

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**BAZI *SALVIA* TÜRLERİNİN SİTOPROTEKTİF, ANTİMUTAJENİK/  
ANTİREKOMBİNOJENİK, ANTİOKSİDAN ve ANTİBAKTERİYEL  
ÖZELLİKLERİNİN *IN VIVO* ve *IN VITRO* ORTAMDA  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**HANİFE DİDEM KARAKUŞ**

**DOKTORA TEZİ**

**Jüri Üyeleri :** Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)  
Prof. Dr. Tuncay DİRMENCİ  
Doç. Dr. Mehmet Emin DİKEN  
Dr. Öğr. Üyesi ÖMER FARUK KARASAKAL  
Dr. Öğr. Üyesi Ümran ALAN

**BALIKESİR, OCAK – 2026**

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “Bazı *Salvia* türlerinin sitoprotektif, antimutajenik/antirekombinojenik, antioksidan ve antibakteriyel özelliklerinin *in vivo* ve *in vitro* ortamda değerlendirilmesi” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
  - Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
  - Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Hanife Didem KARAKUŞ**

**Bu tez çalışması BAP tarafından 2023/075 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

# BAZI *SALVIA* TÜRLERİNİN SİTOPROTEKTİF, ANTİMUTAJENİK/ANTİREKOMBİNOJENİK, ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİNİN *IN VIVO* VE *IN VITRO* ORTAMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ  
HANİFE DİDEM KARAKUŞ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)  
(EŞ DANIŞMAN: DR.ÖĞR.ÜYESİ BEGÜMHAN YILMAZ KARDAŞ)  
BALIKESİR, OCAK - 2026

Tıbbi bitkiler, içerdiği antioksidan moleküller sayesinde doğal terapötik ajan geliştirme çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada, *Salvia candidissima* subsp. *candidissima*, *Salvia multicaulis*, *Salvia suffruticosa* ve *Salvia syriaca* türlerinden elde edilen su, etanol, metanol, ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan, sitoprotektif, antigenotoksik, antibakteriyel ve gelişimsel etkileri hem *in vitro* hem *in vivo* yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır. *In vitro* yöntem olarak LC-MS/MS ile fitokimyasal içerik, DPPH, ABTS ve FRAP antioksidan testleri, sitotoksosite ve genotoksosite testleri için sırasıyla MTS, mikronükleus ve kromozom aberasyon yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca antibakteriyel aktivite testleri için disk difüzyon ve MİK uygulanmıştır. *In vivo* analizler için DPPH, FRAP, ABTS antioksidan aktivite testleri, toksikoloji testleri ve genotoksosite testi (SMART) kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, LC-MS/MS ile gerçekleştirilen fitokimyasal analizlerde her türde yüksek fenolik içerik belirlenmiş; *S. syriaca*'da hesperidin (9307.68 µg/g), *S. candidissima* subsp. *candidissima*'da rosmarinik asit (7583.76 µg/g) ve *S. suffruticosa*'da apigenin-7-O-glukozit (278.47 µg/g) en yoğun bileşikler olarak tespit edilmiştir. DPPH ve ABTS testlerine göre *S. candidissima* subsp. *candidissima*'nın metanol ve etanol ekstraktları en yüksek aktiviteyi gösterirken, FRAP analizinde ise en yüksek indirgeme gücü *S. syriaca*'nın su ekstraktında gözlenmiştir. MTS testiyle yapılan sitotoksosite analizlerinde, özellikle *S. candidissima* subsp. *candidissima*'nın metanol ekstraktı 100 mg/L konsantrasyonda en yüksek hücre yaşamlılığını sağlamış ve en belirgin sitoprotektif etkiyi göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Mikronükleus ve kromozom aberasyon testleriyle, *S. multicaulis* (su) ve *S. syriaca* (metanol) ekstraktları en güçlü antigenotoksik etkiyi sergilemiştir. SMART testi sonuçlarına göre, *S. syriaca*'nın 50 mg/L etanol ekstraktı, en düşük nokta frekansı değerlerini vererek en güçlü *in vivo* antigenotoksik etkiyi ortaya koymuştur. *In vivo* gelişimsel toksisite değerlendirmelerinde *S. suffruticosa*'nın metanol dışındaki ekstraktlarının pupalaşma ve yaşama oranlarını etkilemediği görülmüştür ( $p > 0.05$ ). *In vivo* DPPH, ABTS ve FRAP testlerinde ekstraktların güçlü antioksidan potansiyeli belirlenmiştir. *S. suffruticosa* etanol ekstraktı *S. aureus* üzerinde yüksek antibakteriyel etki sergilemiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Antibakteriyel, antioksidan, genotoksosite, *Salvia* türleri, sitotoksosite

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE CYTOPROTECTIVE, ANTIMUTAGENIC/ANTIRECOMBINOGENIC, ANTIOXIDANT, AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SOME *SALVIA* SPECIES *IN VIVO* AND *IN* *VITRO*

PH.D THESIS

HANİFE DİDEM KARAKUŞ  
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN )  
(CO-SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR BEĞÜMHAN YILMAZ KARDAŞ )  
BALIKESİR, JANUARY - 2026

Medicinal plants hold an important place in natural therapeutic agent development studies due to the antioxidant molecules they contain. In this study, the antioxidant, cytoprotective, antigenotoxic, antibacterial, and developmental effects of water, ethanol, methanol, and ethyl acetate extracts obtained from *Salvia candidissima* subsp. *candidissima*, *Salvia multicaulis*, *Salvia suffruticosa* and *Salvia syriaca* were determined using both *in vitro* and *in vivo* methods. As *in vitro* methods, LC-MS/MS for phytochemical content, DPPH, ABTS, and FRAP antioxidant assays, and MTS, micronucleus, and chromosome aberration methods for cytotoxicity and genotoxicity tests, respectively, were used. In addition, disc diffusion and MIC were applied for antibacterial activity tests. For *in vivo* analyses, DPPH, FRAP, ABTS antioxidant activity assays, toxicity tests, and the genotoxicity test (SMART) were used. When the results were examined, high phenolic content was determined in each species through phytochemical analyses performed by LC-MS/MS; hesperidin (9307.68 µg/g) in *S. syriaca*, rosmarinic acid (7583.76 µg/g) in *S. candidissima* subsp. *candidissima*, and apigenin-7-*O*-glucoside (278.47 µg/g) in *S. suffruticosa* were identified as the most abundant compounds. According to the DPPH and ABTS assays, the methanol and ethanol extracts of *S. candidissima* subsp. *candidissima* showed the highest activity, while the highest reducing power in the FRAP analysis was observed in the water extract of *S. syriaca*. In the cytotoxicity analyses performed with the MTS assay, especially the methanol extract of *S. candidissima* subsp. *candidissima* provided the highest cell viability at 100 mg/L concentration and showed the most pronounced cytoprotective effect ( $p < 0.05$ ). Through micronucleus and chromosome aberration tests, the water extract of *S. multicaulis* and the methanol extract of *S. syriaca* exhibited the strongest antigenotoxic effect. According to the SMART assay results, the 50 mg/L ethanol extract of *S. syriaca* exhibited the lowest spot frequency values, demonstrating the strongest *in vivo* antigenotoxic effect. In the *in vivo* developmental toxicity evaluations, it was observed that all extracts of *S. suffruticosa* except for the methanol extract did not affect pupation and survival rates ( $p > 0.05$ ). In the *in vivo* DPPH, ABTS, and FRAP tests, a strong antioxidant potential of the extracts was determined. The ethanol extract of *S. suffruticosa* exhibited the highest antibacterial effect against *S. aureus*.

**KEYWORDS:** Antibacterial, antioxidant, cytotoxicity, genotoxicity, *Salvia* species

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Lamiacea Familyasının Genel Özellikleri .....	1
1.1.1 <i>Salvia</i> türleri hakkında genel bilgi.....	2
1.1.1.1 <i>Salvia candidissima</i> Vahl subsp. <i>candidissima</i> .....	3
1.1.1.2 <i>Salvia multicaulis</i> Vahl.....	4
1.1.1.3 <i>Salvia suffruticosa</i> Montbret & Aucher ex Benth. ....	5
1.1.1.4 <i>Salvia syriaca</i> L. ....	5
1.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS) .....	6
1.2.1 Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	7
1.3 Antioksidanlar .....	7
1.3.1 DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi .....	8
1.3.2 ABTS (2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) yöntemi .....	8
1.3.3 FRAP (Ferrik indirgeme antioksidan gücü) yöntemi .....	9
1.4 Hücre Kültürü .....	9
1.4.1 Sitotoksosite .....	10
1.4.1.1 MTS testi .....	11
1.5 Genotoksosite .....	11
1.5.1 <i>In vitro</i> genotoksosite test sistemleri .....	11
1.5.1.1 Mikronükleus testi .....	12
1.5.1.2 Kromozom aberasyon testi .....	12
1.5.2 <i>In vivo</i> genotoksosite test sistemleri .....	13
1.5.2.1 Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi .....	13
1.6 <i>In vivo</i> Toksikolojik Etkilerin Belirlenmesi .....	14
1.6.1 Model organizma olarak <i>Drosophila melanogaster</i> .....	14
1.7 Antibakteriyel Aktivite .....	14
1.8 Literatür Özeti.....	15
1.9 Çalışmanın Amacı .....	19
<b>2. MATERYAL - METOT</b> .....	<b>21</b>
2.1 Materyal.....	21
2.1.1 Bitki materyallerinin temini .....	21
2.1.2 Kullanılan kimyasallar ve cihazlar .....	21
2.2 Metot.....	22
2.2.1 Bitki örneklerinden ekstrakt elde edilmesi .....	22
2.2.2 LC-MS/MS ile bitkisel materyallerin kimyasal bileşimlerinin belirlenmesi.....	23
2.2.3 Bitkisel ekstraktlarda antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi.....	23
2.2.3.1 DPPH yöntemi.....	23
2.2.3.2 ABTS yöntemi.....	24
2.2.3.3 FRAP yöntemi .....	24
2.2.4 Hücre kültürü .....	25
2.2.4.1 Malzeme sterilizasyonu .....	25
2.2.4.2 Besiyeri hazırlanması .....	25

## **İÇİNDEKİLER (devam)**

2.2.4.3 Kandan lenfosit izolasyonu .....	25
2.2.5 Sitotoksisite testleri.....	26
2.2.5.1 MTS testi .....	26
2.2.6 Genotoksisite test sistemleri.....	28
2.2.6.1 Mikronükleus testi.....	29
2.2.6.2 Kromozom aberasyon testi .....	30
2.2.6.3 <i>In vivo</i> somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) .....	31
2.2.7 <i>In vivo</i> antioksidan etkilerin belirlenmesi.....	32
2.2.8 <i>In vivo</i> toksikolojik etkilerin belirlenmesi .....	33
2.2.9 Antibakteriyel etkinin belirlenmesi .....	34
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>37</b>
3.1 LC-MS/MS Bulguları .....	37
3.2 Antioksidan Bulguları.....	38
3.3 Sitotoksisite Bulguları .....	40
3.3.1 MTS testi sonuçları.....	40
3.3.1.1 <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> bitkisinin MTS sonuçları.....	40
3.3.1.2 <i>S. multicaulis</i> bitkisinin MTS sonuçları .....	40
3.3.1.3 <i>S. suffruticosa</i> bitkisinin MTS sonuçları .....	41
3.3.1.4 <i>S. syriaca</i> bitkisinin MTS sonuçları .....	42
3.4 Genotoksisiteye İlişkin Deneysel Bulgular .....	42
3.4.1 Mikronükleus test sonuçları .....	42
3.4.2 Kromozom aberasyon testi bulguları.....	45
3.5 <i>In vivo</i> Genotoksisite Test Sistemleri .....	45
3.5.1 Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	45
3.5.2 <i>In vivo</i> antioksidan bulguları .....	47
3.5.2.1 <i>In vivo</i> DPPH.....	47
3.5.2.2 <i>In vivo</i> ABTS.....	49
3.5.2.3 <i>In vivo</i> FRAP .....	52
3.5.3 <i>In vivo</i> toksikolojik etkilerin belirlenmesi .....	53
3.6 Antibakteriyel Aktivite.....	59
<b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>61</b>
4.1 LC-MS/MS Sonuçları.....	61
4.2 Antioksidan Aktivite Test Sonuçları .....	63
4.3 Sitotoksisite Test Sonuçları .....	66
4.4 Genotoksisite Test Sonuçları .....	69
4.4.1 Mikronükleus sonuçları .....	69
4.4.2 Kromozom aberasyon sonuçları .....	73
4.5 <i>In vivo</i> Genotoksisite Test Sistemleri .....	78
4.5.1 Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	78
4.5.2 Toksisite sonuçları .....	81
4.6. <i>In vivo</i> Antioksidan Sonuçları .....	83
4.7 Antibakteriyel Aktivite Test Sonuçları.....	86
<b>5. DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER.....</b>	<b>90</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>92</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>113</b>
EK A: Etik Kurul Kararı.....	114
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>116</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Çalışmada kullanılan <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> alt türünün fotoğrafı	3
Şekil 1.2: Çalışmada kullanılan <i>S. multicaulis</i> türünün fotoğrafı	4
Şekil 1.3: Çalışmada kullanılan <i>S. suffruticosa</i> türünün fotoğrafı	5
Şekil 1.4: Çalışmada kullanılan <i>S. syriaca</i> türünün fotoğrafı	6
Şekil 2.1: Ficoll-Paque eklenmiş kanın santrifüj sonrası katmanları	26
Şekil 2.2: Mikronükleus taşıyan hücrelerin görüntüleri	29
Şekil 2.3: Lenfositlerde farklı tiplerde kromozom sapmaları	31
Şekil 3.1: <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları	40
Şekil 3.2: <i>S. multicaulis</i> bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları	41
Şekil 3.3: <i>S. suffruticosa</i> bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları	41
Şekil 3.4: <i>S. syriaca</i> bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları	42
Şekil 3.5: <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> bitkisinin <i>in vivo</i> DPPH sonuçları	47
Şekil 3.6: <i>S. multicaulis</i> bitkisinin <i>in vivo</i> DPPH sonuçları	48
Şekil 3.7: <i>S. suffruticosa</i> bitkisinin <i>in vivo</i> DPPH sonuçları	48
Şekil 3.8: <i>S. syriaca</i> bitkisinin <i>in vivo</i> DPPH sonuçları	49
Şekil 3.9: <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> bitkisinin <i>in vivo</i> ABTS sonuçları	49
Şekil 3.10: <i>S. multicaulis</i> bitkisinin <i>in vivo</i> ABTS sonuçları	50
Şekil 3.11: <i>S. suffruticosa</i> bitkisinin <i>in vivo</i> ABTS sonuçları	50
Şekil 3.12: <i>S. syriaca</i> bitkisinin <i>in vivo</i> ABTS sonuçları	51
Şekil 3.13: <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % puparasyon etkileri	53
Şekil 3.14: <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % hayatta kalma etkileri	53
Şekil 3.15: <i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % eklozyon etkileri	54
Şekil 3.16: <i>S. multicaulis</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % puparasyon etkileri	54
Şekil 3.17: <i>S. multicaulis</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % hayatta kalma etkileri	55
Şekil 3.18: <i>S. multicaulis</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % eklozyon etkileri	55
Şekil 3.19: <i>S. suffruticosa</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % puparasyon etkileri	56
Şekil 3.20: <i>S. suffruticosa</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % hayatta kalma etkileri	56
Şekil 3.21: <i>S. suffruticosa</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % eklozyon etkileri	57
Şekil 3.22: <i>S. syriaca</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % puparasyon etkileri	57
Şekil 3.23: <i>S. syriaca</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % hayatta kalma etkileri	58
Şekil 3.24: <i>S. syriaca</i> ekstraktlarının <i>D. melanogaster</i> üzerindeki % eklozyon etkileri	58
Şekil A.1: Etik kurul kararı 1. sayfası	114
Şekil A.2: Etik kurul kararı 2. sayfası	115

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> Araştırmada kullanılan cihazların marka, model ve üretici bilgileri.....	21
<b>Tablo 2.2:</b> Araştırmada kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve özellikleri .....	22
<b>Tablo 2.3:</b> Deney tüplerine eklenen bileşenler .....	28
<b>Tablo 2.4:</b> Genotoksisite testlerinde kullanılan başlıca tampon bileşenleri .....	28
<b>Tablo 3.1:</b> Bitki Ekstraktlarının LC-MS/MS Analizi Sonuçları.....	37
<b>Tablo 3.2:</b> <i>Salvia</i> türlerine ait su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının DPPH testi kullanılarak belirlenen IC <sub>50</sub> değerleri.....	38
<b>Tablo 3.3:</b> <i>Salvia</i> türlerine ait su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının ABTS <sup>+</sup> testi kullanılarak belirlenen IC <sub>50</sub> değerleri.....	39
<b>Tablo 3.4:</b> <i>Salvia</i> türlerinin su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının FRAP testi ile belirlenen Trolox eşdeğeri antioksidan kapasiteleri .....	39
<b>Tablo 3.5:</b> Mikronükleus testi sonuçları .....	43
<b>Tablo 3.6:</b> <i>Salvia</i> türlerinin kromozomal aberasyon profili ve mitotik aktivite düzeyleri .	45
<b>Tablo 3.7:</b> <i>Salvia</i> türlerine ait su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarında gerçekleştirilen SMART testi sonuçları.....	46
<b>Tablo 3.8:</b> <i>In vivo</i> FRAP testi sonuçları.....	52
<b>Tablo 3.9:</b> <i>Salvia</i> türlerinin farklı çözücü ekstraktlarının <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> suşlarına karşı inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri .....	59

## SEMBOL LİSTESİ

<b>ABTS<sup>+</sup></b>	: 2,2-(azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit))
<b>Cyt-B</b>	: Sitokalsin-B
<b>DPPH</b>	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
<b>FBS</b>	: Fetal bovine serum
<b>FRAP</b>	: Ferrik İndirgeme Antioksidan Gücü
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>IC<sub>50</sub></b>	: İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>KA</b>	: Kromozom aberasyon
<b>KCl</b>	: Potasyum klorür
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Monopotasyum fosfat
<b>Mİ</b>	: Mitotik indeks
<b>MİK</b>	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
<b>MNi</b>	: Mikronükleus
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	: Disodyum fosfat
<b>ND</b>	: Not detected (tespit edilmedi)
<b>NDI</b>	: Nükleer bölünme indeksi
<b>NK</b>	: Negatif kontrol
<b>Pen/Strep</b>	: Penisilin/ Streptomisin
<b>PK</b>	: Pozitif kontrol
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen çeşitleri
<b>SMART</b>	: Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimimin her aşamasında bilgisi, vizyonu ve akademik rehberliğiyle bana yol gösteren, tüm laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan, her konuda desteğini esirgemeyen, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a en derin şükranlarımı sunarım.

Bilimsel araştırma sürecine olan bakışımı şekillendirmemde büyük katkısı olan, pozitif tutumuyla motivasyonumu artıran ve her zaman desteğini hissettiğim değerli eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Begümhan YILMAZ KARDAŞ'a gönülden teşekkür ederim.

Akademik sürecim boyunca bilgi birikimi ve desteğiyle çalışmama anlamlı katkılar sağlayan, varlığıyla her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Emin DİKEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme sürecinde yapıcı eleştirileri, yönlendirici katkıları ve her daim verdikleri destekle yanımda olan; çalışmamın gelişimine anlamlı katkılar sunan değerli hocalarım Prof. Dr. Tuncay DİRMENCİ ve Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARASAKAL'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam kapsamında kullanılan bitki örneklerinin temininde ve teşhisinde değerli katkılar sunan Doç. Dr. Mikail AÇAR'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük memnuniyet duyduğum, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak her aşamada desteklerini esirgemeyen; iş birliği ve dayanışmalarıyla laboratuvar sürecini benim için çok daha kolay ve anlamlı hâle getiren kıymetli ekip arkadaşlarım Uzm. Kardelen SEZGİN BEYDİLLİ, Sertap KARABAŞ, Uzm. Sibel ATAY ve Dr. Zübeyde Nur YALÇIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Öğretmenlik görevimi sürdürürken tez çalışmalarımı yürütebilmem için gerekli anlayışı ve desteği sağlayan Şule Yüksel Şenler Kız Anadolu İmam Hatip Lisesi idarecilerine ve her zaman yanımda olan değerli meslektaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Zorlu anlarda motivasyonumu artıran, desteğini hissettiren ve yanımda olduklarını her daim gösteren tüm dostlarıma ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tez sürecinde sabırları, anlayışları ve sevgileriyle bana her zaman güç veren; desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli annem Tülay KARAARSLAN, babam Fikret KARAARSLAN ve kardeşim İrem BAŞALOĞLU başta olmak üzere tüm aileme; her anımda yanımda olan sevgili eşim Ufuk ile canım çocuklarım Beren ve Kartal'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2026**

**Hanife Didem KARAKUŞ**

# 1.GİRİŞ

Türkiye'nin sahip olduğu coğrafi konum, iklimsel çeşitlilik, farklı toprak tipleri ve topografik özellikler, ülkedeki bitki örtüsünün oldukça zengin ve çeşitli olmasına katkı sağlamaktadır. Türkiye florası, Asteraceae, Rosaceae, Fabaceae ve Lamiaceae gibi tür bakımından zengin familyaları içermektedir [1]. Bu çeşitlilik, araştırmalar açısından önemli potansiyel barındırmaktadır.

Biyoteknoloji alanındaki son gelişmeler, tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin taşıdığı biyolojik önemin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. İnsanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan bu bitkiler, bünyelerinde barındırdıkları biyoaktif bileşenler sayesinde günümüzde hastalıkların önlenmesinde, tedavisinde ve yeni farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde kullanılmaya devam edilmektedir [2]. Lamiaceae familyası, zengin sekonder metabolit içeriğiyle (örneğin terpenoidler, flavonoidler, fenolik bileşikler ve uçucu yağlar) dikkat çekmektedir [3].

Sekonder metabolitler, bitkilerin çevresel stres faktörlerine karşı uyum sağlamasında, savunma sistemlerinin etkinleşmesinde, metabolik süreçlerin düzenlenmesinde ve stres toleransının artırılmasında temel işlevlere sahiptir [4]. Bitkisel kaynaklı ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde, sekonder metabolitler önemli bir biyolojik kaynak olarak öne çıkmaktadır. Alkaloidler, flavonoidler ve terpenoidler gibi bu bileşik grupları; antikanser, antioksidan ve antibakteriyel gibi çok çeşitli terapötik etkiler göstermektedir. Yapılan bilimsel çalışmalar, her yıl yeni sekonder metabolitlerin tanımlandığını ve bunların bir kısmının klinik kullanıma girdiğini ya da antikanser tedavilerinde deneme aşamasına ulaştığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu bileşiklerin moleküler yapılarında yapılan modifikasyonlar; etkinliklerini ve hedef seçiciliğini artırmakla kalmayıp, toksisite ve yan etki profillerinin azaltılmasına da katkı sağlamaktadır [5].

## 1.1 Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri

Lamiaceae, halk arasında "nane ailesi" olarak bilinen, aromatik ve tıbbi özellikleriyle tanınan kozmopolit bir bitki familyasıdır [6], [7]. Yaklaşık 236 cins ve 7200 türüyle, kapalı tohumlu bitkiler arasında altıncı en büyük familya konumundadır [8], [9]. Lamiaceae familyasına ait türler, ekonomik değerlerinin yanı sıra kapsamlı farmakolojik özellikleriyle de dikkat çekmektedir [10]. Yayılım açısından ağırlıklı olarak yaz mevsiminde yağış alan bölgelerde görülmekte; habitat tercihleri ise kuru alanlar, ormanlık bölgeler ve çayırlıklar gibi çeşitli

ekosistemleri kapsamaktadır. Bu familyanın tür çeşitliliği özellikle Akdeniz havzasında yoğunlaşmakta olup, Avustralya, Güneybatı Asya ve Güney Amerika gibi farklı kıtalarda da temsil edilmektedir [11].

Lamiaceae familyasına ait türler, diş ve ağız sağlığı ürünlerinde, antispazmodik, aromatik, sindirimi kolaylaştırıcı, karminatif, galaktagog (süt artırıcı), mide yatıştırıcı ve baş ağrısı, ishal, öksürük ile kabızlık gibi çeşitli rahatsızlıkların geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır [12], [13], [14], [15]. Familyaya ait bazı bitkiler aynı zamanda süs bitkisi olarak değerlendirilmektedir. Bu bitkilerde yüksek oranda bulunan uçucu yağlar, tıbbi ve kozmetik alanlardaki uygulamalarda önemli rol oynamaktadır [16]. 113 flavonoid, 26 yağ kökenli bileşik ve 15 sterol de dahil olmak üzere çeşitli ikincil metabolitler içermektedir. Bu kimyasal bileşenler, familyanın antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral gibi biyolojik aktivitelerini desteklemekte ve tıbbi kullanımlardaki önemini ortaya koymaktadır [17].

### **1.1.1 *Salvia* türleri hakkında genel bilgi**

*Salvia* L. cinsi, Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasına ait, çoğunluğu tıbbi özelliklere sahip otsu bitkiler ve çalılardan oluşan yaklaşık 900 tür içermektedir. Halk arasında adaçayı olarak bilinen bu cinsin üyeleri, genellikle kuru ve kurak topraklarda yetişme eğilimindedir. *Salvia* türleri, kare kesitli gövdeleri ile karşılıklı dizili aromatik yaprakları sayesinde karakteristik bir morfolojik yapı sergilemektedir [18].

Son yıllarda *Salvia* türleri üzerine gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar, bu bitkilere yönelik küresel ilginin belirgin şekilde arttığını ortaya koymaktadır. Pek çok *Salvia* türü; kozmetik, parfümeri ve farmasötik sanayilerde çeşitli amaçlarla kullanılmakta olup, bazı türleri süs bitkisi olarak da kültüre alınmaktadır [19]. Ayrıca, bazı *Salvia* tohumlarının Orta ve Güney Amerika'da geleneksel bir besin kaynağı olarak değerlendirildiği bilinmektedir [20]. Bununla birlikte, belirli *Salvia* türleri bazı *Lepidoptera* (kelebek ve güve) larvaları için de besin bitkisi işlevi görmektedir [21]. Ekonomik değerlerinin ötesinde, *Salvia* türleri antik dönemlerden bu yana farklı kültürlerde halk hekimliği uygulamalarında yaygın biçimde kullanılmıştır. Bu türlerin antidiyabetik, antitümör, antiplazmodiyal ve antiinflamatuvar gibi biyolojik aktiviteler sergilediği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir [22]. Ayrıca çay, merhem, tentür ve ekstrakt formlarında hazırlanarak analjezik, balgam ve gaz söktürücü, sedatif, anhidrotik ve yara iyileştirici etkilerinden yararlanılmıştır. Soğuk algınlığı, bronşit,

tüberküloz, adet düzensizlikleri ile mide ve sindirim sistemi rahatsızlıklarının semptomatik tedavisinde geleneksel olarak değerlendirildiği bilinmektedir [23].

*Salvia* türlerinden elde edilen sekonder metabolitlerin çok yönlü biyolojik aktiviteler sergilediği; antimikrobiyal, antioksidan, antikanser ve nörolojik etkiler de dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik yelpazede değerlendirildiği bilimsel çalışmalarla desteklenmiştir [2].

#### **1.1.1.1 *Salvia candidissima* Vahl subsp. *candidissima***

*Salvia candidissima* Vahl subsp. *candidissima*, Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasına ait, 700 ila 2000 metre arasındaki yüksekliklerde, Orta ve Doğu Anadolu bölgelerinde doğal olarak yetişen, çok yıllık otsu bir taksondur [24].

Doğu Anadolu bölgesinde halk arasında “Galabor” adıyla anılmaktadır. Geleneksel kullanımlarına bakıldığında, özellikle nezle gibi üst solunum yolu rahatsızlıklarında tercih edildiği görülmektedir. Bu amaçla, bitkinin yapraklarıyla hazırlanan infüzyon (çay) içilerek uygulanır [25].



**Şekil 1.1:** Çalışmada kullanılan *S. candidissima* subsp. *candidissima* alt türünün fotoğrafı

### 1.1.1.2 *Salvia multicaulis* Vahl

*Salvia multicaulis* Vahl., Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasına ait, Türkiye ve çevresinde yaygın olarak bulunan çok yıllık otsu bir bitkidir [26]. *Salvia multicaulis*; Türkiye’de başta Mardin, Siirt, Elazığ ve Şanlıurfa olmak üzere Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yoğunlaşan, dünya genelinde ise Batı Asya’dan Orta Doğu’ya kadar geniş bir coğrafyaya yayılan bir türdür. Kalkerli zeminler, kayalık yamaçlar ve step alanları gibi zorlu habitat koşullarına adaptasyon sağlayan bu tür; halk arasında Pune, Kürt reyhanı, çok dallı adaçayı, dağ çayı, süt otu, bozkulak ve giyacılık gibi çeşitli yöresel isimlerle tanınmaktadır [27].

*S. multicaulis*, odunsu rizomdan gelişen, yoğun örtü oluşturan ve genellikle 12 ila 55 cm yüksekliğe ulaşan, dik gövdeye sahiptir. Çiçek taç yaprakları genellikle pembemsi mor tonlarında olmakla birlikte nadiren beyaz renkte de olabilir. Bu bitki türü, 550 ila 2600 metre arasındaki rakımlarda; kireçtaşı, volkanik kayalar, şist ve kumlu yamaçlar gibi taşlık alanlarda doğal olarak yetişir. *S. multicaulis*’in; iştah açıcı, gargara olarak kullanımı, solunum ve idrar yolu rahatsızlıklarının giderilmesi, öksürük, halsizlik, mide problemleri, boğaz enfeksiyonları (farenjit, bademcik iltihabı), diyabet, bronşit ve astım gibi çeşitli sağlık sorunlarında destekleyici olarak kullanıldığı; ayrıca doğal antibiyotik etkisi, bağışıklık sistemini güçlendirme, sinir sistemini yatıştırma ve sindirimi kolaylaştırma gibi farmakolojik etkiler gösterdiği bildirilmiştir [28].



**Şekil 1.2:** Çalışmada kullanılan *S. multicaulis* türünün fotoğrafı

### 1.1.1.3 *Salvia suffruticosa* Montbret & Aucher ex Benth.

*Salvia suffruticosa* Montbret & Aucher ex Benth., Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait, çalimsı yapıda gelişen çok yıllık bir bitkidir. Doğal yayılış alanı İran'ın batı ve kuzeybatı bölgeleri olmakla birlikte, Ermenistan, Irak ve Suriye'de de yetişmektedir. Türkiye'de ise İç, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde başta Ankara, Kayseri, Niğde, Elazığ, Malatya ve Van illeri olmak üzere geniş bir yayılış sergilemektedir. Bu türe ait toprak üstü kısımlar, bazı salatalar ve çeşitli yiyeceklerin hazırlanmasında kullanılmaktadır [29]. Ayrıca halk arasında "Kalınşalba" adıyla da anılmaktadır [30].



Şekil 1.3: Çalışmada kullanılan *S. suffruticosa* türünün fotoğrafı

### 1.1.1.4 *Salvia syriaca* L.

*Salvia syriaca* L., Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasının çok yıllık şifalı bir bitki türü olarak, başta Akdeniz, İran-Turanya ve Sahra-Arap fitocoğrafik bölgelerinde, özellikle de Ürdün florasında yayılış göstermektedir [31]. Bu tür, serpantin topraklar, yol kenarları ve yamaçlar gibi farklı ekolojik alanlarda gelişebilmekte olup, geniş çevresel toleransı sayesinde çeşitli habitatlara uyum sağlayabilmektedir [32]. Halk arasında "Çevlikotu" olarak bilinmektedir [30].



**Şekil 1.4:** Çalışmada kullanılan *S. syriaca* türünün fotoğrafı

## 1.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel metabolizmanın doğal bir yan ürünü olarak ortaya çıkan ve çeşitli biyokimyasal süreçlerde sinyal iletimi işlevi gören moleküllerdir. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve singlet oksijen bu gruba örnek olarak gösterilebilir. Düşük ve kontrollü düzeylerde ROS; hücre sinyalizasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi fizyolojik süreçlerde görev alırken, aşırı üretimleri oksidatif stres oluşturarak DNA, protein ve lipitlerde hasara yol açabilir ve böylece hücrel işlev bozukluklarına ve çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir [33-35].

ROS oluşumu hem endojen hem de ekzojen faktörlerden ileri gelmektedir. Endojen olarak özellikle mitokondride oksidatif fosforilasyon sırasında üretilirken [36], [37], ultraviyole radyasyonu, çevresel kirlenmeler, ağır metaller ve bazı ilaçlar gibi dış stres faktörleri de ROS düzeylerini artırabilir. Ayrıca bağışıklık sistemi hücreleri olan monositler ve makrofajlar, enflamatuar süreçlerde yüksek miktarda ROS üreterek oksidatif stresin artışına katkıda bulunur [38], [39]. Hücrel korumada rol oynayan endojen antioksidan savunma mekanizmaları bu moleküllerin zararlı etkilerini sınırlamaya yöneliktir. Bu sistemin enzimatik bileşenleri serbest radikalleri detoksifiye eden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi enzimlerden oluşurken; enzimatik olmayan bileşenleri vitamin C, vitamin E, glutatyon ve flavonoidlerdir. Bu faktörler birlikte çalışarak oksidatif hasarı azaltır ve hücrel bütünlüğün korunmasına katkı sağlar [40].

### **1.2.1 Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), DNA, lipitler ve proteinler gibi biyomoleküllerle etkileşime girebilen bir reaktif oksijen türüdür [41]. Hücrelerdeki çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçler üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [42]. Yaşlanma süreciyle birlikte oksidanların yanı sıra oksidatif olarak değişime uğramış protein, lipit ve DNA düzeylerinde artış görüldüğünü ortaya koyan çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu bulgular, hidrojen peroksit gibi oksidanların DNA üzerinde yapısal değişiklikler oluşturarak genotoksik etkilere neden olabileceğini göstermektedir [43].

Hidrojen peroksit, tümörler, bakteriyel enfeksiyonlar, periodontal hastalıklar, inflamasyon, kardiyovasküler bozukluklar ve kemik yaralanmaları dahil olmak üzere pek çok hastalığın başlangıcı ve ilerleyişi ile ilişkilendirilmektedir [44]. Özellikle aşırı üretildiğinde, ikincil reaktif türler oluşturarak oksidatif stres ve doku hasarına yol açması, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, kanser ve yaşlanma gibi çeşitli patofizyolojik süreçlere katkıda bulunur [45]. Bu nedenle, oksidatif stresin olumsuz etkilerini dengelemek için antioksidan savunma sistemleri temel bir rol üstlenir.

### **1.3 Antioksidanlar**

Antioksidanlar, vücutta endojen olarak sentezlenen ya da ekzojen yollarla alınan bileşikler olup, reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasarı önleyen veya azaltan maddelerdir. Bu bileşikler, hücresel düzeyde oksidatif stresin etkilerini hafifletmeye katkı sağlar [2,46].

Oksidatif stres; kanser, otoimmün bozukluklar, yaşlanma, katarakt, romatoid artrit, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok kronik ve dejeneratif hastalığın patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. İnsan organizması, oksidatif stresle başa çıkabilmek için doğal olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar sentezlemekte ya da bu bileşikleri besinler ve takviyeler yoluyla dışarıdan almaktadır [47]. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRx) yer almaktadır. Bu enzimlerden SOD, serbest radikallere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında ise bazı vitaminler ve glutatyon gibi bileşiklerin yanı sıra, bitkisel kaynaklı flavonoidler ve fenolik asitler de yer almaktadır [40], [47], [48].

Bitkilerde doğal olarak bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenoidler ve uçucu yağlar gibi sekonder metabolitlerin antioksidan etkileri, bu tür bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin araştırılmasını önemli hâle getirmiştir [48]. Bu sebeple, hem farmasötik uygulamalarda hem de gıda ve kozmetik endüstrisinde bu bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin kantitatif olarak belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu amaçla, yaygın olarak kullanılan *in vitro* spektrofotometrik yöntemler arasında DPPH, ABTS<sup>+</sup> ve FRAP testleri yer almaktadır [49].

### **1.3.1 DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi**

DPPH testi, bileşiklerin, özellikle de fenolik yapıdaki maddelerin serbest radikal giderme kapasitelerini belirlemede yaygın olarak kullanılan, pratik, ekonomik ve hızlı bir yöntemdir. Bu test aracılığıyla, örneklerin antioksidan potansiyelleri kantitatif olarak değerlendirilebilmektedir [50].

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) molekülü, yapısında delokalize tek bir elektron bulundurması nedeniyle stabil bir serbest radikal olarak tanımlanır ve karakteristik olarak derin mor bir renk sergiler. Antioksidan özellik gösteren bir bileşik ile etkileşime girdiğinde, bu serbest radikal bir elektron alarak indirgenir ve renk değişimi meydana gelir. Bu dönüşüm sonucunda mor renk sarıya döner ve bu renk değişimi, genellikle 517 nm (alternatif olarak 525 nm) dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlenerek nicel analiz gerçekleştirilir. Elde edilen veriler genellikle % inhibisyon ya da IC<sub>50</sub> (yarı maksimal inhibitör konsantrasyon) cinsinden ifade edilir. IC<sub>50</sub> değeri ne kadar düşükse, antioksidan kapasite o kadar yüksektir [49], [51], [52]. Bu yöntem; flavonoidler, polifenoller ve fenolik asitler gibi bileşiklerin antioksidan kapasitelerini belirlemede ve gıda, farmasötik, kozmetik ürünlerin kalite kontrolünde yaygın şekilde kullanılmaktadır [53].

### **1.3.2 ABTS (2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) yöntemi**

ABTS testi, bitki özlerinde bulunan antioksidan bileşiklerin serbest radikalleri giderme kapasitelerini belirlemek amacıyla kullanılan yaygın ve duyarlı bir analiz yöntemidir. Bu yöntem sayesinde, çeşitli fitokimyasalların oksidatif stresle ilişkili biyolojik hasarlara karşı potansiyel koruyucu etkileri değerlendirilebilmektedir [54]. ABTS<sup>+</sup> radikal katyonu, karakteristik olarak mavi-yeşil renkte bir kromofor olup, 645 nm, 734 nm ve 815 nm dalga boylarında belirgin absorpsiyon maksimumlarına sahiptir. Antioksidan bileşikler, bu radikal katyonu indirgediklerinde, renkli yapı renksiz ABTS formuna dönüşür ve bu süreç spektrofotometrik olarak ölçülebilen bir absorbans azalmasıyla kendini gösterir [51], [55].

ABTS testi, yapısal çeşitliliği yüksek antioksidanların değerlendirilmesine olanak tanıyan bir yöntem olup, hem lipofilik hem de hidrofilik özellikteki bileşiklerin (flavonoidler, hidroksisinatlar, karotenoidler ve çeşitli plazma antioksidanları dâhil) radikal giderme aktivitelerini belirlemede etkili bir şekilde kullanılmaktadır [55].

### **1.3.3 FRAP (Ferrik indirgeme antioksidan gücü) yöntemi**

FRAP testi, örneklerin antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla geliştirilen, spektrofotometrik prensiplere dayalı bir yöntemdir [51]. Özellikle bitki ekstraktları, arı ürünleri ve çeşitli biyolojik sıvılarda bulunan antioksidan aktivitenin kantitatif olarak değerlendirilmesinde yaygın biçimde tercih edilmektedir [56].

FRAP testinin çalışma prensibi, düşük pH koşullarında antioksidanların ferrik ( $Fe^{3+}$ )-tripiridiltiazin (TPTZ) kompleksini ferroz ( $Fe^{2+}$ ) forma indirgeme kapasitesine dayanmaktadır [51]. Bu indirgeme reaksiyonu sonucunda koyu mavi renkli bir kompleks meydana gelir ve oluşan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek antioksidan kapasite kantitatif şekilde belirlenir [51], [56].

FRAP yönteminde absorbans değerlerindeki artış, örneğin indirgeme kapasitesinin yükseldiğini göstermektedir [56]. Hesaplamalar, Trolox (E vitamini analogu) veya askorbik asit gibi standart antioksidanlar kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrileri üzerinden yapılır. Elde edilen sonuçlar genellikle Trolox eşdeğeri ( $\mu M$  Trolox/g veya  $mM$   $Fe^{2+}$  eşdeğerleri/kg) ya da askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/mL) şeklinde ifade edilmektedir. Daha yüksek FRAP değerleri, örneğin daha güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir [52].

## **1.4 Hücre Kültürü**

Hücre kültürü, biyomedikal araştırmaların temel araçlarından biri olup, hücrelerin doğal yaşam ortamları dışında belirli ve kontrol edilebilir koşullar altında çoğaltılması ve sürdürülmesi işlemidir. Bu sistemler, özellikle toksisite ve biyolojik aktivite çalışmalarında, canlı hayvan deneylerine alternatif bir yaklaşım olarak önemli bir potansiyele sahiptir [57]. Hücre kültürü sürecinde hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalabilmesi için çeşitli parametrelerin ve çevresel koşulların sürekli olarak izlenmesi gerekmektedir. Bu koşullar arasında hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu destekleyen aminoasitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller, hormonlar, karbondioksit, oksijen ve antibiyotik gibi

besinsel ve biyokimyasal faktörler yer almaktadır. Ayrıca, fizikokimyasal koşullar açısından kültür ortamının pH değeri ve sıcaklığı da düzenli olarak kontrol edilmesi gereken temel unsurlardır [58]. Hücre kültürü, hücre biyolojisinin, doku morfolojisinin, hastalık mekanizmalarının ve ilaç etkilerinin incelenmesinde temel bir yöntemdir. Özellikle sitoprotektif ve antimutajenik etkilerin araştırılmasında, *in vitro* koşullarda güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlaması nedeniyle önemli bir model sistem olarak kullanılmaktadır. İki boyutlu (2B) kültürler, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmaları sebebiyle uzun yıllardır tercih edilirken, üç boyutlu (3B) kültürler hücreler arası etkileşimleri ve *in vivo* koşulları daha gerçekçi yansıtmaları nedeniyle biyomedikal araştırmalarda, ilaç keşfi ve terapötik yaklaşımlarda giderek artan şekilde önem kazanmaktadır [59].

#### **1.4.1 Sitotoksosite**

Sitotoksosite, bir maddenin hücrelerin büyümesini, canlılığını veya proliferasyonunu olumsuz yönde etkileme ya da doğrudan hücre ölümünü indükleme kapasitesini ifade etmektedir [60].

Sitotoksosite (hücre toksisitesi), sentetik ya da doğal kimyasalların, bitki özütlerinin ve çeşitli bileşiklerin hücreler üzerindeki zararlı etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılan önemli bir biyolojik kavramdır. Bu zararlı etkiler; hücrelerin büyüme, canlılık ve proliferasyon süreçlerinin olumsuz yönde etkilenmesi veya doğrudan hücre ölümünün indüklenmesi şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Sitotoksosite çalışmaları, genellikle *in vitro* koşullarda hücre kültürü modelleri kullanılarak yürütülmekte olup, farklı biyolojik aktivitelerin araştırılmasında merkezi bir role sahiptir [61].

Sitotoksosite değerlendirmelerinde kullanılan yöntemler genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik esaslara dayanmaktadır. En yaygın kullanılan kolorimetrik testler, tetrazolyum tuzlarına (MTT, MTS, XTT, WST-1) dayalı yöntemlerdir. Bu testlerde metabolik olarak aktif hücreler, sarı renkli tetrazolyum tuzlarını renkli formazan ürünlerine indirger ve ortaya çıkan renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. Böylece hücrelerin metabolik aktiviteleri üzerinden canlılık ve toksisite düzeyleri belirlenebilir. Bu yöntemler, hem süspansiyon halindeki hücrelerde hem de yüzeye yapışarak büyüyen hücrelerde uygulanabilmektedir [62].

#### 1.4.1.1 MTS testi

Sitotoksisite analizlerinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan MTS testi, tetrazolyum tuzuna dayalı kolorimetrik bir yöntemdir [61]. Bu test, hücre canlılığı ve metabolik aktivitenin değerlendirilmesi yoluyla bir maddenin hücreler üzerindeki olası toksik etkilerini ortaya koymaktadır. Sitotoksisite çalışmaları, özellikle bitki ekstraktları gibi biyolojik kaynaklı test materyallerinin potansiyel toksisite düzeylerinin belirlenmesinde değerli bir ön adım olarak kabul edilmekte; farmasötik ve kozmetik ürünlerin geliştirilmesinde minimum toksisite düzeyinin saptanması açısından önemli bir rol oynamaktadır [49].

MTS testi, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrogenaz enzimlerinin, MTS reaktifini[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H tetrazolyum-inner-salt] indirgemesi esasına dayanmaktadır. Bu indirgenme sonucunda kültür ortamında çözümlü nitelikte renkli bir formazan ürünü oluşur. Ortaya çıkan renk değişimi hücre canlılığı ile doğru orantılıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilir [61].

#### 1.5 Genotoksisite

Genotoksisite, genetik materyalde (DNA ve kromozomlar) değişikliklere neden olabileme kapasitesi olarak tanımlanır. Çoğu zaman 'mutajenite' kavramı ile karıştırılsa da, ikisi arasında önemli bir fark bulunmaktadır. Genotoksisite mutajeniteyi kapsamakla birlikte, her genotoksik etki DNA dizisinde kalıcı genetik değişikliklere yol açmayabilir. Bu bağlamda genetik toksisite; çekirdek, kromozom veya DNA yapısında meydana gelen yapısal ve fonksiyonel bozulmalar şeklinde tanımlanmaktadır [60], [63], [64]. Günümüzde en sık kullanılan genotoksisite testleri arasında mikronükleus testi, kromozomal aberasyon testi, gen mutasyon testleri ve kuyruklu yıldız testi (Comet) yer almaktadır [65].

##### 1.5.1 *In vitro* genotoksisite test sistemleri

*In vitro* genotoksisite testleri, kimyasal veya biyolojik maddelerin hücre kültürü ya da mikroorganizma sistemlerinde neden olabileceği DNA ve kromozomal hasarların değerlendirilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerdir. Bu testlerde kullanılan sistemler, hızlı uygulanabilirlikleri, düşük maliyetleri ve etik açıdan avantajlı olmaları nedeniyle genotoksisite araştırmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir. Genetik hasarlar,

mutasyonlar, kromozom aberasyonları veya DNA zincir kırıkları gibi parametreler üzerinden değerlendirilmektedir. *In vitro* yöntemler, erken tarama ve ön değerlendirme amacıyla önemli bilgiler sunmakta, ancak organizma içindeki metabolizma ve biyotransformasyon süreçlerini tam olarak yansıtamadıkları için genellikle *in vivo* testlerle tamamlanmaktadır.

#### **1.5.1.1 Mikronükleus testi**

Mikronükleus (MN) testi, hücrelerin genetik materyalinde meydana gelen hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir genotoksisite testidir. Mikronükleus oluşumunun kökeni, hücre bölünmesi sırasında anafazda iğ ipliklerine bağlanamayan ve geride kalan (lagging) kromatinlerden kaynaklanmaktadır. Bu kromatin parçaları, sitokinez sonrasında çekirdekten bağımsız küçük çekirdekçikler (mikronükleuslar) şeklinde ortaya çıkar. Bu nedenle mikronükleuslar, yavru hücrelerin sitoplazmalarında ana çekirdekle benzer morfolojik ve boyanma özelliklerine sahip, belirgin şekilde ayrı küçük küresel yapılar olarak tanımlanmaktadır [60].

Mikronükleus testi, farklı hücre tiplerine uygulanabilen, hızlı ve pratik bir genotoksisite yöntemidir. Kültür ortamında mikronükleus oluşum oranındaki artış, somatik hücrelerde genomik instabilitenin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [66].

#### **1.5.1.2 Kromozom aberasyon testi**

Kromozom aberasyon (CA) testi, hücrelerin genetik materyalinde ortaya çıkan yapısal ve sayısal değişikliklerin değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir genotoksisite yöntemidir. Bu test, genotoksik ajanlara maruz kalma sonucu meydana gelen kromozomal hasarların saptanmasında ve potansiyel karsinojenlerin güvenlik risk değerlendirmesinde kritik bir öneme sahiptir [67], [68]. Kromozom aberasyon analizi ile değerlendirilen periferik kan lenfositlerindeki (PBL) yapısal değişiklikler, 30 yılı aşkın süredir genotoksik karsinojenlere maruziyetin erken biyolojik belirteçleri olarak kullanılmaktadır [60]. Lenfosit hücreleri, kolay elde edilebilmeleri, uzun ömürlü olmaları ve dolaşım sırasında farklı dokulardan geçerken genetik hasar biriktirme potansiyelleri nedeniyle genotoksisite testlerinde sıklıkla tercih edilmektedir [69].

Genetik hastalıklar veya genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda kromozomal hasarın meydana gelebileceği artık iyi bilinmektedir. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan

çalışmalar, kromozom aberasyonlarının kanser gelişimi ile ilişkili biyolojik göstergeler olduğunu ortaya koymuştur [70]. Bu nedenlerle CA testi, hem temel araştırmalarda hem de toksikolojik güvenlik değerlendirmelerinde genotoksisiteyi ortaya koymak için yaygın olarak kullanılan en önemli testlerden biri olarak kabul edilmektedir.

### **1.5.2 *In vivo* genotoksisite test sistemleri**

*In vivo* genotoksisite testleri, kimyasal ve biyolojik ajanların canlı organizmalarda DNA ve kromozomlar üzerinde yol açabileceği hasarları değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bu testler, maddenin organizma içinde metabolize edilmesi ve biyolojik süreçlere katılması nedeniyle *in vitro* sistemlere kıyasla daha gerçekçi sonuçlar sunar. Genetik hasarlar mikronükleus, kromozom aberasyonu, gen mutasyonu ve comet (kuyruklu yıldız) testleri ile değerlendirilebildiği gibi, somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri (SMART) de bu alanda yaygın olarak kullanılan önemli yöntemlerden biridir. *In vivo* sistemler, doğal metabolik süreçleri ve hücrel etkileşimleri bütüncül biçimde yansıtılmaları açısından avantaj sağlarken, uzun süre gereksinimi ve yüksek maliyet gibi dezavantajlara sahiptir.

#### **1.5.2.1 Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi**

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), genetik hasarın farklı türlerini değerlendirerek genotoksisiteyi ortaya koyan kapsamlı bir yöntemdir. Bu test, canlı organizma için çeşitli kimyasal maddelerin neden olabileceği mutasyon, delesyon, kromozomal sapma, gen dönüşümü ve nadir görülen mitotik rekombinasyon gibi olayları tespit etmektedir. Özellikle mitotik rekombinasyon sonucu heterozigotluk kaybı ile oluşan mutant klonların *Drosophila* kanatlarında gözlemlenmesi, yöntemin temelini oluşturmaktadır [71], [72], [73], [74].

SMART testinin en önemli avantajları arasında, *Drosophila melanogaster*'in kolay ve düşük maliyetle üretilmesi, kısa yaşam döngüsü sayesinde hızlı sonuç elde edilebilmesi ve farklı genetik soy hatlarının kullanılabilmesi yer almaktadır. Ayrıca insan ile birçok temel genetik mekanizmayı paylaşması, bu türü genotoksisite araştırmaları için güçlü bir model organizma haline getirmektedir. Testin yüksek güvenilirlik, tekrarlanabilirlik ve farklı kimyasal ya da biyolojik ajanların etkilerini ayırt etme kapasitesi, SMART yönteminin mutajenite ve antigenotoksisite çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir [75], [76], [77]. SMART testinin güçlü yönlerine rağmen bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Test

yalnızca somatik hücrelerde meydana gelen genetik değişiklikleri değerlendirmekte, dolayısıyla germ hücrelerine ait mutasyonları doğrudan yansıtmamaktadır.

Ayrıca bazı kimyasal maddeler metabolik aktivasyon olmadan etkilerini ortaya koyamayabilir, bu da testin duyarlılığını sınırlayabilmektedir.

## **1.6 *In vivo* Toksikolojik Etkilerin Belirlenmesi**

*In vivo* toksikolojik testler, kimyasal veya biyolojik maddelerin canlı organizmalar üzerindeki potansiyel zararlı etkilerini değerlendirmek için kullanılan temel yöntemlerdir. Bu yaklaşımda, test edilecek numuneler belirli doz rejimlerinde model organizmalara (örneğin fare, sıçan, zebra balığı ve meyve sineği gibi) uygulanmakta ve elde edilen sonuçlar maddenin toksisite düzeyi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır [51].

### **1.6.1 Model organizma olarak *Drosophila melanogaster***

Meyve sineği (*Drosophila melanogaster*), insan hastalıklarının moleküler mekanizmalarını incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılan güçlü bir genetik model organizmadır. Memeli canlılar ile *D. melanogaster* arasında birçok temel biyolojik, fizyolojik ve nörolojik özelliğin korunmuş olması, bu türün model sistem olarak önemini artırmaktadır. Nitekim insan hastalıklarına neden olan genlerin yaklaşık %75'inin *D. melanogaster*'de işlevsel homologlarının bulunması, bu organizmayı biyomedikal araştırmalarda vazgeçilmez kılmaktadır [77].

*D. melanogaster*, ortalama 3 mm uzunluğunda, sarımsı kahverengi gövdeye sahip küçük bir türdür. Dölllenmiş yumurtadan ergin bireyin oluşumuna kadar geçen yaşam döngüsü yaklaşık 10 gün sürmekte olup, toplam yaşam süresi kültür koşullarına bağlı olarak 50–80 gün arasında değişmektedir. Kısa yaşam döngüsü sayesinde genetik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde yapılan araştırmalarda kısa sürede çok sayıda birey elde edilebilmektedir. Ayrıca embriyo, larva, pupa ve ergin evrelerinin tamamının farklı deney düzeneklerinde model olarak kullanılabilmesi, *D. melanogaster*'i çok yönlü bir araştırma organizması haline getirmektedir. Bu avantajları sayesinde toksikoloji ve genotoksisite çalışmalarında güvenilir bir *in vivo* model olarak tercih edilmektedir [78], [79].

## **1.7 Antibakteriyel Aktivite**

Antimikrobiyal aktivite, mikroorganizmaların çoğalmasını engelleme veya onları ortadan kaldırma kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde antibiyotiklere karşı gelişen

direnç, acil bir küresel sağlık sorunu haline gelmiş olup, bu durum yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine olan ihtiyacı artırmaktadır. Bu bağlamda, bitki kökenli bileşikler doğal, güvenilir ve etkili alternatifler olarak öne çıkmaktadır [2], [48], [49], [60], [80].

Özellikle flavonoidlerin antibakteriyel aktiviteleri, halk hekimliğinde uzun süredir kullanılmakta olan bitkilerden elde edilen ekstraktların *in vitro* koşullarda kapsamlı şekilde incelenmesiyle bilimsel olarak da giderek daha fazla ortaya konulmaktadır [80].

Doğal kaynaklardan elde edilen fitokimyasallar, alternatif veya tamamlayıcı tedavi seçenekleri olarak yoğun ilgi görmektedir. Bitkilerden izole edilen ekstraktlar ve sekonder metabolitler, antimikrobiyal potansiyelleri sayesinde hem geleneksel tıpta hem de modern farmasötik uygulamalarda yaygın olarak değerlendirilmektedir [81]. Bitki bazlı antibakteriyel ajanların etkinliği, özellikle fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenoidler ve alkaloidler ile ilişkilendirilmektedir. Bu bileşikler; hücre zarında geçirgenlik değişikliklerine yol açarak, enzim fonksiyonlarını inhibe ederek ya da genetik materyali doğrudan etkileyerek antimikrobiyal aktivite göstermektedir [80]. Özellikle Gram pozitif bakteriler, hücre duvarı yapılarının farklılığı nedeniyle bitki ekstraktlarına karşı daha duyarlı olabilmektedir [82].

Bitkisel ürünlerin antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan yöntemler arasında disk difüzyon, agar dilüsyon ve mikrodilüsyon teknikleri yer almaktadır. Bu yöntemlerde, bakteriyel büyüme inhibisyon zonları veya minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ölçülerek biyolojik aktivite düzeyi belirlenmektedir [83]. Dolayısıyla, bitkisel kaynaklı bileşiklerin antibakteriyel potansiyellerinin araştırılması, antibiyotik direncine karşı yeni ve güvenilir tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde önemli bir katkı sağlamaktadır.

## 1.8 Literatür Özeti

Literatüre bakıldığında *Salvia candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türleri ile ilgili sitotoksik ve genotoksik çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Rustaie ve arkadaşları tarafından, *S. suffruticosa* toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol, kloroform ve petrol eteri ekstratlarından izole edilen bileşiklerin (lupeol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kafeik asit ve 1-feruloil- $\beta$ -D-glikopiranoz) serbest radikal süpürücü etkileri DPPH metodu ile değerlendirilmiş ve 12  $\mu$ g/mL IC<sub>50</sub> değeri ile kafeik asidin en yüksek aktiviteyi sağladığı bildirilmiştir [29]. Norouzi-Arasi ve arkadaşları

tarafından *S. suffruticosa* toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Uçucu yağın *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* ve *Escherichia coli* üzerinde belirgin aktivite sergilediği ancak *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir [84].

Topçu ve arkadaşları tarafından *Salvia amplexicaulis* Lam., *S. aucheri* Benth., *S. bracteata* Banks & Sol., *S. candidissima*, *S. cassia* Sam. ex Rech.f., *S. eriophora* Boiss. & Kotschy, *S. heldreichiana* Boiss. ex A.DC, *S. hypargeia* Fisch. & C.A.Mey., *S. napifolia* Jacq., *S. pilifera* Montbret. & Aucher ex Benth., *S. recognita* Fisch. & C.A.Mey., *S. staminea* Montbret & Aucher ex Benth., *S. syriaca*, *S. tomentosa* Mill., *S. triloba* Mill. türlerinin sitotoksik aktivitesi ovaryum kanseri hücre hatlarında (A2780) test edilmiştir. En yüksek aktivitenin elde edildiği bitki olan *S. hypargeia* üzerinden biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama çalışmaları yapılarak abietan tipi diterpen, 2 triterpen ve yağ asidi karışımı (%51.6 palmitik asit, %6.4 palmitoleik asit) izole edilmiştir. İzole edilen 6-hidroksisalvinolon ve demetilkriptojanol sırasıyla 3.9 ve 1.2 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleriyle, yağ asidi karışımı ise 0.6 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleriyle A2780 hücre hatlarında en yüksek aktiviteyi sağlayan örnekler olarak belirlenmiştir [85].

Altun ve arkadaşları tarafından *Salvia kronenburgii* Rech.f., *S. multicaulis* ve *S. verticillata* L. toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın ve α-pinen, β-pinen, 1,8-sineol, linalol oksit ve karyofilen oksit maddelerinin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Candida albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağların, *P. aeruginosa* hariç diğer türler üzerinde düşük etki gösterdikleri bildirilmiş, maddeler içerisinde ise en yüksek aktivitenin α-pinen maddesinden elde edildiği bildirilmiştir [86]. Uluben ve arkadaşları tarafından *S. multicaulis* köklerinden izole edilen diterpenoidlerin *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşu üzerinde antitüberküloz aktivitesi test edilmiştir. Multikaulin, 12-demetilmultikaulin, multiortokinon, 12-demetilmultiortokinon, 12-metil-5-dehidrohorminon, 12-metil 5-dehidroasetilhorminon ve salvipimaron bileşiklerinin tamamının anlamlı aktivite gösterdiği, 12-demetilmultikaulin, 12-demetilmultiortokinon, 12-metil-5-dehidrohorminon ve 12-metil-5-dehidroasetil-horminonun ise en etkili bileşikler oldukları belirlenmiştir [87]. Gharenaghadeh ve arkadaşları tarafından *S. multicaulis* uçucu yağının ve uçucu yağın nanoemülsiyon formunun antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Nanoemülsiyon

formunun normal uçucu yağa kıyasla belirgin olarak daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir [88]. Bahadori ve arkadaşları *S. syriaca* toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ ile toprak üstü kısımlarından hazırlanan n-hekzan, diklorometan ve metanol ekstresinin DPPH yöntemi ile serbest radikal süpürücü ve FRAP yöntemi ile demir indirgenme testi üzerindeki etkilerini çalışmış ve uçucu yağın her iki deneyde de yüksek aktivite sergilediği bildirilmiştir [89].

Karamian ve arkadaşları tarafından *S. syriaca* toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın ve metanol ekstresinin etkisi DPPH, metal şelasyon, süperoksit radikal süpürücü aktivite ve  $\beta$ -karoten/linoleik asit deneyleri ile değerlendirilmiştir. Metanol ekstresinin tüm deneylerde kayda değer düzeyde bir aktivite sağladığı bildirilmiştir. *S. syriaca* toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın ve metanol ekstresinin antimikrobiyal etkileri disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Metanol ekstresinin denenen bakterilerin çoğu üzerinde antibakteriyal etki gösterdiği, en güçlü etkiyi *Proteus vulgaris* üzerinde sergilediği gözlenmiştir. Uçucu yağın ise *P. vulgaris* üzerinde aktivite göstermediği ancak *Bacillus cereus* üzerinde aktif olduğu bildirilmiştir [90]. Tosun ve arkadaşları tarafından Türkiye’de Doğu Anadolu’dan toplanan sekiz *Salvia* türünün (*S.aethiopsis* L., *S. candidissima*, *S.limbata* C.A.Mey, *S.microstegia* Boiss & Balansa, *S. nemorosa* L., *S. pachystachys* Trautv, *S. verticillata*, and *S. virgata* Jacq.) metanol ekstreslerinde DPPH ve  $\beta$ -karoten testleri ile antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. *Salvia* türlerinin ekstratlarının toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi ve gallik asit kullanılarak belirlenmiştir. Geniş bir varyasyon gözlemlenmiştir. Türler arasında antioksidan aktivite ve toplam fenolik içerik açısından hem DPPH hem de  $\beta$ -karotende en aktif bitki  $IC_{50}=18.3 \mu\text{g/ml}$  ve %75.8 değeri ile *S. verticillata* olmuştur. Yüksek antioksidan aktivitesi sayesinde gıda endüstrisinde kullanılabilir olduğu rapor edilmiştir [91]. Sung-Sook Cho ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için DPPH ve ABTS'nin radikal temizleme aktivitesi ölçülmüş, DPPH deneyinde, hesperetin, hesperidin ve hesperidin glukozidinin tedavisi, konsantrasyona bağlı bir şekilde DPPH radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. Hesperetin, hesperidin ve hesperidin glukozidinden daha yüksek bir etki göstermiş ve hesperidin ve hesperidin glukozid önemli bir fark göstermemiştir. Ortalama temizleme konsantrasyonu (%50 temizleme temsil eden  $SC_{50}$ ), hesperetin için  $525.18 \pm 1.02 \mu\text{M}$ , hesperidin için  $896.21 \pm 0.15 \mu\text{M}$ , hesperidin glukozidi için  $911.00 \pm 0.14 \mu\text{M}$  iken, pozitif kontrol olarak askorbik asidin  $SC_{50}$ 'si  $61.78 \pm 0.02 \mu\text{M}$  bulunmuştur [92].

Carvalho ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Melissa officinalis* (L.) (Lamiaceae), limon otu olarak bilinen bir bitkide antigenotoksitesini, antimutajenesini ve ayrıca kuyruklu yıldız ve mikronükleus analizi yoluyla genotoksik/mutajenik potansiyelini *in vivo* araştırmıştır. CF-1 erkek fareler, intraperitoneal enjeksiyonla tuzlu su veya Metilmetansülfonat (MMS) dozlarıyla tedaviden önce, 2 hafta boyunca bir *M. officinalis* özütünün etanolik (Mo-EE) (250 veya 500 mg/kg) veya sulu (Mo-AE) (100 mg/kg) çözeltileriyle tedavi edilmiştir. Dozlardan bağımsız olarak, kan ve kemik iliği örneklerinde genotoksik veya mutajenik etki gözlenmemiştir. Mo-EE, alkilleyici ajan (MMS) ile tedavi edilen farelerin kan hücrelerinde tüm dozlarda antigenotoksik bir etki göstereceği, bu Mo-AE için geçerli olmamıştır. Mikronükleus testi, Mo-EE'nin koruyucu etkisini ortaya koymuş, ancak yalnızca en yüksek dozda uygulandığında. *M. officinalis*'in etanolik bir özütünün antigenotoksik/antimutajenik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç da tıbbi açıdan önemli olduğunun bir göstergesi olmuştur [93]. Ghorbani ve arkadaşları; Kim ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, rosmarinik asitin serbest radikal ve reaktif oksijen türlerini temizleyerek biyolojik sistemlerde güçlü bir antioksidan kapasitesi sergilediğini bulmuştur [94], [95].

Sadeghi ve arkadaşları son zamanlarda rosmarinik asitin periferik kan mononükleer hücrelerinde lipopolisakkarit kaynaklı oksidatif hasar ve inflamasyon üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışma, RA aracılı lipid peroksidasyonunda ve NO seviyelerinde düşüş olduğunu ve antioksidan/oksidan dengesinin geri kazanıldığını göstermiştir [96].

Pizzale ve arkadaşları, Exarchou ve arkadaşları, Papageorgiou ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda *Salvia fruticosa* özlerinin antioksidan etkileri ile toplam fenol ve flavonoid düzeyleri ile bazı fenolik bileşenler arasında güçlü bir pozitif ilişki tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda araştırmacılar, bu bitkiye ait uçucu yağlarda bulunan fenolik maddelerin antioksidan aktivitede önemli rol oynadığını belirtmişlerdir [97], [98], [99].

Papageorgiou ve çalışma arkadaşları, bitkilerde fenolik bileşiklerin sentezlenmesi ve birikiminin; sıcaklık, nem ve yağış gibi çevresel faktörlerin etkileşimine bağlı olarak artış ya da azalma gösterebildiğini bildirmiştir [99].

Urek ve arkadaşları, İzmir yöresinden temin edilen *Salvia fruticosa* Mill. bitkisinin yaprak ve çiçek ekstraktlarında toplam fenolik içeriklerin incelenen *Polygonum cognatum* Meissn, *Salvia officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. ve *Origanum vulgare* L.

türlerinininkinden daha yüksek olduğu; yaprak ekstraktındaki hidroksil radikali süpürme kapasitelerinin (%) ise *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* ve *Thymus vulgaris* ekstrelerine kıyasla yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Yaprak ve çiçek ekstraktları arasında yapılan karşılaştırmalı değerlendirmeler, *Salvia fruticosa*'nın yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir [100].

Buna ek olarak, Şenol ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada, 28'i endemik olmak üzere toplam 55 farklı Türk *Salvia* taksonunun antioksidan aktiviteleri analiz edilmiş; elde edilen sonuçlara göre, en yüksek antioksidan etkinlik (%89,23) *S. fruticosa*'nın diklorometan ekstraktlarında gözlemlenmiştir [101]. Literatürde başka *Salvia* türleri ile yapılan çalışmalarda metanol, %80 metanol ve diklorometan özütlerinin antikanser özellikte olduğu bildirilmiştir. *S. eremophila* Boiss ve *S. santolinifolia* Boiss.'in tüm özütleri 1.5-75.2 µg özüt/mL'lik IC<sub>50</sub> değerlerinde sitotoksik aktivite göstermişlerdir [102]. Zare ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada *S. officinalis* özütünün, doz ve zamana bağlı olarak, apoptozise bağlı bir yolak aracılığıyla lenfoma ve lösemik hücrelerin çoğalmasını engellediği bulunmuştur [103]. Ertürk ve arkadaşları; *S. candidissima* subsp. *candidissima* metanol özütünün MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki potansiyel sitotoksik/apoptotik aktivitelerini değerlendiren bir başka çalışmada ise bitkinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin sağ kalımını doza bağlı bir şekilde baskıladığını göstermiştir [104].

### 1.9 Çalışmanın Amacı

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mutajenik özellikleri nedeniyle deneysel modellerde iyi bilinen bir kanser indükleyicisi olup hücrelerde doğal bir oksidatif hasar kaynağıdır. DNA üzerinde tek ve çift zincir kırıkları da dahil olmak üzere çeşitli lezyonlara yol açabilmektedir [67]. Oluşan oksidatif hasarın onarılamaması durumunda bu birikim zamanla artmakta ve diyabet, Alzheimer, kardiyovasküler hastalıklar ve malign tümörler gibi çok sayıda patolojinin gelişiminde rol oynamaktadır [105]. Bu tür oksidatif hasara karşı doğal koruyucuların belirlenmesi, özellikle bitkisel kaynaklı ajanların değerlendirilmesini önemli kılmaktadır. Bitkisel ürünlere yönelik araştırmalarda en temel öncelik, bu ürünlerin güvenilirliğinin belirlenmesidir [106,107]. Türkiye florasında yaklaşık 400 civarında bitkinin tıbbi kullanım potansiyeli bulunduğu bildirilmiştir ve *Salvia* türleri bu bitkiler arasında önemli bir yere sahiptir [28]. Tıbbi bitkilerin genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi yalnızca bu ürünlerin

güvenli pazarlanması açısından değil, aynı zamanda farmasötik ürünlerin ruhsatlandırılması için gerekli klinik öncesi güvenlilik çalışmalarının da ayrılmaz bir parçasıdır. Bunun yanında, genotoksisite testleri, söz konusu bitkilerin olası mutajenik veya karsinojenik risklerinin ortaya konulması açısından da kritik bir rol taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, Türkiye florasında tıbbi önemi bulunan dört farklı *Salvia* türü (*S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa*, *S. syriaca*) seçilerek bu türlerin su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının biyolojik aktiviteleri *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca insan lenfosit kültürlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı oksidatif hasara karşı sitoprotektif ve antijenotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda sitotoksik etkiler MTS testi ile, genotoksik ve antijenotoksik etkiler mikronükleus, kromozom aberasyon testleri ile, antimutajenik/antirekombinojenik etkiler ise SMART kanat spot testiyle *Drosophila melanogaster* üzerinde *in vivo* olarak analiz edilmiştir. Ayrıca, ilgili *Salvia* türlerinin antioksidan kapasiteleri DPPH, ABTS ve FRAP testleriyle, antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon ve MİK yöntemiyle ve fitokimyasal özellikleri LC-MS/MS analiziyle araştırılmıştır. Gelişimsel toksisite ve *in vivo* antioksidan etkiler ise *D. melanogaster* modelinde puparasyon, hayatta kalma ve eklozyon oranları üzerinden analiz edilmiştir. Amacımız, bu *Salvia* türlerinin güvenilirliğini, terapötik potansiyelini ve oksidatif strese karşı koruyucu etkinliğini sistematik olarak ortaya koymaktır.

## 2. MATERYAL - METOT

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Bitki materyallerinin temini

Bu araştırmada kullanılan *Salvia candidissima* subsp. *candidissima*, *Salvia multicaulis*, *Salvia suffruticosa* ve *Salvia syriaca* türleri, çiçeklenme dönemlerinde belirlenen lokalitelerden Doç. Dr. Mikail AÇAR tarafından teşhis edilerek toplanmıştır.

***Salvia candidissima* subsp. *candidissima*:** Tunceli Ovacık arası yol kenarı 5. km, yaklaşık 1000 m, 28-29 Haziran 2020 (39.121075°N, 39.508863°E).

***Salvia multicaulis* :** Tunceli Aktuluk mahallesi, Munzur Üniversitesi kampüs içi açık alanlar ve yol kenarları, 1000 m (39.045467°N, 39.508405°E).

***Salvia suffruticosa*:** Tunceli Atatürk mahallesi, boş tarlalarda, 900 m (39.077282°N, 39.531123°E).

***Salvia syriaca* :** Tunceli Atatürk mahallesi, boş tarlalarda, 900 m (39.077585°N, 39.533380°E).

#### 2.1.2 Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

Araştırma kapsamında kullanılan cihazlar ile kimyasal maddeler ilişkin detaylı bilgiler sırasıyla Tablo 2.1 ve Tablo 2.2' de sunulmuştur.

**Tablo 2.1:** Araştırmada kullanılan cihazların marka, model ve üretici bilgileri

Kullanılan Cihazlar	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Analitik terazi (Denver Instrument)</li><li>• Buzdolabı (+4° C Regal)</li><li>• Buzdolabı (-20° C) (Altus)</li><li>• Biyogüvenlik kabini (Labconco)</li><li>• Etüv (Memmert)</li><li>• Magnetik karıştırıcı (Heidolph)</li><li>• Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre (Thermo Scientific)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 380R)</li><li>• Spektrofotometre (Perkin Elmer Spektrum 100)</li><li>• Su banyosu (Elma Sonic)</li><li>• Otoklav (Hirayama)</li><li>• Saf su cihazı (Human Power I)</li><li>• pH metre (Hanna Instruments)</li></ul>

**Tablo 2.2:** Araştırmada kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve özellikleri

<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• ABTS tuzu</li><li>• 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)</li><li>• Etil Asetat</li><li>• Etil Alkol</li><li>• Eter</li><li>• Fetal Bovin Serum</li><li>• Ficoll-Paque PLUS</li><li>• Glisiyal Asetik Asit</li><li>• Giemsa Boyası</li><li>• Hidrojen Peroksit</li><li>• KCl</li><li>• Kolşisin</li><li>• KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub></li><li>• Metanol</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Müller Hinton Agar</li><li>• Müller-Hinton Broth</li><li>• MTS reaktifi</li><li>• Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li><li>• NaCl</li><li>• NaOH</li><li>• Penisilin/ Streptomisin</li><li>• Phytohemoglutinin</li><li>• RPMI 1640 Besiyeri</li><li>• Sitokalsin B</li><li>• Tripan Mavisi</li><li>• Tetrazolium violet</li><li>• Trolox</li><li>• Luria-Bertani Broth</li></ul>

## 2.2 Metot

### 2.2.1 Bitki örneklerinden ekstrakt elde edilmesi

Havada kurutulan *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* bitkilerinin yaprak ve çiçek kısımları öğütülerek toz haline getirilmiştir. Her bitki örneğinden 50 gram tartılarak, 250 mL'lik su ve %80 konsantrasyonda hazırlanmış 250 mL'lik etanol, metanol ve etil asetat çözücüleri ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Karışımlar, gece boyunca çalkalamalı inkübatörde (150 rpm, 25 ± 2 °C) bekletilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında süzölen çözeltiler, düşük basınç altında döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) kullanılarak konsantre edilmiştir. Böylece, -20 °C'de saklanmak üzere yağlı kıvamda yarı katı ekstraktlar elde edilmiştir [108], [109].

Ekstraksiyon sürecinde çözücü seçimi, özellikle çözünürlük ve seçicilik gibi parametreler dikkate alındığında büyük önem taşır. Ekstrakte edilecek bileşiklerin çözünürlüğü, kullanılan çözücünün polaritesiyle doğrudan ilişkili olup, bu uyum çözücü verimliliğini belirleyen temel etkenlerden biridir. Bu bağlamda, etanol, metanol, su ve aseton gibi çözücüler, bitkisel materyallerden biyoaktif bileşiklerin izole edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Etanol, hem polar hem de apolar bileşenleri çözme kapasitesine sahip olması nedeniyle çok yönlü bir çözücüdür. Özellikle fenolik bileşikler, terpenoidler, lipitler ve yağ asitlerinin ekstraksiyonunda etkili ve güvenli bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Metanol ise yüksek polaritesi sayesinde flavonoidler, alkaloidler, tanenler ve saponinler gibi çeşitli biyoaktif bileşiklerin çözünmesinde yüksek verimlilik sağlar. Ancak, toksik yapısı nedeniyle laboratuvar uygulamalarında dikkatli kullanılmalıdır [110].

### **2.2.2 LC-MS/MS ile bitkisel materyallerin kimyasal bileşimlerinin belirlenmesi**

Fenolik bileşiklerin tayini için, Sifaou ve arkadaşlarının ekstraksiyon metoduna bazı uyarlamalar yapılarak çalışma yürütülmüştür. Her bir örnekten 0.5 gram alınarak, içerisinde %12.7 su, %14.8 etanol ve %72.5 metanolden oluşan toplam 1 mL çözücü eklenmiştir. Karışımlar, 55 °C'de ve 250 rpm hızında çalkalayıcı inkübatörde 60 dakika süreyle tutulmuştur. Işıktan etkilenmemesi için tüpler alüminyum folyoyle kaplanmış ve ekstraktlar +4 °C'de gece boyunca saklanmıştır. Sonrasında çözücüler rotary evaporatör yardımıyla buharlaştırılarak analiz için uygun konsantrasyona getirilmiştir [111].

Fenolik bileşiklerin analizi, Agilent 1260 Infinity sıvı kromatografi sistemi ve Agilent 6420 Triple Quadrupole LC-MS/MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ayrım, C18 ODS kolonu (25 × 4.6 mm, 5 µm partikül boyutu) kullanılarak yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 2 µL, akış hızı ise 0.4 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak, %0.1 formik asit içeren su (solüsyon A) ile metanol (solüsyon B) kullanılmıştır. Bu koşullar altında fenolik bileşiklerin hassas ve seçici analizi sağlanmıştır.

### **2.2.3 Bitkisel ekstraktlarda antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi**

*Salvia* türlerinin antioksidan kapasiteleri, serbest radikallerin etkisini azaltma ve nötralize etme yetenekleri temel alınarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) ve FRAP (Ferrik Redüksiyon Gücü) radikal süpürme yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler, bitki ekstraktlarının radikal süpürme etkinliğini ölçerek, potansiyel antioksidan aktivitelerini ortaya koymuştur.

#### **2.2.3.1 DPPH yöntemi**

*Salvia* türlerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde, serbest radikal giderme esasına dayanan 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, 0.0240 g DPPH tartılarak metanol içerisinde çözdürülmüş ve çözelti hacmi 100 mL'ye balon joje ile tamamlanmıştır. Analiz için, 0.05 mL bitki ekstraktı (stok: 10 mg/mL) [112], 2.5 mL DPPH çözeltisi ve 2.5 mL metanol ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım, oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, absorbans değerleri 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür [113].

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için Paired Student's t-testi uygulanmıştır. Her analiz en az üç biyolojik tekrarla gerçekleştirilmiş, ortalama değerler  $\pm$  standart hata (SE) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiş ve hesaplamalarda Microsoft Office Excel yazılımı kullanılmıştır.

### 2.2.3.2 ABTS yöntemi

*Salvia* türlerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS<sup>+</sup>) radikal süpürme testidir. ABTS<sup>+</sup> radikali, eşit hacimlerde alınan 7 mM ABTS tuzu ve 2.4 mM amonyum persülfat çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Oluşan karışım, radikal oluşumunun tamamlanması amacıyla karanlık ortamda 12-16 saat boyunca bekletilmiştir.

Analiz için, 2.95 mL ABTS<sup>+</sup> çözeltisi ile 0.05 mL bitki ekstraktı (stok: 10 mg/mL) karıştırılarak 3 mL'lik küvetlere aktarılmış ve absorbans değerleri 734 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür [112]. Her örnek için analizler üç biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SE) şeklinde ifade edilmiştir [113]. İstatistiksel değerlendirmelerde Paired Student's t-testi kullanılmış ve  $p < 0.05$  değeri anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir. Hesaplamalar Microsoft Office Excel programı aracılığıyla yapılmıştır.

### 2.2.3.3 FRAP yöntemi

Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem, ferrik redüksiyon antioksidan gücü (FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power) yöntemi testidir. Yöntem, ilgili literatürde belirtilen protokol esas alınarak uygulanmıştır [114]. FRAP reaktifi, 40 mM HCl içinde çözülmüş 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) çözeltisinin, 25 mL asetat tamponu (pH 3.6) ve 20 mM FeCl<sub>3</sub> ile belirli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan nihai çözelti, 1.67 mM Fe<sup>3+</sup> ve 0.83 mM TPTZ içermektedir.

Analizlerde, bitki ekstraktları hazırlanan oksidan çözeltiliye eklenmiş ve ardından 593 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, E vitamininin suda çözünür analogu olan Trolox kullanılarak hazırlanmış ve sonuçlar " $\mu\text{g/g}$  Trolox eşdeğeri" cinsinden ifade edilmiştir [115].

## **2.2.4 Hücre kültürü**

### **2.2.4.1 Malzeme sterilizasyonu**

Hücre kültürü işlemleri sırasında kontaminasyonu önlemek amacıyla, kullanılan tüm cam ve plastik malzemeler deney öncesinde uygun yöntemlerle steril hâle getirilmiştir. Tek kullanımlık plastik malzemeler (pipet uçları, Eppendorf tüpleri, Falcon tüpleri vb.) üretici tarafından steril olarak temin edilmiş ya da cam malzemeler (beher vb.) ile birlikte 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

Kullanılan çözeltiler ve besiyerleri, filtrasyonla sterilize edilmeye uygun olanlar için 0.22 µm por çapına sahip membran filtre ile süzülerek sterilize edilmiş; ısıl işleme dayanıklı sıvı ortamlar ise otoklavlanarak steril hâle getirilmiştir. Çalışma alanı ve hücre kültürü kabini ise deney öncesinde %70’lik etanol ile silinerek dezenfekte edilmiş, ardından UV lamba altında en az 30 dakika ışıklandırılarak sterilizasyon sağlanmıştır.

### **2.2.4.2 Besiyeri hazırlanması**

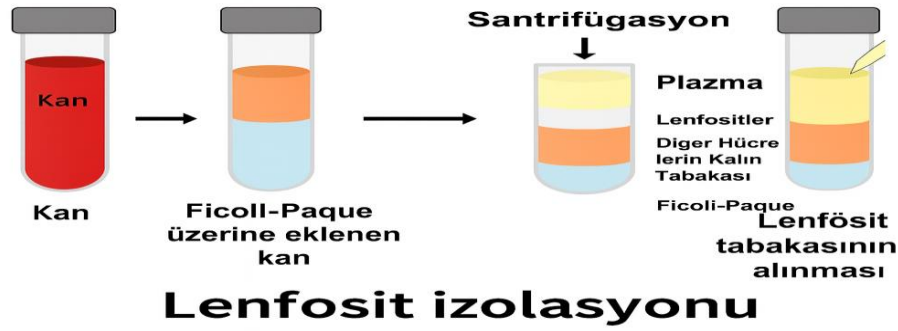
Bu çalışmada, kandan izole edilen lenfositlerin kültür ortamında çoğalmasını sağlamak amacıyla 500 mL RPMI-1640 besiyeri özel olarak hazırlanmıştır. Besiyerine, hücrelerin gelişimini desteklemek için %10 oranında Fetal Bovin Serum (FBS) ilave edilmiştir. Olası mikrobiyolojik kontaminasyonu engellemek amacıyla, penisilin ve streptomisin antibiyotik karışımı kullanılmıştır. Lenfositlerin aktivasyonunu teşvik etmek için kültür ortamına phytohemagglutinin (PHA) eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri, kullanılana kadar +4 °C’de steril koşullar altında saklanmıştır.

### **2.2.4.3 Kandan lenfosit izolasyonu**

Deneylede kullanılmak üzere izole edilecek lenfositler, sağlıklı, kronik hastalığı olmayan, sigara kullanmayan ve son aylarda enfeksiyon geçirmemiş gönüllü bireylerden alınmıştır. Sitotoksisite analizlerinde EDTA içeren tüpler, genotoksisite testlerinde ise heparin kaplı tüpler tercih edilmiştir.

Çalışmaya, yaşları 25-30 arasında değişen 5 erkek ve 5 kadın olmak üzere toplam 10 gönüllü katılmıştır. Kan örnekleri laboratuvara ulaştırıldıktan sonra, her örnek 7 mL Ficoll-Paque üzerine karışmadan yavaşça 3 mL kan eklenmiştir. Bu karışım, 1500 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek yoğunluk farkına dayalı katmanlaşma sağlanmıştır. Santrifüj sonunda, kan dört katmana ayrılmıştır. Plazma katmanının hemen altında, bulanık görünümdeki lenfosit

tabakası dikkatle toplanmıştır. Toplanan hücre süspansiyonuna 7 mL serum fizyolojik eklenmiş ve 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek lenfositler çöktürülmüştür. Elde edilen lenfositler, sitotoksisite deneyleri için hazırlanan stok besiyerlerine aktarılmış ve kültür hacmi 5 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Her kültüre 100 µL lenfosit süspansiyonu ilave edilmiştir [73].



Şekil 2.1: Ficoll-Paque eklenmiş kanın santrifüj sonrası katmanları

### 2.2.5 Sitotoksisite testleri

Çalışmada, bitki ekstraktlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla sitotoksisite analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) testi uygulanmıştır. Hücrelerin metabolik aktivitelerine bağlı olarak indirgenmiş formların ölçülmesi esasına dayanan bu yöntem, canlı hücrelerin varlığını kantitatif olarak değerlendirmeyi mümkün kılmıştır.

#### 2.2.5.1 MTS testi

*Salvia* türlerine ait ekstraktların olası toksik etkileri, izole edilmiş insan lenfositleri üzerinde MTS(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler, sağlıklı ve gönüllü bireylerden alınan periferik kan örneklerinden Ficoll-Paque yoğunluk gradyanı santrifügasyonu yöntemiyle izole edilmiştir.

MTS testi, mitokondriyal aktiviteye dayalı olarak hücre canlılığını belirlemeye yarayan kolorimetrik bir yöntemdir. Kullanılan tetrazolyum tuzu, canlı hücrelerde mitokondriyal enzimler aracılığıyla indirgenerek sarıdan mora dönüşen formazan adlı renkli bir ürüne dönüşür. Bu renk değişimi yalnızca metabolik olarak aktif hücrelerde gerçekleştiğinden, test

sonucunda elde edilen absorbans değeri hücre canlılığı hakkında doğrudan bilgi verir. Cansız hücrelerde bu dönüşüm gözlenmez ve renk değişimi meydana gelmez [73]. Çalışmada uygulanan MTS protokolü, toplam dört günlük bir deney sürecine dayanmaktadır.

**1. gün;** İzolasyon sonrası elde edilen hücreler, her biri 5 mL kültür ortamı içeren deney tüplerine 100 µL hücre süspansiyonu olacak şekilde eklenmiş ve 37 °C sıcaklıkta bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreç, hücrelerin ortama adapte olarak çoğalmalarını sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

**2. gün;** İnkübasyondan çıkan lenfosit hücrelerine *Salvia* ekstraktlarının üç farklı konsantrasyonu (25, 50 ve 100 mg/L) uygulanmıştır. Negatif kontrol grubuna (sadece besiyeri ve hücre) ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Örnekler iki gruba ayrılarak ilk grup 24 saat, ikinci grup ise 48 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir.

**3. gün;** 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ilk gruptaki hücrelere MTS testi uygulanmıştır. Öncelikle tüpler 1500 rpm hızında 10 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutularak hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, oluşan pellet 300 µL taze besiyeri ilave edilerek hücrelerin yeniden süspansiyon olmaları sağlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonları 96 kuyucuklu mikrotiplere 100 µL'lik hacimlerle ve üç tekrar halinde transfer edilmiştir. Her kuyucuğa 20 µL MTS reaktifi ilave edilerek 4 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

**4. gün;** 48 saatlik inkübasyon süresi tamamlanan ikinci gruptaki hücreler için de üçüncü günde uygulanan protokol birebir tekrarlanmış ve absorbans ölçümleri aynı şekilde gerçekleştirilmiştir [116].

## 2.2.6 Genotoksisite test sistemleri

Genotoksisite değerlendirmeleri için doğrudan tam kan örneği kullanılmıştır. Hazırlanan 5 mL'lik kültür ortamına 0.5 mL tam kan eklenerek hücre kültürü oluşturulmuştur. Sitotoksisite testlerinde kullanılan su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarındaki farklı dozları genotoksisite testlerinde de uygulanmıştır. Genotoksisite analizlerinde, bitki ekstraktlarının lenfositler üzerindeki etkileri yanı sıra, pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit içeren örnekler de ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

**Tablo 2.3:** Deney tüplerine eklenen bileşenler

1. Tüp	50 mg/L Bitkisel ekstrakt
2. Tüp	50 mg/L Bitkisel ekstrakt + 6.5 µg/ mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3. Tüp	100 mg/L Bitkisel ekstrakt
4. Tüp	100 mg/L Bitkisel ekstrakt + 6.5 µg/ mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
NK Tüpü	0 mg/L Bitkisel ekstrakt
PK Tüpü	6.5 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

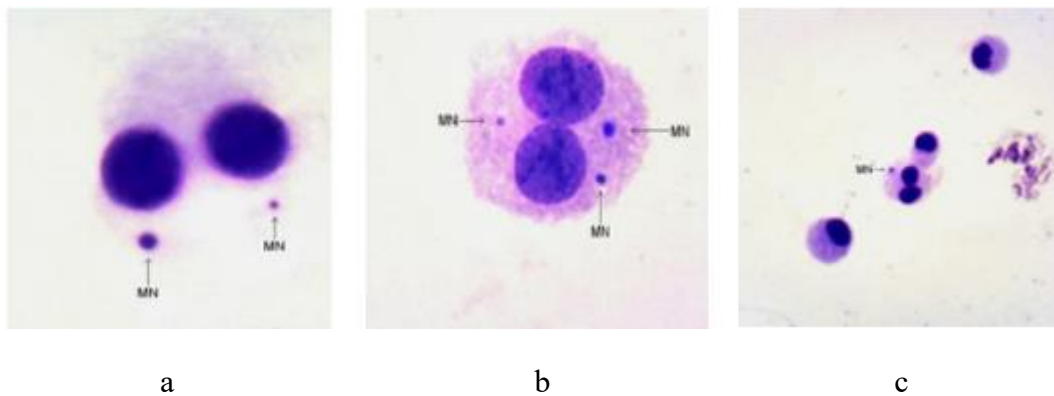
**Tablo 2.4:** Genotoksisite testlerinde kullanılan başlıca tampon bileşenleri

Solüsyon Adı	Hazırlanışı	Kullanım Amacı	Saklama Koşulu
Sörenson Tamponu	56 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 44 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6.8)	Giemsa boyasıyla birlikte boyama işlemleri için kullanılır.	Taze hazırlanmalıdır.
%5 Giemsa Solüsyonu	5 mL Giemsa + 95 mL Sörenson tamponu	Genetik materyalin boyanmasında kullanılır.	Taze hazırlanmalıdır.
KCl (0.075 M)	2.794 g KCl + 500 mL saf su	Hücre şişirme, hipotonik ortam sağlamaktır.	+4 °C veya 37 °C'de saklanabilir.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 500 mL saf su	Tampon çözelti hazırlanmasında kullanılır.	Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 L saf su	Tampon çözelti hazırlanmasında kullanılır.	Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir.

### 2.2.6.1 Mikronükleus testi

Genotoksisite analizinde kullanılan mikronükleus testi, hücrelerin genetik hasarının değerlendirilmesinde önemli bir yöntemdir. Bu çalışmada, kültür ortamına hücre bölünmesinin son aşaması olan sitokinezde durdurma sağlamak amacıyla 44. saatin başında, bölünmekte olan hücrelerde sitokinez inhibisyonu yapan 3 µg/mL konsantrasyonunda sitokalazin-B (Cyt-B) ilave edilmiştir. Böylece, binükleer hücrelerin oluşumu teşvik edilmiştir. 48. saatte bitki ekstraktları kültür ortamına eklenmiş ve hücreler 72. saatte toplanmıştır. Hücreler, 800 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir.

Pellet içerisindeki hücrelerin şişmesini sağlamak ve mikronükleusların mikroskop altında daha kolay gözlemlenebilmesi için 0,075 M konsantrasyondaki KCl hipotonik solüsyonu uygulanmıştır. Hipotonik ortamda hücreler yaklaşık 4 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tekrar 800 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Pellet, metanol ve glasilik asetik asidin 3:1 oranında karışımı ile hazırlanan taze ve soğuk fiksatifle yavaşça 7 mL'ye tamamlanmış, ardından kültür ortamına birkaç damla formaldehit eklenerek hücrelerin sabitlenmesi sağlanmıştır. Bu fiksasyon işlemi 5 dakika sürmüştür ve sonrasında tekrar 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak, fiksatif hacmi 1 mL artırılarak, temizlenmiş lameller üzerine yayma yapılmıştır. Hazırlanan yaymalar kurutulduktan sonra, %5'lik Giemsa solüsyonu ile şalede 15 dakika boyanmış, ardından distile su ile durulanıp serin ortamda kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan preparatlar, ışık mikroskopunda 40x büyütme ile incelenmiş ve binükleer hücreler içerisinde mikronükleus içeren hücreler sayılmıştır [108].



**Şekil 2.2:** Mikronükleus taşıyan hücrelerin görüntüleri a) iki mikronükleuslu hücre, b) üç mikronükleuslu hücre, c) mikronükleus ve mononükleuslu hücreler [117].

Mikronükleus testi kapsamında, nükleer bölünme indeksi (NBİ) hücre proliferasyonunu ölçmek amacıyla aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$NBİ = [(1 \times N1^a) + (2 \times N2^b) + (3 \times N3^c) + (4 \times N4^d)] / (N1 + N2 + N3 + N4) \quad (2.1)$$

Burada; N1, N2, N3 ve N4 sırasıyla bir, iki, üç ve dört çekirdeğe sahip hücre sayısını ifade etmektedir. NBİ değeri, hücre bölünme hızını yansıtarak genotoksik etki değerlendirmesinde önemli bir parametre olarak kullanılır.

<sup>a</sup>mononükleuslu hücre sayısı, <sup>b</sup>binükleuslu hücre sayısı, <sup>c</sup>trinükleuslu hücre sayısı, <sup>d</sup>tetranükleuslu hücre sayısı

### 2.2.6.2 Kromozom aberasyon testi

Bu testte, 5 mL'lik besiyeri içerisine 0.5 mL periferik tam kan eklenmiş ve kültür tüpleri 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Testin amacı, lenfositlerin bölünme sürecinde metafaz evresinde durdurularak kromozomların mikroskopik olarak gözlemlenebilir hale getirilmesidir.

İnkübasyonun 48. saatinde deney gruplarına bitki örnekleri ile birlikte pozitif kontrol amacıyla hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edilmiştir.

İnkübasyonun 70. saatinde, hücrelerin metafaz evresinde durdurulmasını sağlamak amacıyla kültür ortamına 5 µg/mL kolşisin ilave edilmiştir.

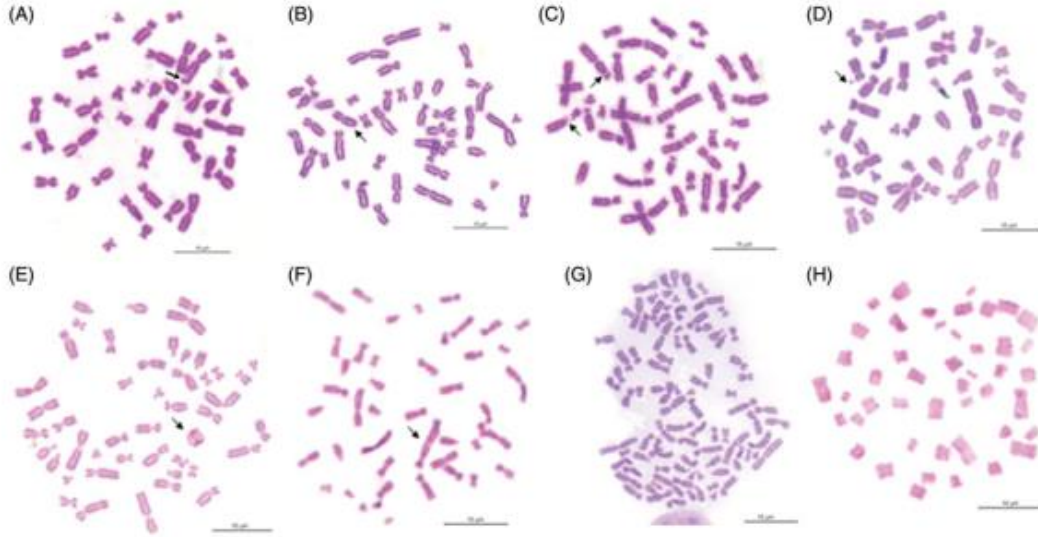
72. saatin sonunda tüpler 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Çöken hücrelerin şişmesi ve kromozomların daha net gözlenebilmesi için pellet üzerine 7 mL %0.075 M KCl çözeltisi eklenmiş ve tüpler 6 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından tekrar 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj uygulanmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan hücreler, 3:1 oranında taze hazırlanmış metanol:glasiyel asetik asit içeren fiksatif solüsyonu ile sabitlenmiş ve hacim 6 mL'ye tamamlanmıştır.

İlk fiksasyonun ardından tüpler 15 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu fiksasyon işlemi toplam üç kez tekrarlanmıştır. Son fiksasyondan sonra pellet uygun miktarda fiksatif ile çözüldükten sonra lamlar üzerine damlatılarak yayma preparatlar hazırlanmıştır ve kuruması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tamamen kuruyan lamlar,

%5'lik Giemsa boyası içeren solüsyonda 15 dakika süreyle boyanmış, ardından distile suyla yıkanarak tekrar kurutulmuştur [118], [119].

Bu testte, mitotik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla % mitotik indeks (MI), 2.2 numaralı formülde belirtilen yöntem esas alınarak hesaplanmıştır:

$$\%MI = (\text{Bölünen Hücre} / \text{Toplam Hücre}) \times 100 \quad (2.2)$$



**Şekil 2.3:** Lenfositlerde farklı tiplerde kromozom sapmaları

(A) Kromatit kırığı, (B) Kardeş kromatit birleşimi, (C) Kromozom kırıkları, (D) Fragman, (E) Halka kromozom, (F) Disentrik kromozom, (G) Poliploidi, (H) Endoreduplikasyon [120].

### 2.2.6.3 *In vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

Bu test kapsamında, *D. melanogaster* türü için uygun deneysel koşullar hazırlanmıştır. Besiyeri, 1000 mL saf su içerisine 86 g şeker, 18 g agar, 180 g irmik, 40 g maya, 8 damla mikostatin ve 10 mL propiyonik asit ilave edilip homojen bir şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. Elde edilen karışım sterilize edilmiş şişelere 20'şer gram olacak şekilde dağıtılmıştır [119,120].

Çalışmada, genotipleri mwh/mwh olan 7 erkek ve flr<sup>3</sup>/TM3, Bds genotipine sahip 7 dişi *D. melanogaster* bireyi çaprazlanarak 22 °C sıcaklıkta 72 ± 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürecin sonunda elde edilen larvaların üçüncü instar evresine gelenlerinden 70 tanesi seçilerek, deney ve kontrol gruplarına ayrılmış besiyerlerine transfer edilmiştir. Negatif kontrol grubunun besiyerine herhangi bir madde eklenmemiştir. Deney grubu besiyerlerine ise çalışmada kullanılan bitki ekstraktları, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonlarında

uygulanmıştır. Gelişen bireylerden elde edilen sineklerin kanatlarından preparatlar hazırlanmış ve her bir kanat, ışık mikroskobunda (40x büyütme) incelenmiştir.

Kanatlarda gözlemlenen lezyonlar; tekli noktalar veya ikiz noktalar olarak sınıflandırılmıştır. Tekli nokta sayısı üçten az olanlar “küçük tek noktalar”, üçten fazla olanlar ise “büyük tek noktalar” olarak kaydedilmiştir.

Her birey için kanat başına nokta frekansı (Fr) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$Fr = \text{Toplam nokta sayısı} / \text{Kanat sayısı (N)} \quad [123]. \quad (2.3)$$

### **2.2.7 *In vivo* antioksidan etkilerin belirlenmesi**

*D. melanogaster* türü için uygun deneysel koşullar sağlanmıştır. Bitki örneklerinin *in vivo* antioksidan potansiyelini değerlendirmek amacıyla, her biri Oregon R (yabanıl tip) genotipine sahip 50 yetişkin *D. melanogaster*, bitki ekstraktları (50 mg/ L<sup>-1</sup>), hidrojen peroksit (6.5 µg mL<sup>-1</sup>), su, etanol, metanol ve etil asetat örnekleri içeren besiyerlerine yerleştirilmiştir. Negatif kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Tüm gruplar 22 °C sıcaklıkta 5 gün süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur [124, 125].

İnkübasyon süresi sonunda sinekler toplanarak, her grup 300 µL 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.0) içinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 4000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır [124, 126].

#### **2.2.7.1 *In vivo* DPPH testi**

Her deney grubundan elde edilen süpernatantların *in vivo* antioksidan etkileri DPPH yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 0.6 mM derişiminde 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) çözeltisi metanol içerisinde hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri, hazırlanmış DPPH çözeltisi ile %10 (v/v) oranında karıştırılmış ve 60 dakika boyunca karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Ardından absorbans değerleri 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve radikal süpürme kapasiteleri hesaplanmıştır [113]. İstatistiksel değerlendirmede Paired Student's t-testi uygulanmış, en az üç tekrar için ortalama ± standart hata değerleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplanmıştır. p<0.05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir [124], 126].

### 2.2.7.2 *In vivo* ABTS testi

Her deney grubundan elde edilen süpernatantların *in vivo* antioksidan aktiviteleri, ABTS radikal süpürme yöntemi ile belirlenmiştir. ABTS<sup>+</sup> radikali, ABTS tuzunun amonyum persülfat ile reaksiyonu sonucu hazırlanmış ve karanlık koşullarda 12–16 saat bekletilerek aktive edilmiştir.

Ölçüm aşamasında, 2.95 mL ABTS<sup>+</sup> çözeltisi ile 0.05 mL süpernatant (0.1–100 mg/L aralığında) karıştırılarak 3 mL'lik tüplere aktarılmış, ardından absorbans değerleri 734 nm dalga boyunda spektrofotometre ile kaydedilmiştir. Tüm örnekler için üç teknik tekrar yapılmıştır [113]. Elde edilen veriler Microsoft Office Excel programı kullanılarak analiz edilmiş; istatistiksel değerlendirmede Paired Student's t-testi uygulanmıştır. Sonuçlar, en az üç biyolojik tekrardan hesaplanan standart hata değerleri ile birlikte verilmiş olup  $p < 0.05$  düzeyi anlamlılık kriteri olarak kabul edilmiştir [124, 126] .

DPPH ve ABTS testleriyle belirlenen *in vivo* antioksidan aktiviteler, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{In vivo antioksidan aktivite \%} = \frac{(\text{Kontrol absorbansı} - \text{Örnek absorbansı})}{\text{Örnek absorbansı}} \times 100 \quad (2.4)$$

### 2.2.7.3 *In vivo* FRAP testi

Her deney grubundan elde edilen süpernatantların *in vivo* antioksidan aktiviteleri, FRAP yöntemi ile de değerlendirilmiştir. Bu yöntem, daha önce yayımlanmış protokoller doğrultusunda uygulanmıştır [114]. FRAP analizinde kullanılan reaktif karışım, 40 mM HCl içerisinde çözülmüş 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), 20 mM FeCl<sub>3</sub> ve 25 mL asetat tampon çözeltisinin belirli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Nihai reaktif çözeltide, 1.67 mM Fe (III) ve 0.83 mM TPTZ bulunacak şekilde son konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Deney gruplarından elde edilen süpernatant örnekleri, bu reaktif karışıma ilave edilerek 593 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerler, Trolox standart eğrisi temel alınarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ( $\mu\text{g TE/g}$ ) Trolox eşdeğeri şeklinde raporlanmıştır [115].

### 2.2.8 *In vivo* toksikolojik etkilerin belirlenmesi

*In vivo* toksisite analizleri için *D. melanogaster* (Oregon R, yabancı tip) türü üzerinde uygun laboratuvar koşulları sağlanmıştır. Besiyerleri, gerekli bileşenlerin karıştırılmasıyla hazırlanmış ve önceden sterilize edilen şişelere her biri 20 gram olacak şekilde dağıtılmıştır [122].

Bitki ekstraktlarının olası toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, her şişeye 25 adet erişkin (dişi ve erkek) *D. melanogaster* bireyi yerleştirilmiş ve bu sinekler  $48 \pm 4$  saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen 1. dönem larvalar arasından eşit sayıda seçilerek, deney gruplarına uygulanmıştır. Deney grupları; bitki ekstraktı (50 mg/L), pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (6.5 µg/mL) ve negatif kontrol olarak yalnızca su içeren besiyerlerinden oluşmaktadır. Larvalar, 22 °C sıcaklıkta ergin birey haline gelene kadar gözlemlenmiştir.

Gelişimsel süreçte elde edilen puparasyon, hayatta kalma ve eklozyon oranları aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır [127], [128], [129], [130], [131]:

$$\% \text{ Puparasyon} = (\text{Pupa Sayısı} / \text{Larva Sayısı}) \times 100 \quad (2.5)$$

$$\% \text{ Hayatta Kalma} = (\text{Ergin Sinek Sayısı} / \text{Larva Sayısı}) \times 100 \quad (2.6)$$

$$\% \text{ Eklozyon} = (\text{Ergin Sinek Sayısı} / \text{Pupa Sayısı}) \times 100 \quad (2.7)$$

## 2.2.9 Antibakteriyel etkinin belirlenmesi

### 2.2.9.1 Disk difüzyon yöntemi

Antibakteriyel etkinin değerlendirilmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, 19 gram Mueller Hinton agar 500 mL distile suda çözündürülmüş, ardından 121 °C’de 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Steril hale getirilen besiyeri, steril petri kutularına dökülmüş ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır. Daha önce -20 °C’de saklanan bitki ekstraktları (10 mg/mL), oda sıcaklığına getirildikten sonra 6 mm çapında steril disklerin üzerine emdirilmiştir. Ekstrakt emdirilmiş diskler, +4 °C’de bir gece bekletilmiştir.

Testte kullanılan bakteriler:

- *Escherichia coli* (ATCC 8739)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

Her bir bakteri türü için 24 saatlik kültürden hazırlanan süspansiyonlardan 100 µL ( $10^5$  CFU/mL), Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (CLSI) önerileri doğrultusunda katı besiyerine ekilmiştir. Ekimin ardından, bitki ekstraktı emdirilmiş diskler agar yüzeyine dikkatlice yerleştirilmiş ve plaklar 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, disk çevresinde oluşan inhibisyon zonları Image J yazılımı ile ölçülmüş ve elde

edilen zon çaplarına göre bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkileri değerlendirilmiştir [132].

### 2.2.9.2 Minimum inhibitör konsantrasyonu

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) tayini için 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi kullanılmıştır. Plakanın her kuyucuğuna 100 µL Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri pipetlenmiştir. İlk kuyucuğa, 10 mg/mL konsantrasyonundaki bitki ekstraktından 100 µL eklenmiş ve ardından seri iki kat seyreltme yöntemiyle 10. kuyucuğa kadar devam edilmiştir. 11. ve 12. kuyucuklara ekstrakt eklenmemiştir.

Her kuyucuğa, 10<sup>5</sup> CFU/mL yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 10 µL ilave edilmiştir (11. kuyucuğa kadar). Bu inokülasyon işlemi Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (CLSI) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

- Negatif kontrol: Sadece MHB içerir.
- Pozitif kontrol: MHB ve bakteri süspansiyonu içerir.

İnkübasyon öncesinde tüm kuyucuklardaki optik yoğunluk (OD), 600 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okunmuştur. Mikrolaka, 37 °C'de 18–24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda tekrar 600 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler kullanılarak her örneğin OD değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$OD_{600} = OD_{600} (\text{örnek}) - OD_{600} (\text{kör}) \quad (2.8)$$

MİK değeri, test edilen bitki ekstraktının bakteri üremesini inhibe ettiği en düşük konsantrasyon olarak, pozitif ve negatif kontroller ile karşılaştırılarak belirlenmiştir [133].

Absorbans verilerini takiben elde edilen MİK değerlerinin ikinci bir yöntemle doğrulanmıştır. Bu yöntemde bakteri üremesini kontrol edebilmek amacıyla metabolizma indikatörü olarak Fluka marka Ledanitrotetrazolium violet (INT) [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride] kullanılmıştır.

Hazırlık aşamasında 0,04 g INT tartılarak 10 mL steril distile suda çözülmüş ve stok çözelti hazırlanmıştır. Kontaminasyon riskini minimuma indirebilmek için çözelti 2 mL'lik

ependorf tüplere bölünmüş ve +4 °C'de, ışık almayan koşullarda muhafaza edilmiştir. Bu amaçla, her bir well plate çukuruna 15 µL INT çözeltisi eklenmiş ve 37 °C'de 3–4 saat inkübatörde bekletilmiştir.

İnkübasyon sonrasında, bakteriyel üremenin gerçekleştiği çukurlar pembe renge boyanmıştır. Boyanmanın gözleendiği ilk çukurdan bir önceki çukurdaki ekstre konsantrasyonu, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak kabul edilmiştir. Böylece test edilen bitki ekstraktlarının MİK değerleri belirlenmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 LC-MS/MS Bulguları

*S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türlerinden elde edilen ekstraktlarda, LC-MS/MS yöntemiyle toplam 36 farklı fenolik bileşiğin varlığı analiz edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına ait bileşen oranları Tablo 3.1’de detaylı şekilde sunulmaktadır.

**Tablo 3.1:** Bitki Ekstraktlarının LC-MS/MS Analizi Sonuçları

BİLEŞEN ADI	<i>S.candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i>	<i>S.multicaulis</i>	<i>S. suffruticosa</i>	<i>S.syriaca</i>
	Ortalama ± std (ug/gr)			
(-)-Epicatechin	ND	ND	ND	ND
(+)-Catechin	ND	ND	ND	ND
2,5-Dihydroxybenzoic acid	3.91 ±0.09	3.95±0.03	6.40±0.05	<b>186.32±0.08</b>
2-Hydroxycinnamic acid	ND	ND	ND	0.07±0.00
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	0.43 ±0.01	0.26±0.02	1.25±0.01	0.46±0.03
3-Hydroxybenzoic acid	2.73 ±0.06	10.44±0.04	2.76±0.03	12.20±0.09
3-Hydroxytyrosol	1.18±0.00	1.22±0.01	0.69±0.01	0.40±0.01
4-Hydroxybenzoic acid	2.74±0.01	10.74±0.19	2.70±0.01	12.57±0.10
Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside	6.51±0.09	<b>177.60±22.29</b>	<b>278.47±22.91</b>	4.86±0.04
Apigenin	2.52±0.05	9.00±0.28	14.23±0.02	0.75±0.02
Caffeic acid	15.12±0.07	23.81±3.30	18.03±0.00	7.20±0.10
Chlorogenic acid	0.34±0.01	3.03±0.24	4.30±0.04	2.49±0.13
Ellagic acid	ND	ND	ND	ND
Eriodictyol	ND	0.14±0.01	ND	0.06±0.01
Ferulic acid	2.32±0.08	1.54±0.03	0.86±0.04	10.29±0.99
Gallic acid	0.33±0.03	ND	0.09±0.02	2.73±0.02
Hesperidin	0.02±0.01	20.87±0.24	0.78±0.01	<b>9307.68±199.57</b>
Homovanillic acid	0.47±0.00	0.86±0.00	0.53±0.07	0.03±0.01
Hyperoside	2.47±0.08	0.74±0.04	6.48±0.02	<b>615.65±28.34</b>
Kaempferol	15.76±0.39	9.67±0.01	10.51±0.61	1.83±0.01
Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	13.23±0.02	<b>110.97±5.23</b>	<b>117.01±8.81</b>	14.10±0.31
Luteolin	15.72±0.06	7.71±0.24	8.48±0.00	2.18±0.08
Oleuropein	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -Coumaric acid	4.17±0.00	0.72±0.01	ND	1.55±0.02
Pinoresinol	ND	0.28±0.01	0.82±0.03	ND
Protocatechuic acid	3.96±0.06	4.22±0.05	6.67±0.06	<b>182.29±4.06</b>
Pyrocatechol	ND	0.06±0.01	ND	ND
Quercetin	ND	ND	ND	23.82±0.60
Resveratrol	ND	ND	ND	ND
Rosmarinic acid	<b>7583.76±217.05</b>	14.29±0.36	5.34±0.01	<b>1227.32±5.83</b>
Sinapic acid	ND	0.07±0.02	ND	0.98±0.04
Syringic acid	2.71±0.22	0.90±0.03	0.93±0.02	5.23±0.03
Taxifolin	ND	ND	ND	ND
Vanillin	0.04±0.00	ND	0.04±0.00	0.05±0.00
Verbascoside	0.19±0.00	ND	ND	ND

ND: Not detected (tespit edilmedi).

### 3.2 Antioksidan Bulguları

DPPH, ABTS ve FRAP testleri kullanılarak ölçülen antioksidan aktiviteler değerlendirilmiş ve detaylı bir şekilde analiz edilmiştir.

#### 3.2.1 DPPH radikal süpürme aktivitesi

DPPH testi ile DPPH radikali süpürücü aktivite ile çalışma kapsamındaki bitkilerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite verileri Tablo 3.2’de sunulmuştur. Sonuçlar, bitki ekstraktlarının radikali etkisizleştirici “%50 inhibisyonu sağlayan konsantrasyon” (IC<sub>50</sub>) olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 3.2:** *Salvia* türlerine ait su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının DPPH testi kullanılarak belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri

Örnekler	DPPH (IC <sub>50</sub> mg/mL)
Gallik asit (Pozitif kontrol)	0.005 ± 0.000
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> su	0.57 ± 0.10
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> etanol	0.12 ± 0.01
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> metanol	0.09 ± 0.00
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> etil asetat	0.34 ± 0.01
<i>S. multicaulis</i> su	3.34 ± 0.06
<i>S. multicaulis</i> etanol	0.18 ± 0.07
<i>S. multicaulis</i> metanol	0.13 ± 0.01
<i>S. multicaulis</i> etil asetat	2.92 ± 0.09
<i>S. suffruticosa</i> su	3.31 ± 0.13
<i>S. suffruticosa</i> etanol	2.10 ± 0.01
<i>S. suffruticosa</i> metanol	1.77 ± 0.04
<i>S. suffruticosa</i> etil asetat	2.35 ± 0.07
<i>S. syriaca</i> su	0.48 ± 0.13
<i>S. syriaca</i> etanol	0.13 ± 0.00
<i>S. syriaca</i> metanol	0.15 ± 0.01
<i>S. syriaca</i> etil asetat	0.40 ± 0.05

#### 3.2.2 ABTS radikal süpürme aktivitesi

ABTS testi ile ABTS<sup>+</sup> radikali temizleme aktivitesi ile çalışma kapsamındaki bitkilerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite verileri Tablo 3.3’te sunulmuştur. Sonuçlar, bitki ekstraktlarının radikali etkisizleştirici “%50 inhibisyonu sağlayan konsantrasyon” (IC<sub>50</sub>) olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 3.3:** *Salvia* türlerine ait su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının ABTS<sup>+</sup> testi kullanılarak belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri

Örnekler	ABTS (IC <sub>50</sub> mg/mL)
Gallik asit (Pozitif kontrol)	0.001 ± 0.000
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> su	0.19 ± 0.00
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> etanol	0.07 ± 0.01
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> metanol	0.08 ± 0.01
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> etil asetat	1.51 ± 0.07
<i>S. multicaulis</i> su	0.52 ± 0.01
<i>S. multicaulis</i> etanol	0.51 ± 0.05
<i>S. multicaulis</i> metanol	0.45 ± 0.05
<i>S. multicaulis</i> etil asetat	0.36 ± 0.00
<i>S. suffruticosa</i> su	0.59 ± 0.02
<i>S. suffruticosa</i> etanol	0.84 ± 0.04
<i>S. suffruticosa</i> metanol	0.27 ± 0.03
<i>S. suffruticosa</i> etil asetat	0.81 ± 0.15
<i>S. syriaca</i> su	0.84 ± 0.04
<i>S. syriaca</i> etanol	0.27 ± 0.03
<i>S. syriaca</i> metanol	0.81 ± 0.15
<i>S. syriaca</i> etil asetat	0.47 ± 0.02

### 3.2.3 FRAP analizi

FRAP testi ile gerçekleştirilen metal iyonları şelatlama aktivitesi antioksidan aktivite verileri Trolox eşdeğer şeklinde hesaplanarak sunulmuştur. Yapılan analizler sonucunda gram bitkide mg antioksidan değer olarak kaydedilmiş ve Tablo 3.4’de sunulmuştur.

**Tablo 3.4:** *Salvia* türlerinin su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının FRAP testi ile belirlenen Trolox eşdeğeri antioksidan kapasiteleri

Örnekler	FRAP (mg TE /g)
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> su	25.94 ± 3.10
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> etanol	32.12 ± 3.62
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> metanol	38.61 ± 6.13
<i>S. candidissima</i> subsp <i>candidissima</i> etil asetat	30.27 ± 5.64
<i>S. multicaulis</i> su	9.44 ± 0.52
<i>S. multicaulis</i> etanol	14.40 ± 1.71
<i>S. multicaulis</i> metanol	14.79 ± 1.25
<i>S. multicaulis</i> etil asetat	5.05 ± 0.29
<i>S. suffruticosa</i> su	6.25 ± 0.30
<i>S. suffruticosa</i> etanol	7.94 ± 0.15
<i>S. suffruticosa</i> metanol	14.42 ± 1.78
<i>S. suffruticosa</i> etil asetat	4.87 ± 0.78
<i>S. syriaca</i> su	42.14 ± 6.38
<i>S. syriaca</i> etanol	27.48 ± 2.54
<i>S. syriaca</i> metanol	26.84 ± 1.69
<i>S. syriaca</i> etil asetat	40.06 ± 4.06

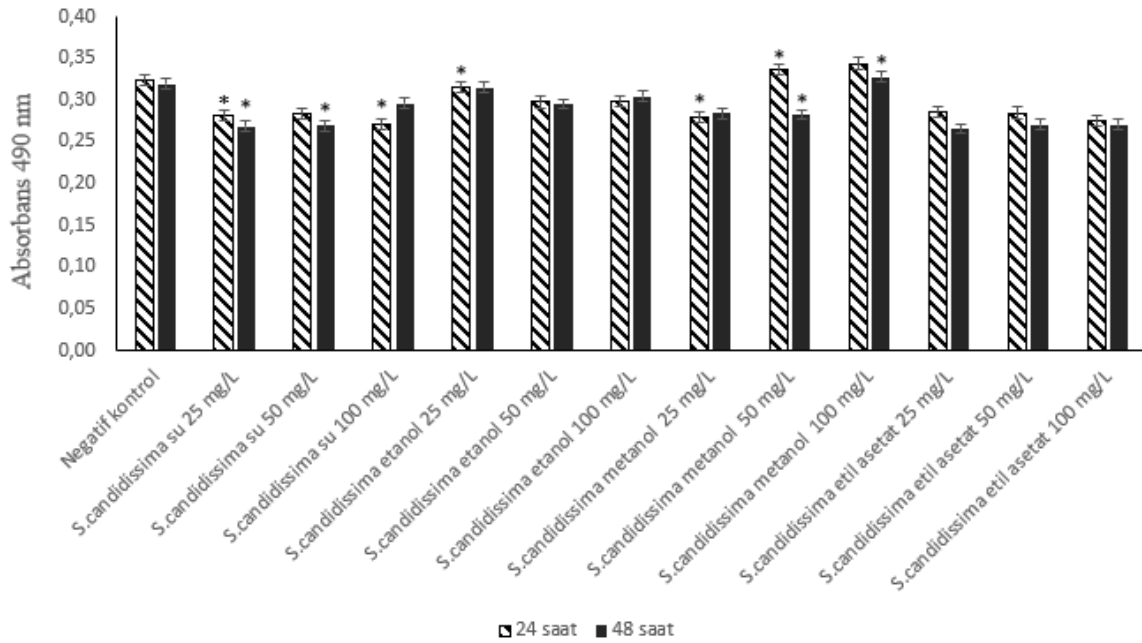
### 3.3 Sitotoksosite Bulguları

#### 3.3.1 MTS testi sonuçları

*Salvia* türlerinden elde edilen su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktları, 24 ve 48 saat süreyle lenfosit hücre kültürleriyle inkübe edilmiştir. Hücre yaşamlılığı 490 nm dalga boyunda ölçüm alınarak MTS testi ile değerlendirilmiş ve böylece bitki ekstraktlarının lenfositler üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

##### 3.3.1.1 *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinin MTS sonuçları

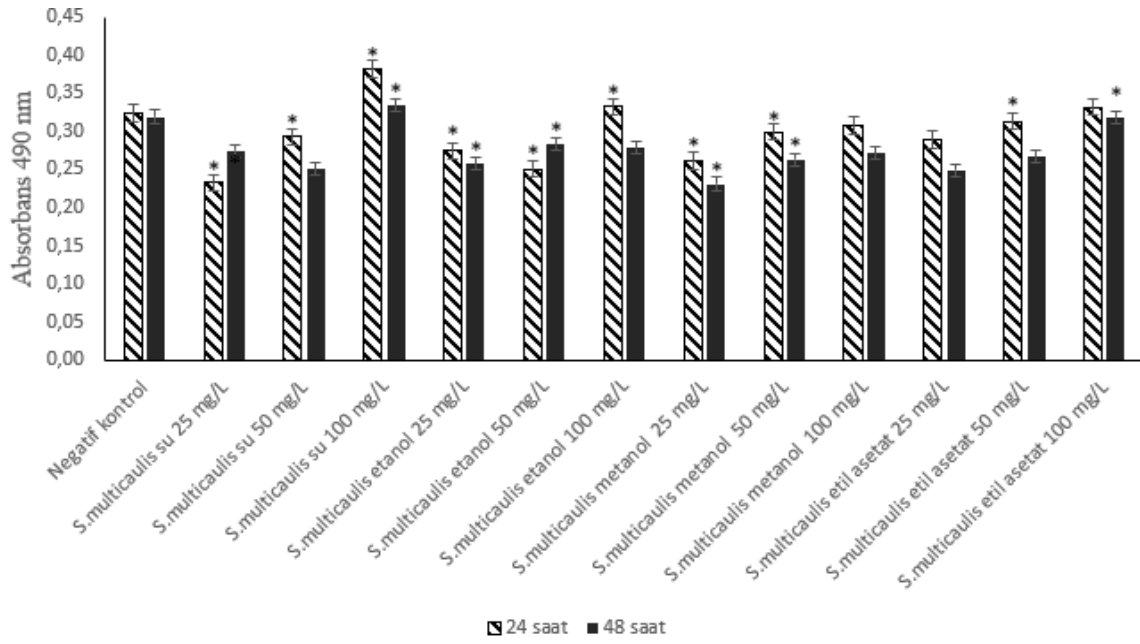
*S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinden elde edilen su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarına ait, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonrası gerçekleştirilen MTS testi sonuçları Şekil 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 3.1: *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05))

##### 3.3.1.2 *S. multicaulis* bitkisinin MTS sonuçları

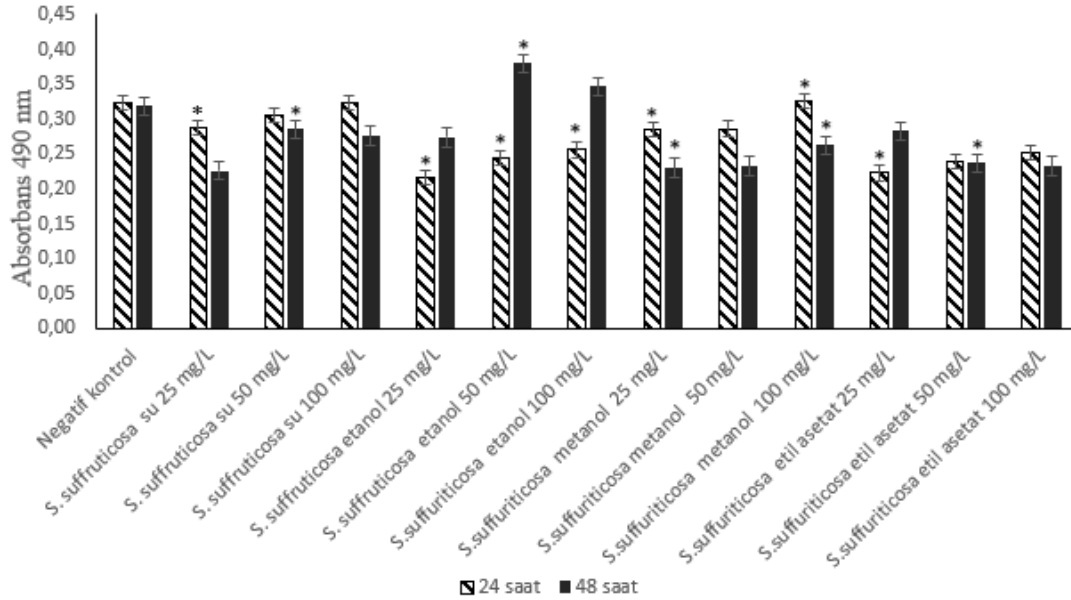
*S. multicaulis* bitkisinden elde edilen su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarına ait, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonrası gerçekleştirilen MTS testi sonuçları Şekil 3.2’de sunulmuştur.



Şekil 3.2: *S. multicaulis* bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05))

### 3.3.1.3 *S. suffruticosa* bitkisinin MTS sonuçları

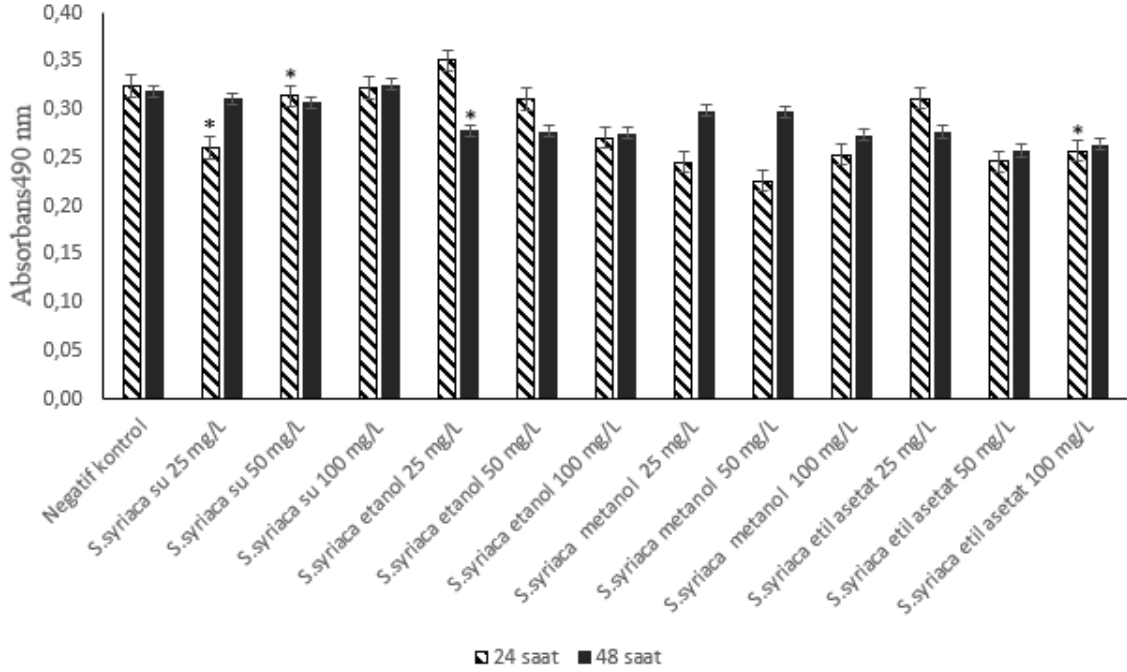
*S. suffruticosa* bitkisinden elde edilen su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarına ait, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonrası gerçekleştirilen MTS testi sonuçları Şekil 3.3'de sunulmuştur.



Şekil 3.3: *S. suffruticosa* bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05))

### 3.3.1.4 *S. syriaca* bitkisinin MTS sonuçları

*S. syriaca* bitkisinden elde edilen su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarına ait, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonrası gerçekleştirilen MTS testi sonuçları Şekil 3.4’de sunulmuştur.



Şekil 3.4: *S. syriaca* bitkisinin 24 ve 48 saat MTS sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05))

## 3.4 Genotoksisiteye İlişkin Deneysel Bulgular

### 3.4.1 Mikronükleus test sonuçları

*S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* bitkilerinden hazırlanan su, metanol, etanol ve etil asetat ekstraktlarına ait mikronükleus testi sonuçları Tablo 3.5’te verilmiştir.

**Tablo 3.5:** Mikronükleus testi sonuçları

<b>Örnekler</b>	<b>%MN ± SH</b>	<b>NBİ ± SH</b>
Negatif Kontrol	0.77 ± 0.13	1.25 ± 0.03
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6.5 µg/mL)	9.37 ± 0.51	1.20 ± 0.01
<b><i>S.candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i></b>		
Su (50 mg/L)	2.38 ± 1.18 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.04
Su (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.06 ± 1.11 <sup>ab</sup>	1.21 ± 0.04
Su (100 mg/L)	4.80 ± 1.52 <sup>ab</sup>	1.47 ± 0.01
Su (100 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5.43 ± 2.11 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.06
Etanol (50 mg/L)	2.16 ± 0.47 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.01
Etanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.62 ± 0.55 <sup>ab</sup>	1.26 ± 0.03
Etanol (100 mg/L)	2.60 ± 1.00 <sup>ab</sup>	1.21 ± 0.03
Etanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.73 ± 1.45 <sup>ab</sup>	1.25 ± 0.02
Metanol (50 mg/L)	2.84 ± 1.50 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.02
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.68 ± 1.30 <sup>ab</sup>	1.39 ± 0.04
Metanol (100 mg/L)	2.16 ± 1.02 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.05
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.48 ± 1.66 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.06
Etil Asetat (50 mg/L)	2.30 ± 0.22 <sup>ab</sup>	1.22 ± 0.04
Etil Asetat (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.92 ± 1.33 <sup>ab</sup>	1.25 ± 0.05
Etil Asetat (100 mg/L)	1.05 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.19 ± 0.05
Etil Asetat (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.33 ± 0.57 <sup>ab</sup>	1.22 ± 0.05
<b><i>S. multicaulis</i></b>		
Su (50 mg/L)	0.31 ± 0.01 <sup>ab</sup>	1.32 ± 0.03
Su (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1.12 ± 0.43 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.00
Su (100 mg/L)	0.96 ± 0.25 <sup>b</sup>	1.33 ± 0.01
Su (100 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1.01 ± 0.02 <sup>ab</sup>	1.20 ± 0.02
Etanol (50 mg/L)	2.97 ± 0.56 <sup>ab</sup>	1.47 ± 0.01
Etanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.45 ± 0.28 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.01
Etanol (100 mg/L)	1.46 ± 0.01 <sup>ab</sup>	1.10 ± 0.01
Etanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.31 ± 0.67 <sup>ab</sup>	1.58 ± 0.06
Metanol (50 mg/L)	2.13 ± 0.23 <sup>ab</sup>	1.34 ± 0.02
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.40 ± 0.53 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.04
Metanol (100 mg/L)	4.03 ± 0.43 <sup>ab</sup>	1.54 ± 0.02
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5.58 ± 0.45 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.02
Etil Asetat (50 mg/L)	1.14 ± 0.16 <sup>ab</sup>	1.30 ± 0.04
Etil Asetat (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.14 ± 0.20 <sup>ab</sup>	1.38 ± 0.05
Etil Asetat (100 mg/L)	2.53 ± 0.62 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.02
Etil Asetat (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.31 ± 0.79 <sup>ab</sup>	1.47 ± 0.03

<b>Tablo 3.5 (devamı)</b>		
<b><i>S. suffruticosa</i></b>		
Su (50 mg/L)	2.38 ± 1.18 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.04
Su (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.06 ± 1.11 <sup>ab</sup>	1.21 ± 0.04
Su (100 mg/L)	4.80 ± 1.52 <sup>ab</sup>	1.47 ± 0.01
Su (100 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5.43 ± 2.11 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.06
Etanol (50 mg/L)	2.16 ± 0.47 <sup>ab</sup>	1.26 ± 0.03
Etanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.62 ± 0.55 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.01
Etanol (100 mg/L)	2.60 ± 1.00 <sup>ab</sup>	1.21 ± 0.03
Etanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.73 ± 1.45 <sup>ab</sup>	1.25 ± 0.02
Metanol (50 mg/L)	2.84 ± 1.50 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.02
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.68 ± 1.30 <sup>ab</sup>	1.39 ± 0.04
Metanol (100 mg/L)	2.16 ± 1.02 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.05
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.48 ± 1.66 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.06
Etil Asetat (50 mg/L)	2.30 ± 0.22 <sup>ab</sup>	1.22 ± 0.04
Etil Asetat (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.92 ± 1.33 <sup>ab</sup>	1.25 ± 0.05
Etil Asetat (100 mg/L)	1.05 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.19 ± 0.05
Etil Asetat (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.33 ± 0.57 <sup>ab</sup>	1.22 ± 0.05
<b><i>S. syriaca</i></b>		
Su (50 mg/L)	1.87 ± 0.98 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.06
Su (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.43 ± 1.64 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.04
Su (100 mg/L)	4.05 ± 1.32 <sup>ab</sup>	1.31 ± 0.03
Su (100 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	4.70 ± 1.46 <sup>ab</sup>	1.36 ± 0.04
Etanol (50 mg/L)	2.84 ± 1.34 <sup>ab</sup>	1.43 ± 0.04
Etanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.56 ± 1.27 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.04
Etanol (100 mg/L)	3.60 ± 1.44 <sup>ab</sup>	1.45 ± 0.01
Etanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	4.21 ± 2.26 <sup>ab</sup>	1.39 ± 0.05
Metanol (50 mg/L)	2.21 ± 1.19 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.01
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.52 ± 1.51 <sup>ab</sup>	1.43 ± 0.01
Metanol (100 mg/L)	1.55 ± 0.74 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.02
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.41 ± 0.97 <sup>ab</sup>	1.29 ± 0.01
Etil Asetat (50 mg/L)	1.81 ± 1.11 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.01
Etil Asetat (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.94 ± 1.65 <sup>b</sup>	1.33 ± 0.03
Etil Asetat (100 mg/L)	2.90 ± 1.14 <sup>ab</sup>	1.41 ± 0.02
Etil Asetat (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3.18 ± 1.62 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.00

a: Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

b: Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

%MN= mikronükleus yüzdesi

NBİ=nükleer bölünme indeksi

SH=standart hata

### 3.4.2 Kromozom aberasyon testi bulguları

*S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* bitkilerinden metanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarla gerçekleştirilen kromozom aberasyonu analizlerine ait bulgular Tablo 3.6’da sunulmuştur.

**Tablo 3.6:** *Salvia* türlerinin kromozomal aberasyon profili ve mitotik aktivite düzeyleri

Örnekler	TA(G+P)	TA(G-P)	%MI
Negatif Kontrol	0.041±0.001 <sup>b</sup>	0.039±0.01 <sup>b</sup>	11.71±0.91 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6.5 µg/mL)	0.269±0.023 <sup>a</sup>	0.121±0.02 <sup>a</sup>	9.74±0.96 <sup>a</sup>
<b><i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i></b>			
Metanol (50 mg/L)	0.022±0.003 <sup>ab</sup>	0.011±0.001 <sup>ab</sup>	11.04±0.24 <sup>ab</sup>
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.090±0.010 <sup>ab</sup>	0.050±0.012 <sup>b</sup>	12.43±1.5 <sup>b</sup>
Metanol (100 mg/L)	0.053±0.027 <sup>b</sup>	0.024±0.013 <sup>b</sup>	11.81±1.7
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.063±0.006 <sup>ab</sup>	0.025±0.002 <sup>b</sup>	12.31±2.1
<b><i>S. multicaulis</i></b>			
Metanol (50 mg/L)	0.017±0.007 <sup>ab</sup>	0.011±0.001 <sup>ab</sup>	11.04±2.2
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.028±0.003 <sup>b</sup>	0.014±0.001 <sup>b</sup>	13.01±0.5 <sup>a</sup>
Metanol (100 mg/L)	0.067±0.014 <sup>ab</sup>	0.040±0.000 <sup>b</sup>	9.95±1.01 <sup>a</sup>
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.132±0.007 <sup>ab</sup>	0.069±0.001 <sup>ab</sup>	12.33±2.4
<b><i>S. suffruticosa</i></b>			
Metanol (50 mg/L)	0.013±0.001 <sup>ab</sup>	0.012±0.001 <sup>ab</sup>	10.94±0.34 <sup>ab</sup>
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.066±0.028 <sup>b</sup>	0.052±0.027 <sup>b</sup>	10.21±1.6 <sup>b</sup>
Metanol (100 mg/L)	0.051±0.026 <sup>b</sup>	0.027±0.014 <sup>b</sup>	12.52±2.7
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.056±0.000 <sup>ab</sup>	0.024±0.002 <sup>b</sup>	11.51±2.7
<b><i>S. syriaca</i></b>			
Metanol (50 mg/L)	0.012±0.001 <sup>ab</sup>	0.011±0.002 <sup>b</sup>	11.93±0.34 <sup>ab</sup>
Metanol (50 mg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.079±0.015 <sup>b</sup>	0.052±0.027 <sup>b</sup>	11.22±1.9 <sup>b</sup>
Metanol (100 mg/L)	0.033±0.007 <sup>ab</sup>	0.026±0.013 <sup>b</sup>	12.50±1.2
Metanol (100mg/L+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.050±0.005 <sup>b</sup>	0.025±0.002 <sup>b</sup>	11.51±2.3

### 3.5 *In vivo* Genotoksisite Test Sistemleri

#### 3.5.1 Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

SMART yöntemi kullanılarak elde edilen mutasyon ve rekombinasyon verileri aşağıda yer almaktadır.

**Tablo 3.7:** *Salvia* türlerine ait su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarında gerçekleştirilen SMART testi sonuçları

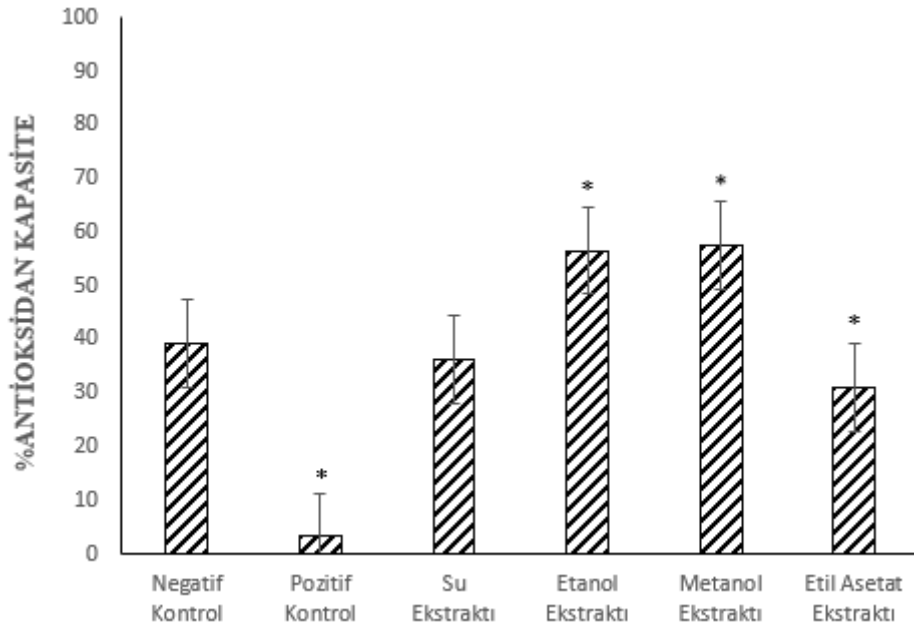
	Nokta sayısı	Fr	Nokta sayısı	Fr	Nokta sayısı	Fr
Negatif Kontrol	0	0 <sup>b</sup>	1	0.1 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - 6.5µg/mL)	42	0.84 <sup>a</sup>	32.6	0.65 <sup>a</sup>	36	0.72 <sup>a</sup>
<b><i>S.candidissima</i></b>						
<b>subsp.candidissima</b>						
<b>1. konsantrasyon (50 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	3.5	0.19 <sup>ab</sup>	6	0.47 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	1.8	0.11 <sup>ab</sup>	4	0.38 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	1	0.06 <sup>b</sup>	7	0.44 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	1	0.06 <sup>b</sup>	7.5	0.52 <sup>ab</sup>	1	0.055 <sup>b</sup>
<b>2. konsantrasyon (100 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	2	0.16 <sup>ab</sup>	4.5	0.29 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	3	0.22 <sup>ab</sup>	6	0.42 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	2	0.12 <sup>ab</sup>	5.2	0.35 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	3	0.17 <sup>ab</sup>	10	0.66 <sup>a</sup>	0	0 <sup>b</sup>
<b><i>S. multicaulis</i></b>						
<b>1. konsantrasyon (50 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	5.5	0.28 <sup>ab</sup>	6	0.34 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	4	0.28 <sup>b</sup>	3	0.21 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	8	0.4 <sup>ab</sup>	5	0.25 <sup>ab</sup>	0.5	0.025 <sup>ab</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	7	0.43 <sup>b</sup>	4	0.25 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
<b>2. konsantrasyon (100 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	2.5	0.2 <sup>ab</sup>	5	0.41 <sup>ab</sup>	2	0.16 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	8	0.42 <sup>ab</sup>	4.5	0.23 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	8	0.53 <sup>b</sup>	2.5	0.16 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	4.5	0.28 <sup>ab</sup>	3.5	0.21 <sup>ab</sup>	1	0.062 <sup>b</sup>
<b><i>S. suffruticosa</i></b>						
<b>1. konsantrasyon (50 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	3.5	0.175 <sup>ab</sup>	3	0.15 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	2.5	0.12 <sup>ab</sup>	3	0.14 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	1.5	0.07 <sup>ab</sup>	1	0.051 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	3.5	0.24 <sup>ab</sup>	2.5	0.16 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
<b>2. konsantrasyon (100 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	4.5	0.22 <sup>ab</sup>	4	0.2 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	4.5	0.25 <sup>ab</sup>	2	0.11 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	2.5	0.12 <sup>ab</sup>	3	0.15 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	4.5	0.23 <sup>ab</sup>	2.5	0.13 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>

<b>Tablo 3.7: (devam)</b>						
<b><i>S. syriaca</i></b>						
<b>1. konsantrasyon (50 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	2.5	0.17 <sup>ab</sup>	4	0.27 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	1	0.03 <sup>b</sup>	1	0.064 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	1	0.054 <sup>ab</sup>	10	0.53 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	4.5	0.31 <sup>ab</sup>	1.5	0.1 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>
<b>2. konsantrasyon (100 mg/L)</b>						
Su Ekstraktı	1	0.08 <sup>ab</sup>	1.5	0.13 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etanol Ekstraktı	0.5	0.027 <sup>b</sup>	3	0.20 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Metanol Ekstraktı	2.5	0.17 <sup>ab</sup>	5	0.34 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>
Etil Asetat Ekstraktı	0.5	0.025 <sup>b</sup>	10	0.53 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>b</sup>

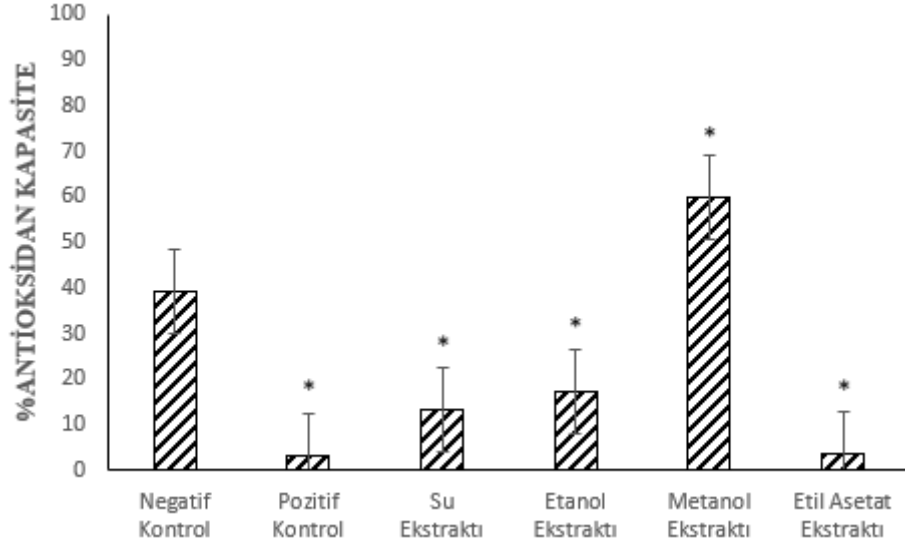
### 3.5.2 *In vivo* antioksidan bulguları

#### 3.5.2.1 *In vivo* DPPH

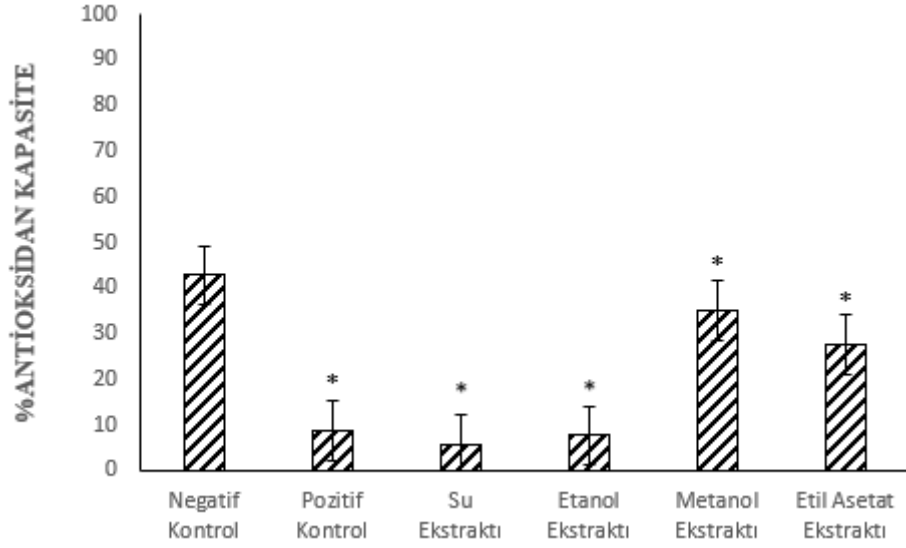
*In vivo* koşullarda gerçekleştirilen antioksidan kapasite testine ait bulgular Şekil 3.5-3.6-3.7-3.8'de görselleştirilmiştir. DPPH radikal süpürme aktivitesi, her bir ekstrakt için % antioksidan kapasitesi cinsinden hesaplanarak değerlendirilmiştir.



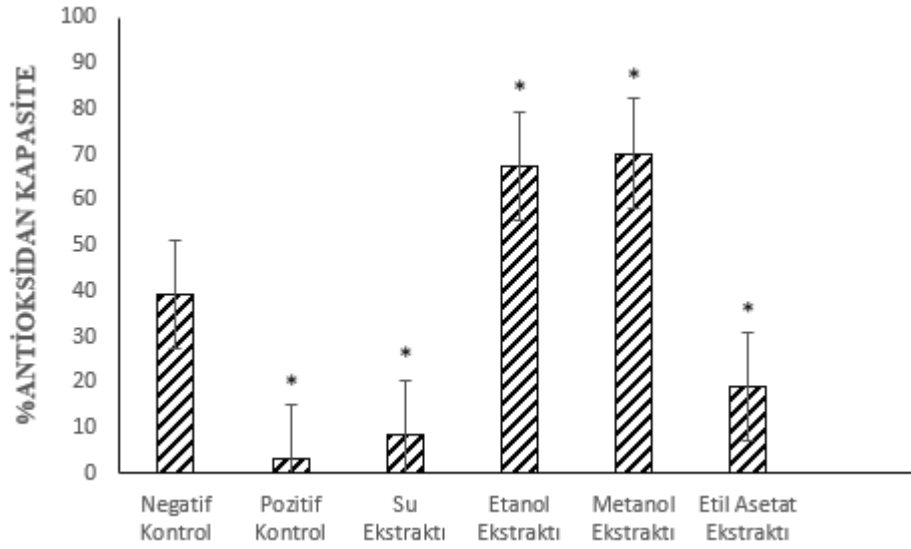
**Şekil 3.5:** *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinin *in vivo* DPPH sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



**Şekil 3.6:** *S. multicaulis* bitkisinin *in vivo* DPPH sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



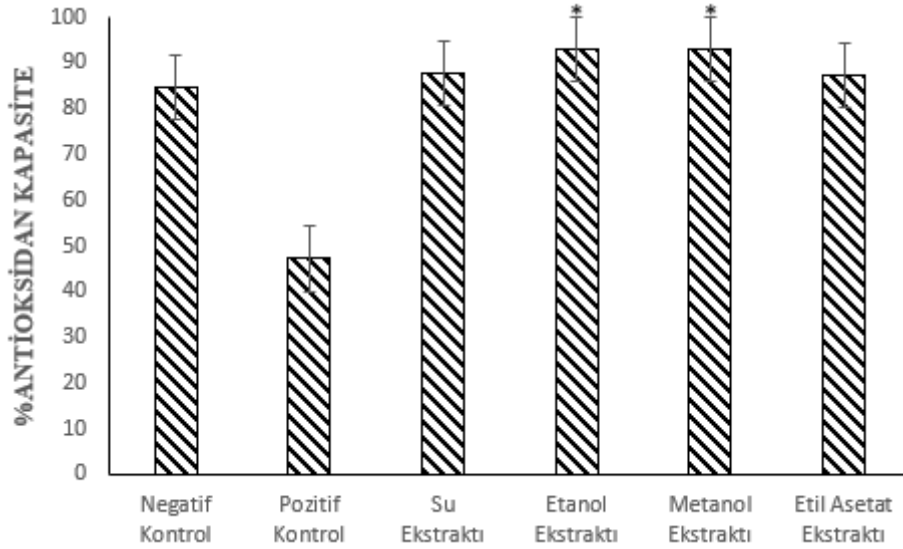
**Şekil 3.7:** *S. suffruticosa* bitkisinin *in vivo* DPPH sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



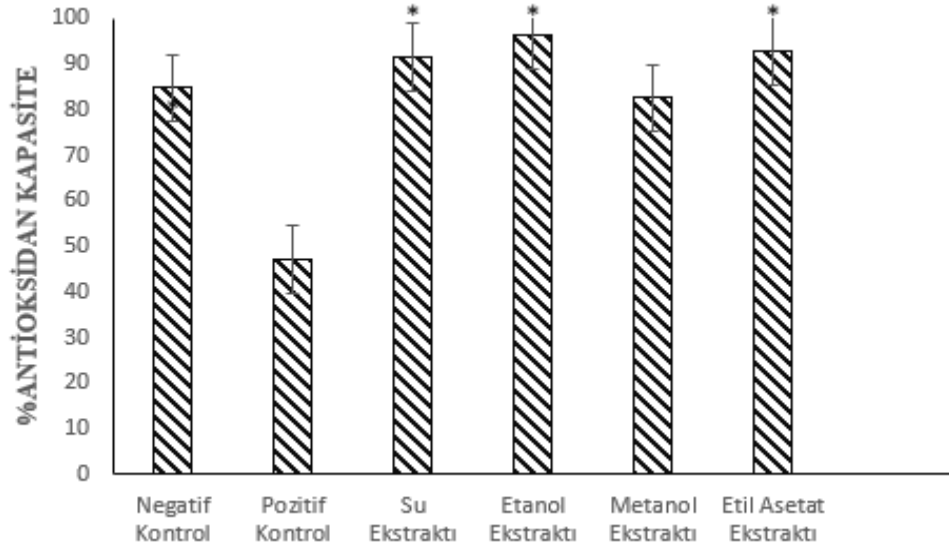
**Şekil 3.8:** *S. syriaca* bitkisinin *in vivo* DPPH sonuçları (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)

### 3.5.2.2 *In vivo* ABTS

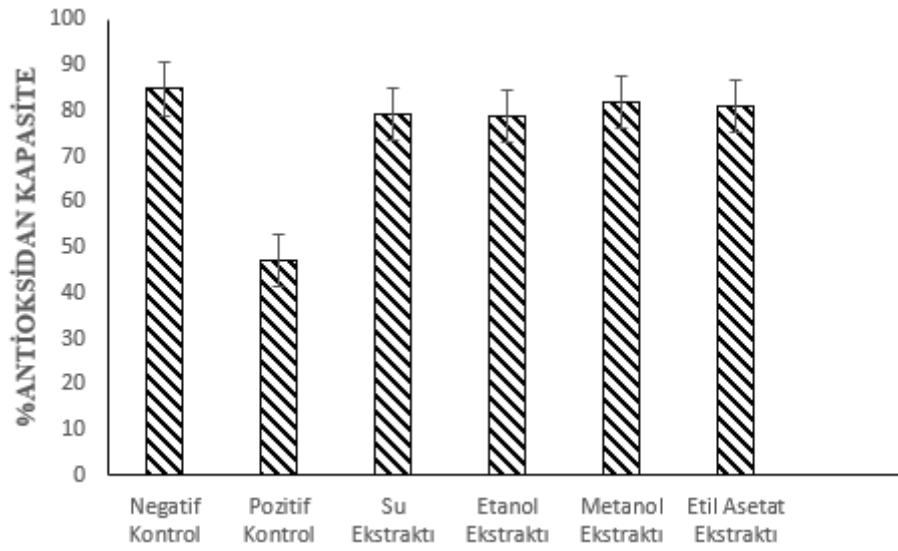
*In vivo* ortamda uygulanan antioksidan aktivite testine ilişkin sonuçlar Şekil 3.9-3.10-3.11-3.12’de sunulmuştur. ABTS<sup>+</sup> radikal süpürme kapasitesi, her bir ekstrakt için % antioksidan kapasite değeri olarak hesaplanmıştır.



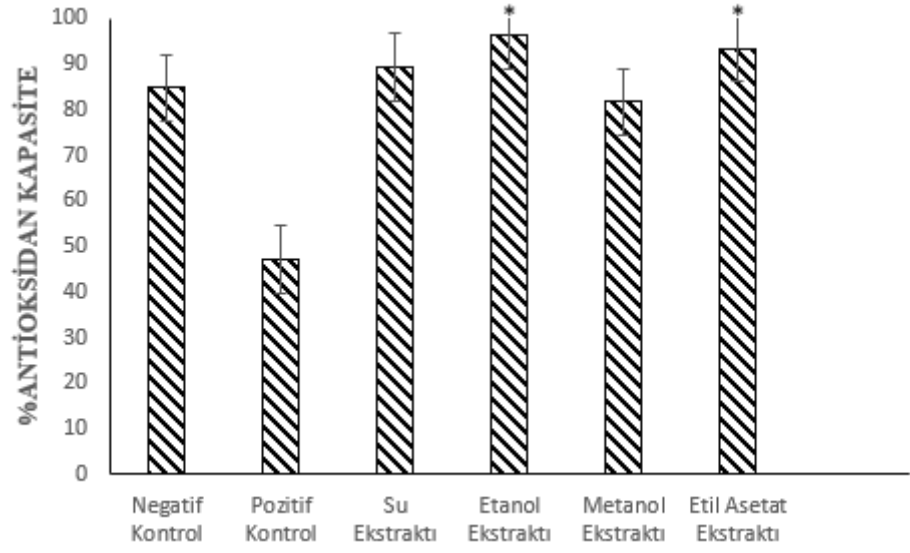
**Şekil 3.9:** *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinin *in vivo* ABTS sonuçları



**Şekil 3.10:** *S. multicaulis* bitkisinin *in vivo* ABTS sonuçları



**Şekil 3.11:** *S. suffruticosa* bitkisinin *in vivo* ABTS sonuçları



Şekil 3.12: *S. syriaca* bitkisinin *in vivo* ABTS sonuçları

### 3.5.2.3 *In vivo* FRAP

*In vivo* ortamda gerçekleştirilen antioksidan kapasite testine ilişkin FRAP analiz sonuçları Tablo 3.8’de sunulmuştur.

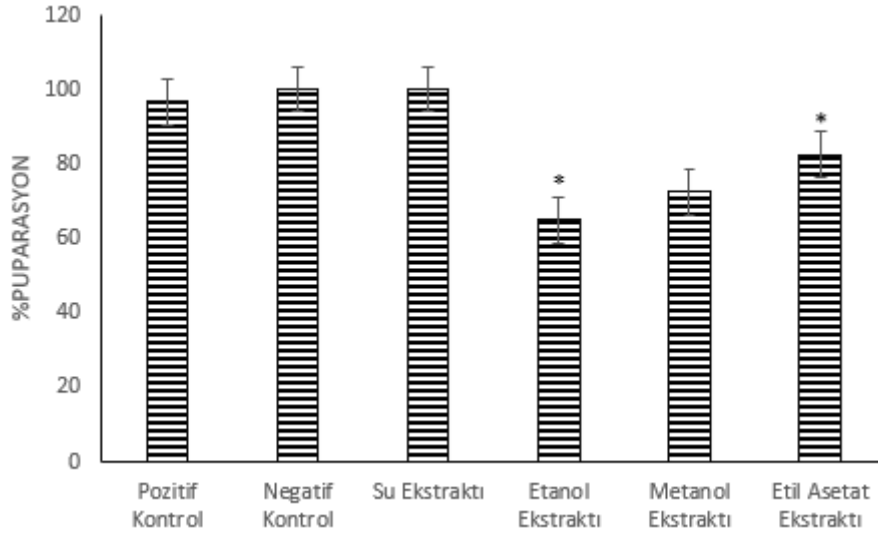
**Tablo 3.8:** *In vivo* FRAP testi sonuçları

Örnekler	Ekstrakt	FRAP ( $\mu\text{g TE/g}$ )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6.5 $\mu\text{g/mL}$ )		0.0078 $\pm$ 0.0001
<i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i>	Su	0.0204 $\pm$ 0.0001*
	Etanol	0.0147 $\pm$ 0.0003*
	Metanol	0.0122 $\pm$ 0.0001*
	Etil Asetat	0.0234 $\pm$ 0.0003*
<i>S. multicaulis</i>	Su	0.0042 $\pm$ 0.000007*
	Etanol	0.0034 $\pm$ 0.000003*
	Metanol	0.0025 $\pm$ 0.000002*
	Etil Asetat	0.0060 $\pm$ 0.000008*
<i>S. suffruticosa</i>	Su	0.0049 $\pm$ 0.000009*
	Etanol	0.0051 $\pm$ 0.0003*
	Metanol	0.0061 $\pm$ 0.0002*
	Etil Asetat	0.0078 $\pm$ 0.0006
<i>S. syriaca</i>	Su	0.0045 $\pm$ 0.0002*
	Etanol	0.0143 $\pm$ 0.0007*
	Metanol	0.0133 $\pm$ 0.0001*
	Etil Asetat	0.0083 $\pm$ 0.0001*

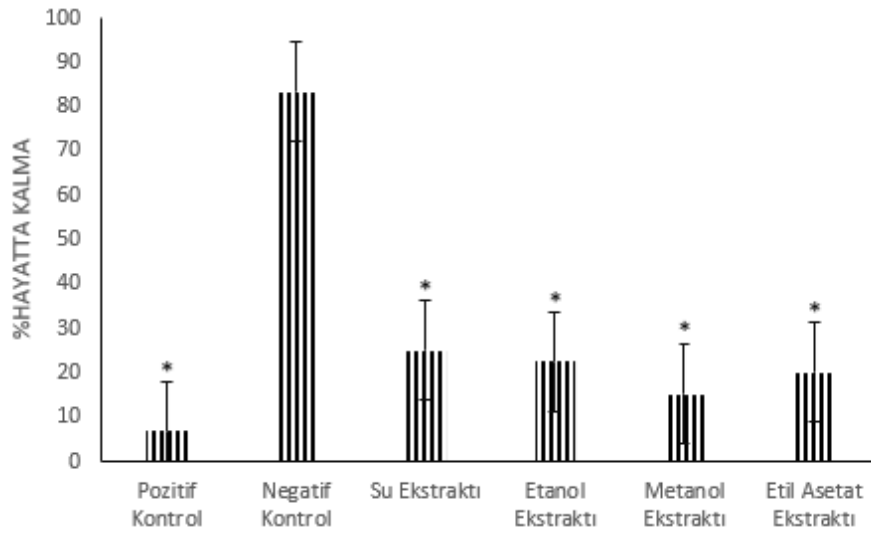
(\* , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir (p<0.05).)

### 3.5.3 *In vivo* toksikolojik etkilerin belirlenmesi

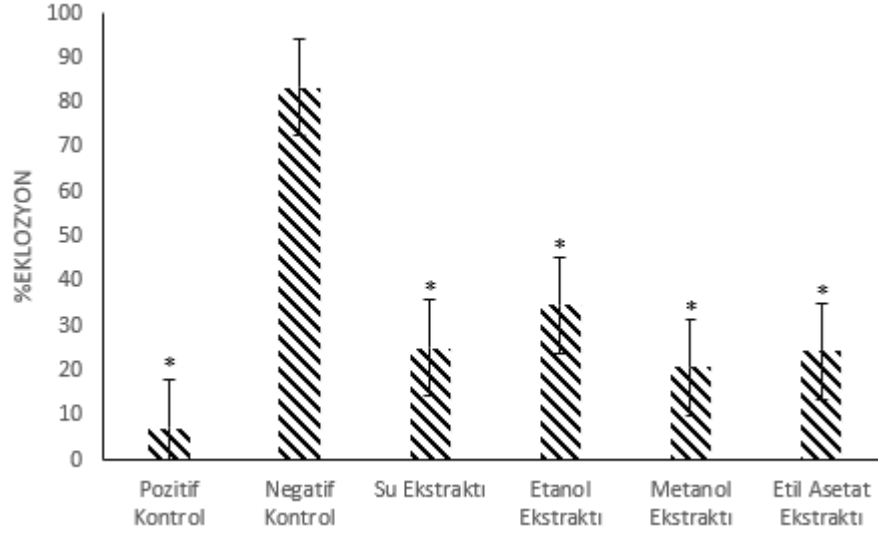
*Salvia* türlerinden elde edilen ekstraktların *D. melanogaster* üzerindeki biyolojik etkileri; % puparasyon, % hayatta kalma ve % eklozyon oranları üzerinden değerlendirilmiş olup, elde edilen tüm bulgular Şekil 3.13-3.24 arasında gösterilmiştir.



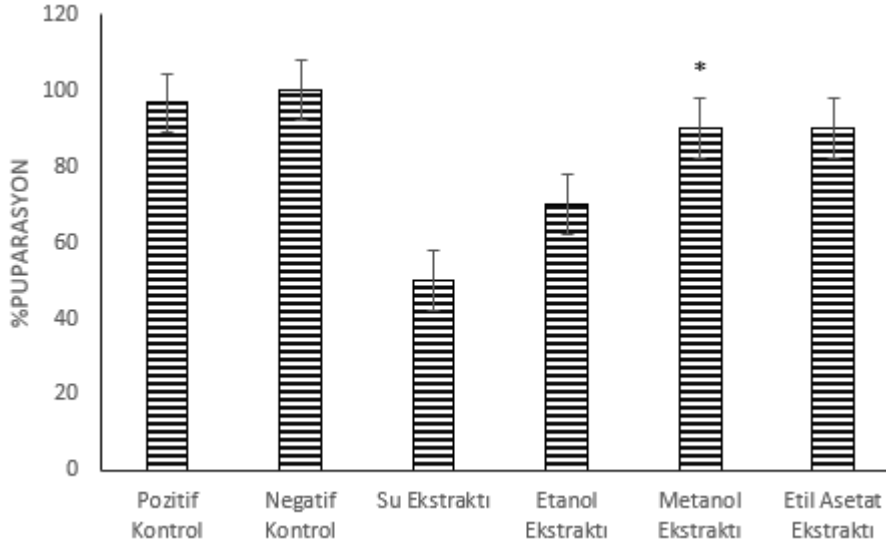
**Şekil 3.13:** *S. candidissima* subsp. *candidissima* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % puparasyon etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



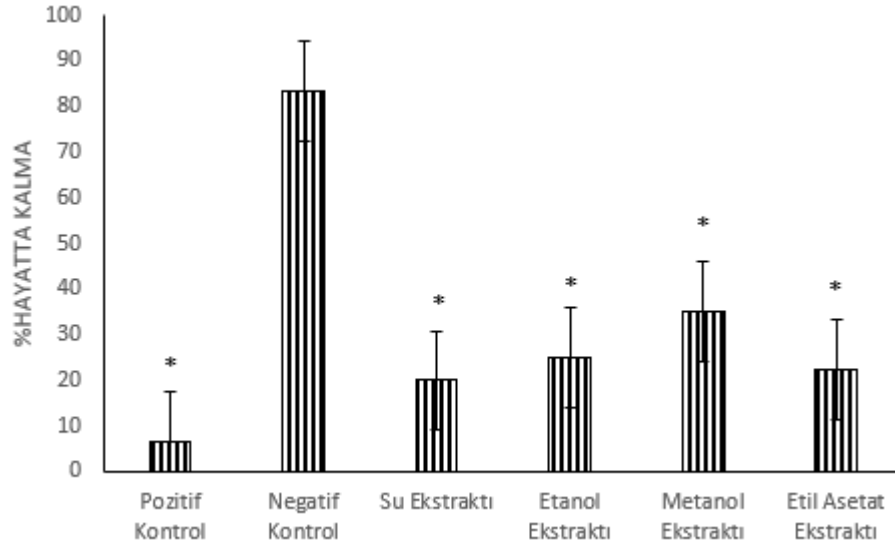
**Şekil 3.14:** *S. candidissima* subsp. *candidissima* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % hayatta kalma etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



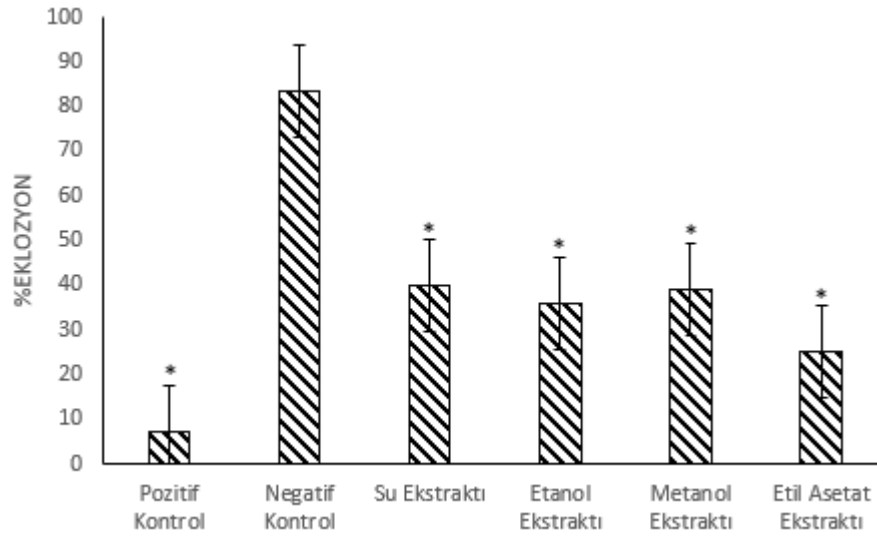
**Şekil 3.15 :** *S. candidissima* subsp. *candidissima* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % eklozyon etkileri  
(\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



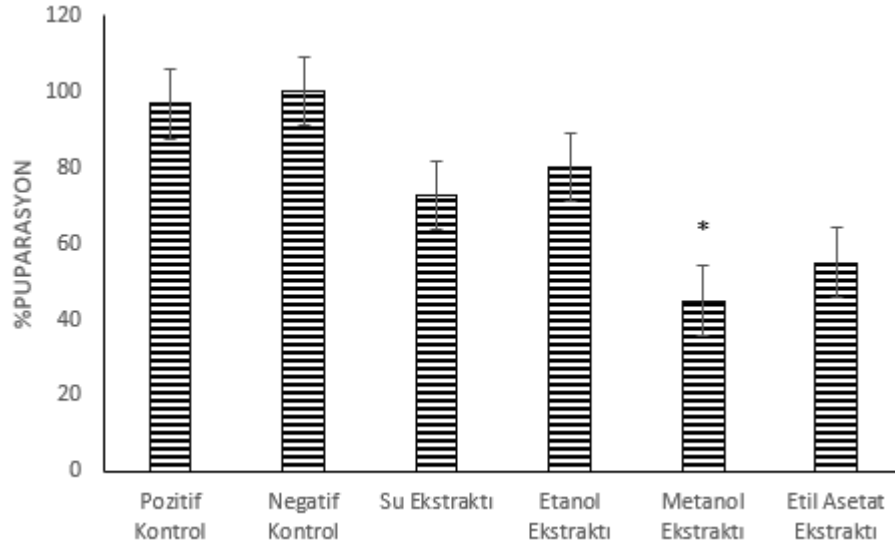
**Şekil 3.16:** *S. multicaulis* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % puparasyon etkileri  
(\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



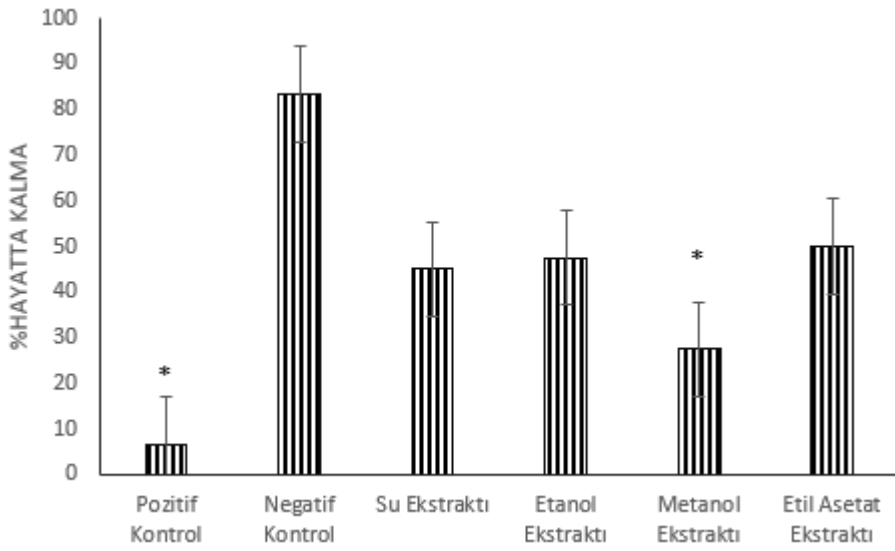
**Şekil 3.17:** *S. multicaulis* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % hayatta kalma etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



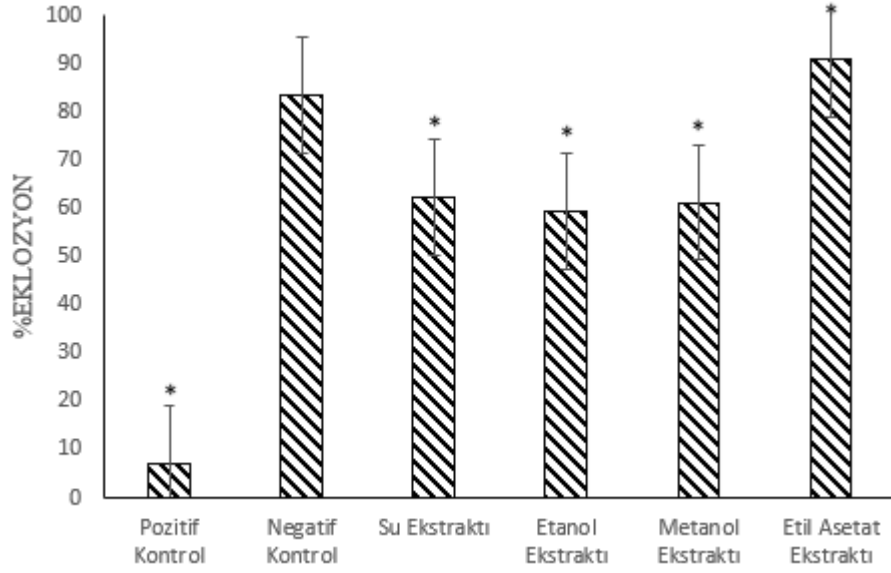
**Şekil 3.18:** *S. multicaulis* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % eklozyon etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



**Şekil 3.19:** *S. suffruticosa* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % puparasyon etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)

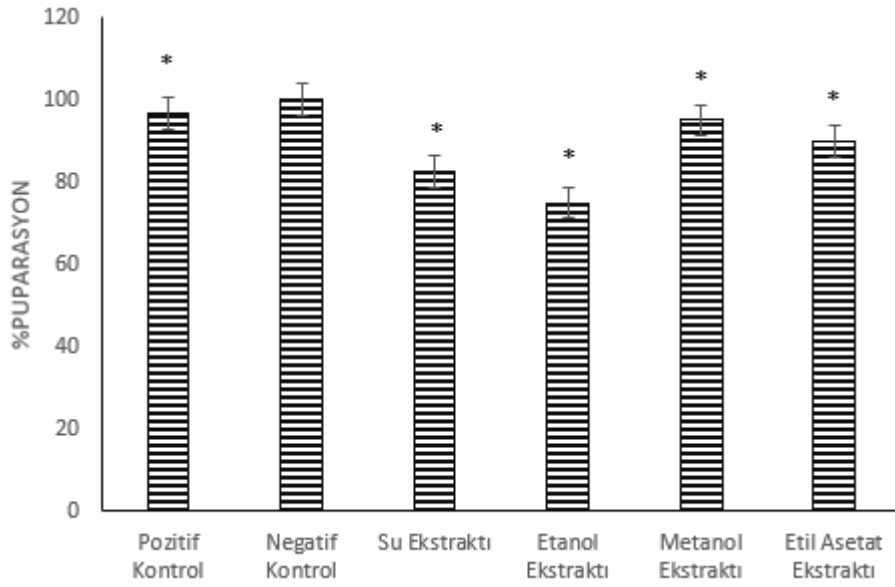


**Şekil 3.20:** *S. suffruticosa* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % hayatta kalma etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



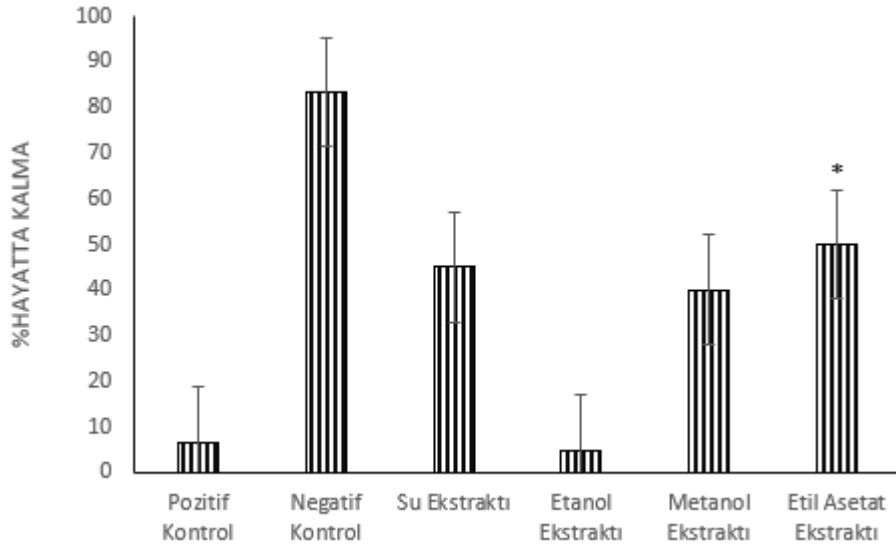
**Şekil 3.21:** *S. suffruticosa* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % eklozyon etkileri

(\* , negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)

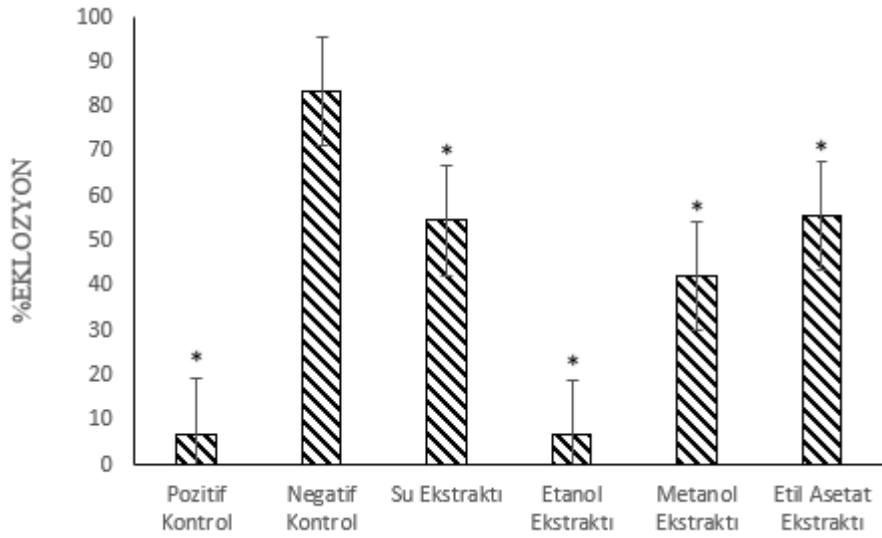


**Şekil 3.22:** *S. syriaca* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % puparasyon etkileri

(\* , negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)



**Şekil 3.23:** *S. syriaca* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % hayatta kalma etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05))



**Şekil 3.24:** *S. syriaca* ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerindeki % eklozyon etkileri (\*, negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).)

### 3.6 Antibakteriyel Aktivite

Bu çalışmada incelenen dört farklı *Salvia* türünün (*S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa*, *S. syriaca*) su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC-8739) ve Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538) bakterilerine karşı etkinlikleri disk difüzyon yöntemi ve MİK testi ile değerlendirilmiştir.

Pozitif kontrol olarak penisilin/streptomisin 4mg/mL konsantrasyonunda kullanılmıştır. Pozitif kontrolün gösterdiği etkinlikler sırasıyla *E. coli* için  $25.68 \pm 0.25$  mm, *S. aureus* için  $23.20 \pm 0.05$  mm zon çapı ölçülmüştür.

Sonuçlar, Tablo 3.9'da sunulmuştur. Ekstraktların tamamına bakıldığında inhibisyon zon çapları 6.38 mm ile 11.22 mm arasında bulunmuştur.

**Tablo 3.9:** *Salvia* türlerinin farklı çözücü ekstraktlarının *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri

	İnhibisyon Zonu (mm)		MİK (mg/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Pozitif Kontrol (penisilin/streptomisin)	$25.68 \pm 0.25$	$23.20 \pm 0.05$	0.156	0.156
<b><i>S. candidissima</i> subsp. <i>candidissima</i></b>				
Su	$6.93 \pm 0.48$	$9.74 \pm 0.36$	5	5
Etanol	$7.98 \pm 0.60$	$8.44 \pm 0.12$	5	5
Metanol	$9.52 \pm 0.44$	$8.55 \pm 0.47$	2.5	5
Etil asetat	$8.14 \pm 0.53$	$10.0 \pm 0.41$	2.5	5
<b><i>S. multicaulis</i></b>				
Su	$11.18 \pm 0.88$	$6.68 \pm 0.09$	25	25
Etanol	$8.47 \pm 0.09$	$8.12 \pm 0.11$	25	5
Metanol	$8.41 \pm 0.26$	$7.39 \pm 0.16$	5	5
Etil asetat	$6.67 \pm 0.24$	$7.11 \pm 0.07$	25	25
<b><i>S. suffruticosa</i></b>				
Su	$6.60 \pm 0.11$	$6.15 \pm 0.04$	5	50
Etanol	$9.03 \pm 0.02$	$11.22 \pm 0.69$	1.25	5
Metanol	$8.14 \pm 0.49$	$8.28 \pm 0.19$	5	5
Etil asetat	$6.87 \pm 0.08$	$6.59 \pm 0.02$	2.5	50

---

**Tablo 3.9: (devam)**

***S. syriaca***

Su	$6.70 \pm 0.07$	$6.46 \pm 0.08$	25	50
Etanol	$6.78 \pm 0.21$	$6.75 \pm 0.15$	5	2.5
Metanol	$7.27 \pm 0.06$	$6.82 \pm 0.40$	1.25	5
Etil asetat	$6.51 \pm 0.14$	$6.57 \pm 0.09$	25	25

---

## 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

### 4.1 LC-MS/MS Sonuçları

Çalışmamızda *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türlerine ait bitki ekstraktları LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiş; toplamda 36 farklı fenolik bileşiğin (2-hidroksisünamik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 3-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, 4-hidroksibenzoik asit, apigenin, apigenin-7-*O*-glukozit, kafeik asit, klorojenik asit, eriodiktiol, ferulik asit, gallik asit, hesperidin, hyperozid, kaempferol, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozit, pinoresinol, protokatekik asit, pirokatekol, kuersetin, rosmarinik asit, sinapik asit, siringik asit, taksifolin, vanilin, verbaskozit, (+)-kateşin, (-)-epikateşin, *p*-kumarik asit, oleuropein, homovanilik asit, 3-hidroksitirozol, resveratrol ve ellajik asit) miktarları belirlenmiştir. *Salvia* türlerinden elde edilen ekstraktlara ait LC-MS/MS analiz sonuçları Tablo 3.1'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Birden fazla çözücü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi, tek çözücülü ekstraksiyona kıyasla, hedeflenen biyoaktif bileşenlerin daha yüksek verimle ve seçici olarak elde edilmesini sağlamakta; aynı zamanda daha yüksek saflıkta ekstraktların hazırlanmasına olanak tanımaktadır [134], [135], [136].

Elde edilen analiz verilerine göre bitkilerde en yüksek düzeyde tespit edilen üç fenolik bileşik sırasıyla *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinde rosmarinik asit (7583.76 µg/g), kaempferol (15.76 µg/g) ve luteolin (15.72 µg/g); *S. multicaulis* bitkisinde apigenin-7-*O*-glukozit (177.60 µg/g), luteolin-7-*O*-glukozit (110.97 µg/g) ve kafeik asit (23.81 µg/g); *S. suffruticosa* bitkisinde apigenin-7-*O*-glukozit (278.47 µg/g), luteolin-7-*O*-glukozit (117.01 µg/g) ve kafeik asit (18.03 µg/g); *S. syriaca* bitkisinin analizinde ise hesperidin (9307.68 µg/g), rosmarinik asit (1227.32 µg/g) ve hyperoside (615.65 µg/g) olarak tespit edilmiştir.

Literatür incelendiğinde Jedidi ve arkadaşlarının çalışmasında *Salvia officinalis* yapraklarında 13 farklı fenolik bileşen tanımlanmış; özellikle protokateşuik asit öne çıkan ana bileşen olarak raporlanmıştır. Bu çalışma yöntem olarak HPLC-PDA-ESI-MS/MS sistemini kullanmıştır. Yapılan analizler sonucunda, fenolik bileşik miktarları ile antioksidan kapasite arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğu gözlemlenmiştir [137].

Koçer ve çalışma arkadaşları, *Salvia cilicica* Boiss. özütünün fenolik bileşen içeriğini belirlemek amacıyla LC-MS/MS tekniğini, metodolojik olarak optimize edilmiş bir protokol

eşliğinde uygulamış ve luteolin, asetohidroksamik asit, protokateşuik asit, kaempferol, fumarik asit, gallik asit, kafeik asit, kuersetin, 4-hidroksibenzoik asit ve naringenin olmak üzere toplam 10 fenolik bileşiği tanımlamışlardır. Elde edilen bulgular arasında başlıca luteolin, protokateşuik asit, kaempferol, gallik asit, kafeik asit ve naringenin gibi önemli flavonoid ve fenolik asit türevleri yer almaktadır [138]. Farhat ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda *Salvia officinalis* türünün bileşiminde gallik asit, ferulik asit, kafeik asit, rosmarinik asit, genkwanin, luteolin, naringin, karnosol, luteolin-7-*O*-glukozit, apigenin-7-*O*-glukozit, *p*-hidroksibenzoik asit, metil karnosat, apigenin ve karnosik asit gibi çeşitli fenolik asitler ve flavonoidlerin yer aldığı rapor edilmiştir [139]. Akkol ve arkadaşları *S. halophila* Çit ve *S. virgata* türlerinde luteolin-7-*O*-glukozit, gallik asit, *o*-kumarik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, luteolin, kafeik asit ve rosmarinik asit gibi fenolik bileşiklerin varlığını tespit etmiştir [140]. Velamuri ve arkadaşlarının çalışmasında UHPLC-QTOF-MS/MS tekniği kullanılarak *Salvia officinalis* ve *Rosmarinus officinalis* fenolik profilleri detaylıca analiz edilmiş; rosmarinik asit ( $17\,678.7 \pm 673.4 \mu\text{g/g}$ ) ve 12-methoxy karnosik asit ( $21\,918.3 \pm 715.4 \mu\text{g/g}$ ) en yüksek konsantrasyonlarda rapor edilmiştir [141] Al-Jaber ve çalışma arkadaşlarının gerçekleştirdiği HPLC analizleri sonucunda, *Salvia eigii* Zohary, *S. hierosolymitana* Boiss. ve *S. viridis* L. türlerinde luteolin-7-*O*-glukozitin dikkate değer düzeylerde bulunduğu belirlenmiştir (sırasıyla 1756.73, 21 651.36 ve 26 125.14 mg/kg kuru bitki). Bununla birlikte, rosmarinik asit özellikle *S. hierosolymitana* (27 124.93 mg/kg) ve *S. eigii* (15 783.33 mg/kg) türlerinde en baskın fenolik bileşik olarak öne çıkmıştır. Ayrıca, *S. hierosolymitana* ve *S. viridis* örneklerinde salvianolik asit B'nin (896.11 ve 890.9 mg/kg) varlığı da rapor edilmiştir [142].

Rosmarinik asit, başlıca *Lamiaceae* ve *Boraginaceae* familyalarına ait bitkilerde doğal olarak bulunan, yapısal olarak kafeik asit türevi bir polifenolik bileşik olup, çeşitli biyolojik aktiviteleri ile dikkat çekmektedir. Literatürde güçlü antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral ve antikanser özellikler gösterdiği bildirilen bu molekül, farmasötik, gıda ve kozmetik endüstrilerinde potansiyel uygulamalara sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda rosmarinik asidin nöroprotektif etkileri de araştırılmış; özellikle nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer gibi) bağlamında bellek ve bilişsel işlevler üzerinde olumlu etkiler sağladığı rapor edilmiştir [143]. Nadeem ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada rosmarinik asitin, tümör oluşum sürecine farklı biyolojik mekanizmalar üzerinden etki ederek müdahalede bulunabildiği; bu mekanizmalar arasında hücre çoğalmasının baskılanması, apoptozun indüklenmesi, metastazın engellenmesi ve inflamatuvar yanıtların modülasyonu yer aldığı

tespit edilmiştir. Bununla birlikte, rosmarinik asidin literatürde antimikrobiyal, antiinflamatuar, antioksidan, ayrıca antidepresan ve yaşlanma karşıtı etkiler gösterdiği de çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [144].

Apigenin-7-*O*-glukozitin yalnızca güçlü bir antioksidan değil, aynı zamanda belirgin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu da rapor edilmiştir. Dolayısıyla bu bileşik, hem oksidatif stresin azaltılmasında hem de mikrobiyal enfeksiyonların kontrolünde öne çıkan biyolojik olarak değerli bir flavonoid olarak değerlendirilmektedir [46].

Hesperidin ve türevleri, portakal ve limonlarda bulunan, geniş bir hastalık yelpazesinde terapötik potansiyele sahip biyolojik açıdan değerli flavonoidlerdir. Yapılan çalışmalar bu bileşiklerin güçlü antioksidan, antiviral, antikanser ve antidiyabetik etkilerinin yanı sıra analjezik, organ koruyucu, nöroprotektif, antihipertansif ve kardiyoprotektif özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur [145].

Çalışmamızda elde edilen LC-MS/MS bulguları, literatürde bildirilen fenolik profillerle genel olarak uyum göstermektedir. Özellikle rosmarinik asit, apigenin türevleri, luteolin türevleri ve kafeik asit hem bizim sonuçlarımızda hem de farklı *Salvia* türlerinde baskın bileşikler olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, *S. syriaca*'da hesperidinin diğer türlere kıyasla belirgin biçimde daha yüksek düzeyde bulunması, bu türün biyolojik aktiviteleri açısından dikkat çekici bir sonuç olarak değerlendirilmektedir. Benzer şekilde, *S. candidissima* subsp. *candidissima*'da rosmarinik asidin yüksek yoğunluğu, bu türün güçlü antioksidan potansiyeline işaret etmektedir. Bu farklılıklar, türler arası fenolik çeşitliliğin hem ekolojik koşullar hem de genetik faktörlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir [146].

#### **4.2 Antioksidan Aktivite Test Sonuçları**

Bu çalışmada, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türlerinden hazırlanan ekstraktların antioksidan aktiviteleri; DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların serbest radikal giderme kapasiteleri, elektron verme yetenekleri ve demir indirgeme güçleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Her örneğe ait IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 3.2 ve 3.3'de, FRAP analizleri Tablo 3.4'de ayrıntılı olarak sunulmuştur. Bu analizlerde, referans bileşik olarak gallik asit (0.1 mg/mL) kullanılmış ve tüm ekstraktlar bu pozitif kontrol ile

karşılaştırılmıştır. Gallik asidin DPPH testinde belirlenen IC<sub>50</sub> değeri 0.005 ± 0.010 mg/mL, ABTS testinde ise 0.001 ± 0.100 mg/mL olarak hesaplanmıştır. FRAP testinde sonuçlar trolox eşdeğerinde hesaplanmıştır.

*S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinde DPPH testine ait IC<sub>50</sub> değerleri 0.09 – 0.57 mg/mL aralığında değişmiş, en düşük IC<sub>50</sub> değeri 0.09 ± 0.00 mg/mL ile metanol ekstraktında gözlenmiş ve bu örnek en yüksek radikal süpürme kapasitesini göstermiştir. En zayıf DPPH aktivitesi ise 0.57 ± 0.10 mg/mL ile su ekstraktında belirlenmiştir. ABTS testinde ise en yüksek antioksidan aktivite 0.07 ± 0.01 mg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile etanol ekstraktında saptanırken, en düşük aktivite 1.51 ± 0.07 mg/mL ile etil asetat ekstraktında gözlenmiştir. FRAP analizine göre, 38.61 ± 6.13 mg/g TE değeri ile en yüksek demir indirgeme kapasitesi metanol ekstraktına aitken, bu testte en düşük değer 25.94 ± 3.10 mg/g TE ile su ekstraktında kaydedilmiştir.

*S. multicaulis* bitkisinde DPPH testinde elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri 0.13–3.34 mg/mL aralığında değişmiş, en yüksek radikal süpürme kapasitesi 0.13 ± 0.01 mg/mL ile metanol ekstraktında gözlenmiştir. En zayıf DPPH aktivitesi ise 3.34 ± 0.06 mg/mL ile su ekstraktına aittir. ABTS testinde ise IC<sub>50</sub> değerleri 0.36–0.52 mg/mL arasında bulunmuş, en güçlü antioksidan etki 0.36 ± 0.00 mg/mL ile etil asetat ekstraktında belirlenmiştir. Su ekstraktı, bu testte de en düşük aktiviteyi sergilemiştir (0.52 ± 0.01 mg/mL). FRAP analizine göre, en yüksek demir indirgeme kapasitesi 14.79 ± 1.25 mg/g TE değeri ile metanol ekstraktında gözlenmiş; en düşük değer ise 5.05 ± 0.29 mg/g TE ile etil asetat ekstraktında kaydedilmiştir.

*S. suffruticosa* bitkisinin DPPH analizine göre, en yüksek radikal süpürme etkisi 1.77 ± 0.04 mg/mL IC<sub>50</sub> değeriyle metanol ekstraktında belirlenmiş, en zayıf etki ise 3.31 ± 0.13 mg/mL ile su ekstraktında gözlenmiştir. ABTS test sonuçları 0.27–0.84 mg/mL aralığında olup, en düşük IC<sub>50</sub> değeriyle en yüksek antioksidan etki 0.27 ± 0.03 mg/mL ile yine metanol ekstraktında saptanmıştır. Bu testte en zayıf etkiyi 0.84 ± 0.04 mg/mL ile etanol ekstraktı göstermiştir. FRAP yöntemiyle ölçülen demir indirgeme kapasitesinde en yüksek değer 14.42 ± 1.78 mg/g TE ile metanol ekstraktında elde edilirken, en düşük değer 4.87 ± 0.78 mg/g TE ile etil asetat ekstraktında kaydedilmiştir. Üç farklı analiz yöntemi de metanol ekstraktının antioksidan kapasitesinin diğer çözücülere kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

*S. syriaca* bitkisinin DPPH analizine göre en düşük IC<sub>50</sub> değeri 0.13 ± 0.00 mg/mL ile etanol ekstraktında gözlenmiş olup, bu durum en yüksek radikal süpürme kapasitesine işaret etmektedir. En düşük DPPH aktivitesi ise 0.48 ± 0.13 mg/mL ile su ekstraktında belirlenmiştir. ABTS testi sonuçları 0.27–0.84 mg/mL aralığında değişmiş, en yüksek antioksidan etkinlik 0.27 ± 0.03 mg/mL IC<sub>50</sub> değeriyle yine etanol ekstraktında tespit edilmiştir. Bu testte en düşük etki su ekstraktına aittir (0.84 ± 0.04 mg/mL). FRAP analizine göre, en yüksek demir indirgeme kapasitesi 42.14 ± 6.38 mg/g TE ile su ekstraktında belirlenirken, en düşük değer 26.84 ± 1.69 mg/g TE ile metanol ekstraktında saptanmıştır.

DPPH, ABTS ve FRAP analizleri sonucunda metanol ve etanol ekstraktlarının, su ve etil asetat ekstraktlarına kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bu durum, kullanılan çözücülerin polaritelerinin fenolik bileşiklerin ekstraksiyonundaki verimliliği doğrudan etkilemesinden kaynaklanabilir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar, çözücü türünün antioksidan kapasite ölçümlerinde belirleyici bir faktör olduğunu göstermektedir.

Literatür incelendiğinde, Uysal ve arkadaşlarının *Salvia ceratophylla* L. üzerine yaptıkları çalışmalarda, hidro-alkollü ekstrelerin düşük polariteli çözücülerle hazırlananlardan daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olabileceği bildirilmiştir. Bu bağlamda, hidro-metanolik toprak üstü ekstrenin DPPH radikalini en yüksek düzeyde süpürdüğü (193.40 ± 0.27 mg TE/g) belirlenmiştir. ABTS analizleri incelendiğinde, kök ekstreleri arasında en güçlü radikal temizleyici etkinin hidro-metanolik örnekte (116.50 ± 1.65 mg TE/g) ortaya çıktığı görülmektedir. Bu bulgu, fenolik bileşiklerin elde edilmesinde hidro-alkollü çözücülerin daha etkin rol oynadığını ortaya koyan çalışmalarla benzerlik taşımaktadır. FRAP yönteminde ise hidro-metanolik kök ekstrenin en yüksek indirgeme kapasitesi (142.00 ± 0.14 mg TE/g) ile öne çıktığı saptanmıştır. Bu sonuç, hidro-alkollü ekstrelerin güçlü indirgeme özelliklerini vurgulayan önceki araştırmalarla paralellik göstermektedir [147].

Mokhtari ve arkadaşlarının kekik (*Thymus vulgaris* L.), adaçayı (*Salvia officinalis* L.), kekik-adaçayı karışımı ile sentetik antioksidanlardan biri olan BHT'nin (bütil hidroksitoluen, E321) karşılaştırıldığı bir çalışmada, DPPH radikal süpürme testinde en düşük EC<sub>50</sub> değerinin kekik-adaçayı karışımında (55.51 µg/mL) ölçüldüğü; bu sonucu artan sırayla kekik, adaçayı ve BHT'nin takip ettiği bildirilmiştir (69.39, 77.21 ve 86.58 µg/mL).

Aynı araştırmada, kekik, adaçayı ve bu iki bitkinin karışımlarının metanolik ekstreleri üzerinde gerçekteştirilen FRAP analizleri de BHT ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, adaçayı ekstresi ile BHT'nin en dūřuk FRAP değerlerini verdiğini ortaya koyarken, metanolik adaçayı ekstresi ile BHT arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir. Buna karşılık, kekik-adaçayı ekstresinin, hem diğer metanolik ekstrelerden hem de BHT çözeltisinden anlamlı derecede daha yüksek FRAP kapasitesi sergilediği ifade edilmiştir [148].

Rustaie ve arkadaşlarının çalışmasında, *Salvia suffruticosa*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol, kloroform ve petrol eteri ekstrelerinden çeşitli bileşikler (lupeol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kafeik asit ve 1-feruloil- $\beta$ -D-glikopiranoz) izole edilmiştir. Bu bileşiklerin serbest radikal süpürücü potansiyelleri DPPH yöntemi ile değerlendirilmiş ve 12  $\mu$ g/mL IC<sub>50</sub> değeri ile kafeik asidin en güçlü aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [29]. Ayrıca Asadi ve arkadaşlarının farklı *Salvia* türleri üzerinde yaptıkları çalışmada *S. multicaulis*'in orta düzeyde antioksidan kapasiteye sahip olduğunu bildirmiştir [149]. Bahadori ve arkadaşlarının çalışmasında özellikle rutin ve rosmarinik asit bakımından zengin *S. syriaca* metanolik ekstresi, DPPH testinde BHT ile benzer düzeyde (EC<sub>50</sub> = 70 ve 66  $\mu$ g/mL) radikal süpürme kapasitesi göstermiştir [89].

Türkiye'den farklı popölasyonlara ait yapılan farklı çalışmalarda *S. fruticosa*'nın fenolik zengin ekstreleri [150] ve *S. cadmica* Boiss.'in sulu ve metanolik ekstreleri DPPH, ABTS ve FRAP testlerinde yüksek aktivite sergilemiş, bu türlerde rosmarinik asit ana bileşik olarak tespit edilmiştir (20.6–41.9 mg/g ekstrakt) [151].

### 4.3 Sitotoksisite Test Sonuçları

Bu çalışmada *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türlerinden hazırlanan su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının 25 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik maruziyet sonucunda sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitoprotektif etkileri MTS yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular şekil 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4'te sunulmaktadır. 490 nm'de elde edilen absorbans değerleri negatif kontrol ile karşılaştırılarak bitki ekstraktlarının normal hücre yaşamlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

MTS test sonuçlarına göre *S. candidissima* subsp. *candidissima* su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının 24 saatlik maruziyet sonucunda sağlıklı lenfosit hücrelerinin normal yaşamlılığını desteklediği ve negatif kontrole göre benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Özellikle 50 mg/L konsantrasyonundaki su; 25, 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarındaki etanol ekstraktları; 50 ve 100 mg/L metanol ekstraktları ; 25, 50 ve 100 mg/L etil asetat ekstraktları 24 saat sonucunda negatif kontrole benzer ( $p>0.05$ ) veya negatif kontrolden yüksek ve anlamlı ( $p<0.05$ ) absorbands değerleri göstermiştir (Şekil 3.1).

*S. multicaulis* su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının ise 24 saatlik maruziyet sonucunda sağlıklı lenfosit hücrelerinin normal yaşamlılığını desteklediği ve negatif kontrole göre benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Özellikle 100 mg/L konsantrasyonlarındaki su, etanol ve metanol ekstraktları ile 25, 50, 100 mg/L etil asetat ekstraktı negatif kontrole benzer ( $p>0.05$ ) veya negatif kontrolden yüksek ve anlamlı ( $p<0.05$ ) absorbands değerleri göstermiştir (Şekil 3.2).

*S. suffruticosa* su, metanol ve etil asetat ekstraktlarının 24 saatlik maruziyet sonucunda sağlıklı lenfosit hücrelerinin normal yaşamlılığını desteklediği ve negatif kontrole göre benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Özellikle 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarındaki su, metanol ve etil asetat ekstraktları 24 saat sonucunda negatif kontrole benzer ( $p>0.05$ ) veya negatif kontrolden yüksek ( $p<0.05$ ) absorbands değerleri göstermiştir (Şekil 3.3).

*S. syriaca* su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının 24 saatlik maruziyet sonucunda sağlıklı lenfosit hücrelerinin normal yaşamlılığını desteklediği ve negatif kontrole göre benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır ( $p>0.05$ ). Özellikle 100 mg/L su ekstraktı; 50 ve 100 mg/L etanol ekstraktları; 25, 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarındaki metanol ekstraktları; 25 ve 50 mg/L etil asetat ekstraktları; 24 saat sonucunda negatif kontrole benzer ( $p>0.05$ ) veya negatif kontrolden yüksek ( $p<0.05$ ) absorbands değerleri göstermiştir (Şekil 3.4).

MTS testinin sonuçları incelendiğinde tüm bitkilerin 48 saatlik maruziyeti hücre yaşamlılığını 24 saat maruziyete göre azaltmıştır. Bu durum, primer lenfosit hücrelerinin *in vitro* hücre kültürü ortamlarındaki yaşamlılığının kısıtlı olması gerçeği ile uyumludur [152].

48 saatlik inkübasyon sonrasında en yüksek yaşamlılıklar *S. candidissima* subsp. *candidissima*'nın 100 mg /L metanol konsantrasyonunda, *S. multicaulis*'in 100 mg/L su konsantrasyonunda, *S. suffruticosa*'nın 50 mg/L etanol konsantrasyonunda ve *S. syriaca*'nın 100 mg/L su konsantrasyonunda gözlenmiştir (Şekil 3.1-3.4).

Literatürde başka *Salvia* türleri ile yapılan çalışmalarda Firuzi ve arkadaşları metanol ve diklorometan özütlerinin antikanser özellikte olduğu bildirilmiştir. *S. eremophila* ve *S. santolinifolia*'nın tüm özütleri 1.5-75.2 µg/mL'lik IC<sub>50</sub> değerlerinde sitotoksik aktivite göstermişlerdir [102]. Najaran ve arkadaşlarının çalışmasında *Salvia chloroleuca* Rech. f., ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri, MTS testi ile değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar, hücre proliferasyonunun doza bağlı olarak anlamlı şekilde baskılandığını ortaya koymuştur [153].

Jažo ve arkadaşları *Salvia officinalis* uçucu yağlarının sitotoksik etkileri MTS yöntemiyle farklı sağlıklı ve kanserli hücre hatlarında değerlendirmiştir. Elde edilen bulgular, sağlıklı hücre hatlarının kanser hücrelerine kıyasla adaçayı uçucu yağlarına daha dirençli olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle fibroblast kökenli hücreler ile kanser hücrelerinin, akciğer dokusundan türetilen kanser dışı hücrelere kıyasla daha az duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Kimyasal analizler, α- ve β-tuyon, kafur ve 1,8-sineol gibi başlıca bileşenlerin farklı oranlarda bulunmasının, uçucu yağların sitotoksik aktivitesindeki farklılıklarla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, *S. officinalis* uçucu yağlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin, hem kimyasal bileşim farklılıkları hem de hücre tipine bağlı olarak değiştiğini göstermekte ve bitkinin potansiyel farmakoterapötik kullanımına işaret etmektedir [154].

Parsaee ve arkadaşları *Salvia chorassanica* Bunge kök ekstraktının farklı fraksiyonları MTS testiyle değerlendirmiş ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraksiyonunun HeLa hücrelerinde diğer fraksiyonlara kıyasla daha güçlü proliferasyon baskılayıcı etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu fraksiyonun IC<sub>50</sub> değeri 48 saat sonunda 2.38 µg/mL olarak hesaplanmış olup, sitotoksik etkinin apoptoz mekanizması aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmiştir [3]. Bu bulgular, çalışmamızda belirli *Salvia* ekstraktlarının hücre canlılığını azaltan etkileriyle benzerlik göstermektedir [155].

Benzer biçimde, Ertürk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *S. candidissima* subsp. *candidissima*'nın metanolik ekstraktı da MTT ve ATP canlılık testleri ile MCF-7 ve MDA-

MB-231 kanser hücrelerinde doza bağlı sitotoksosite ve apoptozis oluşturduğu tespit edilmiştir [104]. Son yıllarda Ayvazyan ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada, *Salvia glutinosa* L.ve *S. miltiorrhiza* Bunge türlerinden izole edilen diterpenoidlerin MDA-MB-231 ve HL-60 gibi kanser hücrelerinde belirgin sitotoksik etki gösterdiği; bu etkinin ise ilgili bileşiklerin fitokimyasal profilleriyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur [156]. Shahneh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Salvia officinalis* metanolik ekstresinin hücre çoğalması ve sitotoksik aktivite üzerindeki etkileri, boya dışlama ve MTT sitotoksosite testleriyle değerlendirilmiş; elde edilen bulgular, lenfoma ve lösemi hücrelerinde proliferasyonun doz ve zamana bağlı olarak baskılandığını ve bu etkinin büyük olasılıkla apoptoza aracılık eden mekanizmalarla gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır [157].

Erhan ve arkadaşları, *Salvia officinalis* uçucu yağının farklı konsantrasyonlarının (25–200 µM) HaCaT keratinosit hücreleri üzerinde MTT yöntemiyle test edildiği bir çalışmada, uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Özellikle 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda yüksek dozların belirgin sitotoksik etkilere yol açtığı, bunun da apoptotik mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşebileceği ifade edilmiştir. Araştırmacılar bu bulguların, adaçayı yağının aşırı hücre proliferasyonunu baskılayarak potansiyel biyolojik fayda sağlayabileceğini düşündürttüğünü belirtmişlerdir [158].

Bu çalışmalar, bizim MTS verilerimizle paralellik göstererek, *Salvia* ekstraktlarının hücre canlılığını doza ve fraksiyona bağlı olarak etkileyebildiğini, aynı zamanda belirli dozlarda hücre koruyucu potansiyel barındırdığını desteklemektedir.

#### **4.4 Genotoksosite Test Sonuçları**

Çalışmamızda, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. suffruticosa*, *S. multicaulis* ve *S. syriaca* türlerinin genotoksik potansiyelleri; *in vitro* (MN-KA) ve *in vivo* SMART yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

##### **4.4.1 Mikronükleus sonuçları**

Bu çalışmada, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türlerine ait su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının iki farklı konsantrasyonun, insan lenfosit hücrelerinde olası genotoksik etkileri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında ve yokluğunda, mikronükleus (MN) testi ve nükleer bölünme indeksi (NKİ) değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiş ve deney sonuçları Tablo 3.5’de verilmiştir.

MN testi sonuçları incelendiğinde, negatif kontrol grubuna ait ortalama MN frekansı  $0.77 \pm 0.13$  olarak belirlenirken, pozitif kontrol grubunda bu oran  $9.37 \pm 0.51$  olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrol grubunda görülen yükseliş, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Literatür incelendiğinde de  $H_2O_2$ 'nin yüksek MN değerlerine sebep olduğu bilinmektedir. Bayhan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, NK grubunun % MN değeri  $8.74 \pm 0.12$ ,  $H_2O_2$  grubunu da  $27.7 \pm 1.42$  olarak bulmuşlardır.  $H_2O_2$  grubundaki % MN artışı NK ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ) [159].

*S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinin MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 2.38-4.80, etanol ekstraktının 2.16-2.60, metanol ekstraktının 2.16-2.84, etil asetat ekstraktının 1.05-2.30 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sonuçlar içerisinde 50 mg/L su, 50-100 mg /L metanol ve 100 mg/L etil asetat ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p > 0.05$ ).

*S. multicaulis* bitkisinin MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 0.31-0.96, etanol ekstraktının 1.46-2.97, metanol ekstraktının 2.13-4.03, etil asetat ekstraktının 1.14-2.53 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sonuçlar içerisinde 100 mg/L su ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p > 0.05$ ).

*S. suffruticosa* bitkisinin MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 2.38-4.80, etanol ekstraktının 2.16-2.60, metanol ekstraktının 2.16-2.84, etil asetat ekstraktının 1.05-2.30 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sonuçlar içerisinde 50 mg/L su, 50-100 mg /L metanol ve 100 mg/L etil asetat ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p > 0.05$ ).

*S. syriaca* bitkisinin MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 1.87-4.05, etanol ekstraktının 2.84-3.60, metanol ekstraktının 1.55-2.21, etil asetat ekstraktının 1.81-2.90 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5).

Bu sonuçlar içerisinde 50 mg/L su, 50-100 mg /L metanol ve 50 mg/L etil asetat ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p > 0.05$ ).

Bayhan ve arkadaşları mikronükleus deney sonuçlarında NBİ değerlerini negatif kontrol grubunda  $1.36\pm 0.04$ , pozitif kontrol grubunda ise  $1.42\pm 0.05$  olarak tespit etmişlerdir. *Cirsium steirolepis* Petr. bitkisinin su, etil alkol ve metil alkol ekstraktlarında NBİ değerleri 1.29-1.62 değerleri arasında bulunmuştur [159]. Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak gözlenmiş NBİ değerleri NK 1.25 iken PK 1.20, ekstraktlarda ise 1.10-1.76 arasında tespit edilmiştir. Nükleer bölünme indeksi canlı ve aktif bölünen sağlıklı lenfosit hücrelerinin durumunu belirten bir parametredir [73]. Bu çalışmada elde edilen NBİ değerleri de mikronükleus testi için kullanılan tüm hücrelerin senkronize bir şekilde bölündüğünü ortaya koymaktadır.

*S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisi ile  $H_2O_2$ 'nin beraber uygulandığı hücrelerdeki MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 3.06-5.43, etanol ekstraktının 2.62-3.73, metanol ekstraktının 3.48-3.68, etil asetat ekstraktının 2.33-2.92 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sonuçlar içerisinde 100 mg /L metanol ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p>0.05$ ).

*S. multicaulis* bitkisi ile  $H_2O_2$ 'nin beraber uygulandığı hücrelerdeki MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 1.01-1.12, etanol ekstraktının 3.31-3.45, metanol ekstraktının 3.40-5.58, etil asetat ekstraktının 3.14-3.31 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sonuçlar içerisinde 50 mg/L su ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p>0.05$ ).

*S. suffruticosa* bitkisi ile  $H_2O_2$ 'nin beraber uygulandığı hücrelerdeki MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 3.06-5.43, etanol ekstraktının 2.62-3.73, metanol ekstraktının 3.48-3.68, etil asetat ekstraktının 2.33-2.92 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sonuçlar içerisinde 100 mg /L metanol ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p>0.05$ ).

*S. syriaca* bitkisi ile  $H_2O_2$ 'nin beraber uygulandığı hücrelerdeki MN test sonuçları incelendiğinde (50-100 mg/L) su ekstraktının 3.43-4.70, etanol ekstraktının 3.56-4.21, metanol ekstraktının 2.41-3.52, etil asetat ekstraktının 2.94-3.18 aralıklarında % MN'a sebep olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sonuçlar içerisinde 50 mg/L su, 50-100 mg /L etil asetat ekstraktının NK ile benzer sonuçlar verdiği ortaya konmuştur ( $p>0.05$ ).

*Salvia* türlerinden elde edilen ekstraktların tüm konsantrasyonları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte uygulandığında %MN oranlarında (1.01-5.58 %MN) anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur (p<0.05). Bu da çalışmada kullanılan *Salvia* türlerinin antijenotoksik olduğunu göstermektedir.

Çebi ve arkadaşlarının çalışmasında, *S. kronenburgii* özütünün meme kanseri hücre hatlarında belirgin sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Comet testi verileriyle de sonuçlar desteklenmiştir [160]. Ayrıca, Topçu ve arkadaşları tarafından tanımlanan bitkinin içeriğindeki abietanoid diterpenlerin genotoksik potansiyel taşıması bu bulguları desteklemektedir [161]. Di Sotto ve arkadaşları, *Salvia cinnabarina* M. Martens & Galeotti türünden türetilen 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-trien-3-oic asidin sodyum tuzunun, etil metansülfonata (EMS) maruz bırakılan insan lenfositlerinde mikronükleus (MN) oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Bu bileşik, genotoksik hasara karşı belirgin bir antiklastojenik etki göstererek, DNA bütünlüğünü koruma potansiyeline sahip bir koruyucu ajan olarak değerlendirilmiştir [162]. Mathew ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Salvia officinalis* (adaçayı) ile yapılan ön uygulamanın, İsviçre albino farelerinde metil paratizonun neden olduğu mikronükleus oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir. Elde edilen bulgular, adaçayı ekstresinin genotoksik hasara karşı koruyucu (genoprotektif) potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir [163]. Stavropoulou ve arkadaşları tarafından *Salvia verticillata*'nın hidrometanolik ekstraktının kültürlenmiş insan lenfositlerinde mikronükleus oluşumunu anlamlı düzeyde artırmadığı bildirilmiştir. Bu durum, ekstraktın genotoksik bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Öte yandan, aynı ekstraktın mitomisin C gibi mutajenik bir ajana karşı mikronükleus frekansını azaltarak antijenotoksik özellik sergilediği rapor edilmiştir [164]. *Salvia officinalis* ekstresinin, siklofosamid ile işlem görmüş sıçanlarda mikronükleuslu polikromatik eritrosit (MNPC) frekansını anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir. Bu durum, ekstraktın genotoksik etkilere karşı koruyucu bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Söz konusu antimutajenik etkinin, büyük ölçüde bitkinin antioksidan özelliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [165]. *Salvia fruticosa* yaprağı ekstresinin, S9 metabolik aktivasyon sistemi olmaksızın uygulandığı tüm konsantrasyon ve tedavi sürelerinde, insan periferik kan lenfositlerinde mikronükleus (MN) oluşumunu indüklediği bildirilmiştir. Ayrıca, 24 saatlik uygulama sırasında mitomisin C ile kombine edildiğinde, MN frekansında anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir [166]. *Salvia* türlerine ait özütlerin, metil paratizon ile önceden işlem görmüş İsviçre albino farelerinde mikronükleus (MN) oluşumunu anlamlı düzeyde inhibe

ettiği rapor edilmiştir. En yüksek mikronükleus inhibisyonu *Salvia microphylla* ile gözlenmiş ( $27 \pm 0.09$ ), bunu sırasıyla *Salvia farinacea* ( $33 \pm 0.09$ ) ve *Salvia splendens* ‘Blue Ribbon’ ( $37 \pm 0.07$ ) türleri takip etmiştir [167]. Carvalho ve arkadaşlarının *Melissa officinalis*’in genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir *in vivo* çalışmada, bitki ekstresinin metil metan sülfonat (MMS) tarafından indüklenen DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Mikronükleus testinde, *M. officinalis* ekstresinin MMS kaynaklı genotoksisiteyi tamamen engellediği; komet testinde ise benzer koşullar altında DNA hasarını yaklaşık  $35\text{--}45$  oranında düşürdüğü rapor edilmiştir. Bu bulgular, bitkinin DNA bütünlüğünü koruyucu yönde etkin bir biyolojik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir [93].

#### 4.4.2 Kromozom aberasyon sonuçları

Kromozom aberasyon testlerinden elde edilen sonuçlar, *Salvia* türlerinin hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kaynaklı genotoksisite üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Negatif kontrol grubunda TA (G+P) değeri  $0.041 \pm 0.001$ , TA (G–P) değeri  $0.039 \pm 0.01$ , ve % MI değeri  $11.71 \pm 0.91$  olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $6.5 \mu\text{g/mL}$ ) grubunda ise TA(G+P)  $0.269 \pm 0.023$ , TA(G–P)  $0.121 \pm 0.02$ , ve %MI  $9.74 \pm 0.96$  olarak hesaplanmıştır. Bu farklar, negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

*S. candidissima* subsp. *candidissima* türünün metanol ekstraktı iki farklı konsantrasyonda 50 ve 100 mg/L değerlendirilmiştir. 50 mg/L grubunda TA(G+P)  $0.022 \pm 0.003$ , TA(G–P)  $0.011 \pm 0.001$ , ve %MI  $11.04 \pm 0.24$ , 100 mg/L grubunda TA(G+P)  $0.053 \pm 0.027$ , TA(G–P)  $0.026 \pm 0.013$ , ve %MI  $11.81 \pm 1.7$  olarak belirlenmiştir. Her iki konsantrasyonda da TA(G+P) ve TA(G–P) değerleri düşük olup, negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile birlikte uygulamalarda ise TA(G+P) değerleri  $0.090 \pm 0.010$  ve  $0.063 \pm 0.006$ , TA(G–P) değerleri  $0.050 \pm 0.012$  ve  $0.025 \pm 0.002$  olarak hesaplanmıştır. Bu kombinasyonlarda pozitif kontrole kıyasla belirgin azalışlar ( $p < 0.05$ ), %MI değerlerinde ise artış eğilimi gözlenmiştir ( $12.43 \pm 1.5$  ve  $12.31 \pm 2.1$ ). Bu sonuçlar, *S. candidissima* metanol ekstraktının  $\text{H}_2\text{O}_2$ ’nin indüklediği genotoksik etkiyi hafiflettiğini ve hücre bölünmesini koruyucu yönde etkilediğini göstermektedir.

*S. multicaulis* metanol ekstraktlarının 50 ve 100 mg/L dozlarında TA(G+P) değerleri sırasıyla  $0.017 \pm 0.007$  ve  $0.067 \pm 0.014$ , TA(G–P) değerleri  $0.011 \pm 0.001$  ve  $0.040 \pm 0.000$ , %MI değerleri ise  $11.04 \pm 2.2$  ve  $9.95 \pm 1.01$  olarak hesaplanmıştır. Düşük dozda DNA hasar

oranı oldukça düşük, yüksek dozda ise hafif artış gözlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte uygulamalarda TA(G+P) değerleri  $0.028 \pm 0.003$  ve  $0.132 \pm 0.007$ , TA(G-P) değerleri  $0.014 \pm 0.001$  ve  $0.069 \pm 0.001$  olarak bulunmuştur. Buna karşılık %MI değerleri  $13.01 \pm 0.5$  ve  $12.33 \pm 2.4$  olarak yükselmiştir. Pozitif kontrolle kıyaslandığında, özellikle 50 mg/L + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kombinasyonu genotoksik etkiyi önemli ölçüde azaltmış ( $p < 0.05$ ), ayrıca mitotik aktiviteyi artırmıştır. Bu bulgular, *S. multicaulis*'in düşük dozda antigenotoksik etki gösterdiğini ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin mitoz bölünme sürecine verdiği zararı önleyebildiğini göstermektedir.

*S. suffruticosa* metanol ekstraktının genotoksik etki düzeyi oldukça düşüktür. 50 mg/L grubunda TA(G+P)  $0.013 \pm 0.001$ , TA(G-P)  $0.012 \pm 0.001$ , ve %MI  $10.94 \pm 0.34$ , 100 mg/L grubunda TA(G+P)  $0.051 \pm 0.026$ , TA(G-P)  $0.027 \pm 0.014$ , ve %MI  $12.52 \pm 2.7$  olarak bulunmuştur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile kombine edilen gruplarda TA(G+P) değerleri  $0.066 \pm 0.028$  ve  $0.056 \pm 0.000$ , TA(G-P) değerleri  $0.052 \pm 0.027$  ve  $0.024 \pm 0.002$ , %MI değerleri ise  $10.21 \pm 1.6$  ve  $11.51 \pm 2.7$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ekstraktın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu kromozomal aberasyonları kısmen azalttığını, ancak mitotik aktivite üzerindeki etkisinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Genel olarak *S. suffruticosa*, hafif antigenotoksik özellik sergilemiş, genotoksisite ve sitotoksisite düzeyleri açısından biyolojik olarak güvenli bulunmuştur. *S. syriaca* metanol ekstraktı iki farklı konsantrasyonda incelenmiştir. 50 mg/L grubunda TA(G+P)  $0.012 \pm 0.001$ , TA(G-P)  $0.011 \pm 0.002$ , %MI  $11.93 \pm 0.34$ , 100 mg/L grubunda TA(G+P)  $0.033 \pm 0.007$ , TA(G-P)  $0.025 \pm 0.013$ , %MI  $12.50 \pm 1.2$  olarak belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte uygulamalarda TA(G+P) değerleri  $0.079 \pm 0.015$  ve  $0.050 \pm 0.005$ , TA(G-P) değerleri  $0.052 \pm 0.027$  ve  $0.025 \pm 0.002$ , %MI değerleri ise  $11.22 \pm 1.9$  ve  $11.51 \pm 2.3$  olarak saptanmıştır. Bu değerler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte DNA hasarının bir miktar arttığını, ancak hücre bölünmesinde ciddi bir azalma olmadığını göstermektedir. *S. syriaca* genel olarak hafif pro-oksidatif eğilim göstermiş, bu durum yüksek dozlarda antioksidan bileşiklerin oksidatif koşullar altında pro-oksidan özellik kazanmasıyla açıklanabilir.

Tüm *Salvia* türleri değerlendirildiğinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pozitif kontrol grubunda yüksek aberasyon oranı ve düşük mitotik indeks beklenen şekilde doğrulanmıştır. Bitki ekstraktları bu hasarı belirli oranlarda azaltmıştır. *S. candidissima* subsp. *candidissima* ve *S. multicaulis* türleri belirgin antigenotoksik etki göstermiş, *S. suffruticosa* hafif koruyucu özellik göstermiş, *S. syriaca* ise yüksek dozda pro-oksidatif eğilim sergilemiştir.

Sonuç olarak, *Salvia* türlerinden elde edilen metanol ekstraktlarının genel olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı kromozomal aberasyonları azalttığı, mitotik indeksi büyük ölçüde koruduğu ve genotoksisiteye karşı biyolojik koruma potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir.

Literatürde yapılan çeşitli çalışmalar, bitkisel özütlerin serbest radikal kaynaklı genetik hasarlara karşı koruyucu etkiler gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, Lamiaceae familyasına ait *Salvia farinacea* Benth., *Salvia microphylla* Kunth ve *Salvia splendens* Sellow ex Nees 'Blue Ribbon' türlerinin metanolik özütleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada, bu bitkilerin metil paratasyonun neden olduğu genotoksik etkilere karşı potansiyel genoprotektif özellikler taşıdığı belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada İsviçre albino fareleri, deney öncesinde ilgili *Salvia* türlerinin özütleriyle ön işlemden geçirilmiş ve ardından metil paratasyona maruz bırakılmıştır. Kromozomal aberasyon testi ve mikronükleus analizi ile değerlendirilen sonuçlar, her üç bitki türünün de kemik iliği hücreleri ve spermatozoidlerde oluşan kromozomal hasarı anlamlı düzeyde baskıladığını göstermiştir ( $p < 0.001$ ). En yüksek koruyucu etki, *S. microphylla* özütü ile elde edilmiş ( $\%2,33 \pm 0,19$  kemik iliğinde;  $\%3,33 \pm 0,19$  spermatozoidlerde), bu türü sırasıyla *Salvia farinacea* Benth. ( $\%4,33 \pm 0,39$  ve  $\%3,67 \pm 0,58$ ) ve *Salvia splendens*, 'Blue Ribbon' ( $\%3,67 \pm 0,19$  ve  $\%4,33 \pm 0,39$ ) takip etmiştir. Benzer şekilde, mikronükleus oluşumuna karşı en yüksek inhibisyon da *S. microphylla* ( $\%0,27 \pm 0,09$ ) ile gözlemlenmiş; ardından *S. farinacea* ( $\%0,33 \pm 0,09$ ) ve *S. splendens* 'Blue Ribbon' ( $\%0,37 \pm 0,07$ ) gelmiştir. Bu etkilerin, söz konusu bitkilerde bulunan rosmarinik asit, betulinik asit, myricetin, askorbik asit ve asiatic asit gibi biyoaktif fitokimyasalların antioksidan ve DNA koruyucu özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışma sonuçları, bu *Salvia* türlerinin metil paratasyona karşı potansiyel birer nutrasötik ajan olarak değerlendirilebileceğini ve genetik hasara karşı koruyucu stratejiler geliştirilmesinde önemli bir rol üstlenebileceklerini ortaya koymaktadır [167].

Vujošević ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada adaçayı (*Salvia officinalis*) yağının terpenoid fraksiyonlarının artan konsantrasyonları, memeli *in vivo* sisteminde mitomisin C tarafından indüklenen kromozomal aberasyonların sıklığını azalttığını bulmuşlardır [168].

İnsan periferik kan lenfositleri (HPBL) üzerinde yapılan bir çalışmada, *Salvia fruticosa* yaprak ekstresinin genotoksik ve antijenotoksik etkileri, 1.5, 3.0 ve 6.0 µL/mL konsantrasyonlarında ve 24 ile 48 saatlik uygulama süreleri boyunca, S9 karışımının varlığı

ve yokluğu durumlarında değerlendirilmiştir. Bu amaçla kardeş kromatit değişimi (SCE), kromozom aberasyonu (CA) ve mikronükleus (MN) test sistemleri kullanılmıştır. Ayrıca, ekstresinin sitotoksik etkileri mitotik indeks (MI), proliferasyon indeksi (PI) ve nükleer bölünme indeksi (NDI) üzerinden analiz edilmiştir. S9 metabolik aktivasyon sistemi olmadan gerçekleştirilen deneylerde, *S. fruticosa* ekstresi tek başına 48 saatlik sürede SCE sıklığını artırmış; bununla birlikte, tüm konsantrasyon ve sürelerde CA ve MN oluşumunu da tetiklemiştir. Mitomisin C (MMC) ile kombine edildiğinde, özellikle yüksek doz hariç olmak üzere, ekstre ve MMC'nin birlikte uygulanması sinerjik bir şekilde SCE ve CA indüksiyonunu artırmıştır. Bununla birlikte, MN oluşumu açısından ekstre 24 saatlik uygulamada MMC'nin etkisini artırırken, 48 saatlik sürede MN sıklığını anlamlı düzeyde azaltmıştır. Ayrıca, MI değerlerinde düşüş gözlenmiş ve bu durum Sf ekstresinin sitotoksik potansiyelini ortaya koymuştur; ancak PI ve NDI değerlerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. S9 sisteminin varlığında ise, *S. fruticosa* yaprak ekstresi SCE sıklığını kontrol grubu ile benzer seviyede tutmuş ancak siklofosfamid (Cyp) kaynaklı genotoksik etkileri hafifletmiştir. Bununla birlikte, CA ve MN frekanslarını kendi başına artırdığı gözlemlenmiş; ancak Cyp'nin neden olduğu kromozomal hasarı anlamlı düzeyde artırmamıştır. Sitotoksik parametreler açısından bakıldığında, *S. fruticosa* ekstresi Cyp'nin sitotoksik etkisini tetiklese de, kendisi doğrudan belirgin bir sitotoksikite göstermemiştir.

Bu bulgular, *S. fruticosa* ekstresinin kromozom aberasyonlarına neden olabileceğini, ancak aynı zamanda belirli genotoksik ajanlara karşı kısmi bir koruyuculuk sergileyebileceğini ortaya koymaktadır [166].

Aşkın Çelik ve Aslantürk tarafından gerçekleştirilen bir başka araştırmada, Lamiaceae familyasına ait olan *Rosmarinus officinalis* ve *Lavandula stoechas* L. türlerinin sulu ekstraktlarının (infüzyon ve dekoksiyon yöntemleriyle elde edilmiş) insan periferik kan lenfositleri üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkileri *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Çalışmada, lenfosit hücreleri *R. officinalis* (1.5 ve 3 mg/ml) ile *L. stoechas* (0.4 ve 1.2 mg/ml) ekstraktlarına 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Deneysel tasarımda PBS (fosfat tamponlu salin) negatif kontrol, mitomisin C (MMC, 0.25 µg/ml) ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sitotoksikite, mitotik indeks değerleri üzerinden değerlendirilmiş; ayrıca kromozomal anomaliler (kromozom aberasyonları) ve mikronükleus formasyonları da gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubunda kromozomal

anormallik oranı %2.93 olarak saptanırken, negatif kontrol grubunda bu tür anormalliklere rastlanmamıştır. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Araştırma bulguları, test edilen ekstraktların artan konsantrasyonlara bağlı olarak insan periferik lenfosit hücrelerinin bölünme oranını anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir ( $p < 0.01$ ). Özellikle metafazdaki hücre sayısındaki belirgin azalma nedeniyle bazı gruplarda kromozomal analizler gerçekleştirilememiştir. Bununla birlikte, ekstrakt uygulamaları, kontrol gruplarına kıyasla mikronükleus oluşumunda anlamlı artışlara yol açmıştır ( $p < 0.01$ ). En yüksek sitotoksik etki, *L. stoechas* bitkisinin 3 mg/ml konsantrasyondaki dekoksasyon ekstraktı ile 48 saatlik uygulama sonrası gözlenmiş; genotoksosite açısından en belirgin etki ise 1.2 mg/ml'lik *L. stoechas* dekoksasyon ekstraktı ile elde edilmiştir. Ek olarak, *R. officinalis*'e ait infüzyon ve dekoksasyon ekstraktlarının da artan dozlarda lenfosit hücrelerinin mitotik aktivitesini belirgin şekilde baskıladığı ve bu durumun sitotoksik etkiye neden olduğu ortaya konmuştur [169].

Bayhan ve çalışma arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, *Cirsium* cinsine ait türlerin metanolik ekstraktları ile bu ekstraktların  $H_2O_2$  ile kombinasyonlarının insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla kromozom aberasyon testi uygulanmış ve elde edilen bulgular, dört farklı bitki türünün her iki doz seviyesinde de  $H_2O_2$ 'nin yol açtığı genetik hasara karşı koruyucu özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Çalışma kapsamında, *Cirsium balikesirense* Yıldız, Arabacı & Dirmenci türüne ait 100 mg/L dozunun, negatif kontrole benzer toplam aberasyon (TA) oranları göstermesi ve  $H_2O_2$  kaynaklı toksisiteyi en etkili şekilde azaltması bakımından öne çıktığı belirlenmiştir. Ancak yalnızca bitki ekstraktı ile işlem gören gruplar arasında, *C. byzantinum* Forbes'in 100 mg/L'lik dozu ile *C. steriolepis* Petrak'ın 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarının, NK grubuna kıyasla kromozomal aberasyonları anlamlı biçimde artırdığı tespit edilmiştir. Bu durum, ilgili dozların genotoksik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Öte yandan, *C. balikesirense* ve *C. baytopae* P.H.Davis & Parris türlerinin uygulanan dozlarının, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında benzer kromozomal aberasyon oranları sergilediği ve herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bu gruplardan elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $p > 0.05$ ) [159].

## 4.5 *In vivo* Genotoksisite Test Sistemleri

### 4.5.1 Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

*D. melanogaster* üzerinde gerçekleştirilen somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türlerinin su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının 50 ve 100 mg/L konsantrasyonları kullanılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin genotoksik/ antigenotoksik etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Test bulgularında, küçük tek nokta frekansları incelendiğinde pozitif kontrol grubunda 0.84, negatif kontrolde ise 0.00 değerleri saptanmıştır. Büyük tek nokta frekanslarında pozitif kontrol 0.65, negatif kontrol ise 0.10 olarak belirlenmiş ve pozitif kontrolün negatif kontrole göre 6.5 kat daha yüksek frekans göstererek istatistiksel olarak anlamlı bir artış sergilediği saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). İkiz nokta frekansları incelendiğinde negatif kontrolde değer gözlenmezken (0.00), pozitif kontrol 0.72 olarak tespit edilmiş ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu durum literatür incelendiğinde tutarlılık göstermektedir.

Wild Korkmaz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada negatif kontrol grubunda küçük tek nokta frekansı 0.03, büyük tek nokta ve ikiz tek nokta frekansı 0.00 olarak tespit etmişlerdir. Pozitif kontrol grubunda ise küçük tek nokta 0.05, büyük tek nokta 0.069, ikiz tek nokta frekansı ise 0.23 olarak tespit ederek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin negatif kontrole göre nokta frekanslarında artışa sebep olduklarını göstermişlerdir ( $p < 0.05$ ) [49]. Yılmaz Kardeş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in, negatif kontrole göre nokta frekanslarında artışa sebep olduklarını göstermişlerdir [73].

Nokta frekansları incelendiğinde; *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinin (50 mg/L) su ekstraktının 0-0.47, etanol ekstraktı 0-0.38, metanol ekstraktı 0-0.44, etil asetat ekstraktının ise 0-0.52 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir. *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinin (100 mg/L) su ekstraktının 0-0.29, etanol ekstraktı 0-0.42, metanol ekstraktı 0-0.35, etil asetat ekstraktının ise 0-0.66 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir.

*S. multicaulis* bitkisinin (50 mg/L) su ekstraktının 0-0.34, etanol ekstraktı 0-0.28, metanol ekstraktı 0.025-0.4, etil asetat ekstraktının ise 0-0.43 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir. *S. multicaulis* bitkisinin (100 mg/L) su ekstraktının 0.16-0.41, etanol ekstraktı 0-0.42, metanol ekstraktı 0-0.53, etil asetat

ekstraktının ise 0.062-0.28 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir.

*S. suffruticosa* bitkisinin (50 mg/L) su ekstraktının 0-0.175, etanol ekstraktı 0-0.14, metanol ekstraktı 0-0.7, etil asetat ekstraktının ise 0-0.24 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir. *S. suffruticosa* bitkisinin (100 mg/L) su ekstraktının 0-0.22, etanol ekstraktı 0-0.25, metanol ekstraktı 0-0.15, etil asetat ekstraktının ise 0-0.23 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir.

*S. syriaca* bitkisinin (50 mg/L) su ekstraktının 0-0.27, etanol ekstraktı 0-0.064, metanol ekstraktı 0-0.53, etil asetat ekstraktının ise 0-0.31 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir. *S. syriaca* bitkisinin (100 mg/L) su ekstraktının 0-0.13, etanol ekstraktı 0-0.20, metanol ekstraktı 0-0.34, etil asetat ekstraktının ise 0-0.53 küçük, büyük ve ikiz nokta frekanslarına sebep olduğu görülmektedir.

Bu sonuçlara göre tüm bitki ekstraktları (50-100 mg/L) düşük oranlarda nokta frekanslarına sebep olmuştur ve bu frekanslar genotoksik hasara yol açtığı bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin sebep olduğu frekanslardan oldukça küçüktür (p<0.05).

Literatürde yer alan bir çalışmada, Yılmaz Kardeş ve arkadaşları *Lallemantia iberica* (M.Bieb.) Fisch. & C.A.Mey. bitkisinin etanol ve metanol ekstraktlarını kullanarak gerçekleştirdikleri SMART analizinde, her iki ekstraktın da pozitif kontrol grubuna kıyasla küçük tek nokta (small single spot) frekansında anlamlı düzeyde azalma sağladığını bildirmiştir. Buna göre, etanol ve metanol ekstraktları sırasıyla 2.22 ve 2.19 kat daha düşük frekans göstermiştir (p<0.05). Büyük tek nokta (large single spot) tipi ise yalnızca etanol ekstraktı grubunda tespit edilmiş olup, bu grup da pozitif kontrole göre 0.39 kat daha düşük frekansa sahip bulunmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (p<0.05). Öte yandan, ikiz nokta (twin spot) tipi yalnızca pozitif kontrol grubunda gözlemlenmiş; ekstrakt uygulanan gruplarda bu formun oluşmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, bu veriler ışığında *L. iberica*'nın etanol ve metanol ekstraktlarının, DNA'daki pürin ve pirimidin bazları ile deoksiriboz iskeleti üzerinde etkili olabilen hidroksil radikallerine karşı koruyucu bir etki göstererek somatik mutasyonları önleyebileceğini ifade etmişlerdir [73].

Ayar ve çalışma arkadaşları, Lamiaceae familyasına ait *Stachys annua* (L.) L., *Scutellaria salviifolia* Benth. ve *Nepeta nuda* L. türlerinin antigenotoksik potansiyellerini SMART ile incelemiştir. Çalışma sonucunda, genotoksik bir ajan olan etil metansülfonatın (EMS) yol açtığı DNA hasarının, *S. salviifolia* bitki özü ile anlamlı düzeyde azaldığı ve bu türün belirgin bir antigenotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer türlerin ise farklı ekstrakt konsantrasyonlarında [0.1, 0.25, 0.50 ve 1 (v/v)] uygulandığında, meyve sineklerinin kanat hücrelerinde oluşan nokta (spot) sayısını azaltmalarına karşın bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı görülmediği rapor edilmiştir ( $p>0.05$ ) [170].

Wild Korkmaz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Lamiaceae familyasından bir bitki olan *Phlomis pungens* Willd. ekstraktlarının antigenotoksik potansiyeli değerlendirdiğinde,  $H_2O_2$  ile birlikte uygulandıklarında çeşitli spot (nokta) tiplerinin frekanslarında belirgin azalmalar meydana geldiği gözlemlenmiştir. Özellikle etanol ve metanol bazlı ekstraktlar, %74'ün üzerinde inhibisyon oranı göstererek dikkate değer bir koruyucu etki ortaya koymuştur. Bu bulgular doğrultusunda, *P. pungens* ekstraktlarının  $H_2O_2$ 'nin yol açtığı genetik hasarı baskılayabilme kapasitesine sahip olduğu ve bu nedenle antigenotoksik ajanlar arasında değerlendirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır [49].

Gayozo ve arkadaşlarının yaptıkları güncel araştırmada *Salvia hispanica* L. müsilağının *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyonlar üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada, siklofosamid ile oluşturulan genotoksik etkinin ardından farklı müsilağ konsantrasyonları uygulanmış ve tedavi sonrasında mutasyon sıklığında yaklaşık %18 ile %45 arasında bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, *S. hispanica* müsilağının antimutajenik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır [171].

Patenkovic ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Salvia officinalis* (adaçayı) çayının antimutajenik potansiyeli *D. melanogaster* üzerinde gerçekleştirilen SMART testi ile incelenmiştir. Deneysel uygulamalarda kronik, akut ve kombine tedavi protokolleri kullanılmış; mutajen madde olarak metil metansülfonat (MMS) tercih edilmiştir. Elde edilen bulgular, adaçayı infüzyonunun MMS tarafından indüklenen mutasyonların sıklığını azaltarak belirgin düzeyde antimutajenik etki gösterdiğini ortaya koymuştur [172].

#### 4.5.2 Toksikite sonuçları

Uzun yıllar boyunca gelişim biyologları ve genetikçiler tarafından model organizma olarak tercih edilen meyve sineği (*D. melanogaster*), son dönemlerde toksikoloji araştırmalarında zararlı kimyasalların temel genetik süreçlerinin aydınlatılmasında yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir [33]. Bu çalışmada, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* bitkilerinin su, etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının ve ayrıca hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'in *D. melanogaster* üzerindeki etkileri; pupa oluşumu, hayatta kalma ve erginleşme oranları açısından değerlendirilmiştir. Larvalar, pupalar ve ergin sinekler sayılmış ve deneysel sonuçlar Şekil 3.13-3.24'te sunulmuştur.

Negatif kontrol grubu, uygun deney koşullarının bir göstergesi olarak yüksek düzeyde pupa oluşumu (%100), hayatta kalma (%83) ve erginleşme (%83) oranları sergilemiştir. Buna karşılık pozitif kontrol olarak kullanılan  $H_2O_2$  güçlü oksidatif stres oluşturmuş ve pupa oluşumu (%97), hayatta kalma (%7) ve erginleşme (%7) oranlarında anlamlı düşümlere neden olmuştur; bu da  $H_2O_2$ 'nin öldürücü ve gelişimsel toksisitesini doğrulamaktadır. Her ne kadar  $H_2O_2$  maruziyeti sonrası pupa oluşum yüzdesindeki düşüş yüksek gibi görünse de, bu düşüş negatif kontrol karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

Yüksek pupa oluşum oranının nedeni, *D. melanogaster* larvalarında yüksek metabolik hız ve hücresel büyümeye bağlı olarak gelişen oksidatif stres yükü sonucu antioksidan enzim katalazın yüksek aktivitesinin olması olabilir. Katalaz geni, antioksidatif savunma sisteminin temel bileşenlerinden biridir. Ergin sineklerde yaşa bağlı olarak katalaz seviyeleri azalmakta ya da büyük ölçüde sabit kalmaktadır. Öte yandan, gelişim süresince katalaz seviyeleri dinamik bir şekilde değişmektedir. Enzim aktivitesindeki zirveler, pupa oluşumunu tetikleyen ekdisteroid hormon artışlarıyla aynı zamanda meydana gelir ve  $H_2O_2$ 'nin ortadan kaldırılmasında görev alan temel enzim olan katalazın mRNA seviyeleriyle örtüşmektedir [43], [44], [45]. Bu çalışmada kullanılan çözücülerin *D. melanogaster* üzerinde toksik etkileri bilinsede, bu etki kullanılan buharlaştırma sistemi sayesinde ortadan kaldırılmıştır [46], [47], [48].

*S. candidissima* subsp. *candidissima*'nın su ekstraktı, negatif kontrolle aynı düzeyde (%100) pupa oluşumu göstermiş ancak hayatta kalma ve erginleşme oranlarında anlamlı düşümlere neden olmuştur (Şekil 3.13). Aynı bitkinin diğer ekstraktları da sineklerin gelişimsel süreçlerinde anlamlı inhibisyonlara yol açmıştır (Şekil 3.14-3.15). *S. multicaulis* ve

*S. syriaca* ekstraktları da pupa oluşumu, hayatta kalma ve erginleşme oranlarında anlamlı azalmalar meydana getirmiştir (Şekil 3.16-3.18 ve 3.22-3.25,  $p < 0.05$ ). *S. suffruticosa* bitkisinin hiçbir ekstresi, metanolik ekstrakt hariç olmak üzere, pupa oluşumu ve hayatta kalma oranlarını etkilememiştir ( $p > 0.05$ ), ancak erginleşme yüzdesi değerlerini anlamlı şekilde etkilemiştir (Şekil 3.19-3.21,  $p < 0.05$ ).

Pozitif kontrol değerleri ile bitki ekstraktlarının neden olduğu gelişimsel süreçlere ait sayısal veriler karşılaştırıldığında, *S. suffruticosa* ekstraktlarının diğer bitkilere göre çok daha yüksek değerler verdiği görülmüştür. Aslında sonuçlar, metanolik ekstrakt haricinde hiçbir *S. suffruticosa* ekstraktının pupa oluşumu (%60–80,  $p > 0.05$ ) ve hayatta kalma oranlarını (%50–60,  $p > 0.05$ ) etkilemediğini, buna karşılık diğer bitki ekstraktlarının normal gelişim süreçlerini olumsuz etkilediğini göstermektedir. Bu durum, *S. suffruticosa* ekstraktlarının gelişimsel süreçlere müdahale etmediğini açıkça ortaya koymaktadır.

Literatürde *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* bitki ekstraktlarının *D. melanogaster* üzerinde *in vivo* gelişimsel toksisite taramasına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bazı farklı bitki türleriyle yapılmış araştırmalardan elde edilen bulgular mevcuttur. Örneğin, Kushalan ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada *Curculigo orchioides* Gaertn.'in sulu yaprak ekstraktının *Drosophila* larvalarına uygulanmasının bağırsak toksisitesine neden olmadığı, ancak larvaların gelişimi, üremesi ve yaşam oranını anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir [173].

Jabeen ve arkadaşları başka bir çalışmada trans-sinamaldehit, benzaldehit, allil izotiyosiyanat, hekzanal ve etil format gibi çeşitli bitkisel uçucu bileşiklerin etkileri incelenmiş; bu bileşiklerin yapay diyet ortamındaki benekli kanatlı *Drosophila* yumurtalarından larva çıkışını kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde engellediği saptamıştır [174].

Pam ve arkadaşları bir çalışmada ise *Mangifera indica* L.'nin sulu gövde kabuğu ekstraktları *D. melanogaster* üzerinde test etmiş ve artan ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak genç sineklerin yaşam oranı, erginleşme başarısı, tırmanma yetenekleri ile antioksidan aktivitelerinde anlamlı azalmalar meydana geldiği rapor etmiştir [175].

Benli ve Türkoğlu tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, *D. melanogaster* üzerinde on farklı gıda koruyucusunun (sorbik asit, potasyum sorbat, benzoik asit, sodyum benzoat, potasyum asetat, sodyum metabisülfid, potasyum metabisülfid, sodyum tetraborat, sodyum sülfid ve borik asit) toksik etkileri incelenmiş ve bu maddelerin yaşama yüzdesi ile ömür uzunluğu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Larvalara uygulanan bu maddeler sonucunda, negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm koruyucuların yaşam oranını ve ömür uzunluğunu azalttığı ortaya konmuştur [176].

*Salvia* türleri üzerinde yaptığımız çalışma ve literatür bulguları birlikte değerlendirildiğinde, bazı ekstraktların ortaya koyduğu toksik etkinin, içerdiği sekonder metabolitlerin uygulanan konsantrasyon ve maruz kalma süresi ile ilişkili olabileceği; bu durumun da pupadan ergine geçiş sürecini etkileyerek oksidatif stres oluşumuna katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

#### **4.6. *In vivo* Antioksidan Sonuçları**

Bitkilerin, hem bitki fizyolojisi için gerekli olan sağlıklı işlevlerin sürdürülmesinde hem de çevreye uyum sağlamada önemli rol oynayan antioksidan moleküller içerdiği, ayrıca insan sağlığı açısından da yararlı özellikler taşıdığı bilinmektedir [177]. Bitkilerin antioksidan kapasiteleri genellikle *in vitro* testlerle akademik çalışmalarda rutin olarak değerlendirilir. Ancak, dokulardaki gerçek antioksidan varlığı; emilim, dağılım, metabolizma ve atılım süreçlerine bağlıdır. Gerçekte, *in vivo* antioksidan testlerine dayalı ölçümler, organizmanın fizyolojik koşullarından büyük ölçüde etkilenmektedir [178]. Bu nedenle, bu çalışmada *in vivo* antioksidan aktiviteler, toksisite testlerinde ek bir araç olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 3.5-3.12 ve Tablo 3.8’de verilmiştir.

Bu çalışmada, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* bitkilerinin farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının *D. melanogaster*’da oksidatif stres koşullarındaki antioksidan etkileri DPPH, ABTS ve FRAP testleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, bitki türleri ve ekstrakt tiplerinin antioksidan yanıt üzerinde belirgin farklılıklar ortaya koyduğunu göstermektedir.

Şekil 3.5-3.12 ve Tablo 3.8’de yer alan sonuçlara göre, *S. suffruticosa* türüne ait tüm özütler, ABTS testi aracılığıyla %80’in üzerinde yüksek *in vivo* antioksidan aktivite göstermiştir. Ayrıca, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis* ve *S. syriaca* türlerinin

metanolik ve etanolik özütleri, DPPH testinde %50–70 arası antioksidan aktivite sergilemiş ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

ABTS testi ayrıca tüm bitki özütlerinin antioksidan kapasitelerinin negatif kontrol grubuna kıyasla eşit ya da daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3.9-3.12). Buna paralel olarak, FRAP testi sonuçları da tüm bitki özütlerinin negatif kontrole göre anlamlı düzeyde daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir ( $p<0.05$ ; Tablo 3.8).

Bitkisel özütlere ait FRAP testine dayalı Trolox eşdeğeri (TEAC) değerleri *S. candidissima* subsp. *candidissima* 0.0122 – 0.0234  $\mu\text{g TE/g}$ , *S. multicaulis* 0.0025 – 0.0060  $\mu\text{g TE/g}$ , *S. suffruticosa* 0.0049 – 0.0061  $\mu\text{g TE/g}$ , *S. syriaca* 0.0045 – 0.0143  $\mu\text{g TE/g}$  olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, burada bildirilen Trolox eşdeğer antioksidan kapasiteleri (TEAC) özellikle *S. multicaulis* (0.0025–0.0060  $\mu\text{g TE/g}$ ) ve *S. suffruticosa* (0.0049–0.0061  $\mu\text{g TE/g}$ ) için güçlü bir antioksidan potansiyeli göstermektedir. TEAC, antioksidan aktivitenin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan bir metriktir ve sonuçlar Trolox eşdeğerleri cinsinden ifade edilir. Trolox, E vitamini'nin suda çözünebilir bir analogudur ve standart referans antioksidan olarak kabul edilir. Daha yüksek TEAC değeri, özütün serbest radikalleri nötralize etme kapasitesinin daha yüksek olduğunu, yani Trolox ile eşdeğer antioksidan gücü temsil ettiğini gösterir [55].

*In vivo* FRAP test sonuçlarına göre en iyi aktivite *S. candidissima* subsp. *candidissima* etil asetat ekstresinde ( $0.0234 \pm 0.0003 \mu\text{g TE/g}$ ) görülmüştür. Ardından yine aynı bitkinin su ekstresinde ( $0.0204 \pm 0.0001 \mu\text{g TE/g}$ ) yüksek antioksidan aktivite tespit edilmiştir.

Türk tıbbi bitkileri üzerine yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda TEAC değerlerinin 17.6 – 1472  $\mu\text{mol Trolox eşdeğeri/g}$  kuru madde aralığında,  $EC_{50}$  değerlerinin ise yaklaşık 0.174 – 42  $\text{mg/g}$  kuru madde aralığında değiştiği bildirilmektedir [179].

Bu bağlamda, çalışmada elde edilen en aktif *Salvia* türü özütleri bu aralığın yüksek aktivite segmentinde konumlanmaktadır. Her ne kadar *in vivo* çalışmalar genellikle farklı birimlerle raporlandığı için doğrudan karşılaştırma zor olsada, bazı deneysel bulgular *S. multicaulis*

uçucu yağının skopolamin kaynaklı bilişsel bozuklukları hafiflettiğini ve sistemik antioksidan/nöroprotektif etki gösterdiğini ortaya koymuştur [180].

Bu bulgular, özellikle *S. multicaulis* ve *S. suffruticosa*'nın fizyolojik koşullar altında antioksidan etkinliklerinin daha ileri *in vivo* sistemlerle araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

Farklı antioksidan test yöntemlerinin (DPPH, ABTS, FRAP) aynı örnekler üzerinde farklı sonuçlar vermesi, kullanılan testlerin kimyasal prensiplerinden kaynaklanmaktadır. DPPH ve ABTS testleri radikal süpürme aktivitesi, FRAP testi ise indirgeme gücü üzerinden değerlendirme yapmaktadır. Ayrıca; DPPH ve ABTS testleri tek elektron transferi (SET) ve sınırlı düzeyde hidrojen atom transferi (HAT) mekanizmalarına dayanırken, FRAP testi yalnızca SET mekanizmasıyla çalışmaktadır [181].

Bu testlerin duyarlılığı; pH, çözücü polaritesi ve bileşik çözünürlüğü gibi çevresel parametrelerden etkilenmekte, özellikle DPPH testinin diğerlerinden ayrışması, farklı antioksidan sınıflarına karşı farklı yanıtlar vermesinden kaynaklanmaktadır [182]. Bu nedenle, antioksidan kapasitenin daha bütüncül biçimde değerlendirilebilmesi için birden fazla tamamlayıcı testin birlikte uygulanması önerilmektedir [183].

Bu çalışmada elde edilen *in vivo* antioksidan aktivite sonuçları, incelenen bitki özütlerinin organizmanın fizyolojik antioksidan sistemine zarar vermediğini (dengeyi bozmadığını) göstermektedir. Literatürde başka bitki türleriyle ilgili benzer gözlemler bulunmakla birlikte, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* özütlerinin *D. melanogaster* üzerinde yapılan *in vivo* antioksidan aktivite çalışmalarına rastlanmamıştır. Buna karşılık, bazı araştırmalar farklı model organizmalar kullanarak *Salvia* türlerinin *in vivo* uygulamalarını ve plazma antioksidan seviyelerini incelemiştir.

Literatürde bazı bitki türleriyle yapılan araştırmalarda benzer bulgular rapor edilmiş olsa da, elde edilen bu sonuçlarla doğrudan karşılaştırma yapılabilecek çalışmalar sınırlıdır. Örneğin, Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Choerospondias axillaris* (Roxb.) B.L.Burt & A.W.Hill meyvesinden elde edilen sulu ekstraktın, D-galaktoz ile yaşlanma modeli oluşturulan farelerde oksidatif hasarı belirgin şekilde azalttığı ve güçlü bir *in vivo* antioksidan etki sergilediği, bu nedenle oksidatif stresle bağlantılı hastalıkların yönetiminde doğal bir ajan olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir [184].

Başka bir çalışmada, Chen ve arkadaşları *Swertia chirayita* (Roxb.) H.Karst.'ın etanolik ekstraktının karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile toksisite oluşturulan farelerde karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan sistemi desteklediği; SOD, CAT ve GSH düzeylerini yükselterek, MDA düzeylerini azaltmak suretiyle güçlü *in vivo* antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir [185].

Etuh ve çalışma arkadaşları *Mangifera indica*'nın (mango) soğuk sulu yaprak ekstraktının *D. melanogaster*'de yaşam oranını (%100 – %85 aralığında) anlamlı biçimde arttırmış; katalaz, glutatyon-S-transferaz ile toplam tiol seviyelerini yükselterek güçlü antioksidan koruyucu etki sağladığı rapor etmişlerdir [126].

Sani ve arkadaşları, *Salvia officinalis*'in metanolik yaprak özütünün, Alloksan ile diyabet oluşturulmuş Wistar sıçanlarda; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler ile trigliserit (TG), total kolesterol (TC), HDL, LDL ve VLDL gibi plazma lipid parametreleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlara kıyasla, adaçayı özütü verilen grupta SOD aktivitesinde %60 artış, TG ve LDL seviyelerinde sırasıyla %40 ve %30 azalma gözlenmiştir. Metformin yalnızca orta düzeyde antioksidan ve lipid düşürücü etki göstermiştir. Bu bulgular, *S. officinalis*'in diyabet yönetiminde anlamlı antioksidan ve lipolipidemik etkileriyle terapötik potansiyel taşıdığını düşündürmektedir [186].

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da benzer şekilde, *Salvia* türlerinin oksidatif stres kaynaklı hasarı azaltmada önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

#### **4.7 Antibakteriyel Aktivite Test Sonuçları**

Bakteriler, insan vücuduna girdiklerinde çeşitli savunma mekanizmaları geliştirerek enfeksiyonlara neden olabilir ve son yıllarda bu durum küresel ölçekte önemli bir sağlık tehdidi oluşturmaktadır. Tıbbi bitkiler ise bu tür bakteriyel savunma ve saldırı sistemlerine karşı potansiyel bir çözüm sunmaktadır [187].

Tıbbi bitkilerin bu savunma mekanizmalarını baskılayarak antibakteriyel etki oluşturabilmesi, özellikle fenolik bileşikler bakımından zengin olan Lamiaceae familyasını araştırmaların odak noktasına taşımıştır. Ailenin en büyük ve farmakolojik açıdan en önemli cinslerinden biri olan *Salvia*, farklı bakterilere karşı gösterdiği aktivite ile geniş bir

antimikrobiyal potansiyele sahiptir. Bu doğrultuda çalışmada incelenen *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisinde en yüksek etki *E. coli*'ye karşı metanol ekstraktında (9.52 mm) gözlenmiş, bunu etil asetat (8.14 mm), etanol ekstraktı (7.98 mm) ve su ekstraktı (6.93 mm) izlemiştir. *S. aureus*'a karşı ise en yüksek zon çapı etil asetat ekstraktında (10.0 mm) tespit edilirken bunu su (9.74 mm), metanol (8.55 mm), etanol ekstraktı (8.44 mm) olarak takip etmiştir. *S. multicaulis* bitkisinde *E. coli*'ye karşı en yüksek inhibisyon su ekstraktında (11.18 mm) gözlenirken etanol (8.47 mm), metanol (8.41 mm), etil asetat ekstraktında (6.67 mm) bulunmuştur. *S. aureus*'ta en yüksek etki etanol ekstraktında (8.12 mm) belirlenmiştir. Ardından metanol (7.39 mm), etil asetat (7.11 mm), su ekstraktı (6.68 mm) ölçülmüştür. *S. suffruticosa* bitkisinde *E. coli*'ye karşı en yüksek etki etanol ekstraktında (9.03 mm) bulunmuştur. Bunu sırasıyla metanol (8.14 mm), etil asetat (6.87 mm), su ekstraktı (6.60 mm) takip etmiştir. *S. aureus*'a karşı ise yine en yüksek etki etanol ekstraktında (11.22 mm) bulunmuştur. Metanol (8.28 mm), etil asetat (6.59 mm), su ekstraktı (6.15 mm) ölçülmüştür. *S. syriaca* bitkisinde *E. coli*'ye karşı en yüksek zon çapı metanol ekstraktında (7.27 mm) bulunmuştur. Ardından etanol (6.78 mm), su (6.70 mm), etil asetat ekstraktlarında (6.51 mm) olarak hesaplanmıştır.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) incelendiğinde ise *E. coli* bakterisinde, *S. candidissima* subsp. *candidissima* bitkisi için metanol ve etil asetat ekstraktında 2.5 mg/mL, su ve etanol ekstraktları 5 mg/mL olarak bulunmuştur. *S. aureus* bakterisi için tüm ekstraktlarda 5 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *S. multicaulis* bitkisinde *E. coli* bakterisinde su, etanol ve etil asetat ekstraktlarında 25 mg/mL değerleri elde edilirken metanol ekstraktında 5 mg/mL olarak bulunmuştur. *S. aureus* bakterisi için etanol ve metanol ekstraktında 5 mg/mL, su ve etil asetat ekstraktında ise 25 mg/mL bulunmuştur. *S. suffruticosa* bitkisinde *E. coli* bakterisi için etanol ekstraktı 1.25 mg/mL ile en iyi sonucu vermiştir. Ardından etil asetat ekstraktında 2.5 mg/mL, su ve metanol ekstraktında ise 5 mg/mL sonucu elde edilmiştir. *S. aureus* bakterisi için etanol ve metanol ekstraktında 5 mg/mL, su ve etil asetat ekstraktında ise 50 mg/mL bulunmuştur. *S. syriaca* bitkisinde *E. coli* bakterisi için metanol ekstraktı 1.25 mg/mL ile en iyi sonucu vermiştir. Ardından etanol ekstraktında 5 mg/mL, su ve etil asetat ekstraktında ise 25 mg/mL tespit edilmiştir. *S. aureus* bakterisi için etanol 2.5 mg/mL, metanol 5 mg/mL, etil asetat 25 mg/mL, su ekstraktında ise 50 mg/mL bulunmuştur.

*E. coli* bakterisine karşı en geniş inhibisyon alanı, *S. multicaulis* bitkisinin su ile elde edilen ekstraktında gözlemlenirken; en dar alan ise *S. syriaca*'nın su bazlı ekstraktında tespit edilmiştir. *S. aureus* bakterisine yönelik olarak ise, en belirgin antibakteriyel etki *S. suffruticosa*'nın etanol ekstraktında görülmüş, buna karşılık en zayıf etki aynı bitkinin su ekstraktında ortaya çıkmıştır.

Literatür incelendiğinde, Al-Shalah ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Salvia rosmarinus* Spenn. bitkisinin sulu özütü başta olmak üzere çeşitli bitki ekstraktlarının, bazı klinik bakteri izolatlarına karşı antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* türleri ve *Klebsiella* türleri gibi hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı agar kuyusu difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktivite test edilmiştir. Elde edilen bulgular, *Salvia rosmarinus*'un sulu özütünün, alkollü özütlerle karşılaştırıldığında test edilen bakteriler üzerinde daha güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur [187]. Bizim çalışmamızda da metanol ve etanol ekstraktlarının antibakteriyel etkinlikleri daha yüksek tespit edilmiştir. Bălăşoiu ve arkadaşlarının antibakteriyel etki değerlendirmeleri sonucunda, *Salvia glutinosa*, *S. splendens* ve *S. verticillata* türlerine ait farklı çözücülerle hazırlanmış özütlerin, test edilen mikroorganizmalar üzerinde farklı düzeylerde inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle n-bütanol ile elde edilen özütlerin, hem *Staphylococcus aureus* hem de *Escherichia coli* suşlarına karşı diğer çözücülere kıyasla daha güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Bu durum, n-bütanol ekstraksiyonunun etkin bileşenlerin çekiminde daha başarılı olabileceğini düşündürmektedir [188].

Rhaimi ve arkadaşlarının antibakteriyel aktiviteye yönelik gerçekleştirdikleri bir çalışmada, test edilen bakterilerin seftriaksona karşı dirençli olduğu ve bu antibiyotikğin etkisiz kaldığı belirlenmiştir. Buna karşılık, *Salvia officinalis*'ten elde edilen uçucu yağın dört farklı bakteri türü üzerinde anlamlı düzeyde inhibitör etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri açısından 1/100 ile 1/500 arasında değiştiği, minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerinin ise 1/100 olduğu saptanmıştır. Ayrıca saf uçucu yağın farklı dozaj seviyeleri (0, 1, 5, 10 ve 20 µL) kullanılarak fumigant toksisitesi değerlendirilmiştir [189].

Al-Qaysi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Salvia officinalis*'in etanol özütünün, çoklu ilaca dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşlarına karşı yüksek

antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir. Agar kuyusu difüzyon yöntemiyle yapılan testlerde, ekstraktın dört farklı konsantrasyonda (62,5–500 mg/mL) her iki bakteriye karşı da anlamlı inhibitör etki oluşturduğu ve bu etkinin konsantrasyon artışıyla birlikte belirgin şekilde yükseldiği bildirilmiştir. En yüksek inhibisyon zonu 500 mg/mL’de 41,66 mm olarak ölçülmüştür. Ekstraktın, test edilen yedi antibiyotiğin tamamından daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır [190].

## 5. DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *S. candidissima* subsp. *candidissima*, *S. multicaulis*, *S. suffruticosa* ve *S. syriaca* türlerine ait farklı çözücü ekstraktlarının (su, metanol, etanol ve etil asetat) antioksidan, sitotoksik, antigenotoksik, antimutajenik, antibakteriyel ve gelişimsel biyolojik etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle çok yönlü olarak değerlendirilmiştir.

LC-MS/MS analizi sonucunda her türde zengin fenolik bileşik profili tespit edilmiştir. Özellikle *S. candidissima* subsp. *candidissima*'da rosmarinik asit, *S. syriaca* 'da hesperidin, *S. suffruticosa* 'da ve *S. multicaulis* 'de apigenin-7-O-glukozit öne çıkan bileşiklerdir.

Antioksidan kapasite testlerinde DPPH ve ABTS testlerine göre *S. candidissima* subsp. *candidissima* metanol ve etanol ekstraktlarıyla en yüksek aktiviteyi gösterirken, FRAP analizinde en yüksek indirgeme gücü *S. syriaca* su ekstraktında gözlenmiştir.

MTS testi sonuçlarına göre, özellikle *S. candidissima* subsp. *candidissima* 'nın metanol ekstraktı, 100 mg/L konsantrasyonda en yüksek hücre yaşamlılığını sağlayarak belirgin sitoprotektif etki göstermiştir ( $p < 0.05$ ).

Genotoksisite değerlendirmelerinde, *S. multicaulis* su ve *S. syriaca* metanol ekstraktları, mikronükleus ve kromozom aberasyon testlerinde en güçlü antigenotoksik etkiyi göstermiştir.

SMART testi sonuçlarına göre, tüm ekstraktlar  $H_2O_2$ 'ye göre anlamlı düzeyde koruyucu etki göstermiştir. *S. syriaca* 'nın 50 mg/L etanol ekstraktı, en düşük nokta frekansları ile en güçlü *in vivo* antigenotoksik etkiyi ortaya koymuştur.

*In vivo* gelişimsel toksisite değerlendirmelerinde, sadece *S. suffruticosa* 'nın metanol dışındaki ekstraktları, puparasyon, hayatta kalma ve eklozyon süreçlerini olumsuz etkilemeden güvenli bir profil sunmuştur.

*In vivo* antioksidan değerlendirmelerde, *S. suffruticosa* 'nın tüm ekstraktları ABTS testine göre yüksek ( $> \%80$ ) antioksidan kapasite göstermiştir. *In vivo* FRAP testinde, *S. candidissima* subsp. *candidissima* 'nın etil asetat ekstresi güçlü antioksidan etki oluşturma potansiyeline sahiptir.

Antibakteriyel testler sonucunda, *S. multicaulis*'in su ekstraktı *E. coli* üzerinde en yüksek inhibisyon zonunu oluştururken, *S. suffruticosa*'nın etanol ekstraktı da *S. aureus* bakterisi üzerinde en yüksek zonu oluşturmuştur. MİK testi verilerine göre, *S. suffruticosa*'nın etanol ekstraktı ile *S. syriaca*'nın metanol ekstraktı, *E. coli* suşuna karşı en düşük MİK değerini (1.25 mg/mL) göstermiştir. *S. aureus* bakterisine karşı ise en etkili ekstrakt, *S. syriaca*'nın etanol ekstraktı olup (2.5 mg/mL) MİK değeri ile belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, incelenen *Salvia* türlerinin antioksidan, genotoksisiteyi azaltıcı ve antibakteriyel aktiviteleri açısından yüksek biyolojik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, söz konusu *Salvia* türlerinde tespit edilen biyolojik olarak aktif fenolik bileşiklerin mekanizmalarının aydınlatılması, özellikle oksidatif stresle ilişkili hastalık modellerinde etki profillerinin *in vivo* düzeyde sistematik olarak değerlendirilmesi ve terapötik potansiyellerinin farmasötik geliştirme süreçlerine entegre edilmesi önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] **P. H. Davis**, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vols. 1–10. Edinburgh, U.K.: Edinburgh University Press, 1985.
- [2] **S. Elmas and O. Elmas**, “*Salvia fruticosa*’nın (Anadolu Adaçayı) terapötik etkileri,” *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, vol. 4, no. 1, pp. 114–137, Apr. 2021, doi: 10.38001/ijlsb.764602.
- [3] **I. M. Shahhat and S. Y. S. Elsheikh**, “Accumulation of secondary metabolites in the family Lamiaceae as influenced by foliar micronutrients,” *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 23, no. 6, pp. 823–838, Nov. 2024, doi: 10.37360/blacpma.24.23.6.53.
- [4] **G. Chen**, “Research Progress on the Effect of Exogenous Additives Treatment on the Synthesis of Plant Secondary Metabolites,” *Academic Journal of Science and Technology*, vol. 14, no. 1, pp. 136–144, Jan. 2025, doi: 10.54097/yCHF3396.
- [5] **M. Z. Bhatti, H. Ismail, and W. K. Kayani**, “Plant secondary metabolites: Therapeutic potential and pharmacological properties,” in *Secondary Metabolites - Trends and Reviews*, IntechOpen, 2022, doi: 10.5772/intechopen.103698.
- [6] **B. Caballero, L. Trugo, and P. Finglas, Eds.**, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands: Academic Press, 2003.
- [7] **V. H. Heywood, R. K. Brummitt, A. Culham, and O. Seberg**, *Flowering Plant Families of the World*. Ontario, Canada: Firefly Books, 2007.
- [8] **K. Kubitzki, Ed.**, *The Families and Genera of Vascular Plants. Volume VII: Flowering Plants, Dicotyledons – Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)*. Berlin, Germany: Springer, 2004.
- [9] **B. Li et al.**, “A large-scale chloroplast phylogeny of the Lamiaceae sheds new light on its subfamilial classification,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 1–18, 2016.
- [10] **F. Zhao et al.**, “An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics,” *BMC Biology*, vol. 19, no. 1, p. 2, Jan. 2021.
- [11] **M. Stankovic**, *Lamiaceae Species: Biology, Ecology and Practical Uses*. Basel, Switzerland: MDPI, 2020.
- [12] **J. Javanmardi et al.**, “Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 21, pp. 5878–5883, 2002.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [13] **T. Juntachote and E. Berghofer**, “Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal,” *Food Chemistry*, vol. 92, no. 2, pp. 193–202, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.04.044.
- [14] **V. Lagouri and E. Nisteropoulou**, “Antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content,” *Journal of Food Lipids*, vol. 16, no. 4, pp. 484–498, Nov. 2009, doi: 10.1111/j.1745-4522.2009.01161.x.
- [15] **M. T. Shirazi, H. Gholami, G. Kavooosi, V. Rowshan, and A. Tafsiry**, “Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils,” *Food Science & Nutrition*, vol. 2, no. 2, pp. 146–155, Mar. 2014, doi: 10.1002/fsn3.85.
- [16] **S. Das, K. W. Sultana, I. Chandra et al.**, “In vitro propagation, phytochemistry and pharmacology of *Basilicum polystachyon* (L.) Moench (Lamiaceae): A short review,” *South African Journal of Botany*, vol. 157, pp. 289–297, 2023.
- [17] **A. Hamed, N. Ahmed, E. Attia, and S. Desoukey**, “A review on various classes of secondary metabolites and biological activities of Lamiaceae (Labiatae) (2002–2018),” *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 35–48, Dec. 2020, doi: 10.21608/jabps.2020.38318.1095.
- [18] **L. B. Anella**, “Salvia: An old standby and promising newcomer,” *HortTechnology*, vol. 10, no. 4, pp. 800–805, Jan. 2000, doi: 10.21273/HORTTECH.10.4.800.
- [19] **A. Kahraman, F. Celep, and M. Doğan**, “Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae),” *South African Journal of Botany*, vol. 76, pp. 187–195, 2010.
- [20] **N. Mohd Ali, S. K. Yeap, W. Y. Ho, B. K. Beh, S. W. Tan, and S. G. Tan**, “The promising future of chia, *Salvia hispanica* L.,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, pp. 1–9, 2012, doi: 10.1155/2012/171956.
- [21] **B. Clebsch**, “The new book of salvias,” in *The New Book of Salvias*, C. Barner, Ed. Portland, OR, USA: Timber Press, 2003, pp. 18–68.
- [22] **V. G. Kontogianni et al.**, “Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity,” *Food Chemistry*, vol. 136, no. 1, pp. 120–129, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.091.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [23] **G. Topçu**, “Bioactive triterpenoids from *Salvia* species,” *Journal of Natural Products*, vol. 69, no. 3, pp. 482–487, Mar. 2006, doi: 10.1021/np0600402.
- [24] **Y. Bayar and N. Genç**, “Determination of the chemical components, antioxidant and antifungal activities of essential oil and plant extract of *Salvia candidissima* Vahl.,” *Mediterranean Agricultural Sciences*, vol. 31, no. 2, pp. 93–99, Aug. 2018, doi: 10.29136/mediterranean.362163.
- [25] **N. Tabanca, B. Demirci, Z. Aytaç, and K. H. C. Başer**, “The chemical composition of *Salvia verticillata* L. subsp. *verticillata* from Turkey,” *Natural Volatiles & Essential Oils*, vol. 4, no. 1, pp. 18–28, 2017.
- [26] **A. Güner**, *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul, Turkey: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, 2012.
- [27] **D. Arslan and M. Fidan**, “Siirt ili florasında doğal olarak yetişen *Salvia multicaulis* Vahl.'ın uçucu yağ kompozisyonunun belirlenmesi,” *European Journal of Science and Technology*, pp. 196–200, Apr. 2020, doi: 10.31590/ejosat.678479.
- [28] **H. Özer**, “Erzurum çevresinde doğal yayılış gösteren *Salvia* türleri ve tıbbi özellikleri,” *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, vol. 25, no. Suppl. 2, pp. 340–345, 2016.
- [29] **A. Rustaie, A. Hadjiakhoondi, T. Akbarzadeh, M. Safevi, N. Samadi, R. Sabourian, and M. Hanavi**, “Phytochemical constituents and biological activities of *Salvia suffruticosa*,” *Research Journal of Pharmacognosy*, vol. 5, no. 2, pp. 25–32, 2018.
- [30] **M. Armağan**, “Tunceli (Türkiye)'de adaçayı yetiştiriciliği potansiyeli,” *Ereğli Tarım Bilimleri Dergisi*, Dec. 2023, doi: 10.54498/ETBD.2023.27.
- [31] **M. M. Al-Gharaibeh, H. R. Hamasha, S. Lachmuth, and I. Hensen**, “Local adaptation to different phytogeographic regions: habitat-related variations in seed germination in response to temperature and salinity for two medicinal *Salvia* species from Jordan,” *Plant Species Biology*, vol. 32, no. 1, pp. 25–35, Jan. 2017, doi: 10.1111/1442-1984.12123.
- [32] **F. Mungan Kılıç**, “A survey on *Salvia* L. taxa distributed in Mardin Province,” *MAS Journal of Applied Sciences*, vol. 7, no. 11, pp. 169–186, Mar. 2022, doi: 10.52520/masjaps.217.
- [33] **R. Ahmad, Ed.**, *Reactive Oxygen Species – Advances and Developments*, vol. 50. London, U.K.: IntechOpen, 2024, doi: 10.5772/intechopen.107774.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [34] **K. Jakubczyk, K. Dec, J. Kalduńska, D. Kawczuga, J. Kochman, and K. Janda**, “Reactive oxygen species – sources, functions, oxidative damage,” *Polski Merkuriusz Lekarski*, vol. 48, no. 284, pp. 124–127, Apr. 2020.
- [35] **A. Parab, H. Dawda, and U. Mukundan**, “A review of reactive oxygen species (ROS) in plants,” *Journal of Advanced Scientific Research*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2023, doi: 10.55218/JASR.202314101.
- [36] **T. R. Kiran, O. Otlu, and A. B. Karabulut**, “Oxidative stress and antioxidants in health and disease,” *Journal of Laboratory Medicine*, vol. 47, no. 1, pp. 1–11, Feb. 2023, doi: 10.1515/labmed-2022-0108.
- [37] **M. T. K.**, “Role of oxidative stress in the pathogenesis of OCD,” *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, vol. 4, no. S2, 2015, doi: 10.4172/2161-1009.1000219.
- [38] **G. Pizzino et al.**, “Oxidative stress: Harms and benefits for human health,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1155/2017/8416763.
- [39] **N. Berakdar and A. Alahmad**, “Review of oxidative stress and antioxidative,” *Innovare Journal of Life Sciences*, pp. 1–3, Mar. 2022, doi: 10.22159/ijls.2021.v10i1.43577.
- [40] **M. Gupta**, “Endogenous antioxidants-I,” in *Dietary Supplements and Nutraceuticals*, Iterative International Publishers, Selfpage Developers Pvt. Ltd., 2024, pp. 132–139, doi: 10.58532/nbennurdsch12.
- [41] **B. J. Ryan, M. L. Lo Faro, M. Whiteman, and P. G. Winyard**, “Reactive oxygen species,” in *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*, Basel, Switzerland: Springer Basel, 2014, pp. 1–6, doi: 10.1007/978-3-0348-0620-6\_10-1.
- [42] **L. Lv, W. Luo, and Q. Diao**, “A mitochondria-targeted rhodol fluorescent probe for imaging of hydrogen peroxide in living cells,” *Analytical Methods*, vol. 14, no. 21, pp. 2117–2122, 2022, doi: 10.1039/D2AY00522K.
- [43] **T. Finkel**, “Signal transduction by reactive oxygen species,” *Journal of Cell Biology*, vol. 194, no. 1, pp. 7–15, Jul. 2011, doi: 10.1083/jcb.201102095.
- [44] **L. Huang et al.**, “Recent theranostic applications of hydrogen peroxide-responsive nanomaterials for multiple diseases,” *RSC Advances*, vol. 13, no. 39, pp. 27333–27358, 2023, doi: 10.1039/D3RA05020C.
- [45] **R. Hopkins**, “Hydrogen peroxide in biology and medicine: An overview,” *Reactive Oxygen Species*, 2017, doi: 10.20455/ros.2017.809.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [46] **C. Sarikurkcu**, “Anthemis chia: Biological capacity and phytochemistry,” *Industrial Crops and Products*, vol. 153, p. 112578, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112578.
- [47] **L. A. Pham-Huy, H. He, and C. Pham-Huyc**, “Free radicals, antioxidants in disease and health,” *International Journal of Biomedical Science*, vol. 4, no. 2, pp. 89–96, Jun. 2008, doi: 10.59566/IJBS.2008.4089.
- [48] **F. Abak**, “Şanlıurfa ili Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasının florası bazı taksonların fitokimyasal ve etnobotanik özellikleri,” Ph.D. dissertation, Recep Tayyip Erdoğan Univ., Rize, Turkey, 2018.
- [49] **F. J. W. Korkmaz, S. Dogan, B. Y. Kardas, M. E. Diken, Ö. F. Karasakal, and M. Acar**, “*In vitro* and in silico analyses of cytoprotective, antigenotoxic and antimutagenic potential of *Phlomis pungens* var. *hirta* extracts against oxidative damage,” preprint, Aug. 2024, doi: 10.21203/rs.3.rs-4780456/v1.
- [50] **M. Yamauchi, Y. Kitamura, H. Nagano, J. Kawatsu, and H. Gotoh**, “DPPH measurements and structure—activity relationship studies on the antioxidant capacity of phenols,” *Antioxidants*, vol. 13, no. 3, p. 309, Mar. 2024, doi: 10.3390/antiox13030309.
- [51] **Md. N. Alam, N. J. Bristi, and Md. Rafiquzzaman**, “Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity,” *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 21, no. 2, pp. 143–152, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
- [52] **Z. Can, O. Yıldız, H. Şahin, A. Asadov, and S. Kolaylı**, “Phenolic profile and antioxidant potential of propolis from Azerbaijan,” *Mellifera*, vol. 15, no. 1, pp. 16–28, May 2016.
- [53] **S. B. Kedare and R. P. Singh**, “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 48, no. 4, pp. 412–422, Aug. 2011, doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- [54] **N. N. Radiartini and Y. Andayani**, “Antioxidant activity of various plant extracts assessed using the ABTS method,” *Jurnal Biologi Tropis*, vol. 24, no. 1b, pp. 196–202, Dec. 2024, doi: 10.29303/jbt.v24i1b.7959.
- [55] **R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans**, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, May 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [56] **P. Shah** and **H. A. Modi**, “Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity,” *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)*, vol. 3, no. 6, pp. 636–641, Jun. 2015.
- [57] **E. Duruel**, “Hücre kültürlerine genel bakış,” *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, vol. 47, no. 2, pp. 136–149, Oct. 2021..
- [58] **B. O. States**, *The Rhetoric of Dreams*. Ithaca, NY, USA: Cornell University Press, 2019.
- [59] **S. Ballav**, **A. J. Deshmukh**, **S. Siddiqui**, **J. Aich**, and **S. Basu**, “Two-dimensional and three-dimensional cell culture and their applications,” *IntechOpen*, 2022. doi: 10.5772/intechopen.100382.
- [60] **S. Vekshari**, “Floridzin molekülünün anti-kanser ve anti-genotoksik etkileri,” Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Turkey, 2021.
- [61] **H. Bayhan**, **S. Doğan**, **B. Yılmaz Kardaş**, **M. E. Diken**, **T. Dirmenci**, and **S. Çelikler**, “Comprehensive antigenotoxic profile of endemic *Cirsium steriolepis* Petrak extracts against hydrogen peroxide induced toxicity,” *Food Science and Biotechnology*, vol. 33, no. 13, pp. 3131–3152, Oct. 2024, doi: 10.1007/s10068-024-01555-7.
- [62] **E. Üstün Karatop**, **C. Eren Cimenci**, and **A. Melisa Aksu**, “Colorimetric cytotoxicity assays,” in *Cytotoxicity – Understanding Cellular Damage and Response*. London, U.K.: IntechOpen, 2023, doi: 10.5772/intechopen.105772.
- [63] **N. Ren**, **M. Atyah**, **W.-Y. Chen**, and **C.-H. Zhou**, “The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 15, no. 1, p. 110, May 2017.
- [64] **S. A. K. S. Mohamed**, **S. Upreti**, **R. S. V. Rajendra**, and **R. Dang**, “Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods,” *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, vol. 1, no. 5, pp. 133–138, 2017.
- [65] **R. Corvi** and **F. Madia**, “*In vitro* genotoxicity testing – Can the performance be enhanced?,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 106, pp. 600–608, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.fct.2016.08.024.
- [66] **Z. Şekeroğlu** and **Ş.-A. V. Şekeroğlu**, “Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi,” *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, vol. 68, no. 4, pp. 241–252, 2011.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [67] **B. Y. Kardaş** and **S. Doğan**, “The effects of mutations on pericentromeric localization of shugoshin,” *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 24, no. 2, pp. 869–877, 2022, doi: 10.25092/baunfbed.1099924.
- [68] **S. T. Matsumoto**, **M. S. Mantovani**, **M. I. A. Malagutti**, **A. L. Dias**, **I. C. Fonseca**, and **M. A. Marin-Morales**, “*In vivo* genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips,” *Genetics and Molecular Biology*, vol. 29, pp. 148–158, 2006.
- [69] **D. Yüzbaşıoğlu**, **N. Zengin**, and **F. Ünal**, “Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri,” *GIDA*, vol. 39, no. 3, pp. 179–186, 2014
- [70] **M. S. T. Ishidate Jr.**, “*In vitro* chromosomal aberration test using Chinese hamster lung (CHL) fibroblast cells in culture,” in *Progress in Mutation Research*, vol. 5, J. Ashby, Ed. Amsterdam–New York–Oxford: Elsevier Science Publishers, 1985, pp. 427–432.
- [71] **A. Y. Çetinkaya** and **S. Yurtsever**, “Somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster* used for investigating the genotoxicity of some food additives,” *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 65–73, 2021.
- [72] **M. C. LaFave** and **J. Sekelsky**, “Mitotic recombination: why? when? how? where?,” *PLoS Genetics*, vol. 5, no. 3, p. e1000411, Mar. 2009, doi: 10.1371/journal.pgen.1000411.
- [73] **B. Yılmaz Kardaş**, **M. E. Diken**, **H. Bayhan**, **M. Acar**, and **S. Doğan**, “Cytoprotective, antimutagenic/antirecombinogenic and antibacterial properties of *Lallemantia iberica* extracts,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 103, no. 4, pp. 1901–1911, Mar. 2023, doi: 10.1002/jsfa.12257.
- [74] **M. Gürbüz**, **E. Oral**, **H. Kizilet**, **Z. Halici**, and **M. Güleç**, “Genotoxic evaluation of selective serotonin-reuptake inhibitors by use of the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*,” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 748, no. 1–2, pp. 17–20, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.06.004.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [75] **U. Graf** and **N. van Schaik**, “Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*,” *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 271, no. 1, pp. 59–67, Feb. 1992, doi: 10.1016/0165-1161(92)90032-H.
- [76] **J. Guzmán Rincón**, **J. Espinosa**, and **U. Graf**, “Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*,” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 412, no. 1, pp. 69–81, Jan. 1998, doi: 10.1016/S1383-5718(97)00174-5.
- [77] **U. B. Pandey** and **C. D. Nichols**, “Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery,” *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 2, pp. 411–436, Jun. 2011, doi: 10.1124/pr.110.003293.
- [78] **M. A. Fernández-Moreno**, **C. L. Farr**, **L. S. Kaguni**, and **R. Garesse**, “*Drosophila melanogaster* as a model system to study mitochondrial biology,” in *Mitochondria: Practical Protocols*, D. Leister and J. M. Herrmann, Eds. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2007, pp. 33–49.
- [79] **M. H. Bülow**, **B. D. Parsons**, and **F. Di Cara**, “*Drosophila melanogaster* as a genetic model system to dissect the mechanisms of disease that lead to neurodegeneration in adrenoleukodystrophy,” in *Peroxisomes and Their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism*, Springer, 2020, pp. 145–159, doi: 10.1007/978-3-030-60204-8\_11.
- [80] **T. P. T. Cushnie** and **A. J. Lamb**, “Antimicrobial activity of flavonoids,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 26, no. 5, pp. 343–356, Nov. 2005, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- [81] **M. M. Cowan**, “Plant products as antimicrobial agents,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 4, pp. 564–582, Oct. 1999, doi: 10.1128/CMR.12.4.564.
- [82] **S. Burt**, “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- [83] **M. Balouiri**, **M. Sadiki**, and **S. K. Ibnsouda**, “Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review,” *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [84] **H. Norouzi-Arasi, A. Abbas-Mohammadi, M. Kaviar, A. Mohammadi, and M. Yousefzadi**, “Volatile constituents and antimicrobial activities of *Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch. ex Benth. from Iran,” *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 20, no. 6, pp. 633–636, Nov. 2005, doi: 10.1002/ffj.1514.
- [85] **G. Topcu, Z. Turkmen, J. K. Schilling, D. G. I. Kingston, J. M. Pezzuto, and A. Ulubelen**, “Cytotoxic activity of some Anatolian *Salvia* extracts and isolated abietane diterpenoids,” *Pharmaceutical Biology*, vol. 46, no. 3, pp. 180–184, Jan. 2008, doi: 10.1080/13880200701735411.
- [86] **M. Altun, M. Ünal, T. Kocagöz, and A. C. Gören**, “Essential oil compositions and antimicrobial activity of *Salvia* species,” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 10, no. 3, pp. 251–258, Jan. 2007, doi: 10.1080/0972060X.2007.10643550.
- [87] **A. Ulubelen, G. Topcu, and C. B. Johansson**, “Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity,” *Journal of Natural Products*, vol. 60, no. 12, pp. 1275–1280, Dec. 1997, doi: 10.1021/np9700681.
- [88] **S. Gharenaghadeh, N. Koushki, S. R. Shariati, A. H. Abbaszadeh, and A. Mortazavi**, “Application of *Salvia multicaulis* essential oil-containing nanoemulsion against food-borne pathogens,” *Food Bioscience*, vol. 19, pp. 128–133, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.fbio.2017.07.003.
- [89] **M. B. Bahadori, N. Zengin, A. M. Ali, E. A. A. Abdalla, G. Sarikurkcu, and M. R. C. A. Bahador**, “Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer’s disease, and antioxidant activities of *Salvia syriaca* L.,” *International Journal of Food Properties*, vol. 20, no. 8, pp. 1761–1772, Aug. 2017, doi: 10.1080/10942912.2016.1218893.
- [90] **R. Karamian, M. Asadbegy, and R. Pakazad**, “Essential oil compositions, antioxidant and antibacterial activities of two *Salvia* species (*S. grossheimii* Bioss. and *S. syriaca* L.) growing in Iran,” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 17, no. 2, pp. 331–345, Mar. 2014, doi: 10.1080/0972060X.2014.895156.
- [91] **M. Tosun, S. Ercişli, M. Şengül, H. Özer, T. Polat, and E. Öztürk**, “Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey,” *Biological Research*, vol. 42, no. 2, 2009, doi: 10.4067/S071697602009000200005.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [92] **S.-S. Choi, S.-H. Lee, and K.-A. Lee**, “A comparative study of hesperetin, hesperidin and hesperidin glucoside: antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities *in vitro*,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 8, p. 1618, Aug. 2022, doi: 10.3390/antiox11081618.
- [93] **N. C. de Carvalho, M. J. F. Corrêa-Angeloni, D. D. Leffa, J. Moreira, V. Nicolau, P. de A. Amaral, A. E. Rossatto, and V. M. de Andrade**, “Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice,” *Genetics and Molecular Biology*, vol. 34, no. 2, pp. 290–297, Apr. 2011, doi: 10.1590/s1415-47572011000200021.
- [94] **A. Ghorbani, H. R. Sadeghnia, A. R. Afshari, and A. Hosseini**, “Rosmarinic acid protects adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in nutrient-deficient conditions,” *Preventive Nutrition and Food Science*, vol. 24, no. 4, pp. 449–455, Dec. 2019, doi: 10.3746/pnf.2019.24.4.449.
- [95] **H.-K. Kim, S. Hwang, B. Sung, Y.-H. Kim, and Y. Chang**, “Gd-complex of a rosmarinic acid conjugate as an anti-inflammatory theranostic agent via reactive oxygen species scavenging,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 8, p. 744, Aug. 2020, doi: 10.3390/antiox9080744.
- [96] **A. Sadeghi, A. R. Bastin, H. Ghahremani, and A. H. Doustimotlagh**, “The effects of rosmarinic acid on oxidative stress parameters and inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced peripheral blood mononuclear cells,” *Molecular Biology Reports*, vol. 47, no. 5, pp. 3557–3566, May 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05447-x.
- [97] **L. Pizzale, R. Bortolomeazzi, S. Vichi, E. Überegger, and L. S. Conte**, “Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 82, no. 14, pp. 1645–1651, Nov. 2002, doi: 10.1002/jsfa.1240.
- [98] **V. Exarchou, E. Nenadis, S. P. Kalli, M. T. B. Garcia, G. J. McDougall, and R. J. D. O. Williams**, “HPLC-SPE-NMR characterization of major metabolites in *Salvia fruticosa* Mill. extract with antifungal potential: relevance of carnosic acid, carnosol, and hispidulin,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no. 2, pp. 457–463, Jan. 2015, doi: 10.1021/jf5050734.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [99] **V. Papageorgiou, C. Gardeli, A. Mallouchos, M. Papaioannou, and M. Komaitis**, “Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 16, pp. 7254–7264, Aug. 2008, doi: 10.1021/jf800802t.
- [100] **R. Öztürk Urek, H. Ayar Kayalı, M. Nakiboğlu, and L. Tarhan**, “Comparison of antioxidant capacities of the leaves and flowers of *Salvia fruticosa* grown in Turkey,” *Asian Journal of Chemistry*, vol. 20, no. 3, pp. 2091–2098, 2008.
- [101] **F. S. Şenol, İ. Erdoğan Orhan, F. Celep, A. Kahraman, M. Doğan, G. Yılmaz, and B. Şener**, “Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities,” *Food Chemistry*, vol. 120, no. 1, pp. 34–43, 2010.
- [102] **O. Firuzi, R. Miri, M. Asadollahi, S. Eslami, and A. R. Jassbi**, “Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven *Salvia* species from Iran,” *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 4, pp. 801–810, 2013.
- [103] **F. Z. Shahneh, S. Valiyari, B. Baradaran, C. Abdolalizadeh, A. Bandehagh, A. Azadmehr, and R. Hajiaghae**, “Inhibitory and cytotoxic activities of *Salvia officinalis* L. extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis,” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 3, no. 1, pp. 51–55, Feb. 2013.
- [104] **E. Ertürk, O. E. Onur, I. Aydın, M. Z. Özel, M. Fırat, and F. Ari**, “Cytotoxic potential of rare plant *Salvia candidissima* subsp. *candidissima* on breast cancer cells,” *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 66, 2023, doi: 10.1590/1678-4324-2023220358.
- [105] **B. Aydemir and E. Karadağ Sarı**, “Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi,” *Kocatepe Veterinary Journal*, vol. 2, no. 2, pp. 56–60, 2009.
- [106] **A. Shafaei, K. Esmaili, E. Farsi, A. F. A. Aisha, A. M. S. Abul Majid, and Z. Ismail**, “Genotoxicity, acute and subchronic toxicity studies of nano liposomes of *Orthosiphon stamineus* ethanolic extract in Sprague Dawley rats,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, no. 1, p. 360, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0885-z.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [107] **A. Akkurt** and **S. Çelik**, “Composition of the essential oil of some *Centaurea L.*,” *Asian Journal of Chemistry*, vol. 26, no. 15, pp. 4912–4914, 2014, doi: 10.14233/ajchem.2014.17813.
- [108] **E. Dirican**, **H. Türkez**, and **B. Toğar**, “Modulatory effects of *Thymbra spicata L.* different extracts against the mercury-induced genotoxicity in human lymphocytes *in vitro*,” *Cytotechnology*, vol. 64, no. 2, pp. 181–186, 2012.
- [109] **N. Ibrahim**, **H. Abbas**, **N. S. El-Sayed**, and **H. A. Gad**, “*Rosmarinus officinalis L.* hexane extract: phytochemical analysis, nanoencapsulation, and *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* anti-photoaging potential evaluation,” *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, p. 13102, Jul. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-16592-7.
- [110] **J.-E. Lee**, **M. Kim**, **H.-J. Park**, **S. Choi**, and **Y. Lee**, “The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from Asteraceae: a comparative review,” *Foods*, vol. 13, no. 19, p. 3151, Oct. 2024, doi: 10.3390/foods13193151.
- [111] **I. Sifaoui**, **E. Mecha**, **A. Silva**, **N. Chammem**, **M. Mejri**, **M. Abderabba**, and **M. R. Bronze**, “Optimized extraction of antioxidants from olive leaves using augmented simplex centroid design,” *Analytical Letters*, vol. 49, no. 9, pp. 1323–1333, Jun. 2016, doi: 10.1080/00032719.2015.1104320.
- [112] **S. Çelikler**, **O. Vatan**, **G. Yıldız**, and **R. Bilaloğlu**, “Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes *in vitro*,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 4, pp. 796–801, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.fct.2009.01.010.
- [113] **M. E. Diken** and **B. Yılmaz**, “Inhibitory effect on acetylcholinesterase and toxicity analysis of some medicinal plants,” *International Journal of Secondary Metabolite*, vol. 9, no. 1, pp. 27–42, Mar. 2022, doi: 10.21448/ijsm.1032863.
- [114] **I. F. F. Benzie** and **J. J. Strain**, “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: the FRAP assay,” *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, Jul. 1996, doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- [115] **M. G. Melilli et al.**, “Improvement of fatty acid profile in durum wheat breads supplemented with *Portulaca oleracea L.*: quality traits of purslane-fortified bread,” *Foods*, vol. 9, no. 6, p. 764, Jun. 2020, doi: 10.3390/foods9060764.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [116] **B. Yılmaz, E. T. Irmak, Y. Turhan, S. Doğan, M. Doğan, and O. Turhan,** “Synthesis, characterization and biological properties of intercalated kaolinite nanoclays: intercalation and biocompatibility,” *Advances in Materials Science*, vol. 19, no. 1, pp. 83–99, Mar. 2019, doi: 10.2478/adms-2019-0007.
- [117] **A. Ayar, H. Uysal, and D. Altun Çolak,** “Anabolik steroidlerin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin insan periferel lenfosit kültüründe mikronükleus test tekniğiyle araştırılması,” *Cumhuriyet Science Journal*, vol. 37, no. 4, p. 329, Oct. 2016, doi: 10.17776/csj.74398.
- [118] **N. Aydemir, S. Çelikler, and R. Bilaloğlu,** “*In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes,” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 582, no. 1–2, pp. 35–41, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.12.013.
- [119] **S. Çelikler Kasimoğulları et al.,** “Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. *in vitro*,” *Turkish Journal of Biology*, vol. 38, pp. 940–947, 2014, doi: 10.3906/biy-1405-23.
- [120] **H. Kefelioğlu, Z. Atlı Şekeroğlu, G. Coşguner, S. Kondaş Yedier, and V. Şekeroğlu,** “Ziprasidone induces cytotoxicity and genotoxicity in human peripheral lymphocytes,” *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 40, no. 4, pp. 425–431, Oct. 2017, doi: 10.1080/01480545.2016.1252920.
- [121] **H. Chung, T. Sztal, S. Pasricha, M. Sridhar, P. Batterham, and P. J. Daborn,** “Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 14, pp. 5731–5736, Apr. 2009, doi: 10.1073/pnas.0812141106.
- [122] **E. U. Yakovleva, E. B. Naimark, and A. V. Markov,** “Adaptation of *Drosophila melanogaster* to unfavorable growth medium affects lifespan and age-related fecundity,” *Biochemistry (Moscow)*, vol. 81, no. 12, pp. 1445–1460, Dec. 2016, doi: 10.1134/S0006297916120063.
- [123] **U. Graf et al.,** “Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*,” *Environmental Mutagenesis*, vol. 6, no. 2, pp. 153–188, Jan. 1984, doi: 10.1002/em.2860060206.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [124] **N. Johnmark** and **H. W. Kinyi**, “Amaranth leaf extract protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*,” *BMC Research Notes*, vol. 14, no. 1, p. 188, Dec. 2021, doi: 10.1186/s13104-021-05603-x.
- [125] **D. A. Omoboyowa**, **S. T. Olugbenga**, **F. D. Adetuyi**, **S. T. Akinsulure**, **K. M. Akinwande**, **C. B. Iwuji**, and **S. F. Ayekolu**, “Modulatory effects of selected compounds on oxidative stress in hydrogen peroxide-induced *Drosophila melanogaster*,” *Pharmacological Research – Modern Chinese Medicine*, vol. 5, p. 100169, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.prmcm.2022.100169.
- [126] **E. M. Alexander et al.**, “The *in vivo* antioxidant protective activity of *Mangifera indica* cold aqueous leaf extract in *Drosophila melanogaster*,” *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, pp. 1–7, Aug. 2019, doi: 10.9734/jabb/2019/v22i230108.
- [127] **M. D. Rand**, **S. L. Montgomery**, **L. Prince**, and **D. Vorobjikina**, “Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model,” *Current Protocols in Toxicology*, vol. 59, no. 1, Feb. 2014, doi: 10.1002/0471140856.tx0112s59.
- [128] **G. E. Macedo et al.**, “*Senecio brasiliensis* impairs eclosion rate and induces apoptotic cell death in larvae of *Drosophila melanogaster*,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 198, pp. 45–57, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.cbpc.2017.05.004.
- [129] **A. Depetris-Chauvin**, **D. Galagovsky**, **C. Chevalier**, **G. Maniere**, and **Y. Grosjean**, “Olfactory detection of a bacterial short-chain fatty acid acts as an orexigenic signal in *Drosophila melanogaster* larvae,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 14230, Oct. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-14589-1.
- [130] **B. Riaz et al.**, “Toxicity, phytochemical composition, and enzyme inhibitory activities of some indigenous weed plant extracts in fruit fly, *Drosophila melanogaster*,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2018, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1155/2018/2325659.
- [131] **Q. F. Liu et al.**, “*In vivo* screening of traditional medicinal plants for neuroprotective activity against A $\beta$ 42 cytotoxicity by using *Drosophila* models of Alzheimer’s disease,” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 38, no. 12, pp. 1891–1901, 2015, doi: 10.1248/bpb.b15-00459.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [132] **A. Basile et al.**, “Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 107, no. 2, pp. 240–248, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.jep.2006.03.019.
- [133] **F. Alshareef**, “Protocol to evaluate antibacterial activity MIC, FIC and time kill method,” *Acta Scientific Microbiology*, vol. 4, no. 5, pp. 02–06, Apr. 2021, doi: 10.31080/ASMI.2021.04.0825.
- [134] **J. Dai and R. J. Mumper**, “Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties,” *Molecules*, vol. 15, no. 10, pp. 7313–7352, Oct. 2010, doi: 10.3390/molecules15107313.
- [135] **J. Azmir et al.**, “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review,” *Journal of Food Engineering*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [136] **Q.-W. Zhang, L.-G. Lin, and W.-C. Ye**, “Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review,” *Chinese Medicine*, vol. 13, no. 1, p. 20, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.
- [137] **S. Jedidi et al.**, “Comparative studies of phytochemical screening, HPLC-PDA-ESI-MS/MS-LC/HR-ESI-MS analysis, antioxidant capacity and *in vitro* fermentation of officinal sage (*Salvia officinalis* L.) cultivated in different biotopes of northwestern Tunisia,” *Chemistry & Biodiversity*, vol. 17, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1002/cbdv.201900394.
- [138] **O. Koçer**, “Determination of optimum extract conditions and evaluation of biological activity potential of *Salvia cilicica* Boiss,” *Scientific Reports*, vol. 15, no. 1, p. 9277, Mar. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-93925-2.
- [139] **M. Farhat, A. Landoulsi, R. Chaouch-Hamada, M. Sotomayor, and J. A. Jordán**, “Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats,” *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 904–914, 2013.
- [140] **E. K. Akkol, F. Göger, M. Koşar, and K. H. C. Başer**, “Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey,” *Food Chemistry*, vol. 108, no. 3, pp. 942–949, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.071.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [141] **R. Velamuri, Y. Sharma, J. Fagan, and J. Schaefer**, “Application of UHPLC-ESI-QTOF-MS in phytochemical profiling of sage (*Salvia officinalis*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*),” *Planta Medica International Open*, vol. 7, no. 4, pp. e133–e144, Nov. 2020, doi: 10.1055/a-1272-2903.
- [142] **H. I. Al-Jaber, A. K. Shakya, and Z. A. Elagbar**, “HPLC profiling of selected phenolic acids and flavonoids in *Salvia eigii*, *Salvia hierosolymitana* and *Salvia viridis* growing wild in Jordan and their *in vitro* antioxidant activity,” *PeerJ*, vol. 8, p. e9769, Aug. 2020, doi: 10.7717/peerj.9769.
- [143] **A. Kuruuzum-Uz and S. Gundogdu**, “Experimental informational compilation on isolation from herbal sources and biological activity of rosmarinic acid,” in *Handbook of Research on Advanced Phytochemicals and Plant-Based Drug Discovery*, 2022, pp. 314–326, doi: 10.4018/978-1-6684-5129-8.ch015.
- [144] **M. Nadeem et al.**, “Therapeutic potential of rosmarinic acid: a comprehensive review,” *Applied Sciences*, vol. 9, no. 15, p. 3139, Aug. 2019, doi: 10.3390/app9153139.
- [145] **I. Subhan and Y. H. Siddique**, “Pharmacological attributes of hesperidin,” *Current Traditional Medicine*, vol. 10, no. 7, Dec. 2024, doi: 10.2174/2215083810666230822113623.
- [146] **A. Moshari-Nasirkandi, H. Sadeghi, M. Ghaedi, and N. Farsuni**, “Chemometrics-based analysis of the phytochemical profile of 20 *Salvia* species,” *Scientific Reports*, vol. 14, pp. 1–15, 2024.
- [147] **S. Uysal et al.**, “Chemical characterization, cytotoxic, antioxidant, antimicrobial, and enzyme inhibitory effects of different extracts from one sage (*Salvia ceratophylla* L.) from Turkey: open a new window on industrial purposes,” *RSC Advances*, vol. 11, no. 10, pp. 5295–5310, 2021, doi: 10.1039/D0RA10044G.
- [148] **R. Mokhtari, M. Kazemi Fard, M. Rezaei, S. A. Moftakharzadeh, and A. Mohseni**, “Antioxidant, antimicrobial activities, and characterization of phenolic compounds of thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and thyme–sage mixture extracts,” *Journal of Food Quality*, vol. 2023, pp. 1–9, Jan. 2023, doi: 10.1155/2023/2602454.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [149] **S. Asadi, A. Ahmadiani, M. A. Esmaeili, A. Sonboli, N. Ansari, and F. Khodaghali**, “*In vitro* antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 5, pp. 1341–1349, May 2010, doi: 10.1016/j.fct.2010.02.035.
- [150] **E. Sarrou, S. Martens, and P. Chatzopoulou**, “Metabolite profiling and antioxidative activity of sage (*Salvia fruticosa* Mill.) under the influence of genotype and harvesting period,” *Industrial Crops and Products*, vol. 94, pp. 240–250, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.indcrop.2016.08.022.
- [151] **M. S. Kocak, C. Sarikurkcu, M. Cengiz, S. Kocak, M. C. Uren, and B. Tepe**, “*Salvia cadmica*: phenolic composition and biological activity,” *Industrial Crops and Products*, vol. 85, pp. 204–212, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.indcrop.2016.03.015.
- [152] **H. Lodish, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell**, “Growth of animal cells in culture,” in *Molecular Cell Biology*, New York, NY, USA: W. H. Freeman, 2000.
- [153] **M. Tayarani-Najaran, J. Z. Asili, E. Aioubi, and S. A. Emami**, “Growth inhibition and apoptosis induction by *Salvia chloroleuca* in MCF-7 breast cancer cell line,” *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 4, pp. 789–799, 2013.
- [154] **Z. Jažo, M. Glumac, V. Paštar, S. Bektić, M. Radan, and I. Carev**, “Chemical composition and biological activity of *Salvia officinalis* L. essential oil,” *Plants*, vol. 12, no. 9, p. 1794, Apr. 2023, doi: 10.3390/plants12091794.
- [155] **J. Parsaee, H. Asili, M. Tayarani-Najaran, Z. Jahed, et al.**, “Apoptosis induction of *Salvia chorassanica* root extract on human cervical cancer cell line,” *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 1, pp. 75–83, 2013.
- [156] **A. Ayvazyan, L. Deutsch, C. Zidorn, B. Kircher, and S. S. Çiçek**, “Cytotoxic diterpenoids from *Salvia glutinosa* and comparison with the tanshinone profile of danshen (*Salvia miltiorrhiza*),” *Frontiers in Plant Science*, vol. 14, Dec. 2023, doi: 10.3389/fpls.2023.1269710.
- [157] **F. Z. Shahneh, S. Valiyari, B. Baradaran, C. Abdolalizadeh, A. Bandehagh, A. Azadmehr, and R. Hajiaghvae**, “Cytotoxic activities of *Salvia officinalis* L. extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis,” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 3, no. 1, pp. 51–55, Feb. 2013.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [158] **M. K. Erhan**, “The potential of *Salvia officinalis* as a suppressor of cell proliferation in animal feed and human nutrition: an experimental study,” *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 44, no. 2, pp. 244–248, Apr. 2020, doi: 10.3906/vet-1910-23.
- [159] **H. Bayhan**, “Bazı endemik *Cirsium* türlerinin hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile indüklenmiş olan insan lenfosit hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin giderilmesindeki potansiyelinin araştırılması,” Master’s thesis, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Turkey, 2022.
- [160] **A. Çebi et al.**, “Cytotoxic and genotoxic effects of an endemic plant of Turkey *Salvia kronenburgii* on breast cancer cell lines,” *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, vol. 15, no. 5, p. 1080, 2019, doi: 10.4103/jcrt.JCRT\_1322\_16.
- [161] **G. Topçu, R. Yücer, and H. Şenol**, “Bioactive constituents of Anatolian *Salvia* species,” in *Salvia Biotechnology*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 31–132, doi: 10.1007/978-3-319-73900-7\_2.
- [162] **A. Di Sotto et al.**, “Anticlastogenic effect in human lymphocytes by the sodium salt of 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-trien-3-oic acid,” *Journal of Natural Products*, vol. 75, no. 7, pp. 1294–1298, Jul. 2012, doi: 10.1021/np3001893.
- [163] **J. Mathew and J. E. Thoppil**, “Genotoxicity of methyl parathion and antimutagenic activity of *Salvia officinalis* L. (sage) extracts in Swiss albino mice,” *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 5, no. 2, pp. 164–170, 2012.
- [164] **L. S. Stavropoulou et al.**, “Phytochemical profile and evaluation of the antioxidant, cyto-genotoxic, and antigenotoxic potential of *Salvia verticillata* hydromethanolic extract,” *Plants*, vol. 13, no. 5, p. 731, Mar. 2024, doi: 10.3390/plants13050731.
- [165] **F. Ü. Alkan, F. E. Gürsel, A. Ateş, M. Özyürek, K. Güçlü, and M. Altun**, “Protective effects of *Salvia officinalis* extract against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in rats,” *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, Jan. 2012, doi: 10.3906/vet-1105-36.
- [166] **N. Sevindik and E. Rencuzogullari**, “The genotoxic and antigenotoxic effects of *Salvia fruticosa* leaf extract in human blood lymphocytes,” *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 37, no. 3, pp. 295–302, Jul. 2014, doi: 10.3109/01480545.2013.851689.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [167] **J. Mathew** and **J. E. Thoppil**, “Investigation on the antimutagenic activity of three *Salvia* extracts,” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. Suppl 3, pp. 225–230, 2012.
- [168] **M. Vujošević** and **J. Blagojević**, “Antimutagenic effects of extracts from sage (*Salvia officinalis*) in mammalian system *in vivo*,” *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 52, pp. 439–443, 2004.
- [169] **T. Aşkın Çelik** and **Ö. S. Aslantürk**, “Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L., *Lavandula stoechas* L. and *Tilia cordata* Mill. on *in vitro* human peripheral blood lymphocytes,” *Cumhuriyet Science Journal*, vol. 39, no. 1, pp. 127–143, Mar. 2018, doi: 10.17776/csj.405629.
- [170] **D. D. Kiliç**, **A. Ayar**, **C. Baskan**, and **T. Yildirim**, “Lamiaceae ailesine ait bazı bitki türlerinin genotoksik ve antigenotoksik etkileri,” *European Journal of Science and Technology*, pp. 348–352, Dec. 2018, doi: 10.31590/ejosat.430874.
- [171] **G. Gayozo**, **V. Rivarola**, **M. Marín Insfrán**, and **D. Filizzola**, “Actividad antimutagénica de *Salvia hispanica* sobre mutaciones y recombinaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*,” *Steviana*, vol. 8, no. 1, 2016, doi: 10.56152/StevianaFacenV8N1A5.
- [172] **A. Patenkovic**, **M. Stamenkovic-Radak**, **T. Banjanac**, and **M. Andjelkovic**, “Antimutagenic effect of sage tea in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 1, pp. 180–183, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.fct.2008.10.024.
- [173] **S. Kushalan**, **L. C. D’Souza**, **K. Aloysius**, **A. Sharma**, and **S. Hegde**, “Toxicity assessment of *Curculigo orchioides* leaf extract using *Drosophila melanogaster*: a preliminary study,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 19, no. 22, p. 15218, Nov. 2022, doi: 10.3390/ijerph192215218.
- [174] **A. Jabeen**, **A. Zaitoon**, **L.-T. Lim**, and **C. Scott-Dupree**, “Toxicity of five plant volatiles to adult and egg stages of *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae), the spotted-wing *Drosophila*,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 69, no. 33, pp. 9511–9519, Aug. 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.1c01384.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [175] **D. Pam, A. M. Etuh, O. I. Oyeniran, and I. W. Mdekere**, “Toxicity of *Mangifera indica* aqueous stem bark extract evaluated in *Drosophila melanogaster* used as model organism,” *Annales Pharmaceutiques Françaises*, vol. 79, no. 5, pp. 539–546, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.pharma.2021.02.005.
- [176] **S. Aydın**, “Endemik *Gundelia dersim* bitkisinin farklı ekstraktlarının sitotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılması,” Master’s thesis, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye, 2022.
- [177] **G. Llauradó Maury, M. Montero Cantón, and L. Chávez Rodríguez**, “Antioxidants in plants: A valorization potential emphasizing the need for the conservation of plant biodiversity in Cuba,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 11, p. 1048, Oct. 2020, doi: 10.3390/antiox9111048.
- [178] **R. R. Kotha, F. S. Tareq, E. Yildiz, and D. L. Luthria**, “Oxidative stress and antioxidants—a critical review on in vitro antioxidant assays,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 12, p. 2388, Dec. 2022, doi: 10.3390/antiox11122388.
- [179] **M. P. Kähkönen, et al.**, “Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 10, pp. 3954–3962, Oct. 1999, doi: 10.1021/jf990146l.
- [180] **E. Bagci, E. Akbaba, C. Maniu, E. Ungureanu, and L. Hritcu**, “Evaluation of anti-amnesic activity of *Salvia multicaulis* essential oil on scopolamine-induced amnesia in rats: In vivo and in silico approaches,” *Heliyon*, vol. 5, no. 8, p. e02223, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02223.
- [181] **P. Furdak, K. Kut, G. Bartosz, and I. Sadowska-Bartosz**, “Comparison of various assays of antioxidant activity/capacity: Limited significance of redox potentials of oxidants/indicators,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 26, no. 15, p. 7069, Jul. 2025, doi: 10.3390/ijms26157069.
- [182] **N. Chaves, A. Santiago, and J. C. Alías**, “Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 1, p. 76, Jan. 2020, doi: 10.3390/antiox9010076.
- [183] **J. Rumpf, R. Burger, and M. Schulze**, “Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin–Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 233, p. 123470, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123470.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [184] **H. Wang, X. Gao, D. Zhou, G.-C. Cai, L. Yao, and W.-B. Wang,** “*In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit,” *Food Chem.*, vol. 106, no. 3, pp. 888–895, 2008.
- [185] **Y. Chen, B. Huang, J. He, L. Han, Y. Zhan, and Y. Wang,** “*In vitro* and *in vivo* antioxidant effects of the ethanolic extract of *Swertia chirayita*,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 136, no. 2, pp. 309–315, 2011.
- [186] **M. Fehrestani Sani, S. Montasser Kouhsari, and L. Moradabadi,** “Effects of three medicinal plants extracts in experimental diabetes: Antioxidant enzymes activities and plasma lipids profiles in comparison with metformin,” *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 11, no. 3, pp. 897–903, 2012.
- [187] **L. Abd, H. A. Mohammed, A. R. Omran, A. Althahab, and F. G. Abd,** “Evaluation of the active compound and antibacterial activity of a *Salvia rosmarinus* extract against pathogenic bacteria,” *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinet. Int. Ed.*, vol. 38, no. suppl. 2, pp. 89–91, May 2024, doi: 10.61873/IXYC6187.
- [188] **R. M. Bălăsoiu et al.,** “*In vitro* antimikrobiyal aktivitesi of some *Salvia* spp. extracts collected from the Oltenia flora using different solvents,” *Curr. Health Sci. J.*, vol. 49, pp. 397–402, 2023.
- [189] **S. Rhaimi et al.,** “Molecular docking analysis, chemical composition, and evaluation of antibacterial and insecticidal activities of *Salvia officinalis* essential oil,” *J. Food Process. Preserv.*, vol. 2024, no. 1, 2024.
- [190] **D. B. A. Al-Qaysi and N. A. J. Al-Tulaibawi,** “Antibacterial efficacy of *Salvia officinalis* extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*,” *Int. J. Des. Nat. Ecodyn.*, vol. 17, no. 5, pp. 789–794, Oct. 2022, doi: 10.18280/ijdne.170518.

# **EKLER**

## EKLER

### EK A: Etik Kurul Kararı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Bazı Salvia Türlerinin sitoprotektif, antimitojenik/antirekombinojenik, antioksidan ve antibakteriyel özelliklerinin in vivo ve in vitro ortamda değerlendirilmesi"			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
	AÇIK ADRESİ:	Çağış Yerleşkesi Uşak Yolu Üzeri, 10145 BALIKESİR			
	TELEFON				
	FAKS				
	E-POSTA	bauklinetik@gmail.com			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Serap DOĞAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	BALIKESİR (BAÜN FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ)			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	


Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Fuat EREL  
İmza:

*Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.*

Şekil A.1: Etik kurul kararı 1. sayfası

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Bazı Salvia Türlerinin sitoprotektif, antimutajenik/antirekombinojenik, antioksidan ve antibakteriyel özelliklerinin in vivo ve in vitro ortamda değerlendirilmesi"		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	ILAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2023/79	Tarih:31.05.2023		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve sunum yapılmadığından bir sonraki toplantıda görüşülmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki	Katılım * 
Prof.Dr.Fuat EREL	Göğüs Hastalıkları AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gülten ERKEN	Fizyoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Akın USTA	Kadın Hastalıkları ve Doğum AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Oğuzhan KORKUT	Tıbbi Farmakoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Mustafa ÇOLAK	Göğüs Hastalıkları AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Mehmet ÇALIŞKAN	Halk Sağlığı Uzmanı	Balıkesir KEAS Organize Sanayi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Av.Erman ARDA	Avukat	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Hüsnü KUNDAKÇI	Eczacı	Balıkesir Sağlık Uygulama ve Arş.Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Serhat ALDEMİR	Emekli		E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Fuat EREL  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Şekil A.2: Etik kurul kararı 2. sayfası

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı** :Hanife Didem KARAKUŞ

**Doğum tarihi ve yeri:**

**e-posta** :

### Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Biyoloji	2008-2010
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Biyoloji	2004-2008
Lise	Kütahya Kılıçarslan Lisesi	1999-2003