelerin antimikrobiyal aktivitelerinin tayini yapılmış, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 14153'e karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır. Ekstrelerin *Candida albicans* ATCC 10231'e karşı antifungal aktivitesi ise yine CLSI kriterleri doğrultusunda dilüsyon yöntemiyle saptanmıştır.

Fenolik Bileşiklerin Miktarları

H. calycinum, *H. perforatum* ve *H. confertum* türlerinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstrelerinin LC-MS/MS cihazı ile belirlenen kimyasal içeriklerine göre, her üç tür de fenolik asitlerden klorojenik asit, gallik asit, p-kumarik asit ve protokateşik asit; flavonoitlerden ise rutin, kersitrin ve izokersitrin taşımaktadır.

Çalışılan üç *Hypericum* türü fenolik asitlerden klorojenik asit içeriği açısından karşılaştırıldığında; en yüksek değere $2595,15 \pm 0,179$ µg/g ile *H. calycinum* türünün sahip olduğu, bu türü azalan oranlarda $905,09 \pm 0,062$ µg/g ile *H. confertum* ve $871,69 \pm 0,060$ µg/g ile *H. perforatum* türlerinin takip ettiği Tablo 5-1’de görülmektedir. Bu sonuçlara göre, çalışılan diğer türler klorojenik asit içeriği açısından *H. perforatum* türüne üstünlük sağlamışlardır. Özellikle *H. calycinum* türünün diğer iki türe göre oldukça yüksek miktarda klorojenik asit içerdiği tespit edilmiştir.

Çalışılan üç tür, diğer bir fenolik asit bileşiği olan gallik asit içerikleri açısından değerlendirildiğinde *H. calycinum* türünün $88,97 \pm 0,025$ µg/g ile diğer türlere kıyasla daha yüksek miktarda gallik asit içerdiği belirlenmiştir. *H. confertum* türü $49,57 \pm 0,014$ µg/g gallik asit, *H. perforatum* ise $45,15 \pm 0,013$ µg/g gallik asit içermektedir.

İncelenen türler flavon glikozitlerinden rutin içeriği açısından karşılaştırıldığında en yüksek değere $212,61 \pm 0,034$ µg/g ile *H. calycinum* türünün sahip olduğu, bu türü sırasıyla $48,7 \pm 0,008$ µg/g ile *H. perforatum* ve $45,81 \pm 0,007$ µg/g ile *H. confertum* türlerinin izlediği saptanmıştır. Rutin içeriği açısından *H. calycinum* türü diğerlerine kıyasla oldukça zengindir.

Flavon glikozitlerinden kersitrin içeriği $1805,9 \pm 0,98$ µg/g olan *H. calycinum* türünün, $636,33 \pm 0,345$ µg/g kersitrin taşıyan *H. perforatum* türünden yaklaşık 3 kat fazla kersitrin içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. *H. confertum* türünün ise $1101,04 \pm 0,598$ µg/g ile *H. calycinum* türüne göre daha az; fakat *H. perforatum* türüne göre daha fazla kersitrin içerdiği belirlenmiştir.

İzokersitrin içeriği açısından değerlendirildiğinde *H. confertum* türünün $2729,98 \pm 0,363$ µg/g ile en yüksek değere sahip olduğu; daha sonra sırasıyla

2628,76±0,349 µg/g ile *H. perforatum* ve 346,16±0,046 µg/g ile *H. calycinum* türlerinin onu takip ettiği Tablo 5-1’de görülmektedir.

Diğer fenolik bileşikler açısından değerlendirildiğinde, üç türün de p-kumarik asit içerdiği (*H. calycinum*: 3,18±0,002 µg/g; *H. perforatum*: 9,19±0,005 µg/g; *H. confertum*: 10,7±0,006 µg/g) tespit edilmiştir. Ayrıca *H. calycinum* türünün kafeik asit içermediği, *H. confertum* türünün 5,4±0,002 µg/g ve *H. perforatum* türünün de 4,01±0,001 µg/g kafeik asit içerdiği; yine *H. calycinum* türü rosmarinik asit içermezken *H. confertum* (14,37±0,010 µg/g) ve *H. perforatum* (15,94±0,011 µg/g) türlerinin rosmarinik asit içerdiği tespit edilmiştir.

Her üç tür de protokateşik asit içermektedir. Protokateşik asit açısından da en zengin tür *H. calycinum* olarak tespit edilmiş (14,52±0,006 µg/g), *H. confertum* türü 8,65±0,004 µg/g protokateşik asit içerirken, *H. perforatum* türü 6,13±0,003 µg/g protokateşik asit ile üç tür arasında en az miktarda protokateşik asit içeren tür olmuştur.

Tablo 5-1: *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinin LC-MS/MS ile belirlenen klorojenik asit, gallik asit, rutin, kersitrin, izokersitrin, p-kumarik asit, kafeik asit, rozmarinik asit ve protokateşik asit içerikleri (µg/g)

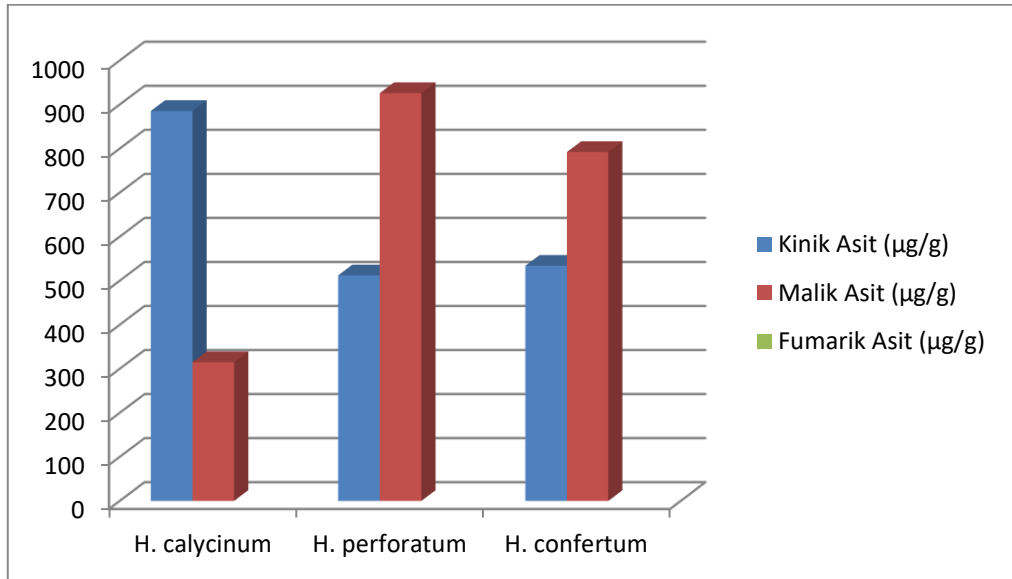
Bitki İçerisindeki Miktarları (µg/g)									
Tür	Klorojenik Asit	Gallik Asit	Rutin	Kersitrin	İzokersitrin	P-Kumarik Asit	Kafeik Asit	Rozmarinik Asit	Protokateşik Asit
<i>H. calycinum</i>	2595,15±0,179	88,97±0,025	212,61±0,034	1805,9±0,98	346,16±0,046	3,18±0,002	---	---	14,52±0,006
<i>H. confertum</i>	905,09±0,062	49,57±0,014	45,81±0,007	1101,04±0,598	2729,98±0,363	10,7±0,006	5,4±0,002	14,37±0,010	8,65±0,004
<i>H. perforatum</i>	871,69±0,060	45,15±0,013	48,7±0,008	636,33±0,345	2628,76±0,349	9,19±0,005	4,01±0,001	15,94±0,011	6,13±0,003

Fenolik Olmayan Organik Asitlerin Miktarı

Çalışılan üç *Hypericum* türünün bileşiminde bulunan fenolik olmayan organik asitlerin (kinik asit, malik asit ve fumarik asit) miktar tayinine göre, *H. calycinum* türü $885,50 \pm 0,073$ $\mu\text{g/g}$ ile en yüksek miktarda kinik asit içeren türdür. *H. confertum* $534,02 \pm 0,044$ $\mu\text{g/g}$ kinik asit, *H. perforatum* ise $512,12 \pm 0,042$ $\mu\text{g/g}$ kinik asit içermektedir.

Her üç tür de malik asit içermektedir. En yüksek miktarda malik asit içeren tür $925,91 \pm 0,105$ $\mu\text{g/g}$ *H. perforatum* türüdür. Sırasıyla $792,17 \pm 0,089$ $\mu\text{g/g}$ ile *H. confertum* ve $314,96 \pm 0,036$ $\mu\text{g/g}$ ile *H. calycinum* türleri onu izlemektedir.

Çalışılan üç türde de fumarik asit bulunmadığı tespit edilmiştir.



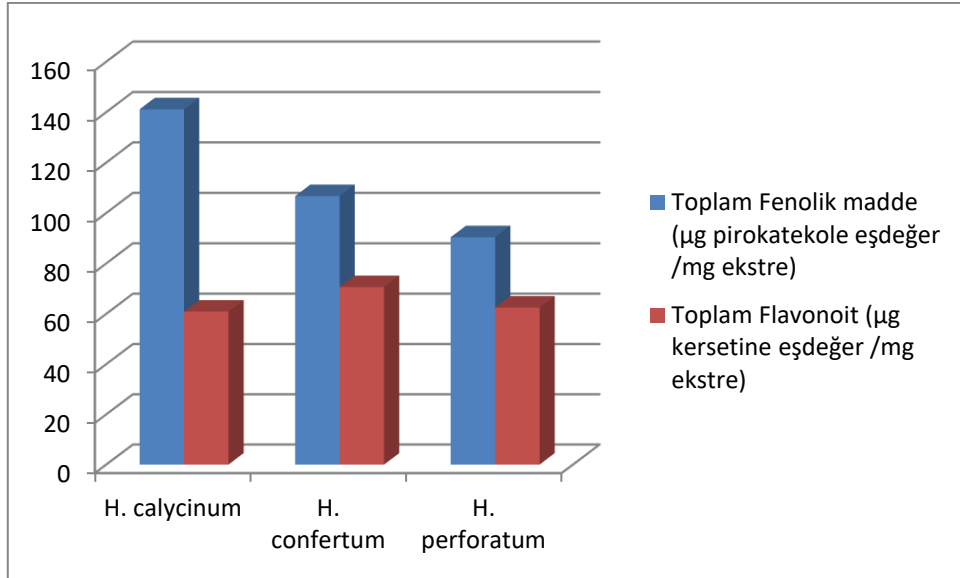
Şekil 5-1: Çalışılan *Hypericum* Türlerinin LC-MS/MS İle Belirlenen Kinik Asit, Malik Asit ve Fumarik Asit İçeriklerini Gösteren Grafik

Antioksidan Aktivite Sonuçları

Bu çalışmada incelenen *H. calycinum*, *H. perforatum* ve *H.confertum* türlerinin antioksidan potansiyelini değerlendirmek amacıyla, hazırlanan metanol ekstratlarının antioksidan aktiviteleri bazı antioksidan testler kullanılarak incelendi. Ekstrelerin antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşikler ve flavonoidler içerdikleri; DPPH serbest radikali giderim, ABTS katyon radikali giderim, metal bağlama ve CUPRAC yöntemleri ile tayin edilen antioksidan etkileri ile doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecekleri sonucuna varıldı.

Çalışılan *Hypericum* türleri ile total fenolik madde miktar tayini çalışması yapılarak doğal antioksidanların en önemli grupları olan fenolik madde miktarları belirlendi. Fenolik bileşikler içerisinde en fazla bulunanları flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Scalbert ve ark. 2005). Fenolik maddeler ve flavonoidler biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyonunu inhibe eden doğal antioksidan yapılarıdır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisinin, serbest radikalleri giderme, metal iyonlarla bileşik oluşturma ve singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Rice-Evans ve ark. 1996). Flavonoid ve polifenollerin kanser gibi çeşitli hastalıkların oluşumunda rol alan oksidan yapıları yok etme, antioksidan enzimlerin aktivitelerini stimüle ederek intraselüler oksidatif stresi azaltma, nitrik oksit ve peroksit radikallerini direkt olarak temizleme gibi mekanizmalarla etkili oldukları bildirilmiştir (Havsteen, 2002).

Bu çalışmada *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* metanol ekstratlarının toplam fenolik bileşik ve toplam flavonoid miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşit olarak belirlendi. Buna göre; toplam fenolik maddeyi en çok içeren tür 141,12±2,40 µg/mg ile *H. calycinum* türüdür. *H. confertum* 106,70±1,84 µg/mg ve *H. perforatum* 90,40±1,28 µg/mg pirokatekol ekivalanı fenolik madde içermektedir. Flavonoid içeriği açısından incelendiklerinde, en zengin türün 70,61±0,51 µg/mg kersetine ekivalan flavonoid içerdiği tespit edilen *H. confertum* olduğu görülmektedir. 62,49±0,77 µg/mg ile *H. perforatum* ikinci, 60,87±2,04 ile *H. calycinum* türü üçüncü sırada yer almaktadır.

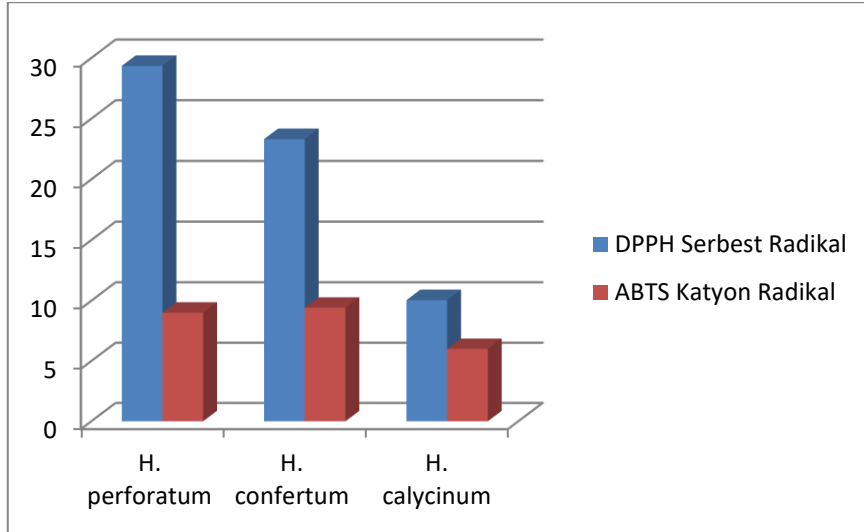


Şekil 5-2: Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Pirokatekole Eşdeğer Toplam Fenolik Madde ve Kersetine Eşdeğer Toplam Flavonoit İçeriklerini Gösteren Grafik

Türlerin biyolojik sistemlerdeki hidrojen verici etkisini belirlemek için kullanılan DPPH radikali ile yapılan çalışmada; IC_{50} değerleri (ekstrenin %50 DPPH radikali giderici aktivite göstermesi için gerekli olan miktarı) kıyaslandığında ise en yüksek antioksidan aktiviteyi $10,05 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ile en düşük IC_{50} değerine sahip olan *H. calycinum* türü göstermektedir. *H. confertum* türünün $23,32 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$ ve *H. perforatum* türünün de $29,35 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile antioksidan etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Her üç tür de standart olarak kullanılan ve IC_{50} değeri $58,86 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunan BHT'ye kıyasla daha aktif bulunmuştur. *H. calycinum* aynı zamanda IC_{50} değeri $16,30 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunan ve diğer bir standart madde olan α - tokoferole göre daha aktif bulunmuştur.

ABTS katyon radikali giderim yöntemi kullanılarak yapılan antioksidan aktivite tayinine göre en yüksek antioksidan etki gösteren tür $6,00 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile yine *H. calycinum* olarak tespit edilmiştir. *H. perforatum* türünün IC_{50} değeri $9,01 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ ve *H. confertum* türünün IC_{50} değeri $9,42 \pm 0,13$ 'tür. Her üç tür de, standart olarak kullanılan maddelerden biri olan α - tokoferolden ($IC_{50} = 10,20 \pm 0,05$) daha yüksek antioksidan etkinlik göstermektedir. Standart olarak kullanılan diğer iki madde BHA ve

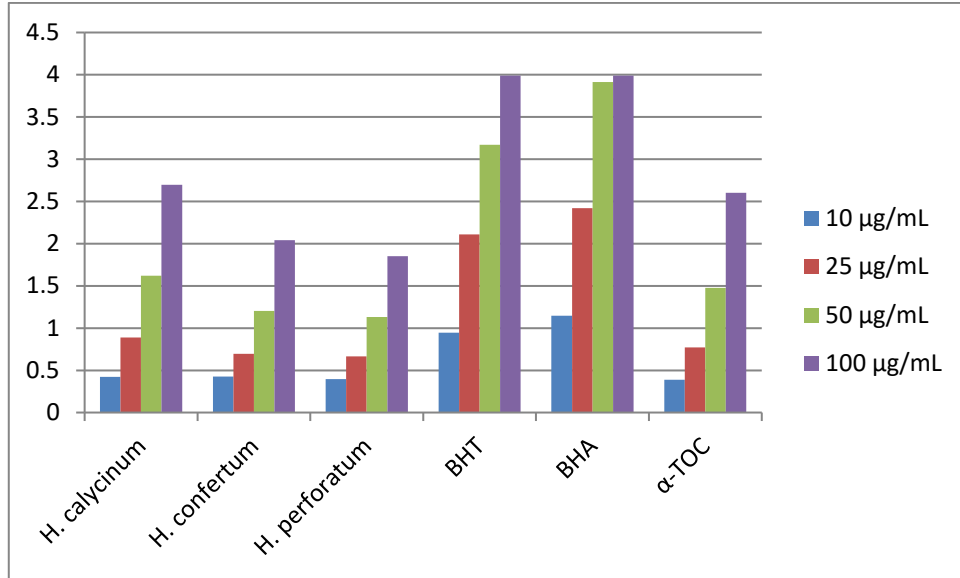
BHT ise sırasıyla $2,74 \pm 0,03$ ve $3,16 \pm 0,06$ IC_{50} değerleri ile her üç türden daha etkili olarak bulunmuştur.



Şekil 5-3: Çalışılan *Hypericum* Türlerinin DPPH Serbest Radikali Giderim ve ABTS Katyon Radikali Giderim Yöntemleriyle Yapılan Antioksidan Aktivite Tayinlerinde Elde Edilen IC_{50} Değerlerini Gösteren Grafik

Ferrozinin, Fe^{+2} ile nicel olarak kırmızı renkli kompleksler oluşturması ve analiz örneği antioksidan özellik gösteriyorsa kelat yapıcı bir ajan olarak davranarak ferrozin- Fe^{+2} kompleksini bozup kırmızı rengin açılmasına neden olması esasına dayanan $Fe(II)$ -Ferrozin metoduna göre belirlenen metal bağlama aktivitesi ile antioksidan etki araştırılmış; her üç türün de standart olarak kullanılan EDTA'ya karşı aktivitesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Üç tür arasında ise en yüksek aktivite gösteren tür yine *H. calycinum* olmuştur.

H. calycinum, *H. perforatum* ve *H. confertum* bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 $\mu g/mL$) belirlenmiş ve standart olarak BHT, BHA ve α -tokoferol kullanılmıştır. Buna göre en etkili tür diğer yöntemlerle de en yüksek antioksidan aktivite gösteren *H. calycinum* türüdür.



Şekil 5-4: Çalışılan *Hypericum* Türlerinin CUPRAC Yöntemiyle Yapılan Antioksidan Aktivite Tayinlerine Göre Belirlenen Antioksidan Aktivitelerini Gösteren Grafik

Hypericum türlerinin, özellikle *H. perforatum* türünün, zengin içerikleri sayesinde özellikle serbest radikal giderici etki mekanizması üzerinden iyi antioksidan aktivite gösterdiklerini tespit eden birçok çalışma mevcuttur. Bu özellik, *Hypericum* türlerinin oksidatif strese bağlı olarak gelişen deri yaraları, egzama ve enflamasyon gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanımını açıklamaktadır. Yine yapılan çalışmalar farklı *Hypericum* türlerinin çok farklı antioksidan aktivite sonuçları verdiğini göstermektedir (Marelli ve ark. 2014). Antioksidan etkinin türlerin bileşiminde bulunan bileşiklerden özellikle flavon glikozitleri ve fenolik bileşiklere bağlı olarak meydana geldiği; fenolik yapı içermeyen floroglusinollerin, katekol grubu içermeyen biflavonoidlerin ve naftodiantronların antioksidan etkiye katkıda bulunmadığı tespit edilmiştir (Apak ve ark. 2007; Silva ve ark. 2008; Orcic ve ark. 2011).

Yapılan bu tez çalışması ile elde edilen sonuçlar, *Hypericum* türlerinin antioksidan etkiye sahip bileşikler açısından zengin türler olduğunu gösteren çalışmalarla uyumludur. Yapılan farklı deneyler ile, her üç türün de iyi antioksidan aktivite gösterdiği, bu üç tür arasında antioksidan etkinliği en yüksek olan türün ise *H. calycinum* olduğu belirlenmiştir. Bu durumun *H. calycinum* türünün fenolik bileşiklerin miktarı açısından diğer iki türe göre daha zengin olmasından kaynaklandığı sonucuna

varılmıştır. *H. calycinum* ile *H. perforatum* türlerinin topraküstü kısımlarının sulu etanol ekstrahelerinin ve DPPH serbest radikal giderici, ferri iyon indükleyici ve metal bağlama aktivitelerinin yöntemleri kullanılarak antioksidan etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada *H. calycinum* türünün tüm bu yöntemlere göre *H. perforatum* türüne kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Öztürk ve ark. 2016). Daha büyük çiçek ve daha geniş yaprak ayalarına sahip olması gibi morfolojik özellikleriyle diğer türlerden ayrılan ve herdem yeşil olan *H. calycinum* bitkisinin, zengin fenolik bileşik içeriği ve buna bağlı oluşan yüksek antioksidan etkinliği ile oldukça önemli bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca üzerinde çalışma yapılmamış olan *H. confertum* türünün de hem fenolik bileşikler, hem de flavonoidler açısından öne çıkan bir tür olduğu ve *H. perforatum* türünden daha iyi antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiş, bu sonuç da anlamlı bulunmuştur.

Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz İnhibisyon Aktivitesi

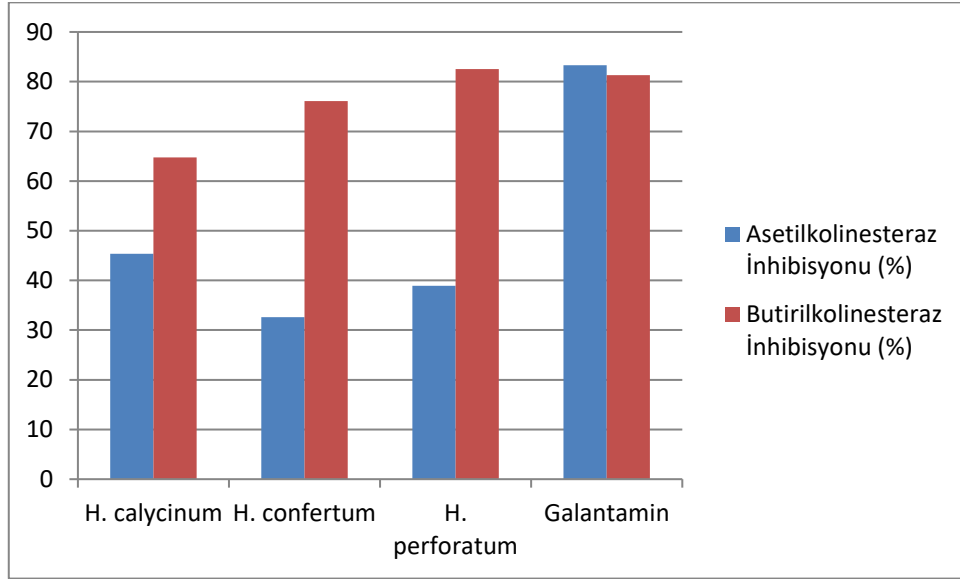
Asetilkolin, dokularda bilginin taşınmasını sağlayan önemli bir nörotransmitter maddedir. Çağımızda son derece önemli ve yaygın bir sorun haline gelen Alzheimer Hastalığı'na sahip kişilerde görülen en belirgin biyokimyasal değişiklik, beynin korteks ve hipokampus bölgelerindeki asetilkolin seviyelerinin sağlıklı kişilere göre oldukça düşük seviyede olmasıdır. Memelilerin beyinde asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz olmak üzere iki majör kolinesteraz formu bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz, kolinerjik sinapslarda asetilkolinin hidrolizinden sorumlu enzim olduğu için bu enzimin inhibisyonu asetilkolin seviyesinde artışa neden olmaktadır. Asetilkolinesteraz, neredeyse tüm dokularda bulunurken, butirilkolinesteraz daha çok santral ve periferik sinir sisteminde ve karaciğerde bulunmaktadır (Talic ve ark. 2014).

Alzheimer tedavisinde kullanılan ilaçlar çoğunlukla asetilkolinesteraz inhibitörleridir ve bitkisel kaynaklı asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibitörleri ile ilgili araştırmalar devam ederek çeşitli alternatifler aranmaktadır. Bu amaçla bu tez çalışmasında *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* bitkilerinin asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçülmüştür. Buna göre her üç tür de, asetilkolinesteraz inhibitör etki açısından standart madde olarak kullanılan galantamine göre düşük etki göstermiştir. 200 µg/mL konsantrasyonda galantamin %83,31±0,09 inhibisyon sağlarken, *H. perforatum* %38,89±1,07; *H. confertum* %32,61±1,08 ve *H.*

calycinum %45,33±1,54 inhibisyon sağlamıştır.

Diğer yandan her üç türün de butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. *H. perforatum*, 200 µg/mL konsantrasyonda %82,50±1,41 ile standart olarak kullanılan galantamine göre (%81,33±1,04) yüksek aktivite göstermiştir. *H. confertum* ve *H. calycinum* ise sırasıyla %76,08±1,26 ve %64,75±0,71 inhibisyon oranlarıyla standart olarak kullanılan galantamine göre düşük inhibitör etki göstermiştir. *H. perforatum* türü ile yapılan bir diğer çalışmada, *H. perforatum* topraküstü kısımlarının metanol ekstresinin 400 µg/mL konsantrasyonda asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzim inhibisyon aktivitesinin diğer dört bitkiye göre (*Arnica montana*, *Salvia officinalis*, *Ruta graveolens* ve *Aronia melanocarpa*) daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir (Talić ve ark. 2014).

H. calycinum türünün standart maddeye göre düşük fakat diğer iki türe göre yüksek asetilkolinesteraz aktivite göstermesi bileşiminde bulunan bazı fenolik bileşiklerin diğerlerine göre yüksek miktarda olmasıyla açıklanabilir. Asetilkolinesteraz inhibitör etkiden sorumlu maddeler, klorojenik asit, rutin, hiperozit, izokersitrin ve kersitrindir. *H. perforatum*, *H. undulatum* ve *H. androseamum* türlerinin antioksidan ve antiasetikolinesteraz aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu maddeleri diğer iki türe göre yüksek miktarda bulunduran *H. androseamum*, diğer iki türe hem daha yüksek antioksidan, hem de daha yüksek antiasetikolineseraz aktivite göstermiştir (Hernandez ve ark. 2010). Bu çalışmada LC-MS/MS ile yapılan analiz sonucu *H. calycinum* türünün diğer türlere göre oldukça yüksek oranda klorojenik asit, rutin ve kersitrin içerdiği belirtilmiştir. Bu etkinin bu nedenle meydana geldiği düşünülmektedir.



Şekil 5-5: Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz Yüzde İnhibisyon Aktivitelerini Gösteren Grafik

Tirozinaz İnhibisyon Aktivitesi

Tirozinaz enzimi, melanin sentezinde iki farklı reaksiyonu katalizleyen multifonksiyonel bir enzimdir. Melanin, cildin epidermis tabakasındaki bazı özel organellerde sentezlenen ve güneş ışığından absorblanan UV radyasyondan cildi koruyan, aynı zamanda serbest oksijen radikallerini de yok edebilen önemli bir maddedir. Buna karşın melanin, aşırı miktarda üretildiği veya düzensiz dağıldığı durumlarda hiperpigmentasyona neden olabilmektedir. Melaninin fazla birikimine bağlı olarak meydana gelen hiperpigmentasyon veya melazma gibi lekeler istenmeyen durumlardır.

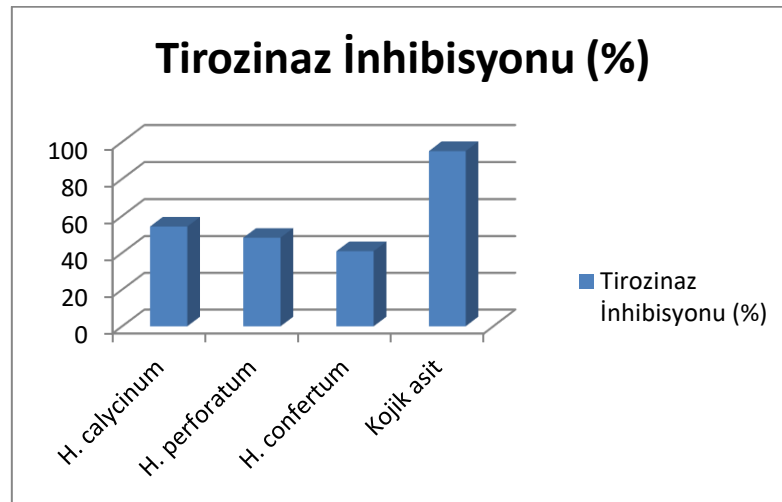
Tirozinaz, melanin biyosentezinde L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonundan ve L-DOPA'nın da dopakinona oksidasyonundan sorumlu enzimdir. Dolayısıyla tirozinaz enziminin inhibisyonu ile melanin sentez reaksiyonunun önemli bir basamağı durdurularak hiperpigmentasyon gibi cilt hastalıklarının önlenmesi mümkün olabilir. Tirozinaz inhibitörleri cilt beyazlatıcı veya depigmentan ilaçların ve kozmetik ürünlerin bileşiminde bu amaçla yer almaktadır (Gillbro ve Olsson, 2011).

Melanin pigmenti aynı zamanda memeli beyinde de bulunmaktadır. Tirozinaz enzimi insan beyinde nöromelanin oluşumu sürecinde dopaminin oksidasyon

reaksiyonunu katalizleyerek dopakinonların oluşmasına neden olur. Dopakinonun aşırı üretimi ise sinir hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle, tirozinaz enziminin dopamin nörotoksitesine yol açabileceği, bu nedenle Parkinson ve Huntington hastalığı ile ilişkilendirilen nörodejenerasyondan da sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (Asanuma, 2003; Şenol ve ark. 2014; Zhou ve Lim, 2010).

H. perforatum, *H. calycinum* ve *H. confertum* türlerinin tirozinaz inhibisyon aktivitesi için Hearing ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Enzim olarak tirozinaz, substrat olarak L-DOPA ve standart madde olarak kojik asidin kullanıldığı çalışmaya göre, her üç türün de tirozinaz inhibisyon aktivitesi kojik aside göre düşük bulunmuştur. Kojik asit 200 µg/mL konsantrasyonda %95,05±0,37 inhibisyon aktivitesi gösterirken, *H. calycinum* % 54,30±0,49; *H. perforatum* % 48,22±0,38 ve *H. confertum* % 40,92±0,21 aktivite göstermiştir.

Standart maddeye göre düşük aktivite göstermesine rağmen diğer iki türe karşı güçlü aktivite gösteren *H. calycinum* türünün bu özelliğinin, bileşiminde diğer iki türe göre daha yüksek miktarda gallik asit ve kinik asit bulunmasına bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Gallik asit ve kinik asitin tirozinaz enzimini inhibe edici etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Akihisa ve ark. 2013; Le Bourvellec ve ark. 2004).



Şekil 5-6: Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Tirozinaz Enzim Yüzde İnhibisyon Aktivitesini Gösteren Grafik

Üreaz İnhibisyon Aktivitesi

Üreaz; yapısında nikel bulunduran ve ürenin hidrolizi ile amonyak ve karbondioksit oluşum reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. Üreazın katalizlediği bu reaksiyonda bir molekül ürenin hidrolize olması ile iki molekül amonyak ve bir molekül karbondioksit meydana gelmektedir. Üreaz bu nedenle azot döngüsünde önemli rol oynamaktadır. (Kayastha ve ark. 1999; Tanaka ve ark. 2004).

Üreaz enzimi, *Klesbsiella aerogenes*, *Bacillus pasteurii* gibi bazı bakterilerde bulunur. Bir diğer önemli bakteriyel kaynaklı üreaz ise *Helicobacter pylori* üreazıdır. *H. pylori*, midenin asidik yapısını etkileyerek gastrit ve ülser gibi birçok mide hastalığına neden olan bir bakteridir. Uzun süren *H. pylori* enfeksiyonları, kanser gibi çok daha ciddi hastalıklara da neden olabilir. Yapılan bazı çalışmalar, *H. pylori* enfeksiyonlarının kanser gelişiminde önemli bir risk faktörü olan atrofi ve intestinal metaplaziye yol açtığını göstermektedir (Correa, 1985; Kuipers ve ark. 1995). Ürenin üreaz enzimi tarafından hidrolizi sonucu oluşan amonyak mide asidini nötralize ederek *H. pylori* suşlarının kolonizasyonuna yardımcı olur (Dunn ve ark. 1990).

Günümüzde *H. pylori* eradikasyonu için önerilen genel tedavi amoksisilin, klaritromisin ve omeprazol kombinasyonudur. Ancak, özellikle klaritromisine karşı *H. pylori* suşlarının direnç geliştirmesi ciddi bir sorun haline gelmiş ve alternatifler arama ihtiyacı doğurmuştur. Üreaz inhibitörleri, *H. pylori* üreazını inhibe ederek midede kolonize olmasını engelledikleri için mide hastalıklarında kullanılan ilaçlardır. Sentetik üreaz inhibitörü ilaçların düşük stabilitesi ve yan etkileri nedeniyle, doğal üreaz inhibitörleri *H. pylori* enfeksiyonu tedavisinde gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Graham ve Fischbach, 2010).

Bu amaçlarla, bu çalışmada *H. perforatum*, *H. calycinum* ve *H. confertum* türlerinin üreaz inhibisyon aktiviteleri değerlendirilmiştir. Üreaz inhibisyon aktivitesi için Hina ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre, enzim olarak üreaz enzimi, substrat olarak ise üre kullanılmıştır. Standart madde ise tiyoüredir (Hina ve ark. 2015).

Tiyoüre 200 µg/mL konsantrasyonda %98,37±0,40 inhibisyon sağlamıştır. *H. perforatum* ve *H. confertum* türleri üreaz inhibisyon aktivitesi göstermezken, *H. calycinum* aynı konsantrasyonda % 19,44±0,29 gibi düşük bir üreaz inhibisyonu sağlamıştır.

Bazı polifenolik bileşikler, özellikle bazı flavonoidler genel olarak üreaz inhibitörü etkiye sahip maddelerdir (Shin ve ark. 2005). Yapılan bir çalışmada, kersetin, rutin, mirsetin, mirsitrin flavonoidleri ile luteolin ve luteolin-7-O-glukozit flavonlarının *H. pylori* üreazı üzerinde iyi bir inhibitör etki meydana getirdiği gösterilmiştir (Xiao ve ark. 2012). *H. perforatum*, *H. confertum* ve *H. calycinum* türlerinin LC-MS/MS ile yapılan analizinde özellikle bu bileşikler açısından zengin içeriğe sahip olmadıkları görülmekte ve antiüreaz etkinliğin olmamasında bu durumun etkili olduğu düşünülmektedir.

Kolajenaz, Elastaz ve Hyaluronidaz İnhibisyon Aktivitesi

Ekstraselüler matriks; derinin dermis tabakasında bulunan, hücreleri birbirine bağlayan ve destekleyen, derinin büyümesinden ve esnekliğinden sorumlu başlıca yapısal bileşenidir (Bravo ve ark. 2016). Ekstraselüler matriksin yapısında proteoglikanlar ve matriks metaloproteinleri bulunur. Kolajen ve elastin bu yapısal matriks proteinlerindendir. Ekstraselüler matrikste en çok bulunan protein kolajendir ve toplam memeli protein kütesinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Kolajen; hücre adhezyonunun düzenlenmesinden, derinin gerilim kuvvetinden ve dokuların gelişiminin yönetiminden sorumludur. Bir diğer yapısal protein olan elastin, dokuların esnekliğinden sorumlu olan matriks proteindir. Elastin, damarlarda kan akımına yardımcı olmak için basınç dalgasının yayılımını sağladığından özellikle aort gibi damarlarda bol miktarda bulunmaktadır (Pereira, 2011). Hyaluronik asit; ekstraselüler matriksin yapısında bulunan diğer grup bileşiklerden olan glikozaminoglikan bileşiğidir. Sülfatlanmamış glikozaminoglikan yapısında olup deride doğal olarak oluşur (Gerdin ve Hällgren, 1997). Hyaluronik asit; doku hidrasyonunun önemli bir belirleyicisidir ve doku onarımı, enfeksiyonlar ve proteolitik granülosit enzimlere karşı korunma sağlamak gibi çeşitli diğer işlevlerde bulunur (Cantor ve ark. 2000).

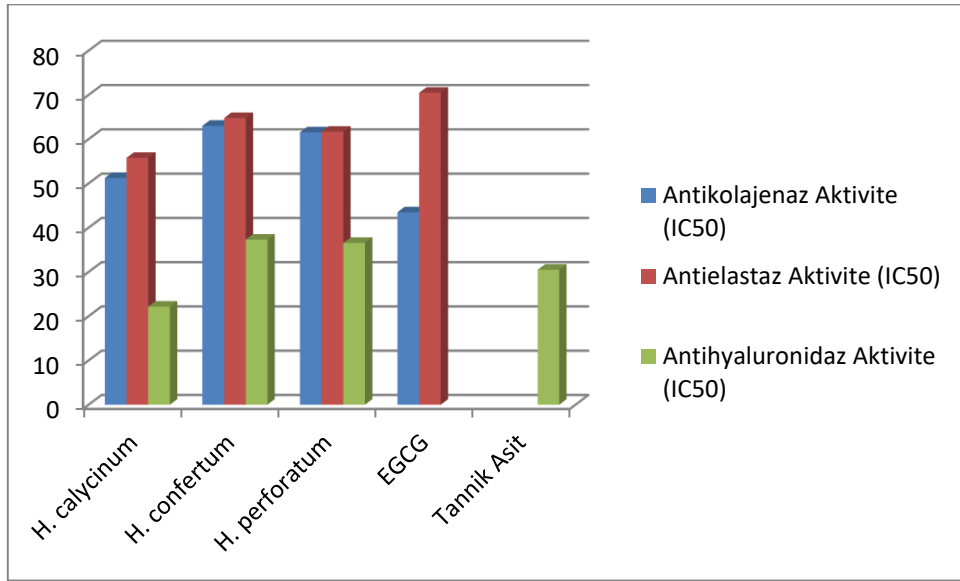
Kolajen, elastin ve hyaluronik asidin yıkımı cilt yaşlanması, yara iyileşmesinin gecikmesi gibi durumlara neden olur ve bu maddelerin yıkımından sorumlu enzimler sırasıyla kolajenaz, elastaz ve hyaluronidazdır. Normal şartlarda esasen dokuların sağlıklı ve dengeli kalmasını sağlamakla görevli bu enzimler, bu dengenin enzimlerden yana bozulması durumunda ekstraselüler matriks bileşenlerinin kontrolsüzce yıkımına ve bu durum da deri yaşlanmasının yanında istenmeyen birçok hastalığa neden olur.

Bu çalışmada, *H. calycinum*, *H. perforatum* ve *H. confertum* türlerinin kolajenaz, elastaz ve hyaluronidaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkisi *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Kolajenaz inhibisyon aktivitesi, van Wart ve Steinbrink tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Enzim olarak *Clostridium histolyticum* bakterisinden elde edilen kolajen enzimi, substrat olarak N-(3-[2-furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) ve standart madde olarak epigallokateşingallat (EGCG) kullanılmıştır. Elastaz enzim inhibisyon aktivitesi için Lee ve Choi tarafından geliştirilen yöntemine göre; enzim olarak domuz pankreasından elde edilen elastaz, substrat olarak N-Süksinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid (SANA) ve standart madde olarak yine EGCG kullanılmıştır. Hyaluronidaz enzim aktivitesi için enzim olarak sıgır testislerinden elde edilen hyaluronidaz enzimi, substrat olarak hyaluronik asit ve standart madde olarak tannik asidin kullanıldığı bu çalışma; Tung ve arkadaşlarının geliştirdiği, hyaluronik asidin setilpiridinyum klorür ile çöktürülmesi esasına dayanan oldukça hassas bir spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılmıştır.

Kolajenaz inhibisyon aktivitesi için IC₅₀ değerleri; *H. calycinum* için 51,24±1,33 µg/mL; *H. perforatum* için 61,53±0,40 µg/mL ve *H. confertum* için 63,01±0,24 µg/mL olarak bulunmuştur. Standart madde olarak kullanılan EGCG'nin IC₅₀ değeri ise 43,47±1,82 µg/mL'dir. Bu sonuçlara göre üç tür içinde en yüksek antikolajenaz aktivite gösteren tür, *H. calycinum* türüdür.

Elastaz inhibisyon aktivitesi için IC₅₀ değerleri; *H. calycinum* için 55,77±1,32 µg/mL; *H. perforatum* için 61,67±0,76 µg/mL ve *H. confertum* için 64,76±0,55 µg/mL olarak bulunmuştur. Standart madde olarak kullanılan EGCG'nin IC₅₀ değeri ise 70,47±0,89 µg/mL'dir. Bu sonuçlara göre üç tür içinde en yüksek antielastaz aktivite gösteren tür, *H. calycinum* türüdür. Diğer iki tür de standart maddeye göre daha yüksek aktivite göstermiştir.

Hyaluronidaz inhibisyon aktivitesi için IC₅₀ değerleri; *H. calycinum* için 22,17±0,02 µg/mL; *H. perforatum* için 36,55±0,11 µg/mL ve *H. confertum* için 37,30±1,49 µg/mL olarak bulunmuştur. Standart madde olarak kullanılan tannik asidin IC₅₀ değeri 30,49±0,08 µg/mL'dir. Bu üç tür içinde en yüksek antihyaluronidaz aktivite gösteren, standart maddeye göre de yüksek aktivite gösteren *H. calycinum* türü olmuştur.



Şekil 5-7: Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Kolajenaz, Elastaz ve Hyaluronidaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi Tayini Sonucu Elde Edilen IC₅₀ Değerlerini Gösteren Grafik

Farklı bitkilerin kolajenaz, elastaz ve hyaluronidaz enzimleri üzerinde inhibisyon aktivitesini belirlemek üzere son yıllarda bazı çalışmalar yapılmaktadır. *Hypericum* türleri ile ilgili çalışmalar da mevcuttur.

Kolajenaz inhibitörleriyle ilgili çalışmalara göre kolajenaz inhibisyonunun sorumlu maddeler polifenoller ve flavonoidlerdir. 5,7,3,5'-tetrahidroksflavon grubu içeren flavonoidlerin daha etkili olduğu, özellikle C-3 hidroksil grubunun önemli olduğu belirtilmiştir. Polifenollerin de hidroksil grupları, kolajenaz enzimiyle hidrojen bağı ve bazı hidrofobik etkileşimler oluşturarak kompetitif inhibisyon yapar. Fenolik bileşiğin hidroksil ve/veya galloil grubu olduğunda kolajenaz inhibisyon aktivitesinde artış meydana gelir (Madhan, 2007). Fenolik bileşiklerden özellikle klorojenik asidin iyi bir kolajenaz inhibitörü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Farklı *Hypericum* türleriyle yapılan antikolajenaz etki deneylerinde klorojenik asit miktarı yüksek olan türlerin kolajenaz inhibisyon aktivitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. (Mandrone ve ark. 2015; Antognoni ve ark. 2017; Boran, 2018). Bu tez çalışmasının antikolajenaz aktivite deneylerinde de en yüksek kolajenaz inhibisyonu sağlayan tür *H. calycinum* olmuş, içeriğindeki klorojenik asit miktarı en yüksek tür olan *H. calycinum*,

standart madde olan EGCG'ye karşı düşük, fakat diğer iki türe karşı yüksek aktivite göstermiştir. Klorojenik asit içeriği oldukça yakın olan *H. confertum* ve *H. perforatum* türlerinin kolajenaz inhibisyon IC_{50} değerleri de oldukça yakındır. Sonuçlar literatürlerle uyumludur.

Toplam fenolik madde ve flavonoit içeriği ile elastaz enzim inhibisyon aktivitesi açısından da lineer korelasyon vardır (Chiocchio ve ark. 2018). Liyanaarachchi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, bitkinin elastaz inhibisyon aktivitesi ile DPPH radikal giderim aktivitesi arasında da doğrusal korelasyon olduğunu göstermektedir (Liyanaarachchi ve ark. 2018). Bunların dışında tanenlerin de antielastaz aktivite gösterdiği ve tanen içeren bitkilerin potansiyel elastaz inhibitörü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Piwowarski, 2011). *Hypericum* türleri; flavonoitler, fenolik bileşikler ve tanenler açısından zengin türler olup çalışılan üç tür olan *H. calycinum*, *H. confertum* ve *H. perforatum* standart madde olan EGCG'ye kıyasla yüksek antielastaz aktivite göstermiştir. En yüksek antielastaz aktivite gösteren tür, yine en zengin fenolik içeriğe sahip olan tür olan *H. calycinum* olmuştur. Diğer iki türün elastaz inhibisyon IC_{50} değerleri antikolajenaz aktivitede olduğu gibi oldukça yakındır.

Hyaluronidaz inhibisyon aktivitesi gösteren bileşiklerin etnofarmakolojide kullanımı oldukça yaygındır. Sperm hyaluronidazını inhibe ettikleri için kontrasepsiyon amacıyla, yılan zehri hyaluronidazını inhibe ettikleri için yılan ısırıklarını tedavi etmek ve yara iyileşmesine yardımcı olmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Bunlar genelde fenolik bileşikler, flavonoitler ve tanen bileşikleridir (Kuppusamy ve Das, 1991; Kakegawa ve ark. 1985). Flavon aglikonları, flavon glikozitlerine göre daha yüksek inhibisyon sağlar. Ayrıca C-2 ve C-3 arası çifte bağ içeren ve 3' ve 4' konumlarında serbest hidroksil taşıyan bileşikler daha yüksek antihyaluronidaz aktivite göstermektedir (Rodney ve ark. 1950; Kuppusamy ve ark. 1990). Hyaluronidaz inhibisyon aktivitesi en yüksek bileşikler ise klorojenik asit, kersetin ve rutindir (Ao, 2009; Lee ve Kim, 2010; Acton, 2012). Çalışılan üç tür arasında en yüksek antihyaluronidaz aktiviteyi yine *H. calycinum* türü göstermiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, LC-MS/MS ile yapılan analizde klorojenik asit ve rutin içeriği diğer türlerden yüksek olup bu deneyde hem diğer iki türden, hem de standart madde olarak kullanılan tannik asitten yüksek aktivite göstermesiyle öne çıkmaktadır. Diğer iki tür yine birbirine çok yakın aktivite göstermiş, standart maddeye göre ise düşük inhibisyon sağlamışlardır.

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarından antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, *H. calycinum* türünün metanol ekstresinin *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 suşuna karşı 9,76 mg/L MİK değeri ile MİK değeri 9,8 mg/L olan sefuroksim-Na referans maddesiyle karşılaştırıldığında diğer ekstrele göre yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. diğer iki tür, 19,53 mg/L MİK değerleri ile sefuroksim-Na maddesine karşı düşük aktivite göstermiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Proteus mirabilis* ATCC 14153 suşlarına karşı hiçbir ekstre aktivite göstermemiştir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarından antifungal aktivite sonuçlarına bakıldığında her üç ekstrenin de *Candida albicans* ATCC 10231 suşuna karşı 312,5 mg/L MİK değerine sahip olduğu, referans madde olarak kullanılan 4,9 mg/L MİK değerine sahip klortrimazol ile karşılaştırıldığında düşük antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Hypericum türlerinin Gram-pozitif bakterilerden *Staphylococcus* suşlarına karşı etkili olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (Saddique ve ark. 2010). Her üç *Hypericum* türünün *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 suşuna karşı aktivite göstermesi literatürleri desteklemektedir

Antifungal aktivite sonuçlarına göre ise, incelenen *Hypericum* türlerinden üçünün de *Candida albicans* ATCC 10231 suşuna karşı zayıf antifungal aktivite göstermesi, günümüze kadar *Candida albicans* ATCC 10231 ile yapılan antifungal aktivite çalışmalarıyla uyum göstermektedir (Vajs ve ark. 2003; Saroglu ve ark. 2007).

Genel Değerlendirme

Bu tez çalışması ile Uludağ'dan toplanan *H. calycinum*, *H. perforatum* ve *H. confertum* türlerinin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmış, bu araştırmaların sonuçlarına göre fenolik bileşikler açısından oldukça zengin bir tür olan *H. calycinum* türünün yapılan deneylerin çoğunda en yüksek aktiviteyi sağladığı görülmüştür. *H. calycinum*, klorojenik asit ve gallik asit gibi bileşikleri yapısında diğer türlerden daha fazla miktarda bulundurmakta ve özellikle antioksidan etki açısından öne çıkmaktadır. Enzim inhibisyon aktivite deneylerinde elde edilen sonuçlara göre de en yüksek inhibisyon sağlayan tür *H. calycinum* olmuştur. Büyük çiçekleri ve geniş yaprak ayaları ile morfolojik olarak diğer türlerden ayrılan ve bahçe süslemesinde de tercih edilen *H. calycinum* türünün, üzerinde daha detaylı araştırmalar yapılması gereken ve önemli bir tıbbi bitki potansiyeli taşıyan bir tür olduğu düşünülmektedir. Antitirozinaz, antikolajenaz, antielastaz ve antiyaluronidaz aktivite gösteren *H. calycinum*, bu etkileri sayesinde hem yaşlanma karşıtı, hem de hiperpigmentasyon tedavisinde kullanılan cilt ürünlerinin formülasyonlarına katılma potansiyeli taşımaktadır.

Diğer yandan *H. confertum* türü de çalışma kapsamında yapılan deneylerin çoğunda iyi aktivite göstermiştir. Flavonoidler açısından da zengin olduğu belirlenen *H. confertum* türünün *H. perforatum* türüne alternatif olabileceği düşünülmekte olup bu amaçla yapılan çalışmalara devam edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Salam, O. M. (2005). Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. *Sci. World J.* 5, 586–595.
- Acton, Q.A. (2012). *Metalloendopeptidases.-Advances in Research and Application*, 2012 edition. Scholarly Edt., Athlanta, 1–35.
- Aizenman, B.E. (1969). Antibiotic preparations from *Hypericum perforatum*. *Mikrobiologicheskii Zhurnal* (Kiev), 31, 128–133.
- Akihisa, T., Kawashima, K., Orido, M., Akazawa, H., Matsumoto, M., Yamamoto, A., Ogihara, E., Fukatsu, M., Tokuda, H., Fuji, J. (2013). Antioxidative and melanogenesis-inhibitory activities of caffeoylquinic acids and other compounds from moxa. *Chemistry & Biodiversity*, 10(3), 313-327.
- Albrecht, M., Hübner, W.D., Podzuweit, H., Schmidt, U. (1994). Johanniskraut-Extrakt zur Behandlung der Depression. *Kassenarzt*. 41, 45-54.
- Ali, M., Latif, A., Zaman, K., Arfan, M., Maitland, D., Ahmad, H., Ahmad, M. (2014). Anti-ulcer xanthones from the roots of *Hypericum oblongifolium* Wall. *Fitoterapia*, 95, 258-265.
- American Botanical Council (2009). Herbal supplement sales experience slight increase in 2008. *Herbal-Gram* 82, 58–61
- An, T.Y., Hu, L.H., Chen, Z.L., Sim, K.Y. (2002). Erectones A and B, two dome-shaped polyprenylated phloroglucinol derivatives, from *Hypericum erectum*. *Tetrahedron Letters*, 43 (1), 163-165.
- Antognoni, F., Lianza, M., Poli, F., Buccioni, M., Santinelli, C., Caprioli, G., Alunno, A. (2017). Polar extracts from the berry-like fruits of *Hypericum androsaemum* L. as a promising ingredient in skin care formulations. *Journal of ethnopharmacology*, 195, 255-265.
- Ao, C. (2009). *Studies on Antioxidant, Antibacterial and Anti-inflammatory Active Compounds from Medicinal Plants*. A Dissertation Submitted to the United Graduate School of Agricultural Sciences. Kagoshima University.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12, 1496-1547.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

Arokiyaraj, S., Balamurugan, R., Augustian, P. (2011). Antihyperglycemic effect of *Hypericum perforatum* ethyl acetate extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(5), 386.

Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N. (2003). Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 5(3), 165-176.

Assiri, K., Alyami, Y., Uyanik, J. M., Romero-Reyes, M. (2017). *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) as a possible therapeutic alternative for the management of trigeminal neuralgia (TN)—A case report. *Complementary therapies in medicine*, 30, 36-39.

Athanasas, K., Magiatis, P., Fokialakis, N., Skaltsounis, A.L., Pratsinis, H., Kletsas, D. (2004). Hyperjovinols A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. *Journal of Natural Products*, 67 (6), 973-977

Avato P. (2005). A survey on the *Hypericum* genus: secondary metabolites and bioactivity, *Bioact. Nat. Prod.*, 30, 603-634.

Avato, P., Raffo, F., Guglielmi, G., Vitali, C., Rosato, A. (2004). Extracts from St. John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy Research*, 18, 230-232.

Avcı, H., Gergeroğlu, H. (2018). Synergistic effects of plant extracts and polymers on structural and antibacterial properties for wound healing. *Polymer Bulletin*, 1-23.

Bäcker, W., Bart, H., Bischoff, F., Grabley, S., Goedecke, R., Johannsbauer, W., Jordan, V., Stockfleth, R., Strube, J., Wiesmet, V. (2005). *Phytoextrakte – Produkte und Prozesse*. Available online: http://www.dechema.de/dechema_media/Downloads/Extraktion/Phytoextrakte.pdf

Bagci, E., Yuce, E. (2010). The Essential Oils of the Aerial Parts of Two *Hypericum* (*H. pseudolaeve* Robson and *H. thymbrifolium* Boiss. & Noë) (Guttiferae) Species from Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(4), 390-397.

Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol.*, 53(5), 583–600.

Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (2007). *Herbal Medicines*. (3th ed.). London: Pharmaceutical Press.

Barros, R.C., Branco, L.G., Carnio, E.C. (2004). Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Brain Res.*, 1030(2), 165-171.

Baytop, T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. (2nd ed.). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi

Beerhues, L. (1996). Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaurea erythraea*. *FEBS Lett*, 383, 264-266.

Beerhues, L. (2006). Molecules of Interest. Hyperforin. *Phytochemistry*, 67, 2201-2207.

Behnke, K., Jensen, G.S., Graubaum, H.J., Gruenwald, J. (2002). *Hypericum perforatum* versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression. *Adv. Ther.*, 19 (1), 43–52.

Bennett, D.A., Phun, L. Jr, Polk, J.F., Voglino, S.A., Zlotnik, V., Raffa, R.B. (1998). Neuropharmacology of St. John's wort (*Hypericum*). *Ann Pharmacother* 32, 1201–1208.

Bergonzi, M.C., Bilia, A.R., Gallori, S., Guerrini, D., Vincieri, F. (2001). Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Dev Ind Pharm.*, 27(6), 491–497.

Bernd, A., Ramirez-Bosca, A., Kippenberger, S., Diaz Alperi, J., Miquel, J., Villalba Garcia, J.F., Pamies Mira, D., Kaufmann, R. (1999). Phototoxic effects of *Hypericum* extract in cultures of human keratinocytes compared with those of psoralen. *Photochem Photobiol.*, 2, 218–221.

Bertoli, A., Menichini, F., Mazzetti, M., Spinelli, G., Morelli, I. (2003). Volatile constituents of the leaves and flowers of *Hypericum triquetrifolium* Turra *Flavour and Fragrance Journal*. 18(2), 91-94.

Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Spinelli, G., Menichini, F. (2000). Constituents of *Hypericum hircinum* oils. *Journal of Essential Oil Research*. 12, 617-620.

Bianchi, A., Adamoli, R., Durante, A., Saibene, A. (1997). *Piante Medicinali e AIDS*. Ed. Tecniche Nuove: Milan.

Biber, A., Fischer, H., Römer, A., Chatterjee, S.S. (1998). Oral bioavailability of hyperforin from *Hypericum* extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* 31(1), 36–43.

Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Morgenni, F., Mazzi, G., Vincieri F.F. (2001). Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int J Pharm*; 213, 199–208.

Bilia, A.R., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2002). St. John's wort and depression, efficacy, safety and tolerability. *Life Sciences*, 70, 3077-3096.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

Boblitz, N., Schrader, E., Henneicke-von-Zepelin, H-H, Wüstenberg, P. (2000). Benefit of a fixed drug combination containing St John's wort and Black Cohosh for climacteric patients – results of a randomised clinical trial. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 5(1), 83-107.

Boiy, A., Roelandts, R., Roskams, T., de Witte, P. A. (2007). Effect of vehicles and esterification on the penetration and distribution of hypericin in the skin of hairless mice. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 4(2), 130-139.

Bombardelli, E., Marozzoni, P. (1995). *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, 66 (1), 43-68.

Bonkanka, C. X., del Carmen Sánchez-Mateo, C., Rabanal, R. M. (2011). Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. *Journal of natural medicines*, 65(1), 122-128.

Boran, R. (2018). Investigations of anti-aging potential of *Hypericum organifolium* Willd. for skincare formulations. *Industrial Crops and Products*, 118, 290-295.

Borchers, H.G. (1994). Ist Phytotherapie eine sinnvolle Alternative bei der Behandlung der Depression? *Schweiz Z Ganzheitsmed.* 3, 116-117.

Bouratoua, A., Touafek, O., Kabouche, A., Zerizer, S., Kabouche, Z. (2016). Components and Antioxidant and Immunomodulatory Activities of *Hypericum tomentosum* subsp. *pubescens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 52(5), 893-895.

Bravo, K., Alzate, F., Osorio, E. (2016). Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Ind. Crop Prod.* 85, 341–352.

Breidenbach, T. H., Kliem, V., Burg, M., Radermacher, J., Hoffmann, M. W., Klempnauer, J. (2000). Profound Drop Of Cyclosporin A Whole Blood Trough Levels Caused By St. John' s Wort (*Hypericum perforatum*). *Transplantation*, 69(10), 2229-2230.

Brenner, R., Azbel, V., Madhusoodanan, S., Pawlowska, M. (2000). Comparison of an extract of *Hypericum* (LI160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clin. Ther.* 22, 411-419.

Brent, K.J., Hollomon, D.W. (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC, Global Crop Protection Federation, Brussels, Monograph No. 2, 1–48.

Bridi, H., Ccana-Ccapatinta, G.V., Stolz, E.D., Meirelles, G.C., Bordignon, S.A.L., Rates, S.M.K., von Poser, G.L. (2016). Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibiting antinociceptive activity in mice. *Phytochemistry* 122, 178–183.

Brockmann, H., Pohl, F., Maier, K., Haschad, M. N. (1942). Über das Hypericin, den photodynamischen Farbstoff des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum*). *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 553(1), 1-52.

Brockmöller, J., Reum, T., Bauer, S., Kerb, R., Hubner, W.D., Roots, I. (1997). Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*; 30(2), 94–101.

Brondz, I., Greibrokk, T., Aasen, A.J. (1983). n-1-alkanols of *Hypericum perforatum*. *J Nat Prod.*, 46(6), 940–941

Bryant, J. P., Reichardt, P. B., Clausen, T. P. (1992). Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals. *Journal of Range Management*. 45(1), 18-24.

Bukhari, I.A., Dar, A., Khan, R.A. (2004). Antinociceptive activity of methanolic extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) preparation. *Pak. J. Pharm. Sci.* 17(2), 13-19.

Burstein, A. H., Horton, R. L., Dunn, T., Alfaro, R. M., Piscitelli, S. C., Theodore, W. (2000). Lack of effect of St John's Wort on carbamazepine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 68(6), 605-612.

Butterweck, V. (2003a). Mechanism of action of St John's wort in depression: what is known?, *CNS Drugs* 17, 539–562.

Butterweck, V., Christoffel, V., Nahrstedt, A., Petereit, F., Spengler, B., Winterhoff, H. (2003b). Step by step removal of hyperforin and hypericin: Activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sci.*, 73, 627–639.

Calapai, G., Crupi, A., Firenzuoli, F. (1999). Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalons and brainstem of the rat. *J Pharm Pharmacol.*, 51, 723–728.

Calapai, G., Crupi, A., Firenzuoli, F., Inferrera, G., Squadrito, F., Parisi, A., Sarro, G., Caputi, A. (2001). Serotonin, norepinephrine and dopamine involvement in the antidepressant action of *Hypericum perforatum*, *Pharmacopsychiatry*, 34, 45–49.

Canning, S., Waterman, M., Orsi, N., Ayres, J., Simpson, N., Dye, L. (2010). The efficacy of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) for the treatment of premenstrual syndrome. *CNS drugs*, 24(3), 207-225.

Cantor, J. O., Shteyngart, B., Cerreta, J. M., Liu, M., Armand, G., Turino, G. M. (2000). The Effect of Hyaluronan on Elastic Fiber Injury *in vitro* and Elastase-Induced Airspace Enlargement *in vivo* (44553). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 225(1), 65-71.

Capasso, F., Gaginella, T.S., Grandolini, G., Izzo, A.A. (2003). *Phytotherapy, A quick reference to herbal medicine*. Berlin: Springer

Cargnin, S.T., Nunes, J.D., Haas, J.S., Baladao, L.F., Cassel, E., Vargas, R.F., Rech, S.B., Von Poser, G.L. (2010). Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878 (1), 83-87.

Carpenter, S., Fehr, M. J., Kraus, G. A., Petrich, J. W. (1994). Chemiluminescent activation of the antiviral activity of hypericin: a molecular flashlight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 12273-12277.

Catania, M.A., Firenzuoli, F., Crupi, A., Mannucci, C., Caputi, A.P., Calapai, G. (2003). *Hypericum perforatum* attenuates nicotine withdrawal signs in mice. *Psychopharmacology*, 169, 186–189.

Ccana-Ccapatinta, G., Stolz, E., Da Costa, P., Rates, S.M.K., von Poser, G.L., (2014). Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum andinum*: antidepressant-like activity of andinin A. *J. Nat. Prod.*, 77, 2321–2325.

Ccana-Ccapatinta, G.V., von Poser, G.L. (2015). Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum laricifolium* Juss. *Phytochem., Lett.* 12, 63–68.

Celep, E., İnan, Y., Akyüz, S., Yeşilada, E. (2017). The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion *Industrial Corps and Products*, 109, 717-723.

Chaloupka, R., Obsil, T., Plasek, J., Sureau F. (1999). The effect of hypericin and hypocrellin-A on lipid membranes and membrane potential of 3T3 fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 1418, 39–47.

Chatterjee, S.S., Nöldern, M., Koch, E., Erdelmeier, C. (1998). Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: The neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*; 31(1), 7–15.

Chen, X. Q., Li, Y., Li, K. Z., Peng, L. Y., He, J., Wang, K., Pan, Z. H., Cheng, X., Li, M. M., Zhao, Q. S., Xu, G. (2011). Spirocyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum beanii*. *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), 59(10), 1250-1253

Chen, F., Rezvani, A.H., Lawrence, A.J. (2003). Autoradiographic quantification of neurochemical markers of serotonin, dopamine and opioid systems in rat brain mesolimbic regions following chronic St John's wort treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 367(2), 126-33.

Chiocchio, I., Mandrone, M., Sanna, C., Maxia, A., Tacchini, M., Poli, F. (2018). Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. *Industrial Crops & Products*, 122, 498–505.

Chung, D.J., Kim, H.Y., Park, K.H. (2007). Black cohosh and St. John's wort (GYNO-Plus) for climacteric symptoms. *Yonsei Med J.*, 48(2), 289-294.

Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., Lin, Y. (1998). Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38(6), 421-464.

Ciccarelli, D., Andreucci, A.C., Pagni, A.M. (2001a). Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* 88, 637–644.

Ciccarelli, D., Andreucci, A. C., Pagni, A. M. (2001b). The “black nodules” of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum*: morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Israel Journal of Plant Sciences*, 49(1), 33-40.

Clewell, A., Barnes, M., Endres, J. R., Ahmed, M., Ghambeer, D. K. (2012). Efficacy and tolerability assessment of a topical formulation containing copper sulfate and *Hypericum perforatum* on patients with herpes skin lesions: a comparative, randomized controlled trial. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 11(2), 209-215.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2000). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M27-A NCCLS. Wayne, Pennsylvania.

Cohen, P. A., Hudson, J. B., Towers, G. H. N. (1996). Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. *Experientia*, 52(2), 180-183.

Correa, P. (1985). Clinical implications of recent development in gastric cancer pathology and epidemiology. *Semin Oncol.*, 12, 2-10.

Corzo-Barragán, D. C., Gaitán-Vaca, D. M. (2017). Evaluation of the effectiveness of different formulations of soap with extract of *Hypericum mexicanum* L. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 131-138.

Coskun, I., Uzbay, T.I., Ozturk, N., Ozturk, Y. (2006). Attenuation of ethanol withdrawal syndrome by extract of *Hypericum perforatum* in Wistar rats. *Fundam Clin Pharmacol.*, 20, 481–488.

Cott, J.M. (2010). St John's wort. *Encyclopedia of dietary supplements*. 727-737.

Couladis, M., Badisa, R. B., Baziou, P., Chaudhuri, S. K., Pilarinou, E., Verykokidou, E., Harvala, C. (2002). Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(8), 719-722.

Couladis, M., Baziou, P., Petrakis, P. V., Harvala, C. (2001). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(3), 204-206.

Crockett, S.L., Poller, B., Tabanca, N., Pferschy-Wenzig, E.M., Kunert, O., Wedge, D.E., Bucar, F. (2011). Bioactive xanthenes from the roots of *Hypericum perforatum* (common St John's wort). *J Sci Food Agric*, 91, 428-434.

Crockett, S. L., Robson, N. K. (2011). Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medicinal and aromatic plant science and biotechnology*, 5(1), 1.

Crockett, S., Wenzig, E.M., Kunert, O., Bauer, R. (2008). Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochemistry Letters*, 1 (1), 37-43.

Crowe, S. (2002). Delayed emergence and St John's wort. *Anesthesiology*; 96, 1025–1027.

Cushnie, T. T., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.

Çakır, A., Mavi, A., Yıldırım, A., Duru, M.E., Harmandar, M., Kazaz, C. (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 73-83.

Çakır, A., Duru, M. E., Harmandar, M., Ciriminna, R., Passannanti, S., Piozzi, F. (1997). Comparison of the volatile oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(4), 285-287.

Çakır, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(1), 62-68.

Çetin, B. (1999). The moss flora of the Uludag National Park (Bursa/Turkey). *Turkish Journal of Botany*.

Çırak, C., Radusiene, J., Janulis, V., Ivanauskas, L., Camaş, N., Ayan, A.K. (2011). Phenolic constituents of *Hypericum triquetrifolium* Turra (Guttiferae) growing in Turkey: variation among populations and plant parts. *Turkish Journal of Biology*, 35, 449-456.

Dakanali, M., Theodorakis, E. A. (2011). Polyprenylated phloroglucinols and xanthenes. In book: Erwan Poupon und Bastien Nay. *Biometric organic synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 433-467.

Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P., Albring, D., Nör, C., Sarmiento, L., Schapoval, E. E. S. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 10(6-7), 511-516.

Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A. ve Linssen, P.H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 140-146.

Daşkın, R. (2008). *Uludağ Florası*. Doktora tezi.

Davis, P.H. (1982). *Flora of Turkey*, 2. Cilt

De Smet, P. A., Nolen, W. A. (1996). *St John's wort as an antidepressant*.

Decosterd, L. A., Hoffman, E., Kyburz, R., Bray, D., Hostettmann, K. (1991). A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and *in vitro* antimalarial activity. *Planta Med.*, 57(6), 548-51.

Decosterd, L.A., Stoeckli-Evans, H., Chapuis, J.-C., Sordat, B., Hostettmann, K. (1989). New cell growth-inhibitory cyclohexadienone derivatives from *Hypericum calycinum* L. *Helv. Chim. Acta* 72, 1833–1845.

Del Monte, D., De Martino, L., Marandino, A., Fratianni, F., Nazzaro, F., De Feo, V. (2015). Phenolic content, antimicrobial and antioxidant activities of *Hypericum perforatum* L. *Industrial Crops and Products*, 74, 342-347.

Delaey, E. M., Kamuhabwa, A. R., Vandenbogaerde, A. L., de Witte, P. A. (1999). Photocytotoxicity of protohypericin after photoconversion to hypericin. *Planta medica*, 65(08), 719-722.

Delaey, E.M., Vandenbogaerde, A., Merlevede, W., Witte, P. (2000). Photocytotoxicity of hypericin in normoxic and hypoxic conditions. *Journal of Photochemistry Photobiology B*, 56, 19–24.

Demirci, B., Baser, K.H.C., Crockett, S.L., Khan, I.A., (2005). Analysis of the volatile constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae). *Journal of Essential Oil Research*, 17, 659-663.

Demisch, L., Hölzl, J., Gollnik, B. (1989). Identification of selective MAO-Typ A inhibition of *Hypericum perforatum* L [abstract]. *Pharmacopsychiatry*, 22:194.

Derbentseva, N. A., Rabinovich, A. S. (1968). Isolation, purification, and study of some physicochemical properties of novoimanin. *Novoimanin Ego Lech. Svoistva*, 15: 18.

Dewick, P.M. (2003). *Medicinal Natural Products: A Systematic Approach*. (2nd ed.). West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E., Izzo, A.A. (2001). St John's wort: prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol Sci.* 22, 292–297.

Díaz, J.G., de Paz, P.P., Herz, W. (2010). new water soluble flavone and xanthone glycosides from *Hypericum canariense* L. *Phytochemistry Letters* 2010 – Elsevier

Dikmen, M., Öztürk, Y., Sagratini, G. (2011). Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts, *Phytother. Res.* 25, 208–214.

Dlugosch, K., Parker, I. (2007). Molecular and quantitative trait variation across the native range of the invasive species *Hypericum canariense*: evidence for ancient patterns of colonization via pre-adaptation? *Molecular Ecology* 16, 4269–4283.

Do Rego, J.C., Benkiki, N., Chosson, E., Kabouche, Z., Seguin, E., Costentin, J. (2007). Antidepressant-like effect of hyperfoliatin, a polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake. *European Journal of Pharmacology*, 569 (3), 197-203.

Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *JNCI: Journal of the national cancer institute*, 90(12), 889-905.

Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.L., Blaser, M.J. (1990). Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 9464-9469.

Dülger, G., Dülger, B. (2014). Antifungal activity of *Hypericum havvae* against some medical *Candida* yeast and *Cryptococcus* species. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 405-408.

Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi S.F., Ahangar, N. (2013). Anticonvulsant activity of *Hypericum scabrum* L.; possible mechanism involved. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17, 2141-2144.

Elisabetta, G., Chiara, C., Gaetano, S., Maria, R., Maria, L. (2017). Evaluation of wound healing activity of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) in horses. *Comp. Clin. Pathol.* 26 (3), 611–615.

Ellison, S. L. R., Williams, A. (2004). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM CITAC Guide CG4, 3rd edition.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.

Ernst, E. (2003). *Hypericum: The Genus Hypericum*. London: Taylor and Francis.

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

European Pharmacopoeia. (6th Ed.). (2008). Herbal Monographs; St. John's Wort (*Hyperici herba*). 3839-3842.

Fahmi, M. (2002). A case of mania induced by *Hypericum*. *World J Biol Psychiatry*, 3, 58–59.

Fathi, H., Ebrahimzadeh, M. A. (2013). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Hypericum perforatum* L. (st. John's wort). *International Journal of Forest, Soil and Erosion (IJFSE)*, 3(2), 68-72.

Fava, M., Alpert, J., Nierenberg, A.A., Mischoulon, D., Otto, M.W., Zajecka, J., Murck, H., Rosenbaum, J.F. (2005). A double-blind, randomized trial of St John's wort,

fluoxetine, and placebo in major depressive disorder. *J. Clin. Psychopharmacol.* 25(5), 441–447.

Feily, A., Abbasi, N (2009). The Inhibitory Effect of *Hypericum perforatum* Extract on Morphine Withdrawal Syndrome in Rat and Comparison with Clonidine *Phytother. Res.*, 23, 1549–1552.

Fenner, R., Sortino, M., Kuze Rates, S. M., Dall’Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P. (2005). Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 12, 236–240.

Ferraz, A., Bordignon, S., Staats, C., Schripsema, J., von Poser, G.L. (2001). Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*, 57, 1227–1230.

Ferraz, A., Faria, D.H., Benneti, M.N., Brondani da Rocha, A., Schwartzmann, G., Henriques, A., von Poser, G.L. (2005). Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine*, 12, 112–115.

Findling, R. L., Mcnamara, N. K., O’riordan, M. A. Reed, M. D., Demeter, C.A., Branicky, L. A., Blumer, J. L. (2003). An openlabel pilot study of St.John's wort in juvenile depression. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 42, 908–914.

Fisel, J., Gäbler, H., Schwöbel, H., Trunzler, G. (1966). *Haronga madagascariensis* Choisy: botanik, pharmakognosie, chemie und therapeutische Anwendung. *Dtsch. Apoth. Z.*, 106, 1053-1060.

Flausino, Jr., O.A., Zangrossi, Jr., H., Salgado, J.V., Viana, M.B. (2002). Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 7, 259–265.

Fobofou, S.A.T., Franke, K., Sanna, G., Porzel, A., Bullita, E., La Colla, P., Wessjohann, L.A. (2015). Isolation and anticancer, anthelmintic, and antiviral (HIV) activity of acylphloroglucinols, and regioselective synthesis of empetrifranzinans from *Hypericum roeperianum*. *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 6327–6334.

Fotie, J., Bohle, D.S. (2006). Pharmacological and biological activities of xanthenes. *Antinfective Agents Med Chem*, 5, 15-31.

Franca, H.S., Kuster, R.M., Rito, P.D., De Oliveira, A.P., Teixeira, L.A., Rocha, L. (2009). Antibacterial activity of the phloroglucinols and hexanic extract from *Hypericum brasiliense* Choisy. *Quimica Nova*, 32 (5), 1103-1106.

Franklin, M., Reed, A., Murck, H. (2004). Sub-chronic treatment with an extract of *Hypericum perforatum* (St John's wort) significantly reduces cortisol and corticosterone in the rat brain, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 14, 7–10.

Frost, P., Bornstein, S., Ehrhart-Bornstein, M., O'Kirwan, F., Huston, C., Heber, D., Go, V., Licinio, J., Wong, M.L. (2003). The prototypic antidepressant drug, imipramine but not *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) reduces HPA-axis function in the rat, *Horm. Metab. Res.*, 35, 602–606.

Gaedcke, F., (2003). Beispiel Johanniskraut. Herstellungs und Qualitätsaspekte pflanzlicher Extrakte. *Pharm Unserer Zeit*, 32, 192–201.

Galeotti, N. (2017). *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. *Journal of ethnopharmacology*, 200, 136-146.

Galeotti, N., Vivoli, E., Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Bartolini, A., Ghelardini, C. A (2010b). prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of st John's Wort in mice. *J Pain*. 11(2), 149–159.

Galeotti, N., Vivoli, E., Bilia, A.R., Souto, E.B., Calpena, A.C., Garcia, M.L. (2010a) St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C gamma and epsilon activity. *Biochem Pharmacol* 79, 1327–1336.

Gambarana, C., Tolu, P.L., Masi, F. (2001). A study of the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* on animal models Study. *Br J Psychiatry*, 179, 308-316.

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., Gu, Z.Y. (2016a). Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinol Congeners from *Hypericum scabrum*. *J. Nat. Prod.*, 79 (6), 1538–1547.

Gao, W., Hu, J.W., Hou, W.Z., Xu, F., Zhao, J., Xu, F., Sun, H., Xing, J.G., Peng, Y., Wang, X.L., Ji, T.F., Li, L., Gu, Z.Y. (2016b). Four new prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum scabrum*. *Tetrahedron Lett.* 57, 2244–2248.

Gärber, U., Schenk, R. (2004). Johanniskrautwelke, *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides*—Ergebnisse mehrjähriger Forschungsarbeiten im Überblick. *Drogenreport* 16, 23–28.

Gartner, M., Müller, T., Simon, J.C. (2005). Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent. *Chem Bio Chem* 6(1), 171–177.

Gerard, J., (1597). *The Herball or General History of Plantes*, John Norton, London.

Gerdin, B., Hällgren, R. (1997). Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *Journal of internal medicine*, 242(1), 49–55.

Gerhard, I., Liske, E., Wüstenberg, P. (1995). Treatment of Psychovegetative symptoms in the Climacteric using Remifemin® plus. 6th Phytotherapy Conference, Berlin

Ghasemi Pirbalouti, A., Fatahi-Vanani, M., Craker, L. (2014). Chemical composition and bioactivity of essential oils of *Hypericum helianthemoides*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum scabrum*. *Pharm Biol.*, 52(2), 175–181.

Ghazanfarpour, M., Kaviani, M., Asadi, N., Ghaffarpasand, F., Ziyadlou, S., Tabatabaee, H. R., Dehghankhalili, M. (2011). *Hypericum perforatum* for the treatment of premenstrual syndrome. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 113(1), 84–85.

Giese, A. C. (1980). Hypericism. *Photochem. Photobiol. Rev.* 5, 229–255.

Gillbro, J. M., Olsson, M. J. (2011). The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(3), 210–221.

Gioti, E. M., Fiamegos, Y. C., Skalkos, D. C., Stalikas, C. D. (2009). Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 117(3), 398–404.

Gitea, D., Vicas, S., Gitea, M. A., Nemeth, S., Tit, D. M., Pasca, B., Iovan, C. (2018). HPLC Screening of Bioactives Compounds and Antioxidant Capacity of Different *Hypericum* Species. *Revista de Chimie*, 69(2), 305-309.

Golsch, S., Vocks, E., Rakoski, J., Brockow, K., Ring, J. (1997). Reversible increase in photosensitivity to UV-B caused by St John's wort extract. *Hautarzt*; 48, 249–252.

Gómez del Rio, M. A., Sánchez-Reus, M. I., Iglesias, I., Pozo, M. A., García-Arencibia, M., Fernández-Ruiz, J., García-García, L., Delgado, M., Benedí, J. (2013). Neuroprotective Properties of Standardized Extracts of *Hypericum perforatum* on Rotenone Model of Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 12(5), 665-679.

Graham, D.Y., Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*; 59, 1143–1153.

Greeson, J.M., Sanford, B., Monti, D.A. (2001) St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, 153(4), 402–414.

Griffith, T. N., Varela-Nallar, L., Dinamarca, M. C., Inestrosa, N. C. (2016): Neurobiological Effects of Hyperforin and its Potential in Alzheimers Disease Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 17(5), 391-406.

Groenteman, R., Fowler, S.V., Sullivan, J.J. (2011). St. John's wort beetles would not have been introduced to New Zealand now: a retrospective host range test of New Zealand's most successful weed biocontrol agents. *Biological Control*, 57, 50–58.

Grush, L.R., Nierenberg, A., Keefe, B., Cohen, L.S. (1998). St John's wort during pregnancy (letter). *JAMA*, 280, 1566.

Gudžić, B., Dordević, S., Palić, R., Stojanović, G. (2001). Essential oils of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum* L. *Flavour and Fragrance Journal* 16(3), 201-203.

Guiley R. (1991). *Harper's encyclopedia of mystical & paranormal experience*. San Francisco.

Gulick, R.M., Mc Auliffe, V., Holden-Wiltse, J., Crumpacker, C., Liebes, L., Stein, D.S., Meehan, P., Hussey, S., Forcht, J., Valentine, F.T. (1999). Phase I studies of hypericin, the active compound in St John's wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults: AIDS Clinical Trials Group Protocols 150 and 258. *Ann Intern Med*; 130, 510–514.

Gunther, R.T., (1968). *The Greek Herbal of Dioscorides*. Hafner Publishing Company.

Gurevich, A. I., Dobrynin, V. N., Kolosov, M. N., Popravko, S. A., Riabova, I. D. (1971). Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *Antibiotiki*, 16(6), 510.

Hadjur C., Richard, M.J., Parat, M.O., Jardon P., Favier A., (1996). Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells, *Photochem. Photobiol.* 64, 375–381.

Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research*, 31(4), 261-272.

Hammerness, P., Basch, E., Ulbricht, C., Barrette, E. P., Foppa, I., Basch, S. (2003). St. John's wort: a systematic review of adverse effects and drug interactions for the consultation psychiatrist. *Psychosomatics*, 44(4), 271-282.

Hamzeloo-Moghadam, M., Khalaj, A., Malekmohammadi, M. (2015). Cytotoxic Activity and Apoptosis Induction of *Hypericum scabrum* L. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 17(10).

Hängslen, K. D., Vesper, J., Ploch, M. (1994). Multicenter double-blind study examining the antidepressant effectiveness of the *Hypericum* extract LI 160. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 7(1), 15-18.

Hashida, W., Tanaka, N., Kashiwada, Y., Sekiya, M., Ikeshiro, Y., Takaishi, Y. (2008). Tomoeones A–H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*. *Phytochemistry*, 69(11), 2225-2230.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3), 67-202.

Hearing, V.J., Jiménez, M. (1987). Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *International Journal of Biochemistry*, 19, 1141-1147.

Hemmati, A., Rashidi, I., Jafari, M. (2007). Promotion of wound healing by *Hypericum perforatum* extract in rabbit. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 2(2), 78-86.

Henry, G. E., Campbell, M. S., Zelinsky, A. A., Liu, Y., Bowen-Forbes, C. S., Li, L., Nair, M. G., Rowley, D. C., Seeram, N. P. (2009). Bioactive acylphloroglucinols from *Hypericum densiflorum*. *Phytother. Res.*, 23(12), 1759-1762.

Hernandez, M. F., Falé, P. L., Araújo, M. E. M., Serralheiro, M. L. M. (2010). Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. *Food Chemistry*, 120(4), 1076-1082.

Hina, Z., Ghazala, H.R., Arfa, K., Huma, S., Sabiha, T., Ajmal, K. (2015). Anti-urease Activity of *Mimusops elengi* Linn (Sapotaceae), *European Journal of Medicinal Plants*, 6, 223-230.

Hohmann, M. S., Cardoso, R. D., Fattori, V., Arakawa, N. S., Tomaz, J. C., Lopes, N. P., Verri Jr, W. A. (2015). *Hypericum perforatum* Reduces Paracetamol Induced Hepatotoxicity and Lethality in Mice by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. *Phytotherapy Research*, 29(7), 1097-1101.

Hosni, K., Msaada, K., Ben Taarit, M. (2011). Volatile constituents of two *Hypericum* species from Tunisia. *Nat Prod Commun*, 6(11), 1731–1734.

Hostanska, K., Rostock, M., Melzer, J., Baumgartner, S., Saller, R. (2012). A homeopathic remedy from arnica, marigold, St. John's Wort and comfrey accelerates *in vitro* wound scratch closure of NIH3T3 fibroblasts. *Complement Altern Med* 12, 100–109.

Hostettmann, K., Wolfender, J.L. (2005). St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety. Basel: Birkhäuser Verlag. *Phytochemistry*, 5-20.

Hölzl, J., Petersen, M. (2003). Chemical constituents of *Hypericum* spp. In: Ernst E.: *Hypericum: The genus Hypericum*. London, New York: Taylor and Francis

Hu, L., Xue, Y., Zhang, J., Zhu, H., Chen, C., Li, X. N., Liu, J., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, Y. (2016). (±)-Japonicols A-D, Acylphloroglucinol-Based Meroterpenoid Enantiomers with Anti-KSHV Activities from *Hypericum japonicum*. *J. Nat. Prod.*, 79(5), 1322-1328.

Hu, L.H., Khoo, C.W., Vittal, J.J., Sim, K.Y. (2000). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, 53 (6), 705-709.

Husain, G. M., Chatterjee, S. S., Singh, P. N., Kumar, V. (2011). Hypolipidemic and antiobesity-like activity of standardised extract of *Hypericum perforatum* L. in rats. *ISRN pharmacology*.

Istikoglou, C.L., Mavreas, V., Geroulanos, G. (2010). History and therapeutic properties of *Hypericum perforatum* from antiquity until today. *Psychiatrike*, 21(4), 8-332.

Ittner, L. M., Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau — a toxic *pas de deux* in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 67-72.

Izzo, A. A. (2004). Drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): A review of the clinical evidence. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 42, 139–148.

Jacobson, J.M., Feinman, L., Liebes, L., Ostrow, N., Koslowski, V., Tobia, A., Cabana, B.E., Lee, D., Spritzler, J., Prince, A.M. (2001). Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St John's wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*; 45, 517–524.

Javidnia, K., Miri, R., Soltani, M., Gholami, M., Khosravi, A. R. (2008). Essential oil composition of four *Hypericum* species from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(3), 374-377.

Jiang, D., Dai, Z., Li, Y. (2004). Pharmacological effects of xanthones as cardiovascular protective agents. *Cardiovascular Drug Reviews*, 22(2), 91-102.

Jurk, C. (2005). *Der niedergeschlagene Mensch. Depression. Eine sozialwissenschaftliche Studie zu Geschichte und gesellschaftlicher Bedeutung einer Diagnose*. PhD Thesis. Gesellschaftswissenschaften, Justus Liebig-Universität, Gießen.

Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A. (2002). Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, 68, 88-91.

Takegawa, H., Matsumoto, H., Satoh, T. (1985). Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibition effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin Tokyo*, 33, 642-646. <https://doi.org/10.1248/cpb.33.642>

Kamalakkannan, N., Prince, P.S. (2006). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(1), 97–103.

Karlioiva, M., Treichel, U., Malago, M., Frilling, A., Gerken, G., Broelsch, C.E. (2000). Interaction of *Hypericum perforatum* (St John's wort) with cyclosporin A metabolism in a patient after liver transplantation. *J Hepatol.*, 33, 853–855.

Kartnig, T., Gruber, A., Sauer, H. (1989). Comparative phytochemical investigations of *Hypericum* species. *Planta Med*, 55: 215

Kayastha, A.M., Das, N. (1999). A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease and its application in blood urea estimation, *Biochemical Education*, 27, 114-117.

Kelsey, J.L., LiVolsi, V.A., Holford, T.R. (1982). A case-control study of cancer of the endometrium. *Am J Epidemiol.*, 116(2), 333-442.

Khosa, R.L., Bhatia, N. (1982). Antifungal effect of *Hypericum perforatum* Linn. *Journal of Scientific Research in Plant Medicine*, 3, 49–50.

Kırmızıbekmez, H., Atay, I., Yeşilada, E. (2008). Determination of four major flavonoids in the methanolic extract of *Hypericum perforatum* by HPTLC-densitometry.

Kırmızıbekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., Celep, E., Mercanoğlu, G., Atay, I., Yeşilada, E. (2009). Phenolic compounds from *Hypericum calycinum* and their antioxidant activity. *Natural Product Communication*, 4, 531-534.

Kıyan, S., Uyanıkgil, Y., Altuncı, Y.A., Çavuşoğlu, T., Uyanıkgil, E.O.C., Karabey, F. (2015). Investigation of acute effects of *Hypericum perforatum* (St. John's

Wort - Kantaron) treatment in experimental thermal burns and comparison with silver sulfadiazine treatment. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.*, 21, 323–336.

Kientsch, U., Burgi, S., Ruedeberg, C., Probst, S., Honegger, U.E. (2001). St. John's wort extract Ze 117 (*Hypericum perforatum*) inhibits norepinephrine and serotonin uptake into rat brain slices and reduces 3-adrenoceptor numbers on cultured rat brain cells. *Pharmacopsychiatry*. 34(1), 56-60.

Kitanov, G. M., Nedialkov, P. T. (1998). Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26(6), 647-653.

Klier, C.M., Schafer, M.R., Schmid-Siegel, B., Lenz, G., Mannel, M. (2002). St John's wort (*Hypericum perforatum*) — is it safe during breastfeeding? *Pharmacopsychiatry*, 35, 29–30.

Klingauf, P., Beuerle, T., Mellenthin A., El-Moghazy, S. A., Boubakir, Z., Beerhues, L. (2005). Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry*, 66(2), 139-145.

Knuppel, L., Linde, K. (2004). Adverse effects of St. John's Wort: A systematic review. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 65, 1470–1479.

Kolak, U., Öztürk, M., Özgökçe, F., Ulubelen, A. (2006). Norditerpene Alkaloids From *Delphinium linearilobum* and Antioxidant Activity. *Phytochem.*, 67(19), 2170-2175.

Kolding, L., Pedersen, L. H., Henriksen, T. B., Olsen, J., Grzeskowiak, L. E. (2015). *Hypericum perforatum* use during pregnancy and pregnancy outcome. *Reproductive Toxicology*, 58, 234-237.

Kommission E. Monographie (1984). *Hyperici herba* (Johanniskraut). Bundesanzeiger 228 und Berichtigungin 1989;43.

Kraus B., Wolff H., Heilmann J., Elstner E. F. (2007). Influence of *Hypericum perforatum* extract and its single compounds on amyloid- β mediated toxicity in microglial cells. *Life Sciences*, 81, 884-894.

Kraus G.A., Dneprovskaja E., Nguyen T.H., Jeon I. (2003). Synthesis of a model system for the preparation of phloroglucinol containing natural products. *Tetrahedron*; 59, 8975–8978.

Kubin, A., Wierrani, F., Burner, U., Alth, G., Grunberger, W. (2005). Hypericin-the facts about a controversial agent. *Current pharmaceutical design*, 11(2), 233-253.

Kuchárová, B. (2015). "Potentiation of hypericin-mediated photodynamic therapy cytotoxicity by MK-886: focus on ABC transporters, GDF-15 and redox status." *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 12(3), 490-503.

Kuipers, E.J., Uytendinck, A.M., Pera, A.J. (1995) Long term sequelae of *H. pylori* gastritis. *Lancet*, 345, 1525-1528.

Kumar, V., Jaiswal, A. K., Singh, P. N., Bhattacharya, S. K. (2000). Anxiolytic activity of Indian *Hypericum perforatum* Linn: an experimental study.

Kumar, V., Singh, P. N., Bhattacharya, S. K. (2001a). Anti-inflammatory and analgesic activity of Indian *Hypericum perforatum* L.

Kumar, V., Singh, P. N., Bhattacharya, S. K. (2001b). Neurochemical studies on Indian *Hypericum perforatum* L.

Kuppusamy, U.R., Das, N.P. (1991). Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*, 47, 1196-2000.

Lane, D. (1979). Significance of noxious weeds on roadsides in agricultural areas of Victoria, Australia. *Weed Research*, 19, 151–156.

Lane-Brown, M.M. (2000). Photosensitivity associated with herbal preparations of St John's wort (*Hypericum perforatum*) (letter). *Med J Aust*; 172:302.

Lavie, G., Mazur, Y., Lavie, D., Prince, A. M., Pascual, D., Liebes, L., Meruelo, D. (1995). Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion*, 35(5), 392-400.

Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Pecoraro, R.E., Rodeheave, G., Robson, M.C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, *Arch Dermatol.*, 130, 489-493.

Le Bourvellec, C., Le Quéré, J. M., Sanoner, P., Drilleau, J. F., Guyot, S. (2004). Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 122-130

Leal, K.Z., Yoneda, J.D., Lindgren, E.B., Pinheiro, C.B., Corrêa, A.L., França, H.S. (2010). Conformational analysis of phloroglucinols from *Hypericum brasiliense* by using x-ray diffraction and molecular modeling. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 21 (5), 837-841.

Lee, J. H., Kim, G. H. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *Journal of food science*, 75(7), 212-217.

Lee, K.K, Choi, J.D., (1999a). Inhibitory effects of 150 plant extracts on anti-elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Int. J. Cosmet. Sci.* 21, 71–82.

Lee, K.K., Choi, J.D. (1999b). The effects of *Areca catechu* L. extracts on antiageing. *Int J Cosmetic Sci.*, 21, 285-94.

Leuschner, G. (1996). Preclinical toxicology profile of *Hypericum* extract LI 160. *Phytomedicine*; 1:104.

Li, Y. P., Hu, K., Yang, X. W., Xu, G. (2018). Antibacterial Dimeric Acylphloroglucinols from *Hypericum japonicum*. *Journal of natural products*, 81(4), 1098-1102.

Li, Y., Rahmanian, M., Widström, C., Lepperdinger, G., Frost, G.I., Heldin, P., (2000) Irradiation-Induced Expression of Hyaluronan (HA) Synthase 2 and Hyaluronidase 2 Genes in Rat Lung Tissue Accompanies Active Turnover of HA and Induction of Types I and III Collagen Gene Expression. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 23(3), 411–418.

Lin, Y.L., Wu, Y.S. (2003). Polyprenylate phloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. *Helvetica Chimica Acta*, 86 (6), 2156-2163.

Linde, K., Berner, M.M., Kriston, L. (2008). St John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst Rev*. CD000448.

Linde, K. (2009a). *Harper's encyclopedia of mystical & paranormal experience*. San Fransisco: Harper

Linde, K. (2009b). St. John's wort—an overview. *Complementary Medicine Research*, 16(3), 146-155.

Linde, K. (2008). Johanniskraut bei Depression – eine Übersicht der randomisierten Studien bezogen auf einzelne Extrakte. Kommission Qualität und Transparenz von Phytopharmaka des Komitees Forschung *Naturmedizin*

Linde, K., Berner, M., Egger, M., Mulrow, C. (2005). St John's wort for depression: meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Psychiatry.*, 186, 99–107.

Liu, X., Yang, X. W., Chen, C. Q., Wu, C. Y., Zhang, J. J., Ma, J. Z., Wang, H., Yang, L. X., Xu, G. (2013). Bioactive polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum cohaerens*. *J. Nat. Prod.*, 76(9), 1612-1618.

Liyanaarachchi, G.D., Jayanetti Koralalage Ramani Radhika Samarasekera, J. K. R. R., Mahanama, K. R. R., Hemalal, K.D.P. (2018). Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals *Industrial Crops & Products*, 111, 597–605.

Lorusso, G., Vannini, N., Sogno, I., Generoso, L., Garbisa, S., Noonan, D. M., Albini, A. (2009). Mechanisms of Hyperforin as an anti-angiogenic angioprevention agent. *European Journal of Cancer*, 45(8), 1474-1484.

Lu, S., Tanaka, N., Tatano, Y., Kashiwada, Y. (2016). Erecricins A–E, prenylated acylphloroglucinols from the roots of *Hypericum erectum*. *Fitoterapia*, 114, 188–193.

Madan, B., Singh, I., Kumar, A., Prasad, A.K., Raj, H.G., Parmar, V.S., Ghosh, B. (2002). Xanthenes as inhibitors of microsomal lipid peroxidation and TNF-alpha induced ICAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Bioorg Med Chem*, 10, 3431-3436.

Madan, B., Krishnamoorthy, G., Rao, J.R., Nair, B.U.(2007). Role of green teapolyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int. J.Biol. Macromol.*, 41, 16–22.

Mainetti, S., Carnevalli, F. (2013). An experience with paediatric burnwounds treated with a plant-derived wound therapeutic. *J Wound Care*, 22, 681–689.

Mandrone, M., Lorenzi, B., Venditti, A., Guarcini, L., Bianco, A., Sanna, C., Antognoni, F. (2015). Antioxidant and anti-collagenase activity of *Hypericum hircinum* L. *Industrial Crops and Products*, 76, 402-408.

Mansour, S., Djebli, N., Ozkan, E. E., Mat, A. (2014). *In vivo* antiinflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, 514-520.

Marrelli, M., Conforti, F., Toniolo, C., Nicoletti, M., Statti, G., Menichini, F. (2014). *Hypericum perforatum*: influences of the habitat on chemical composition, photo-induced cytotoxicity, and antiradical activity. *Pharm. Biol.*, 52 (7), 909-918.

Martínez-Poveda, B., Verotta, L., Bombardelli, E., Quesada, A. R., Medina, M. Á. (2010). Tetrahydrohyperforin and octahydrohyperforin are two new potent inhibitors of angiogenesis. *PloS one*, 5(3), 9558.

Masamoto, Y., Kubo, M. (1980). Inhibitory effect of Chinese crude drugs on tyrosinase. *Planta Medica*, 40(12), 361-365.

Maskovic, P., Solujic, S., (2009). A preliminary study on the antifungal activity of the ethanol extract of *Hypericum perforatum* L. The book of abstracts. In: Eleventh annual conference “YUCOMAT 2009”, Herceg-Novi, August 31–September 4, p.192.

Mathioudaki A., Berzesta A., Kypriotakis Z., Skaltsa H., Heilmann, J. (2018). Phenolic metabolites from *Hypericum kelleri* Bald, an endemic species of Crete (Greece). *Phytochemistry*, 146, 1-7.

Mathis, C. Ourisson, G. (1964). Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*-IV. Repartition des sesquiterpenes, des alcools monoterpeniques et des aldehydes satures dans les huiles essentielles d'*Hypericum*. *Phytochemistry*. 3(1), 115-131.

Mazandarani, M., Yassaghi, S., Rezaei, M. B., Mansourian, A. R., Ghaemi, E. O. (2007). Ethnobotany and antibacterial activities of two endemic species of *Hypericum* in North-East of Iran. *Asian Journal of Plant Sciences*.

Meirelles, G. C., Pippi, B., Hatwig, C., Barros, F., de Oliveira, L. F., Poser, G. L. V., Fuentefria, A. M. (2017). Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction

of *Hypericum carinatum* and fluconazole. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1), 118-123.

Melzer, R., Fricke, U., Hoelzl, J. (1991). Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittel-Forschung*.41(5), 481-483.

Meotti, F.C., Luiz, A.P., Pizzolatti, M.G., Kassuya, C.A.L., Calixto, J.B., Santos, A.R. (2006). Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for arole of the L-arginine nitric-oxide and protein kinase C pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 316, 789–796.

Meral, G. E., Karabay, N. U. (2002). *In vitro* antibacterial activities of three *Hypericum* species from West Anatolia. *Turk. Electron. J. Biotechnol*, 6-10.

Meruelo, D., Lavie, G., Lavie D. (1988). Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *PNAS*. 85(14), 5230-5234.

Miller, H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 48, 91.

Mir, M. Y., Kamili, A. N., Hassan, Q. P., Rafi, S., Parray, J. A., Jan, S. *In Vitro* Regeneration and Free Radical Scavenging Assay of *Hypericum perforatum* L. *National Academy Science Letters*, 1-7.

Mitsopoulou, K. P., Vidali, V. P., Koliopoulos, G., Couladouros, E. A., Michaelakis, A. (2014). Hyperforin and deoxycohumulone as a larvicidal agent against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Chemosphere*, 100, 124-9.

Mockute, D., Bernotiene, G., Judzentiene, A. (2003). Volatile compounds of the aerial parts of wild St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) plants. *Chemija*

Molochko, V.A., Lastochkina, T.M., Krylov, I.A., Brangulis, K.A. (1990). The antistaphylococcal properties of plant extracts in relation to their prospective use as therapeutic and prophylactic formulations for the skin. *Vestnik Dermatologii I Venerologii*, 8, 54–56.

Momekov, G., Ferdinandov, D., Zheleva-Dimitrova, D., Nedilalkov, P., Girreser, U., Kitanov, G. (2008). Cytotoxic effects of hyperatomarin, a prenylated

phloroglucinol from *Hypericum annulatum* Moris subsp *annulatum*, in a panel of malignant cell lines. *Phytomedicine*, 15 (11), 1010-1015.

Montecinos-Oliva, C., Schüller, A., Inestrosa, N. C. (2015). Tetrahydrohyperforin: a neuroprotective modified natural compound against Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.*, 10(4), 552–554.

Moon, H.I. (2010). Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum erectum* Thunb. *Phytotherapy Research*, 24 (6), 941-944.

Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuena, M.A. (2000). Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109-114.

Mukherjee, P.K., Verpoorte, R., Suresh, B. (2000). Evaluation of *in-vivo* woundhealing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70 (3), 315-321.

Muruganandam, A., Ghosal, S., Batthacharya, S. (2000). The role of xanthone in the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* involving dopaminergic and serotonergic systems. *Biogenic amines*, 15, 553-567.

Müller W.E. (2005). *St. John's wort and its active principles in depression and anxiety*. Basel: Birkhäuser Verlag.

Nait-Si, Y., Fourneron, J-D. (2005). Chemical and chromatographic behavior of pseudohypericin and isopseudohypericin and the occurrence of isopseudohypericin in Saint John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts. *Monatsh Chem.*, 136(2), 159–168.

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

Naseem, W., Bardo, S. (2018). Chronic administration of St John's wort attenuates alcohol intake and brain indoleamine 2,3-dioxygenase activity in mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(4), 1203-1207.

Nedialkov, P.T., Zheleva-Dimitrova, D., Momekov, G., Karlov, K., Girreser, U., Kitanov, G.M. (2011). Elegaphenone and 7-epi-clusianone, the major cytotoxic constituents of *Hypericum elegans*. *Natural Product Research*, 25 (18), 1743-1750.

Nielsen H., Arends P. (1978). Structure of the xanthone lignoid kielcorin. *Phytochem*, 17, 2040-2041.

Nussbaum J. M., Seward M. E., Bloom G. S. (2013). Alzheimer disease. *Prion*, 7(1), 14-19.

Nürk, N.M. (2011). *Phylogenetic analyses in St. John's Wort (Hypericum), Inferring Character Evolution and Historical Biogeography*. PhD Thesis.

Oeggl, K., Kofler, W., Schmidl, A., Dickson, J. H., Egarter-Vigl, E., Gaber, O. (2007). The reconstruction of the last itinerary of "Ötzi", the Neolithic Iceman, by pollen analyses from sequentially sampled gut extracts. *Quaternary Science Reviews*

Ohishi, N., Suzuki, T., Ogasawara, T., Yagi, K. (2000). Xanthone derivatives as inhibitors for monoamine oxidase. *J Mol Cat*, 10, 291-294.

Orcic, D.Z., Mimica-Dukic, N.M., Franciskovic, M.M., Petrovic, S.S., Jovin, E.D. (2011). Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chem. Central J.*, 25 (5), 34.

Özkan, E. E., Özden, T. Y., Özsoy, N., Mat, A. (2018). Evaluation of chemical composition, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Hypericum neurocalycinum* and *Hypericum malatyanum*. *South African Journal of Botany*, 114, 104-110.

Özkan, E.E., Özsoy, N., Özhan, G., Çelik, B.Ö., Mat, A. (2013). Chemical composition and biological activities of *Hypericum pamphylicum*. *Industrial Crops and Products*, 50, 182–189.

Öztürk, N., Korkmaz, S., Öztürk, Y. (2007). Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on chicken embryonic fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 111, 33-39.

Öztürk, N., Kıyan, H.T. (2016). Evaluation of Biological Activities of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. Extracts *Free radical Biology and Medicine*, 100:107.

Parker W. L., Johnson F. (1968). The strcture determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. *J. Am. Chem. Soc.*, 90(17), 4716-4723.

Patel, S. (2002). Hypertensive crisis associated with St. John's wort. *Am J Med*; 112, 507–508.

Patocka, J. (2003). The chemistry, pharmacology, and toxicologyof the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *J Appl Biomed* 1, 61–70

Paulke, A., Nöldner, M. Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M. (2008). St. John's wort flavonoids and their metabolites show antidepressant activity and accumulate in brain after multiple oral doses. *Pharmazie*.

Peeva-Naumovska, V., Panovski, N., Grdanovska, T., Fredro-Kumbaradzi, E. (2010). Formulations of St. John's Wort oil ointment and evaluation of its antibacterial effect. Available from: www.amapseec.org/cmapseec.1/Papers/pap_p067.htm (accessed 24.02.10).

Peng, J.Y., Fan, G.R., Wu, Y.T. (2006). Preparative separation and isolation of three flavonoids and three phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum* Thumb. using high-speed countercurrent chromatography by stepwise increasing the flow rate of the mobile phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29 (11), 1619-163 Press; 273-275.

Pereira, A. C., Paulo, M., Araújo, A. V., Rodrigues, G. J., Bendhack, L. M. (2011). Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(9), 947-957.

Pereira, I.O. (2011). Design and Construction of a Decellularization Cell. Faculdade de Engenharia, Mestrado Integrado em Bioengenharia, Porto.

Perovic,S., Müller, W.E.G. (1995). Pharmacological profile of *Hypericum* extract. Effect on serotonin uptake by postsynaptic receptors. *Arzneim- Forsch/Drug Res* 45(11),1145– 1148.

Pinhatti A. V., de Barros F. M., de Farias C. B., Schwartzmann G., Poser G. L., Abujamra A. L. (2013). Antiproliferative activity of the dimeric phloroglucinol and

benzophenone derivatives of *Hypericum* spp. native to southern Brazil. *Anticancer Drugs*, 24(7), 699-703.

Pinhatti, A. V., de Matos Nunes, J., Maurmann, N., Rosa, L. M. G., von Poser, G. L., Rech, S. B. (2010). Phenolic compounds accumulation in *Hypericum ternum* propagated *in vitro* and during plant development acclimatization. *Acta physiologiae plantarum*, 32(4), 675-681.

Piwowarski, J.P., Kiss, A.K., Kozłowska-Wojciechowska, M. K. (2011). Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 937– 941.

Plazas Gonzalez, E. A. (2017). Phytochemical screening and *in vitro* antibacterial activity of extracts and fractions from three Colombian species of the genus *Hypericum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1-14.

Prisacaru, A.I., Andritoiu, C., Andriescu, C. (2013). Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. *Rom J Morphol Embryol.*, 54, 1053.

Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T., Bennett, B.C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 418–428.

Rabanal, R.M., Bonkanka, C.X, Hernandez-Perez, M., Sanchez-Mateo, C.C. (2005). Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum*. *J Ethnopharmacol.*, 70(3), 315-21.

Radulovic, N., Stankov-Jovanovic, V., Stojanovic, G., Smelcerovic, A.,Spiteller, M., Asakawa, Y. (2007). Screening of *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chemistry*, 103(1), 15-21.

Rahimi, R., Nikfar, S., Abollahi, M. (2009). Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: A meta-analysis *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(1), 118-127.

Ramalhete, N., Machado, A., Serrano, R., Gomes, E.T., Mota-Filipe, H., Silva, O. (2016). Comparative study on the *in vivo* antidepressant activities of the Portuguese *Hypericum foliosum*, *Hypericum androsaemum* and *Hypericum perforatum* medicinal plants *Industrial Crops and Products*, 82, 29–36.

Rao, S. G., Udupa, A. L., Udupa, S. L., Rao, P. G. M., Rao, G., Kulkarni, D. R. (1991). *Calendula* and *Hypericum*: two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. *Fitoterapia*, 62, 508-510.

Raso, G. M., Pacilio, M., Di Carlo, G., Esposito, E., Pinto, E., Meli, R. (2002). *In-vivo* and *in-vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1379–1383.

Rayburn, W.F., Gonzalez, C.L., Christensen, H.D., Stewart, J.D. (2001). Effect of prenatally administered *Hypericum* (St John's wort) on growth and physical maturation of mouse offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 184, 191–195.

Raziq, N., Saeed, M., Shahid, M., Muhammad, N., Khan, H., Gul, F. (2015). Pharmacological basis for the use of *Hypericum oblongifolium* as a medicinal plant in the management of pain, inflammation and pyrexia. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 41.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.

Reichling, J., Weseler, A., Saller, R. (2001). A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 34, 116–118.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.

Robson, N.K.B. (1972). Evolutionary recall in *Hypericum* (Guttiferae): *Transactions and Proceedings of the Botanical Society of Edinburgh*, 41, 365–383.

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. (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. (1985). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 3. Sections 1. Campylosporus to 6a. Umbraculoides. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany*, 12, 1–325.

Robson, N.K.B. (1987). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 7. Section 29. Brathys (part 1). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany* 16: 1–106.

Robson, N.K.B. (1990). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. *Bulletin of the Natural History Museum, Botany*, London 20, 1–151.

Robson, N.K.B. (1993). Parallel evolution in tropical montane *Hypericum* *Opera Botanica*, 121, 263–274.

Robson, N.K.B. (1996). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 6. Sections 20. Myriandra to 28. Elodes. *Bulletin of the Natural History Museum, Botany*, London 26, 75–217.

Robson, N.K.B. (2001). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 4(1). Sections 7. Roscyna to 9. *Hypericum* sensu lato (part 1). *Bulletin of the Natural History Museum, Botany*, London, 31, 37–88.

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*, London 32, 61–123.

Robson, N.K.B. (2003). *Hypericum* botany. Pp 1–22. In: E. Ernst [ed]. *Hypericum – The genus Hypericum*. London, New York: Taylor and Francis.

Robson, N.K.B. (2005). *Hypericum* sect. *Ascyreia* (Clusiaceae): new species and subspecies from China. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 43, 271–277.

Robson, N.K.B. (2006). Studies in the genus *Hypericum* L. (Clusiaceae). Section 9. *Hypericum* sensu lato (part 3): subsection 1. *Hypericum* series 2. *Senanensia*,

subsection 2. *Erecta* and section 9b. *Graveolentia*. *Systematics and Biodiversity*, 4, 19–98.

Robson, N.K.B. (2010a). Studies in the genus *Hypericum* L (Hypericaceae) 5(2). Sections 17. *Hirtella* to 19. *Coridium*. *Phytotaxa*, 4, 127–258.

Robson, N.K.B. (2010b). Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 5(1). Sections 10. *Olympia* to 15/16. *Crossophyllum*. *Phytotaxa*, 4, 5–126.

Robson, N.K.B., Adams P. (1968). Chromosome numbers in *Hypericum* and related genera. *Brittonia* 20, 95–106.

Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M. A. C., Hostettmann, K. (1996). More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, 42 (1), 185-188.

Rodney, G., Swanson, A.L., Wheeler, L.M., Smith, G.N., Worrel, C.S. (1950). The effect of a series of Flavonoids on hyaluronidase and some other related enzymes. *Journal of biological chemistry*, 183, 739-747.

Rodriguez-Landa, J. F., Contreras, C. M. (2003). A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine*, 10(8), 688-699.

Rolli, M., Schäfer, C., Müller, W.E. (1995). Effect of *Hypericum* extract (LI160) on neurotransmitter receptor binding and synaptosomal reuptake system, *Pharmacopsychiatry* 28, 207–210.

Röder, C., Schaefer, M., Leucht, S. (2004). Meta-Analyse zu Wirksamkeit und Verträglichkeit der Behandlung der leichten und mittelschweren Depression mit Johanniskraut. *Fortschritte der Neurologie und Psychiatrie*, 72, 330–343.

Ruiz-Aguilar, G. M. L., Ríos-Leal, E., Tomasini-Campocoso, A., Veloz-Rodríguez, R., Barajas-Aceves, M., & Rodríguez-Vázquez, R. (2004). Effect of culture parameters on the degradation of a hydrolyzable tannin extracted from cascalote by *Aspergillus niger*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.

Ruschitzka, F., Meier, P. J., Turina, M., Lüscher, T. F., Noll, G. (2000). Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *The Lancet*, 355(9203), 548-549.

Saddiqe, Z., Naeem, I., Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 511-521.

Samadi, S., Khadivzadeh, T., Emami, A., Moosavi, N.S., Tafaghodi, H., Behnam, H.R. (2010). "The effect of *Hypericum perforatum* on the wound healing and scar of cesarean," *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(1), 113–117.

Sánchez-Mateo, C.C., Bonkanka, C.X., Hernández-Pérez, M., Rabanal, R.M. (2006). Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. *Fil. Journal of Ethnopharmacology*, 107 (1), 1-6.

Sanna, M. D., Ghelardini, C., Galeotti, N. (2016). St. John's wort potentiates anti-nociceptive effects of morphine in mice models of neuropathic pain. *Pain Medicine*, 18(7), 1334-1343.

Saroglou, V., Marin, P.D., Rancic, A., Veljic, M., Skaltsa, H. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (3), 146-152.

Sarrell, E. M., Cohen, H. A., Kahan, E. (2003). Naturopathic treatment for ear pain in children. *Pediatrics*, 111(5), 574-579.

Sarrou, E., Giassafaki, L. P., Masuero, D., Perenzoni, D., Vizirianakis, I. S., Irakli, M., Martens, S. (2018). Metabolomics assisted fingerprint of *Hypericum perforatum* chemotypes and assessment of their cytotoxic activity. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 325-333.

Savikin-Fodulvic, K., Aljancic, I., Vajs, V., Menkovic, N., Macura, S., Gojgic, G., Milosavljevic, S. (2003). Hyperatomarin, an antibacterial prenylated phloroglucinol from *Hypericum atomarium* ssp *degenii*. *Journal of Natural Products*, 66 (9), 1236-1238.

Sayar, H., Gergerlioglu, N., Seringec, N., Ozturk, P., Bulbuloglu, E., Karabay, G. (2014). Comparison of efficacy of topical phenytoin with hypericin in second-degree burn wound healing: an experimental study in rats. *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, 20: 36.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.

Schimmer, O., Hafele, F., Kruger, A. (1988). The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. *Mutat Res*; 206, 201–208.

Schmidt, S., Heilmann, J. (2013). Review: The genus *Hypericum* and its acylphloroglucinols. Unpublished internal data.

Schmidt, S., Jürgenliemk, G., Skaltsa, H., Heilmann, J. (2012). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. *Phytochemistry*, 77, 218-225.

Schmidt, W., Beerhues, L. (1997). Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Lett*, 420, 143-146.

Schmidt, U., Sommer, H. (1993). St. John's wort extract in the ambulatory therapy of depression. Attention and reaction ability are preserved. *Fortschritte der Medizin*, 111(19), 339-342.

Schulte-Lobbert, S., Holoubek, G., Muller, W.E., Schubert-Zsilavecz, M., Wurglics, M. (2004). Comparison of the synaptosomal uptake inhibition of serotonin by St John's wort products. *J Pharm Pharmacol.*, 56(6), 813-818.

Schulz, H., Jobert, M. (1994). Effects of *Hypericum* extract on the sleep EEG in older volunteers. *J Geriatr Psychiatry Neurol.*, 7(1), 39-43.

Schulz, V. (2006). Safety of St. John's Wort extract compared to synthetic antidepressants. *Phytomedicine*, 13(3), 199-204.

Schwarz, U.I. (2003). Unwanted pregnancy on self-medication with St John's wort despite hormonal contraception. *Br J Clin Pharmacol*, 55, 112–113.

Shin, J.E., Kim, J.M., Bae, E.A., Hyun, Y.J., Kim, D.H. (2005). *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med*; 71, 197–201.

Shiu W. K. P., Gibbons S. (2006). Anti-staphylococcal acylphloroglucinols from *Hypericum beanii*. *Phytochemistry*, 67(23), 2568-2572.

Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem.*, 90(1–2), 157–167.

Silva, B.A., Malva, J.O., Dias, A.C.P. (2008). St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several *in vitro* models of oxidative stress. *Food Chem.* 110, 611-619.

Simeon, J., Nixon, M. K., Milin, R., Jovanovic, R., Walker, S. (2005). Openlabel pilot study of St. John's wort in adolescent depression. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 15, 293–301.

Singh, I. P., Bharate, S. B. (2006). Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 558-591.

Singh, R. B., Downing, D. (1995). *Antioxidants and coronary artery disease*.

Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.

Smith, M., Lin, K.M., Zheng, Y.P. (2001). PIII-89 an open trial of nifedipine herb interactions: nifedipine with St John's wort, *Ginseng* or *Ginkgo biloba*. *Clin Pharmacol Ther*, 69:86.

Sommer, H. (1991). Besserung psychovegetativer Beschwerden durch *Hypericum* im Rahmen einer multizentrischen Doppelblindstudie. *Nervenheilk.* 10, 308-310.

Sosa, S., Pace, R., Bornanciny, A. (2007). Topical antiinflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *J Pharm Pharmacol.* 59, 703-709.

Sparenberg, B., Dembch, L., Hölzl, J. (1993). Untersuchungen iiber antidepressive Wirkstoffe von Johanniskraut. *Pharm. Ztg. Wiss.* 138, 50-54.

Spinella, M. (2002). Hypomania induced by herbal and pharmaceutical psychotropic medicines following mild traumatic brain injury. *Brain Inj*; 16, 359–367.

Staffeldt, B., Kerb, R., Brockmöller, J., Ploch, M., Roots, I. (1994). Pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin after oral intake of the *Hypericum perforatum* extract LI 160 in healthy volunteers. *J Geriatr Psychiatry Neurol.*, 7, 47–53.

Stavropoulos, N. E., Kim, A., Nseyo, U. U., Tsimaris, I., Chung, T. D., Miller, T. A., Skalkos, D. (2006). *Hypericum perforatum* L. extract–novel photosensitizer

against human bladder cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(1), 64-69.

Stevinson, C., Ernst, E. (2000). A pilot study of *Hypericum perforatum* for the treatment of premenstrual syndrome. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 107(7), 870-876.

Stolz, E. D., da Costa, P. F., Medeiros, L. F., Souza, A., Battastini, A. M., von Poser, G. L., Bonan, C., Torres, I. L., 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. Epub 2016 Mar 21.,

Stolz, E. D., Hasse, D. R., von Poser, G. L., Rates, S. M. (2014). Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multimediated antinociceptive effect in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 66(12), 1774-1785.

Subhan, F., Khan, N., Sewell, R. D. (2009). Adulterant profile of illicit street heroin and reduction of its precipitated physical dependence withdrawal syndrome by extracts of St John's wort (*Hypericum perforatum*), *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 23(4): 564-571.

Sugimoto, K., Ohmori, M., Tsuruoka, S., Nishiki, K., Kawaguchi, A., Harada, K., Arakawa, M., Sakamoto, K., Masada, M., Miyamori, I., Fujimura, A. (2001). Different effects of St John's wort on the pharmacokinetics of simvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacol Ther.*, 70, 518–524.

Sun, Q., Schmidt, S., Tremmel, M., Heilmann, J., 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.

Suzuki, O., Katsumata Y., Oya, M. (1984). Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Medica*, 50 (3), 272-4.

Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., Yeşilada, E. (2010). Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.*, 127 (2), 468–477.

Szegedi, A., Kohnen, R., Dienel, A., Kieser, M. (2005). Acute treatment of moderate to severe depression with *Hypericum* extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *British Medical Journal*, 330 (7490), 503.

Şenol, F. S., Khan, M. T. H., Orhan, G., Gürkaş, E., Orhan, İ. E., Subutay Öztekin, N., and Ak, F. (2014). In silico approach to inhibition of tyrosinase by ascorbic acid using molecular docking simulations. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(12), 1469-1472.

Tada, M., Chiba, K., Yamada, H., Maruyama, H. (1991). Phloroglucinol derivatives as competitive against thromboxane A2 and leukotriene inhibitors D4 from *Hypericum erectum*. *Phytochemistry*, 30, 2559–2562.

Tala, M. F., Talontsi, F. M., Zeng, G. Z., Wabo, H. K., Tan, N. H., Spiteller, M., Tane, P. (2015). Antimicrobial and cytotoxic constituents from native Cameroonian medicinal plant *Hypericum riparium*. *Fitoterapia*, 102, 149-155.

Talić, S., Dragičević, I., Čorajević, L., Martinović Bevanda, A. (2014). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of extracts from medicinal plants. *Bull Chem Technol Bosnia Herzegovina*, 43, 11-14.

Tanaka, N., Kashiwada, Y., Sekiya, M., Ikeshiro, Y., Takaishi, Y. (2008b). Takaneones A-C, prenylated butylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sikokumontanum*. *Tetrahedron Lett.*, 49, 2799–2803.

Tanaka, N., Kubota, T., Ishiyama, H., Araki, A., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Mikami, Y., Kobayashi, J. (2008a). Petiolins A-C, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Bioorg. Med. Chem.*, 16(10), 5619-5623.

Tanaka, N., Mamemura, T., Shibasaki, A., Gono, T., Kobayashi, J. (2011). Yojironins E-I, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21(18), 5393-5397.

Tao, S.H., Wu, F.E. (2004). A New Flavon From *Hypericum wightianum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 6 (4), 307-310.

Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 68(3), 383–393.

Tedeschi, E., Menegazzi, M., Margotto, D., Suzuki, H., Förstermann, U., Kleinert, H. (2003). Anti-inflammatory actions of St. John's Wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α (STAT-1 α) activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 254–261.

Thiede, H.M., Walper, A. (1994). Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. *J Geriatr Psychiatry*, 7(1), 54-56.

Tocci, N., Weil, T., Perenzoni, D., Narduzzi, L., Madriñán, S., Crockett, S., Mattivi, F. (2018). Phenolic profile, chemical relationship and antifungal activity of Andean *Hypericum* species. *Industrial Crops and Products*, 112, 32-37.

Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F., Galati, E.M. (2001). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd.(Guttiferae). *II Farmaco*, 56(5-7), 455-457.

Tung, J. S., Mark, G. E., Hollis, G. F. (1994). A microplate assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Analytical biochemistry*, 223(1), 149-152.

Tusevski, O., Krstikj, M., Stanoeva, J. P., Stefova, M., Gadzovska Simic, S. (2018). Phenolic profile and biological activity of *Hypericum perforatum* L.: Can roots be considered as a new source of natural compounds? *South African Journal of Botany*. 117, 301-310.

Tusevski, O., Stanoeva, J.P., Markoska, E. (2016). Callus cultures of *Hypericum perforatum* L. a novel and efficient source for xanthone production. *Plant Cell Tiss Org*

Uebelhack, R., Blohmer, J.U., Graubaus, H.J., Busch, R., Gruenwald, J., Wernecke, K.D. (2006). Black cohosh and St. John's wort for climacteric complaints: a randomized trial. *Obstet Gynecol.*, 107, 247-55.

Upton R. (1997). St John's Wort Monograph. Herbalgram # 40. *American Herbal Pharmacopoeia*. Summer, AHP, Scotts Valley, USA; 3–38.

Utsumi T., Okuma, M., Kanno, T., Takehara, T.Y., Yoshioka, T., Fujita, Y., Horton, A.A., Utsumi, K. (1995). Effect of the antiretroviral agent hypericin on rat liver mitochondria, *Biochem. Pharmacol.* 50, 655–662.

Uzbay, I.T., Oglesby, M.W. (2001). Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci Biobehav. Rev.*, 25, 43–52.

Vajs, V., Vugdelija, S., Trifunovi, S., Karadi, I., Jurani, N., Macura, S., Milosavljevi, S. (2003). Further degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort). *Fitoterapia*, 74, 439–444.

Van Wart, H. E., Steinbrink, D. R. A. (1981). A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Analytical Biochemistry*, 113(2), 356–365.

Vandenbogaerde, A., Zanolli, P., Puia, G., Truzzi, C., Kamuhabwa, A., De Witte, P., Merlevede, W., Baraldi, M. (2000). Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats. *Pharmacol, Biochem Behav.*, 65, 627–633.

Vieira, P. M. D. S., Marques, B. S., Ludovico, P., Dias, A. C. P. (2011). Evaluation of the protective effect of *Hypericum perforatum* phenolics compounds, in the toxicity induced by heterologous expression of α -synuclein. In 2nd Annual BioPlant Workshop (pp. 1-1).

Waksman, J.C., Hard, K., Jolliff, H. (2000). Serotonin syndrome associated associated with the use of St John's wort and paroxetine (abstract). *J Toxicol Clin Toxicol.*, 38, 521.

Wang, X.W., Mao, Y., Wang, N.L., Yao, X.S. (2008). A New Phloroglucinol Diglycoside Derivative from *Hypericum japonicum* Thunb. *Molecules*, 13 (11), 2796–2803.

Weatherburn, M.W. (1967). Phenol- hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Analytical Chem.*, 39, 971–974.

Weyerstahl, P., Splittgerber, U., Marschall, H., Kaul, V. K. (1995). Constituents of the leaf essential oil of *Hypericum perforatum* L. from India. *Flavour and Fragrance Journal*. 10(6), 365–370.

Wichtl, M. (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals* Boca Raton, FL: CRC.

Williamson, E.M. (2001). *Synergy and other interactions in phytomedicines*. 8(5), 401-409.

Winkelmann, K., Heilmann, J., Zerbe, O., Rali, T., Sticher, O. (2001). New prenylated bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *Journal of Natural Products*, 64 (6), 701-706.

Witte, B., Harrer, G., Kaptan, T., Podzuweit, H., Schmidt, U. (1995). Treatment of depressive symptoms with a high concentration *Hypericum* preparation. A multicenter placebo-controlled double-blind study. *Fortschritte der Medizin*, 113(28), 404-408.

Woelk, H. (2000). Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. *BMJ*, 321, 536–539.

Woelk, H., Burkard, G., Grunwald, J. (1994). Benefits and risks of the *Hypericum* extract LI 160: drug-monitoring study with 3250 patients. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 7, 34–38.

Wood, S., Huffman, J., Weber, N., Andersen, D., North, J., Murray, B., Hughes, B. (1990). Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Planta Medica*, 56(06), 651-652.

World Health Organization (2002). WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. vol. 2. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization (2007). International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision, Version for 2007

World Health Organization. (2001). *The World Health Report–Mental health: new understanding new hope*. Geneva: WHO.

Wölflle, U., Seelinger, G., Schempp, C. M. (2014). Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta medica*, 80(02/03), 109-120.

Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M. (2006). *Hypericum perforatum*: a “modern “herbal antidepressant. 45(5), 449-468.

Xiang, Q., Venkatanarayananb, N., Ho, C.Y.X. (2017). Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis *Journal of Affective Disorders*, 210, 211–221.

Xiao, Z., Wang, X., Peng, Z., Huang, S., Yang, P., Li, Q. (2012). Molecular docking, kinetics study, and structure–activityrelationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Agric Food Chem*; 60, 10572–10577.

Yadollah-Damavandi, S., Chavoshi-Nejad, M., Jangholi, E., Nekouyian, N., Hosseini, S., Seifae, A., Mohsenikia, M. (2015). Topical *Hypericum perforatum* improves tissue regeneration in full-thickness excisional wounds in diabetic rat model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Yeşilada, E., Gürbüz, İ., Shibata, H. (1999). Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 66 (3), 289-293.

Yılmaz, M.A., Ertas, A., Yener, İ., Akdeniz, M., Çakır, O., Altun, M., Demirtaş, İ., Boğa, M., Temel, H. (2018). A comprehensive LC–MS/MS method validation for the quantitative investigation of 37 fingerprint phytochemicals in *Achillea* species: A detailed examination of *A. coarctata* and *A. monocephala*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 413–424.

Yonkers, K. A., Simoni, M. K. (2018). Premenstrual disorders. *American journal of obstetrics and gynecology*, 218(1), 68-74.

Yue, Q.Y., Bergquist, C., Gerden, B. (2000). Safety of St John's wort. *Lancet*, 355, 576–577.

Yüce, E. (2009). *Hypericum L. (Hypericaceae) cinsine ait Drosanthe (Spach) Endl. Seksiyonunun biyosistematiği*. Doktora Tezi.

Yüce-Babacan, E., Bağcı, E. (2017). Essential oil composition of *Hypericum uniglandulosum* Hausskn. Ex Bornm. and *Hypericum lydium* Boiss. from Turkey *International Journal of Nature and Life Sciences*, 1(1), 12-16

Zanoli, P. (2004). Role of Hyperforin in the Pharmacological Activities of St. John's Wort. *CNS Drug Reviews*, 10 (3), 203-218.

Zdunic, G., Godevac, D., Savikin, K., Novakovic, M., Milosavljevic, S., Petrovic, S. (2011). Isolation and identification of phenolic compounds from *Hypericum richeri* Vill. and their antioxidant capacity. *Natural Product Research*, 25(3), 175-187.

Zhang, J.-J., Yang, X.-W., Liu, X., Ma, J.-Z., Liao, Y., Xu, G. (2015b). 1,9-seco-Bicyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols from *Hypericum uralum*. *J. Nat. Prod.*, 78(12), 3075–3079.

Zhang, J. J., Yang, X. W., Ma, J. Z., Ye, Y., Shen, X. L., Xu, G. (2015a). Cytotoxic polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum henryi*. *Tetrahedron*, 71(43), 8315-8319.

Zhou, Z. B., Zhang, Y. M., Pan, K., Luo, J. G., Kong, L. Y. (2014). Cytotoxic polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum attenuatum*. *Fitoterapia*, 95, 1-7.

Zhou, Z. D., Lim, T. M. (2010). Glutathione conjugates with dopamine-derived quinones to form reactive or non-reactive glutathione-conjugates. *Neurochemical Research*, 35(11), 1805-1818.

Zhou, Z., Li, Z., Wang, X., Luo, J. Kong, L. (2016). Polycyclic Polyprenylated Derivatives from *Hypericum uralum*: Neuroprotective Effects and Antidepressant-like Activity of Uralodin A. *Nat. Prod.* 79, 1231–1240.

Zou, Y., Lu, Y., Wei, D. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 5032-5039.

Zouhar, K. (2004). *Hypericum perforatum*. In: Fire Effects Information System. Available online: <http://www.fs.fed.us/database/feis/>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ezgi	Soyadı	Ersoy
Doğ.Yeri	Bakırköy	Doğ.Tar.	01.02.1989
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	54508071550
Email	ecz.ezgiersoy@gmail.com	Tel	535 395 32 64

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2019
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2012
Lise	Kabataş Erkek Lisesi	2006

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Eczane sahibi ve mesul müdürü	Ersoy Eczanesi	2012-....

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	84	
Almanca	Orta	Orta	Orta		
Fransızca	Orta	Orta	Orta		

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	86	86	73
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Seyahat etmek, kitap okumak, doğa yürüyüşleri

TURNİTİN İNTİHAL RAPORU

ULUDAĞ'DA YETİŞEN ÜÇ HYPERİCUM TÜRÜNÜN KİMYASAL BİLEŞİKLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

ORJİNALLIK RAPORU

%8	%4	%1	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Batman University Öğrenci Ödevi	%4
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to Mugla University Öğrenci Ödevi	<%1
4	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Middle East Technical University Öğrenci Ödevi	<%1
6	arastirma.tarim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
8	www.diss.fu-berlin.de İnternet Kaynağı	<%1