

**KARAÇALI PULUNUN SULU EKSTRESİNİN LC-MS/MS
KARAKTERİZASYONU VE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Beyza ÇAKAL

Danışman

Prof. Dr. Laçine AKSOY

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz 2026

Bu tez çalışması 24.FEN. BİL.25 numaralı proje ile BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARAÇALI PULUNUN SULU EKSTRESİNİN LC-MS/MS
KARAKTERİZASYONU VE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Fatma Beyza ÇAKAL

Danışman

Prof. Dr. Laçine AKSOY

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz 2026

TEZ ONAY SAYFASI

Fatma Beyza ÇAKAL tarafından hazırlanan “Karaçalı pulunun sulu ekstresinin LC-MS/MS karakterizasyonu ve yara iyileştirici etkisinin incelenmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 01/07/2026 tarihinde aşağıdaki jüriler tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Laçine AKSOY

Başkan : Prof. Dr. Ömer HAZMAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Laçine AKSOY
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nilay İŞİTEZ
Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Bekir YALÇIN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01 / 07 / 2026

Fatma Beyza ÇAKAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARAÇALI PULUNUN SULU EKSTRESİNİN LC-MS/MS KARAKTERİZASYONU VE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatma Beyza ÇAKAL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Laçine AKSOY

Doğal ürünler, özellikle bitkilerden elde edilen ekstraktlar, sahip oldukları geniş biyolojik aktivite spektrumu ve olası terapötik kullanım alanları nedeniyle bilimsel araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Rhamnaceae (Cehrigiller), dünya genelinde yaklaşık 50–60 cins ve 900’e yakın tür içeren bir bitki familyasıdır. Bu familya çoğunlukla çalılardan ve küçük ağaçlardan oluşur. *Paliurus spina-christi* Miller (Karaçalı), Rhamnaceae familyasına ait bir çalı bitkisidir. Çok çeşitli habitatlarda yetişebilen, oldukça yaygın bulunan bir türdür.

Bu çalışmada karaçalı pulu olarak bilinen bitki tohumlarının total fenolik madde miktarı ve fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Yapısında bulunan fenolik maddeler LC-MS/MS ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite belirlemek için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Antikanserojenik aktivite kapsamında L929, A549 ve G361 hücreleri kullanılmıştır. Yara oluşumu için L929 hücreleri ve çizik modeli uygulanmıştır.

Sağlıklı hücreler üzerinde proliferatif etkili olduğu, kanserli hücelere ise düşük dozlarda antikanseronik etki gösterdiği görülmüştür. Antimikrobiyal etkisi incelendiğinde *E. coli* üzerine etkili değilken, *S. aureus* ve *C.albicans* e karşı antibakteriyel ve antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir. Ekstraktın oluşturulan yara üzerine doku rejeneratif etkili olduğu da belirlenmiştir. Yapısında en yüksek miktarda bulunan bileşiğin prokatekuik aldehit (0,041 mg analit/g ekstrakt) olduğu sonra sırasıyla salisilik asit (0,028 mg analit/g

ekstrakt), protokatekuik asit (0,021 mg analit/g ekstrakt) bulunduğu belirlenmiştir. Yüksek miktarda bulunan elementlerin kalsiyum (Ca), potasyum (K) ve magnezyum (Mg) olduğu grlmştir.

Sonuçta oldukça yaygın olarak bulunan türün tohumlarının antikanserojenik, antifungal ve doku rejeneratif etkileriyle öne çıktığı söylenilebilir.

2026, xiii + 88 sayfa

Anahtar kelimeler: *Paliurus spina-christi* Miller, Antimikrobiyal, Antioksidan Antikanserojen, Yara İyileştirme.

ABSTRACT

M.Sc. Thesi

LC-MS/MS CHARACTERIZATION OF AQUEOUS EXTRACT OF PALIURUS SPINA-CHRISTI MILLER SCALE AND INVESTIGATION OF ITS WOUND HEALING EFFECT

Fatma Beyza ÇAKAL

Afyon Kocatepe University

Institute of Science

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Laçine AKSOY

Natural products, especially extracts obtained from plants, hold an important place in scientific research due to their broad spectrum of biological activity and potential therapeutic uses. Rhamnaceae is a plant family containing approximately 50-60 genera and nearly 900 species worldwide. This family mostly consists of shrubs and small trees. *Paliurus spina-christi* Miller (Blackthorn) is a shrub belonging to the Rhamnaceae family. It is a fairly common species that can grow in a wide variety of habitats.

This study determined the total phenolic content and phenolic compound content of seeds known as blackthorn scales. The phenolic compounds present were determined using LC-MS/MS. Disk diffusion method was applied to determine antimicrobial activity. L929, A549, and G361 cells were used for anticancer activity. L929 cells and a scratch model were used to simulate wound formation.

It was observed that the extract had a proliferative effect on healthy cells and an anticancer effect at low doses on cancerous cells. When its antimicrobial effect was examined, it was found to be ineffective against *E. coli*, but exhibited antibacterial and antifungal effects against *S. aureus* and *C. albicans*. The extract was also found to have a tissue regenerative effect on the created wound. It was determined that the compound with the highest amount in its structure is protocatechin aldehyde (0.041 mg analyte/g extract), followed

by salicylic acid (0.028 mg analyte/g extract) and protocatechin acid (0.021 mg analyte/g extract). The elements with high amounts were calcium (Ca), potassium (K), and magnesium (Mg).

In conclusion, it can be said that the seeds of this fairly common species stand out with their anticancer, antifungal, and tissue regenerative effects.

2026, xiii + 88 pages

Keywords: *Paliurus spina-christi* Miller, Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, Wound Healing.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yardımlarını esirgemeyen yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı ve bu tezin ortaya çıkmasından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Laçine AKSOY'a, ders döneminden son aşamaya kadar bana destek veren Sayın Prof. Dr. Ömer HAZMAN'a, tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ahmet BÜYÜKBEN'e teşekkür ederim. Ayrıca hayatımın her döneminde maddi ve manevi her türlü destek ve fedakârlıklarından dolayı aileme teşekkür ederim.

Fatma Beyza ÇAKAL
Afyonkarahisar 2026

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET

.....	i
ABSTRAC	
T.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 <i>Palirus spina-christi</i> Miller (Karaçalı)	4
2.1.1 Türkiye’deki Rhamnaceae Türleri ve Endemizm.....	5
2.2 Bitkilere Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemleri	7
2.2.1 Konvensiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri.....	8
2.2.1.1 Soxhlet Ekstraksiyonu	9
2.2.1.2 Maserasyon Yöntemi	10
2.2.1.3 Hidrodistilasyon Yöntemi	11
2.2.1.4 Dekoksiyon Yöntemi	12
2.2.1.5 İnfüzyon Yöntemi	13
2.2.1.6 Digestion Yöntemi	14
2.2.2 Non Konvensiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri	15
2.2.2.1 Ultrason Yardımlı Ekstraksiyon	15
2.2.2.2 Darbeli Elektrik Alan Ekstraksiyonu	17
2.2.3 Enzim Yardımlı Ekstraksiyon	18
2.2.4 Mikrodalga Ekstraksiyonu	19
2.3 Ekstraksiyonda Kullanılan Çözücüler.....	20
2.3.1 Su.....	21
2.3.2 Alkol.....	21
2.3.3 Kloroform	21

2.3.4 Eter	21
2.3.5 İyonik Sıvılar (Yeşil Çözücüler).....	22
2.4 Yara Oluşumu	22
2.5 Kanser	23
2.6 ICP /OES.....	26
2.7 Madde Minarel Analizi.....	28
2.8 <i>Paliurus spina-christi</i> Miller (Karaçalı) ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar	30
3. MATERYAL ve METOT.....	35
3.1 Bitki Materyali.....	35
3.2 <i>Paliurus spina-christi</i> tohumu sulu ekstraktının hazırlanması	35
3.3 Ekstrakta Total Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	36
3.4 Ekstrakt Fitokimyasal Profillerinin LC-MS/MS Analizleri ile Belirlenmesi....	37
3.5 Kütle Spektrometre ve Kromatografi Şartları	38
3.6 <i>Paliurus spina-christi</i> pulunun Antimikrobiyal Aktivitesini Belirlemeye Yönelik Çalışmalar	43
3.6.1 Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkinliğin Belirlenmesi	43
3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları	43
3.7.1 Hücrelerin Çoğaltılması için Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	44
3.7.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi.....	45
3.7.3 Sitotoksik ve Antikanserojen Etkinliğin Belirlenmesi	46
3.7.3.1 MTT Analizi.....	47
3.8 Bitki Ekstraktının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	48
3.9 İstatistiksel Yöntem.....	49
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	50
4.1 Çalışmada kullanılan ekstraktın toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	50
4.2 Ekstrakt Fitokimyasal Profiline Değerlendirilmesi	51
4.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	56
4.4 <i>Paliurus spina-christi</i> ait ekstraktının sitotoksik ve antikanserojenik etkinliğinin değerlendirilmesi.....	59
4.5 <i>Paliurus spina-christi</i> Tohumu Sulu Ekstraktının L929 Hücrelerinde Yara İyileştirici Etkinliği	65
4.6 Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi	68

5. SONUÇ.....	71
6. KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µM	Mikrometre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
gr	Gram
m	Metre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre

Kısaltmalar

A549	İnsan Küçük Olmayan Akciğer Kanseri Hücresi
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle Medium
DMSO	Di Metil Sülfoksit
DPPH	2,2-di fenil-1-pikril Hidrazil
FBS	Fetal Bovine Serum
G361	İnsan Cilt Kanseri Hücresi
HGF	İnsan Gingival Fibroblast Hücreleri
ICP/OES	İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometrisi
L929	Fare Fibroblast Hücreleri
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazolil-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
TAS	Total Antioksidan Statü
TOS	Total Oksidan Statü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1 Total fenolik madde miktarlarının hesaplanmasında kullanılan gallik asite ait kalibrasyon eğrisi	37
Şekil 3.2 Numunelerde miktersal tayini yapılan 53 fitokimyasal standarda ait kromatogram	39
Şekil 3.3 <i>Paliurus spina-christi</i> türüne ait kromatogram.....	40
Şekil 4.1 <i>Paliurus spina-christi</i> ait ekstraktın L929 hücrelerindeki sitotoksite etkisi.....	60
Şekil 4.2 <i>Paliurus spina-christi</i> ait ekstraktının A549 hücrelerindeki antikanserojenik etki.....	62
Şekil 4.3 <i>Paliurus spina-christi</i> ait ekstraktının G361 hücrelerindeki antikanserojenik etki	64
Şekil 4.4 <i>Paliurus spina-christi</i> ait ekstraktının L929,A549 ve G361 hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi	65
Şekil 4.5 <i>Paliurus spina-christi</i> ait ekstraktının yara iyileştirici etkisi.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Türkiye'de Rhamnaceae Familyası Türleri.....	6
Çizelge 3.1 LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri	41
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan ekstraktın total fenolik madde düzeyleri.....	51
Çizelge 4.2 Ekstraktın içersinde varlığı belirlenen bileşen maddeler ve konsantrasyonları.....	52
Çizelge 4.3 Çalışmada kullanılan ekstraktın disk diffüzyon yöntemine göre 24.saatte antimikrobiyal etkinliği	57
Çizelge 4.4 Çalışmada kullanılan ekstraktın disk diffüzyon yöntemine göre 48.saatte antimikrobiyal etkinliği.....	58
Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan ekstraktın yara iyileştirici etkinliği.....	66
Çizelge 4.6 <i>Paliurus spina-christi</i> türünün içerdiği biyoelementler ve konsantrasyonlar.....	68

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 <i>Paliurus spina-christi</i> Miller türünün doğal ortamından görüntü.....	5
Resim 3.1 <i>Paliurus spina-christi</i> pulu ve toz haline getirilmiş hali.....	35
Resim 3.2 Hücre kültürü analizinde besiyerler hazırlanmak için kullanılan pes membran filtre düzeneği.....	45
Resim 3.3 L929 Hücrelerinde MTT analizine ait görseller	48

1. GİRİŞ

Bitkiler, insanlık tarihi boyunca hem besin kaynağı, hem de tıbbi amaçlarla kullanılan en önemli doğal kaynaklardan biri olmuştur. Bitkilerde bulunan sekonder metabolitler; fenolik bileşikler, flavonoidler, alkaloidler ve terpenoidler gibi çeşitli biyolojik aktif maddeleri içermektedir. Bu bileşikler antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikanser gibi birçok biyolojik aktivite gösterebilmektedir. Günümüzde doğal kaynaklardan elde edilen bu bileşiklerin araştırılması ve farmasötik, gıda ve kozmetik endüstrilerinde kullanımı büyük önem taşımaktadır.

Bitkisel materyallerden biyolojik olarak aktif bileşiklerin elde edilmesi sürecinde ekstraksiyon ve izolasyon yöntemleri önemli bir rol oynamaktadır. Ekstraksiyon, bitki dokusu içerisinde bulunan hedef bileşiklerin uygun çözücüler kullanılarak ayrılması işlemidir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri arasında maserasyon, perkolasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu yer almaktadır. Bu yöntemler uzun yıllardır kullanılmasına rağmen zaman, enerji ve çözücü tüketimi açısından bazı sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle son yıllarda ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi modern teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin daha kısa sürede daha yüksek verim sağlayabildiği ve çevre açısından daha sürdürülebilir olduğu bildirilmektedir (Popova ve Bankova 2023).

Bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi de günümüzde önemli araştırma alanlarından biridir. Özellikle bitki ekstraktlarının antioksidan özellikleri, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin azaltılmasında önemli rol oynayabilmektedir. Oksidatif stres; kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşumunda etkili olduğu düşünülen bir süreçtir. Bu nedenle bitkisel antioksidanların araştırılması ve doğal kaynaklardan elde edilmesi bilimsel çalışmalar açısından büyük önem taşımaktadır.

Türkiye’de yaygın olarak yetişen bitki türlerinden biri de *Paliurus spina-christi* Miller dir. Karaçalı veya çaltı dikenli olarak da bilinen tür dikenli bir çalı formunda olup, genellikle 2–4 metreye kadar boylanabilmektedir. Bitki, Güney Avrupa, Balkanlar,

Anadolu ve Batı Asya’da doğal olarak yayılış göstermektedir. Kurak ve yarı kurak alanlarda yetişebilen bu tür, özellikle maki ve çalılık alanlarda yaygın olarak bulunur.

Bitkinin anatomik özelliklerini inceleyen çalışmalarda; gövde, yaprak ve yaprak sapı dokularında kalsiyum oksalat kristallerinin bulunduğu ve bitkinin epidermal yapısında anomositik stomaların yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca bitki dokularında iletim demetleri, trakeitler ve mukilaj hücrelerinin varlığı da tespit edilmiştir. Bu anatomik özelliklerin bitkinin taksonomik sınıflandırılması açısından önemli olduğu belirtilmektedir (Yuca vd. 2023).

Geleneksel tıpta *Paliurus spina-christi* bitkisinin farklı kısımları çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkinin meyve, yaprak ve tohumlarının diüretik, antidiyabetik, antiinflamatuvar ve taş düşürücü etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Brantner ve Males 1999). Ayrıca bitkinin fenolik bileşikler ve flavonoidler bakımından zengin olduğu ve bu bileşiklerin antioksidan aktiviteye katkı sağladığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Zor vd. 2017).

Son yıllarda *Paliurus spina-christi* türü üzerine yapılan çalışmalar bitkinin önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir. Bitkiden elde edilen ekstraktın antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler gösterdiği ve çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bitkinin bazı ekstraktlarının diüretik etkilerinin deneysel çalışmalarla desteklendiği belirtilmektedir. Bu özellikler bitkinin farmakolojik açıdan potansiyel bir doğal kaynak olabileceğini göstermektedir (Ceylan vd. 2021).

Türk Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi başta olmak üzere diğer ülke farmakopeleri, Avrupa İlaç Ajansı EMA, Fitoterapide Avrupa Bilimsel İşbirliği Grubu ESCOP, Dünya Sağlık Örgütü, Bitkisel İlaçlar için Doktor Referans Farmakognozi ve Fitoterapi Derneği monograflarında bitkiye ait bir monograf bulunmadığı görülmüştür.

Literatürde *Paliurus spina-christi* türünün yaprak, dal çiçek ve tohumlarının farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerinde biyolojik aktivite çalışmaları ve fitokimyasal içerik çalışmaları yapılmıştır (Zengin vd. 2023). Yapılan çalışmalar özellikle antioksidatif etki

zerine yoğunlaşmıştır. Antimikrobiyal etkinin incelendiği çalışmalar da bulunmaktadırdır. Ancak bitki tohumlarının antikanserojenik etkinliği ile araştırmalar sınırlıdır. Ayrıca yara üzerine doku rejeneratif özelliğinin belirlendiği çalışmalara da literatürde rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında karaçalı pulunun/tohumlarının sulu ekstresinin antikanserojen aktivitesinin, antimikrobiyal özelliklerinin, yara üzerine iyileştirici potansiyelinin incelenmesi ve LC-MS/MS ve ICP/OES analizi ile fitokimyasal içeriğini belirlemek amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 *Paliurus spina-christi* Miller (Karaçalı)

Paliurus spina-christi Miller (Karaçalı) Rhamnaceae familyasına ait bir çalı bitkisidir. *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisi, Türkiye, Güney Avrupa, Balkanlar ve Kafkaslarda yayılış gösteren bir bitkidir (Deligöz vd. 2007). Karaçalı bitkisinin çiçekleri Mayıs-Temmuz ayları arasında hava şartlarına bağlı olarak gelişmektedir. Karaçalı halk arasında mesih diken, draga diken, öküzgözü, ilme, çaltı diken, sarı çalı, sarıdiken, gibi yerel isimlerle de adlandırılmakta olup, idrar söktürücü, antiromatizmal, hipokolesterolemik, tonik ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Karaçalı meyve özütlerinin antidiyabetik etkisi olduğu da belirtilmektedir (Takım 2021).

Mayıs-Temmuz aylarında sarı, küçük çiçekler açan, 2-4 m boyunda, kışın yaprak döken ve nadiren 5 m'ye kadar boylanan dikenli çalılarıdır. Dallar ince ve zayıftır. Yaprak sapları 3-13 mm uzunluğundadır. Yapraklar simetrik ile asimetrik, oval ile epileptik, 2-4 cm uzunluğunda, 1,5-3,5 cm genişliğinde, yaprak tabanı obtus ile kordat değişken, tepesi obtus, ince ve kâğıt benzeri yapıdadır. Çiçekler tüysüz, çapı 3-6 mm, çiçek sapları 4-8 mm uzunluğunda, reseptör disk şeklindedir. Meyveler dairesel, ortada şişkin, kanatlı, 3 tohumlu ve kuru bir samaradır. Alüvyonlu topraklarda sıklıkla geçilmez ormanlıklar oluşturan istilacı, arsız bir bitkidir. Bu tür, seyrek meşe ormanları, çalılıklar, fundalıklar, çalılık ormanlar, vadi yamaçları, geçitler, nehir vadileri, temizlenmiş orman alanları, bozulmuş ormanlık alanlar ve hatta boş araziler dâhil olmak üzere çok çeşitli habitatlarda bulunabilir. Deniz seviyesinden 1500 ila 2300 m yükseklikte bulunabilir. Bitki kurak topraklarda iyi geliştiğinden erozyonla mücadelede çok etkilidir (Yuca vd. 2023).

Karaçalı ekstraktı içerik olarak incelendiğinde; flavonoidlerin ve tanenlerin, amino asitler, alkaloidler ve sterollerin bulunduğu belirlenmiştir. Karaçalı meyveleri ayrıca alkaloidler, steroller, tanenler, rutin ve isoquercetin, quercetin-3-rutinosid-7-rhamnosid, kaempferol-3-glikozit epigloalkatekol, galloalkatekol, katekol gibi flavonoidleri de içermektedir. Karaçalı bitkisinin sulu ekstraktındaki bu bileşenler antimikrobiyal,

antibakteriyel, antifungal, hipolipidemik ve antioksidan özellik gösterir. Özellikle flavanoidlerinin antidiüretik aktiviteden, fenollerinin ise antibakteriyel aktiviteden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Malkoç vd. 2019).



Resim 2.1 *Paliurus spina-christi* Miller türünün doğal ortamından görüntü

2.1.1 Türkiye’deki Rhamnaceae Türleri ve Endemizm

Türkiye florası, coğrafi konumu ve iklim çeşitliliği nedeniyle oldukça yüksek bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Türkiye’de yaklaşık 11.700 bitki taksonu bulunmakta olup bunların yaklaşık üçte biri endemiktir. Bu durum Türkiye’yi Avrupa’nın en zengin floralarından biri haline getirmektedir. Rhamnaceae familyası Türkiye’de altı cins ile temsil edilmekte olup özellikle Rhamnus cinsi önemli bir çeşitlilik göstermektedir. Türkiye florasında yaklaşık 22 Rhamnus taksonu bulunmakta ve bunların altısı endemik olarak kabul edilmektedir. Bu familyaya ait türler genellikle çalı veya küçük ağaç formunda olup Akdeniz, step ve dağlık habitatlarda yayılım göstermektedir (Dinç 2024).

Rhamnaceae (Cehrigiller), dünya genelinde yaklaşık 50–60 cins ve 900’e yakın tür içeren bir bitki familyasıdır. Bu familya çoğunlukla çalılardan ve küçük ağaçlardan oluşur ve Akdeniz, tropik ve subtropik bölgelerde yaygındır. Türkiye florasında özellikle Rhamnus, Paliurus ve Frangula cinsleri ile temsil edilir (Dinç 2024).

Çizelge 2.1 Türkiye’de Rhamnaceae Familyası Türleri

Cins (genus)	Tür (species)	Türkçe adı	Endemizm Durumu
Rhamnus	<i>Rhamnus alaternus</i>	Akdeniz Cehrisi	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus catharticus</i>	Adi Cehri	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus comitoli</i>	Boynuz Yaprak Cehri	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus punctatus</i>	Benekli Cehri	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus pyrellus</i>	Cehri Türü	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus rhodopeus</i>	Balkan Cehrisi	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus thymifolius</i>	Kekik Yapraklı Cehri	Endemik
Rhamnus	<i>Rhamnus microcarpa</i>	Küçük Meyveli Cehri	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus petiolaris</i>	Saplı Cehri	Endemik
Rhamnus	<i>Rhamnus pichleri</i>	Pichler Cehrisi	Endemik
Rhamnus	<i>Rhamnus depressa</i>	Basık Cehri	Endemik
Rhamnus	<i>Rhamnus libanotica</i>	Lübnan Cehrisi	Endemik Değil
Rhamnus	<i>Rhamnus fallax</i>	Sahte Cehri	Endemik Değil
Frangula	<i>Frangula alnus</i>	Barut Ağacı	Endemik Değil
Frangula	<i>Frangula dodonei</i>	Dodone Türü	Endemik Değil
Paliurus	<i>Paliurus spina christi</i>	Karaçalı	Endemik Değil
Ziziphus	<i>Ziziphus jujuba</i>	Hünnap	Endemik Değil
Ziziphus	<i>Ziziphus lotus</i>	Yabani Hünnap	Endemik Değil
Sageretia	<i>Sageretia thea</i>	Çay Çalısı Türü	Endemik Değil
Sageretia	<i>Sageretia spinosa</i>	Dikenli Sageretia	Endemik Değil

2.2 Bitkilere Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemleri

Doğal ürünler, özellikle bitkilerden elde edilen ekstraktlar, sahip oldukları geniş biyolojik aktivite spektrumu ve olası terapötik kullanım alanları nedeniyle bilimsel araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır (Tomlinson ve Akerele 2015). Yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılan bu doğal kaynakların, inflamatuvar hastalıklar, metabolik sendromlar ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde potansiyel etkiler gösterdiği güncel çalışmalarla ortaya konulmaktadır (Gurib-Fakim 2006). Bitki ekstraktlarında bulunan polifenoller, flavonoidler, alkaloidler, terpenoidler ve glikozitler gibi biyoaktif bileşikler; antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser etkiler başta olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikler sergilemektedir (Shanmugam vd. 2021). Bu nedenle söz konusu doğal biyoaktif bileşikler günümüzde ilaç geliştirme çalışmalarında, besin takviyelerinde, fonksiyonel gıdalarda ve kozmetik ürün formülasyonlarında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Da Silva vd. 2016). Ancak bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinden etkin bir şekilde yararlanılabilmesi için, stabilitelerinin korunması ve yüksek verimde elde edilmeleri amacıyla uygun ve optimize edilmiş ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir (Bhadange vd. 2024).

Ekstraksiyon yönteminin seçimi, doğal ürün karışımlarının kimyasal içeriğini ve biyolojik aktivitesini doğrudan etkileyen önemli bir faktördür (Doughari 2012). Bitki materyallerinden biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde uzun yıllardır maserasyon, Soxhlet ekstraksiyonu ve hidrodistilasyon gibi geleneksel ekstraksiyon teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Yolci Ömeroğlu vd. 2019).

Ekstraksiyon verimi; kullanılan çözücünün türü, ortamın pH değeri, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, partikül boyutu ve uygulanan mekanik kuvvetler gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Spiegel vd. 2013). Örneğin, metanol, etanol ve su gibi polar çözücüler genellikle fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi hidrofilik maddelerin ekstraksiyonunda tercih edilirken; heksan ve kloroform gibi polar olmayan çözücüler terpenoidler ve karotenoidler gibi lipofilik bileşiklerin elde edilmesinde daha etkili olmaktadır (Sicker vd. 2019). Bunun yanında, enzim destekli ekstraksiyon (EAE) gibi yenilikçi yöntemler bitki hücre duvarlarının seçici şekilde parçalanmasını sağlayarak

hücre içindeki biyoaktif bileşiklerin açığa çıkmasını kolaylaştırmakta ve aynı zamanda bu bileşiklerin bozulmasını minimum seviyeye indirmektedir (Sousa vd. 2023). Bu parametrelerin fitokimyasal bileşim üzerindeki etkilerinin anlaşılması, uygun ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi ve yöntemlerin optimize edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Doughari 2012).

Doğal ürün ekstraksiyon çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri standardizasyon eksikliğidir (Kunle vd. 2012). Bitkisel ekstraktların fitokimyasal içerikleri; bitkinin türüne, yetiştiği coğrafi bölgeye, çevresel koşullara ve hasat zamanına bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. Bu durum, farklı üretim partileri arasında tutarlılığın sağlanmasını zorlaştırmaktadır (Atanasov vd. 2021). Söz konusu değişkenlik, özellikle biyoaktivite ve güvenliğin hassas şekilde kontrol edilmesi gereken farmasötik ve nutrasötik uygulamalar açısından önemli bir problem oluşturmaktadır (Butler 2004). Bu nedenle doğal ekstraktların ayrıntılı kimyasal karakterizasyonunu ve kalite kontrolünü sağlamak amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi gibi gelişmiş analitik tekniklerden yararlanılmaktadır (Mendez vd. 2015). Bu analitik yöntemler yalnızca sonuçların tekrarlanabilirliğini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda biyoaktif bileşiklerin korunmasını sağlayan en uygun ekstraksiyon yöntemlerinin belirlenmesine de katkı sağlamaktadır (Altemimi vd. 2017).

2.2.1 Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

Konvansiyonel (geleneksel) ekstraksiyon yöntemleri, bitki bileşenleri (sekonder metabolitler vb.) katı veya sıvı numunelerden çözücü yardımıyla ayırmak için kullanılan klasik tekniklerdir. Ekstraksiyon yöntemleri, bitkisel materyallerden biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde farklı prensiplere dayanan uygulamaları içermektedir. Bu yöntemlerin verimliliği; kullanılan çözücünün yapısı, uygulanan sıcaklık ve karıştırma koşulları gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Ekstraksiyon süresinin uzamasıyla birlikte özellikle polifenolik bileşiklerde iyonizasyon, hidroliz ve oksidasyon gibi kimyasal reaksiyonlara bağlı kayıpların oluşabileceği belirtilmektedir

Bitkilerde bulunan biyoaktif bileşenleri elde etmek için kullanılan konvansiyonel teknikler arasında Soxhlet ekstraksiyon, maserasyon, distilasyon ve infüzyon gibi yöntemler yer alır (Lie vd. 2005).

2.2.1.1 Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu, katı örneklerden çeşitli biyoaktif bileşenlerin elde edilmesinde kullanılan klasik ve yaygın bir ekstraksiyon yöntemidir. Bu teknik; bitkisel yağların, doğal kaynaklı aktif maddelerin ve farklı organik bileşiklerin izolasyonunda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle bitki kaynaklı özütlerin hazırlanmasında yüksek verim sağlaması nedeniyle laboratuvar çalışmalarında sıkça tercih edilmektedir. Bu yöntem, sürekli sıcak ekstraksiyon prensibine dayanmaktadır. Soxhlet düzeneği genellikle kaynatma balonu, ekstraksiyon haznesi, sifon sistemi ve soğutucu bölümden oluşan cam bir sistemdir. Ekstraksiyonda kullanılacak bitki materyali öncelikle kurutulup öğütülerek ince partiküller hâline getirilir. Hazırlanan örnek, gözenekli yapıya sahip filtre kâğıdı ya da özel ekstraksiyon yüksüğü içerisine yerleştirilerek cihazın ekstraksiyon bölümüne aktarılır (Majekodunmi 2015, Ingle vd. 2017).

Sisteme eklenen çözücü, alt kısımdaki balonda ısıtılarak buharlaştırılır. Oluşan çözücü buharı üst bölümde bulunan kondansatöre ulaştığında yoğunlaşır ve sıvı formda yeniden ekstraksiyon haznesine damlar. Böylece çözücü, bitki materyaliyle sürekli temas ederek hedef bileşenlerin çözünmesini sağlar. Haznedeki sıvı miktarı belirli bir seviyeye ulaştığında sifon mekanizması devreye girer ve çözücü, çözünmüş maddelerle birlikte tekrar alt balona taşınır. Bu işlem döngüsel olarak devam ederek örnek içerisindeki bileşiklerin büyük ölçüde çözücüye aktarılması sağlanır (Doughari 2012, Hossain vd.2014).

Ekstraksiyon işlemi, sistemden geri dönen çözücünün artık hedef bileşenleri çözemez hâle gelmesiyle tamamlanmış kabul edilmektedir. Soxhlet yöntemi; seçilen çözücü içerisinde çözünebilen bileşiklerin bulunduğu, ancak çözünmeyen safsızlıkların da yer aldığı bitkisel materyallerin ekstraksiyonunda etkili bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Yöntemin başarısı büyük ölçüde çözücü ile hedef bileşen

arasındaki kimyasal uyuma bağlıdır ve bu durum benzer benzeri çözer ilkesi ile açıklanmaktadır. Bu doğrultuda, apolar özellik gösteren uçucu yağlar ve lipidlerin ekstraksiyonunda genellikle n-heksan ve petrol eteri gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Buna karşılık flavonoidler, tanenler ve bazı alkaloidler gibi polar karakterli sekonder metabolitlerin ekstraksiyonunda etanol, metanol ya da hidroalkolik çözücü sistemleri tercih edilmektedir. Kullanılan çözücünün kaynama noktasının düşük olması ise ekstraksiyon sürecinde oluşabilecek ısısal bozulmaların önlenmesi açısından önem taşımaktadır (Alara vd. 2018, Zhang vd. 2018). Ancak yöntemin yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilmesi nedeniyle, ısıya duyarlı bileşikler açısından bazı sınırlılıklar söz konusudur.

Soxhlet ekstraksiyonunun avantajları arasında; az miktarda çözücü ile fazla miktarda örneğin işlenebilmesi, sürekli çözücü devri sayesinde etkin ekstraksiyon sağlanması ve ek bir filtrasyon işlemine ihtiyaç duyulmaması yer almaktadır. Ayrıca ısıya dayanıklı bitki materyalleri için güvenilir ve verimli bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, sistemde mekanik karıştırmanın bulunmaması ve uzun süre yüksek sıcaklığa maruz kalınması nedeniyle termolabil bileşiklerde bozunma riski oluşturması yöntemin temel dezavantajları arasında gösterilmektedir (Harborne 1998, Majekodunmi 2015).

2.2.1.2 Maserasyon Yöntemi

Maserasyon, bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin ve çeşitli biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde kullanılan klasik ekstraksiyon yöntemlerinden biridir. Bu teknik, işlemin oda sıcaklığında gerçekleştirilmesi sayesinde özellikle ısıya hassas bileşiklerin yapısal bütünlüğünün korunmasına olanak sağlamaktadır (Stalika 2007). Yöntemde, yüzey alanını artırmak amacıyla öğütülmüş bitki materyali uygun özellikteki bir çözücü ile temas ettirilmekte ve belirli bir süre boyunca bekletilmektedir. Ekstraksiyon süresi çoğunlukla 24-72 saat arasında değişmektedir (Tiwari vd. 2011).

Maserasyon işleminin temel mekanizması difüzyon prensibine dayanmaktadır. Çözücü, bitki hücre duvarından geçerek hücre içerisindeki hedef bileşenleri çözmekte ve oluşan konsantrasyon farkı sayesinde bu bileşikler sıvı faza taşınmaktadır. İşlem sırasında

ortamın belirli aralıklarla karıştırılması, çözücü ile bitki materyali arasındaki temasın artmasına katkı sağlayarak kütle transferini hızlandırmakta ve ekstraksiyon etkinliğini yükseltmektedir (Tiwari vd.2011, Azwanida 2015).

Maserasyon yönteminin en önemli avantajlarından biri, düşük maliyetli olması ve ileri düzey ekipman gerektirmeden kolaylıkla uygulanabilmesidir. Bu nedenle bitkisel preparatların hazırlanmasında ve özellikle yağ bazlı ekstraktların üretiminde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Türkiye’de geleneksel kullanım alanı oldukça yaygın olan *Hypericum perforatum* bitkisinden elde edilen yağ ekstreleri, maserasyon yönteminin sık kullanılan örnekleri arasında gösterilmektedir. Bununla birlikte yöntemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Uzun ekstraksiyon süresi gerektirmesi, fazla miktarda çözücü kullanımına ihtiyaç duyulması ve modern ekstraksiyon tekniklerine göre daha düşük verim sağlaması bu sınırlılıkların başında gelmektedir (Stalikas 2007, Azwanida 2015). Ancak yüksek sıcaklığın neden olabileceği bozunmaların önlenmesinin önemli olduğu durumlarda, maserasyon yöntemi farmakognozi ve analitik kimya alanlarında hâlen güvenilir ve uygun bir ekstraksiyon yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (Tiwari vd. 2011).

2.2.1.3 Hidrodistilasyon Yöntemi

Hidrodistilasyon, uçucu yağların ve çeşitli aromatik bileşiklerin bitkisel materyallerden elde edilmesinde kullanılan en eski ve en yaygın ekstraksiyon yöntemlerinden biridir (Bakkali vd. 2008, Tongnuanchan ve Benjakul 2014). Bu yöntemde bitki örneği su ile birlikte ısıtılmakta ve açığa çıkan uçucu bileşenler su buharı yardımıyla taşınmaktadır. İşlem sürecinde çözünme, termal bozunma ve kimyasal dönüşüm gibi çeşitli fizikokimyasal olaylar eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Masango 2005). Yüksek sıcaklık nedeniyle bazı termolabil bileşiklerde yapısal bozulmalar meydana gelebilse de, oluşan azeotropik karışımlar sayesinde bazı uçucu bileşikler normal kaynama noktalarından daha düşük sıcaklıklarda buhar fazına geçebilmektedir. Günümüzde hidrodistilasyon yöntemi özellikle nane, lavanta, kekik, adaçayı ve karanfil gibi tıbbi ve aromatik bitkilerden uçucu yağ üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Literatürde hidrodistilasyon; su distilasyonu, su-buhar distilasyonu ve doğrudan buhar distilasyonu olmak üzere üç temel uygulama şeklinde sınıflandırılmaktadır (Vian vd. 2008, Babu ve Kaul 2007). Yöntem sırasında bitki dokularında bulunan yağ bezleri ve salgı kanallarındaki uçucu bileşenler buhar fazına taşınmakta, ardından soğutucu sistem yardımıyla yoğunlaştırılmaktadır. Yoğuşan karışım daha sonra Clevenger tipi ayırıcı sistem kullanılarak yoğunluk farkına göre birbirinden ayrılmakta ve uçucu yağ elde edilmektedir (Sahraoui vd. 2011).

Hidrodistilasyon işlemi sonunda yalnızca uçucu yağ değil, aynı zamanda sıvı faz ve bitki posası şeklinde yan ürünler de oluşmaktadır. Bu artık materyallerin, özellikle suda çözünebilen fenolik maddeler bakımından zengin olmaları nedeniyle önemli düzeyde antioksidan aktivite gösterebildiği bildirilmektedir. Rocha-Guzmán vd. (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, kekik posasından hazırlanan ekstraktların askorbik asit ve BHT (Bütil hidroksi toluen) gibi sentetik antioksidanlarla benzer hatta bazı durumlarda daha yüksek antioksidan kapasite sergilediği belirtilmiştir (Exarchou vd. 2002, Dorman vd. 2003, Tepe vd. 2005, Chizzola vd. 2008). Bu nedenle hidrodistilasyon sonrasında ortaya çıkan bitkisel artıkların değerlendirilmesi, fenolik bileşikler açısından zengin doğal ürünlerin geliştirilmesi bakımından sürdürülebilir ve ekonomik bir yaklaşım olarak görülmektedir.

2.2.1.4 Dekoksiyon Yöntemi

Dekoksiyon, bitkisel materyalin su ile belirli oranlarda karıştırılarak kaynatılması esasına dayanan geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden biridir. Uygulamada genellikle yaklaşık 1:4 oranında bitki materyali ve su kullanılmaktadır. Bu yöntem özellikle kök, rizom, kabuk, sert tohum ve odunsu gövde gibi dayanıklı bitki kısımlarında tercih edilmektedir. Söz konusu bitki yapılarında aktif bileşiklerin hücre dışına geçişi daha zor olduğundan, yüksek sıcaklık uygulanması ekstraksiyon veriminin artırılmasına katkı sağlamaktadır. Bunun yanında bazı durumlarda yaprak, çiçek ve ince dal gibi daha hassas bitki kısımlarında bulunan uçucu veya suda çözünebilen bileşiklerin elde edilmesi amacıyla da kullanılabilir (Rodino ve Butu 2019).

Dekoksiyon yöntemi, özellikle suda çözünebilen ve yüksek sıcaklığa karşı nispeten dayanıklı bileşiklerin ekstraksiyonu açısından uygun bir tekniktir. İşlem sırasında bitki materyali içeren karışım kontrollü şekilde kaynatılmakta ve çözeltinin hacmi genellikle başlangıç miktarının yaklaşık dörtte birine kadar azaltılmaktadır. Daha sonra elde edilen sıcak ekstrakt süzülerek katı fazdan ayrılmakta, geride kalan bitki artıkları ise su ile yıkanarak çözeltide kalan aktif bileşenlerin maksimum düzeyde geri kazanılması hedeflenmektedir. Gerekğinde son hacim tekrar başlangıç düzeyine tamamlanabilmektedir (Rodino ve Butu 2019).

Literatürde kaynatma yöntemi olarak da ifade edilen dekoksiyon, basit uygulanabilirliği nedeniyle geleneksel bitkisel preparatların hazırlanmasında yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ancak elde edilen ekstraktların stabilitesinin sınırlı olması nedeniyle uzun süre saklanması önerilmemektedir. Uygun koşullarda muhafaza edilse dahi, hazırlanan ekstraktların genellikle kısa süre içerisinde, çoğunlukla aynı gün ya da bir gün içinde tüketilmesi tavsiye edilmektedir (Rodino ve Butu 2019).

2.2.1.5 İnfüzyon Yöntemi

İnfüzyon yöntemi, bitkisel materyalin sıcak veya soğuk su içerisinde belirli bir süre bekletilmesine dayanan pratik ve yaygın bir ekstraksiyon tekniğidir. Maserasyon gibi uzun süre gerektiren yöntemlere kıyasla daha kısa sürede uygulanabilmesi, bu yöntemin önemli avantajlarından biri olarak değerlendirilmektedir (Harbourne vd. 2013). İnfüzyonda temel prensip, suda kolay çözünebilen ya da çözücüye hızlı geçiş gösterebilen bileşiklerin bitki dokusundan sıvı faza aktarılmasıdır.

Uygulama sırasında bitki materyali uygun sıcaklıktaki su ile temas ettirilmekte ve belirli bir süre sonunda ekstrakt elde edilmektedir. Elde edilen sıvı ekstrakt içerisindeki çözücünün uzaklaştırılması ve bileşenlerin yoğunlaştırılması amacıyla çoğunlukla düşük basınç altında çalışan döner buharlaştırıcı sistemlerden yararlanılmaktadır (Hussain 2019). Literatürde yer alan çalışmalar, özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin ekstraksiyonunda infüzyon yönteminin kullanılmasının, bazı biyoaktif bileşiklerin geri kazanımını artırabildiğini ortaya koymaktadır (Ergen vd. 2018). Ayrıca yöntemin

uygulanmasının kolay olması, düşük maliyet gerektirmesi ve kısa sürede ekstrakt elde edilmesine olanak sağlaması nedeniyle geleneksel bitkisel preparatların hazırlanmasında yaygın olarak tercih edildiği bildirilmektedir (Hussain 2019, Ergen vd.2018).

2.2.1.6 Digestion Yöntemi

Digestion (sindirim) yöntemi, analitik kimya ve biyokimya çalışmalarında örnek hazırlama amacıyla yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Bu yöntem, bitkisel materyal içerisinde bulunan karmaşık organik ve inorganik yapıların uygun çözücüler ya da kimyasal reaktifler yardımıyla parçalanarak hedef bileşenlerin analiz edilebilir ve çözünebilir forma dönüştürülmesine dayanmaktadır (Handa 2008). Ekstraksiyon yöntemleri arasında değerlendirilen digestion işlemi, maserasyon yönteminin kontrollü ısı uygulaması içeren bir varyasyonu olarak da tanımlanabilmektedir.

Yöntemde genellikle öğütülmüş ve ince partikül boyutuna getirilmiş bitkisel materyal uygun bir çözücü ile karıştırılmakta ve belirli sıcaklık koşullarında işleme tabi tutulmaktadır. İşlem çoğunlukla yaklaşık 50°C civarında sabit sıcaklık sağlayabilen su banyoları veya etüv sistemlerinde gerçekleştirilmektedir. Kontrollü ısı uygulaması, çözücünün viskozitesini azaltarak bitki dokusu içerisindeki difüzyon hızını artırmakta ve böylece sekonder metabolitlerin çözücü fazına geçişini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle yöntem, özellikle sıcaklığa karşı dayanıklı ve çözünürlüğü yüksek bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili sonuçlar vermektedir (Pandey ve Tripathi 2014, Majekodunmi 2015, Ingle vd. 2017).

Digestion yönteminde kullanılan reaktifler, analiz edilmek istenen bileşenin türüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Elementel analizlerde çoğunlukla asidik parçalama işlemleri tercih edilirken, protein ve karbonhidrat gibi biyomoleküllerin ayrıştırılmasında enzimatik reaksiyonlardan yararlanılabilmektedir. Kullanılan reaktif ve işlem koşullarındaki bu çeşitlilik, digestion yönteminin farklı analitik uygulamalara uyarlanabilmesini sağlamaktadır (Skoog vd. 2014).

2.2.2 Non Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde karşılaşılan uzun uygulama süreleri, ısıya hassas bileşiklerin parçalanma olasılığı ve fazla miktarda saf çözücü kullanımına duyulan ihtiyaç, alternatif ve gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinin ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır. Literatürde "modern ekstraksiyon yöntemleri" veya "yeşil ekstraksiyon teknolojileri" olarak tanımlanan bu yaklaşımlar; ultrason, mikrodalga, enzimatik işlemler, süperkritik akışkanlar ve yüksek basınç uygulamaları gibi çeşitli fiziksel ve biyokimyasal mekanizmalardan faydalanmaktadır. Bu teknikler, hedef bileşiklerin daha etkin şekilde elde edilmesini sağlarken aynı zamanda yenilenebilir kaynakların kullanımı ve çevreye daha az zarar veren çözücülerin tercih edilmesi gibi yeşil kimya ilkeleriyle de uyum göstermektedir (Handa vd. 2008).

2.2.2.1 Ultrason Yardımlı Ekstraksiyon

Ultrason destekli ekstraksiyon (UAE), ultrason dalgalarının oluşturduğu mekanik etkiler sayesinde hücresel yapıları bozarak hedef bileşiklerin çözücüye geçişini kolaylaştıran etkili bir ekstraksiyon yöntemidir (Zahari vd. 2020). Bu teknik, atmosferik basınç altında ve düşük sıcaklıklarda uygulanabilmesi nedeniyle güvenilir, maliyet açısından avantajlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sunan bir yaklaşım olarak geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden ayrılmaktadır (Medina-Torres vd. 2017). UAE uygulamaları genel olarak doğrudan ve dolaylı sistemler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Doğrudan yöntemde ultrason probu numune içerisine daldırılarak enerji aktarımı sağlanırken, dolaylı yöntemde numuneler ultrasonik banyoda oluşturulan ses dalgalarına maruz bırakılmaktadır (Wegler vd. 2020).

Yöntemin temelini oluşturan ultrasonik dalgalar, insan kulağının algılayabileceği frekans sınırlarının üzerinde olup ekstraksiyon uygulamalarında çoğunlukla 20 kHz–100 MHz aralığında kullanılmaktadır. Bu dalgaların sıvı ortamda oluşturduğu sıkışma ve genleşme döngüleri sonucunda kavitasyon olarak adlandırılan olay meydana gelir. Kavitasyon sırasında oluşan mikroskobik gaz kabarcıkları hızla büyüyüp aniden çökerek çok yüksek enerji açığa çıkarır. Bu süreçte lokal sıcaklıkların yaklaşık 5000 K'ye, basınç değerlerinin

ise 1000 atm seviyelerine ulaşabildiği bildirilmektedir (Herrera ve De Castro 2005). Ortaya çıkan yoğun fiziksel kuvvetler hücre duvarlarının parçalanmasına neden olurken, hücre içindeki biyoaktif bileşiklerin çözücü fazına geçişini de hızlandırmaktadır. UAE'nin etkinliği temel olarak çözücünün hücre içerisine daha kolay nüfuz etmesi ve hücrel bileşenlerin çözücüye hızlı şekilde salınması olmak üzere iki ana mekanizmaya dayanmaktadır. Böylece fenolik bileşikler, flavonoidler, alkaloidler ve diğer fitokimyasallar yüksek verimle elde edilebilmektedir (Mason vd. 1996).

Ultrason destekli ekstraksiyonun endüstriyel uygulamalarda ekonomik ve verimli şekilde kullanılabilmesi için proses parametrelerinin dikkatle optimize edilmesi gerekmektedir (Tiwari 2015). Kavitasyon oluşumunu artıran en önemli faktörlerden biri uygulanan güç ve genlik değeridir. Ancak genliğin aşırı yükseltilmesi hem ekipman performansını olumsuz etkileyebilmekte hem de ekstraksiyon veriminde düşüşe yol açabilmektedir (Chemat vd. 2017). Özellikle yüksek viskoziteye sahip sistemlerde etkili kavitasyon oluşturabilmek amacıyla daha yüksek genlik değerlerinin kullanılması gerekebilmektedir. Bunun yanı sıra frekans, işlem süresi, sıcaklık, çözücü türü ve miktarı ile partikül boyutu gibi parametreler de ekstraksiyon performansını belirleyen önemli değişkenler arasındadır (Tiwari 2015, Chemat vd. 2017).

Yapılan bir çalışmada, %68 etanol içeren çözücü sistemi kullanılarak, 3,6 W/cm² ultrason yoğunluğu ve 0,18 mm partikül boyutunda gerçekleştirilen UAE uygulamasında, 70°C sıcaklıkta ve 20 dakikalık işlem sonunda 448,7 mg GAE/g kuru ağırlık toplam fenolik madde elde edilmiştir. Aynı çalışmada UAE yönteminin, geleneksel çözücü ekstraksiyonuna kıyasla daha yüksek DPPH ve ABTS radikal süpürme aktivitesi gösterdiği ve daha kısa sürede daha yüksek verim sağladığı belirtilmiştir (Tiwari 2015, Chemat vd. 2017).

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde uygulanan yüksek sıcaklıklar ve uzun işlem süreleri, antioksidan bileşiklerin kısmen bozulmasına neden olabilmektedir. Buna karşılık UAE'nin, özellikle ıspanak gibi bitkisel materyallerde hücre dokularını etkili biçimde parçalayarak lutein ve β -karoten gibi değerli bileşiklerin ekstraksiyon verimini artırdığı gösterilmiştir (Altemimi vd. 2015). Literatürde yer alan çok sayıda araştırma, ultrasonik

dalgaların oluşturduğu kavitasyon ve ısı transfer mekanizmalarının ekstraksiyon performansını önemli ölçüde iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Bu durum; *Stevia rebaudiana* (Barba vd. 2016), *Hemerocallis citrina* (Yang vd. 2017), *Harpagophytum procumbens* (Baghdikian vd. 2016, Jambrak 2007), civanperçemi (Bashi vd. 2012), *Piper auritum* ve *Porophyllum ruderale* (Conde-Hernandez vd. 2014) gibi birçok bitki türünde başarılı ekstraksiyon sonuçları ile desteklenmiştir.

2.2.2.2 Darbeli Elektrik Alan Ekstraksiyonu

Darbeli (pulsed) elektrik alan (PEF) teknolojisi, hücre yapısının bozulmasını sağlayan yenilikçi bir ekstraksiyon yöntemi olup geleneksel hücre parçalama tekniklerine alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde hücreler kısa süreli ancak yüksek yoğunluklu elektrik darbelerine maruz bırakılmakta ve bunun sonucunda hücre zarının yapısında önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Uygulanan elektrik alanının etkisiyle hücre zarında oluşan transmembran potansiyeli kritik eşik değerine (0,5–1 V) ulaştığında, fosfolipitlerin düzeni bozulmakta ve zar geçirgenliği önemli ölçüde artmaktadır. Elektroporasyon ya da elektropermeabilizasyon olarak adlandırılan bu olay, hücre zarının seçici geçirgenlik özelliğini kaybetmesine neden olmaktadır (Goettel vd. 2013).

PEF uygulamalarında elde edilen etkinlik, kullanılan elektrik alan şiddeti, darbe süresi, darbe şekli ve sisteme verilen toplam enerji gibi çeşitli işlem parametrelerinden etkilenmektedir (Feng vd. 2019). Uygulama şekline bağlı olarak elektrik alan yoğunluğu farklılık göstermektedir. Kesikli sistemlerde genellikle 100-300 V/cm aralığında elektrik alanları tercih edilirken, sürekli sistemlerde bu değerler 20-80 kV/cm seviyelerine kadar ulaşabilmektedir. Ekstraksiyon veriminin yüksek olması için hücre zarında meydana gelen geçirgenlik artışının geri dönüşümsüz nitelikte olması önem taşımaktadır. Zar yapısında meydana gelen bu kalıcı hasar, hücre içerisindeki bileşiklerin dış ortama geçişini kolaylaştırırken aynı zamanda çözücünün hücre içine daha etkin nüfuz etmesini sağlamaktadır (Feng vd. 2019).

PEF yöntemi çoğunlukla oda sıcaklığında uygulanmakta ve işlem sırasında sisteme herhangi bir kimyasal kirletici eklenmemektedir. Bu özelliği sayesinde özellikle sıcaklığa

duyarlı bileşiklerin korunmasında avantaj sağlamaktadır. Ayrıca hem laboratuvar ölçeğinde hem de endüstriyel ölçekte uygulanabilmesi, yöntemin kullanım alanlarını genişletmektedir. Günümüzde PEF teknolojisi; zeytinyağı (Veneziani vd. 2019) gibi bitkisel yağların üretiminde ve çeşitli bitki kaynaklı biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tekniğin çalışma prensibi, elektrotlar arasına yerleştirilen numuneye yüksek voltajlı elektrik darbelerinin uygulanmasına dayanmaktadır. Bu darbeler sonucunda hücre yüzeyinde yük birikimi meydana gelir ve oluşan yüksek transmembran potansiyeli hücre zarında gözenek oluşumuna veya zarın tamamen parçalanmasına neden olur (Young ve Dean 2015). Uygulamalarda üstel olarak azalan kare dalga darbeleri (Dastangoo vd. 2020), monopolar darbeler (Carullo vd. 2020) ve bipolar darbeler (Bensalem vd. 2020) kullanılabilir. Sonuç olarak hücre zarının bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte bitki dokularında bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler ve diğer fitokimyasallar çözücü fazına daha kolay geçmekte ve ekstraksiyon verimi önemli ölçüde artmaktadır (Ranjha vd. 2021).

2.2.3 Enzim Yardımlı Ekstraksiyon

Enzim destekli ekstraksiyon, bitkisel kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde kullanılan çevre dostu ve etkili yöntemlerden biri olup, geleneksel çözücü ekstraksiyon tekniklerine önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Enzimler; doğal kaynaklı bileşiklerin ekstraksiyonu, biyodönüşümü ve sentezi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmakta ve yüksek seçicilikleri sayesinde yalnızca belirli hedef yapılara etki göstermektedir. Ayrıca düşük sıcaklık ve basınç gibi ılımlı çalışma koşullarında etkinliklerini sürdürebilmeleri, enerji tüketimini azaltırken hassas bileşiklerin korunmasına da katkı sağlamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle enzimatik ekstraksiyon teknolojileri, özellikle gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde sürdürülebilir üretim yaklaşımlarının önemli bir parçası haline gelmiştir (Puri vd. 2012).

Enzimatik ekstraksiyonun temel çalışma mekanizması, bitki hücre duvarı ve hücre zarı yapılarının kontrollü şekilde parçalanmasına dayanmaktadır. Enzimlerin hücresel

yapılara etki etmesi sonucunda hücre içerisinde bulunan biyoaktif bileşikler daha kolay serbest kalmakta ve çözücü ortamına geçişleri hızlanmaktadır. Böylece ekstraksiyon sürecinin etkinliği artarken hedef bileşiklerin geri kazanım oranı da yükselmektedir (Chen vd. 2011). Bitkilerde bulunan birçok fenolik bileşik, flavonoid ve diğer fitokimyasal maddeler hücre duvarı bileşenleriyle güçlü bağlar oluşturduğundan, geleneksel ekstraksiyon yöntemleri bu bileşikleri tam olarak açığa çıkarmakta yetersiz kalabilmektedir. Enzimatik ön işlemler sayesinde hücre duvarı matriksi parçalanmakta, bağlı halde bulunan bileşikler serbestleşmekte ve ekstraksiyon verimi önemli ölçüde iyileşmektedir.

Bu amaçla en yaygın kullanılan enzimler arasında selüloz, pektinaz ve amilaz yer almaktadır. Söz konusu enzimler, hücre duvarının temel yapısını oluşturan polisakkaritleri hidrolize ederek dokunun geçirgenliğini artırmakta ve hücre içeriğinin dış ortama aktarılmasını kolaylaştırmaktadır. Hücresel yapının parçalanması sonucunda çözücü ile bitki matriksi arasındaki temas yüzeyi genişlemekte, kütle transferi hızlanmakta ve hedef bileşiklerin ekstraksiyon etkinliği yükselmektedir. Bu nedenle enzim destekli uygulamalar, kimyasal ekstraksiyon yöntemlerinin performansını artıran önemli bir ön işlem basamağı olarak değerlendirilmektedir (Uddin vd. 2018).

2.2.4 Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), mikrodalga enerjisinin oluşturduğu hızlı ve etkin ısıtma etkisinden yararlanılarak hedef bileşiklerin bitkisel matriksten çözücü ortama aktarılmasını sağlayan modern bir ekstraksiyon yöntemidir. Bu tekniğin en önemli avantajlarından biri, numune ve çözücü karışımını kısa sürede homojen şekilde ısıtabilmesidir. Bu özellik sayesinde hem ekstraksiyon süresi önemli ölçüde kısaltılmakta hem de ısıya duyarlı bileşiklerin daha etkin şekilde geri kazanılması mümkün olmaktadır. MAE'nin performansı; kullanılan bitkisel materyalin yapısı, çözücü özellikleri ve özellikle sistemde bulunan bileşenlerin dielektrik karakteristikleri gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bitkisel kökenli biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde çözücü türü ve polaritesi, çözücü hacmi, numune miktarı, uygulama süresi, sıcaklık ve mikrodalga gücü gibi parametrelerin optimize edilmesi ekstraksiyon veriminin artırılması açısından büyük

önem taşımaktadır (Kataoka 2019).

Mikrodalga enerjisiyle gerçekleşen ısıtma mekanizması temel olarak iyonik iletim ve dipol dönmesi olmak üzere iki farklı fiziksel olaya dayanmaktadır. İyonik iletim sırasında, elektromanyetik alanın etkisiyle ortamda bulunan iyonlar sürekli hareket ederek enerji kazanır. Bu hareket esnasında meydana gelen çarpışmalar ve sürtünme etkileri, enerjinin ısıya dönüşmesine neden olur. Dipol dönmesi mekanizmasında ise polar moleküller, uygulanan elektrik alan doğrultusunda yönelmeye çalışır ve alanın sürekli değişmesi nedeniyle tekrar tekrar yeniden hizalanır. Bu sürekli yön değiştirme hareketi moleküler düzeyde yoğun bir enerji dönüşümüne yol açarak sistemin hızla ısınmasını sağlar.

Geleneksel mikrodalga sistemlerinde yaygın olarak kullanılan 2450 MHz frekansta, polar moleküllerin saniyede milyarlarca kez yön değiştirdiği bildirilmektedir. Moleküllerin bu yüksek frekanslı hareketleri sonucunda ortaya çıkan enerji doğrudan ısı enerjisine dönüşmekte ve hücrel yapıların parçalanmasını kolaylaştırarak hedef bileşiklerin çözücüye geçişini hızlandırmaktadır. Böylece kütle transferi artmakta, ekstraksiyon süresi kısaltmakta ve daha yüksek verim elde edilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle mikrodalga destekli ekstraksiyon, fenolik bileşikler, flavonoidler, alkaloidler ve diğer biyoaktif maddelerin geri kazanılmasında yaygın olarak kullanılan etkili ve çevre dostu ekstraksiyon teknolojilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Eskilsson ve Björklund 2000).

2.3 Ekstraksiyonda Kullanılan Çözücüler

Tıbbi bitki ekstraksiyonu için kullanılan çözücüye menstruum denmektedir (Abubakar ve Haque 2020). Çözücü seçimi, bitki türüne, biyoaktif bileşiğine, ekstraksiyonu yapılacak bitki kısmına ve çözücünün ulaşılabilirliğine bağlıdır. Genelde polar bileşikler polar çözücüler, polar olmayan bileşikler ise apolar çözücüler kullanılır. Su, etanol ve metanol polar çözücülerdir, heksan ve diklorometan apolar çözücülerdir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılırken geleneksel olarak su-diklorometan, su-heksan ve su-etanol gibi birbiri içinde karışabilen çözücüler seçilmektedir. Çoğu işlemde organik çözücüler ile karışabilirliği ve

yüksek polariteye sahip olması nedeniyle su seçilmektedir.

2.3.1 Su

Su, en yüksek polariteye sahip çözücülerden biridir ve birçok polar bileşiğin ekstraksiyonunda yaygın olarak tercih edilir. Geniş bir madde yelpazesini çözebilmesi, düşük maliyetli olması, toksik ve yanıcı olmaması önemli üstünlüklerindendir. Mikroorganizma gelişimini destekleyebilir, hidroliz reaksiyonlarına yol açabilir ve ekstraktın yoğunlaştırılması için yüksek miktarda enerji (ısı) gerektirir (Das vd. 2010, Tiwari vd. 2011),

2.3.2 Alkol

Alkoller polar özellik gösterir ve suyla tamamen karışarak özellikle polar ikincil metabolitlerin elde edilmesinde kullanılır. %20'nin üzerindeki derişimlerde mikrobiyal bozulmaya karşı kendini koruyabilir. Düşük derişimlerde toksik etkisi sınırlıdır ve yoğunlaştırma işlemi için daha az ısı gerektirir. Yağ, reçine ve balmumu gibi maddeleri çözmede yetersizdir. Ayrıca uçucu ve yanıcı özellik gösterir (Das vd. 2010, Tiwari vd. 2011).

2.3.3 Kloroform

Kloroform, düşük polariteye sahip bir çözücü olup özellikle lipofilik bileşiklerin ekstraksiyonunda etkilidir. Renksizdir ve karakteristik hoş bir kokuya sahiptir. Organik çözücülerle iyi karışır ve biyolojik sistemlerde kolaylıkla emilip metabolize edilebilir. Sağlık açısından risklidir; sedatif etkisi bulunur ve kanserojen özellik gösterebilir (Cowan 1999, Tiwari vd. 2011, Pandey 2014).

2.3.4 Eter

Eterler genellikle apolar yapıda olup birçok organik bileşiğin ekstraksiyonunda kullanılır. Düşük kaynama noktasına sahip oldukları için kolayca uzaklaştırılabilirler. Kimyasal olarak oldukça stabildirler ve birçok reaktifle etkileşime girmezler. Yüksek uçuculukları

ve kolay alev alabilir olmaları kullanım sırasında risk oluşturur (Cowan 1999, Tiwari vd. 2011, Pandey 2014).

2.3.5 İyonik sıvılar (Yeşil Çözücüler)

İyonik sıvılar, yüksek polariteye ve termal kararlılığa sahip modern çözücülerdir ve özellikle ileri ekstraksiyon tekniklerinde kullanılır (Bhan 2017). Yüksek sıcaklıklarda bile sıvı kalabilirler, yanıcı değildirler ve mikrodalga destekli ekstraksiyon süreçlerinde oldukça etkilidirler. Ayrıca farklı çözücülerle iyi karışabilirler. Geleneksel tentür hazırlama yöntemleri için uygun değildirler (Bhan 2017).

2.4 Yara Oluşumu

Yara iyileşmesi, farklı doku ve hücre tiplerinin birlikte çalışmasını gerektiren oldukça karmaşık biyolojik bir süreçtir. Bu süreçte hücre göçü, hücre çoğalması, ekstraselüler matriks oluşumu ve dokunun yeniden düzenlenmesi gibi olaylar; inflamasyon ve yeni damar oluşumu (anjyogenez) ile koordineli şekilde gerçekleşir. Küçük deri yaraları kısa sürede iyileşebilirken, travma, ciddi hastalıklar veya cerrahi müdahaleler sonucu oluşan büyük yaraların iyileşmesi haftalar sürebilmekte ve çoğu zaman doku fonksiyonunu etkileyebilen skar dokusu meydana gelmektedir (Peña ve Martin 2024).

Yüzeysel deri yaralarının onarılabilmesi için hücresel ve moleküler birçok faktörün bir arada uyumlu şekilde çalışması gerekmektedir. Bu nedenle yara bakım ürünleri ve tedavi yöntemleri; enfeksiyon, oksijen yetersizliği ve inflamasyon gibi iyileşmeyi geciktiren etkenleri azaltmaya yönelik olarak sürekli geliştirilmektedir. Ancak uygun tedavi koşullarında bile iyileşen yara dokusu, çoğu zaman eski mekanik dayanıklılığına tam olarak ulaşamamaktadır. Ayrıca yara iyileşme sürecindeki düzensizlikler kronik yara gelişimine yol açabilmektedir (Guo ve DiPietro 2010).

Bu aşamalarda farklı hücre tipleri görev almakta ve deri onarım sürecine katkıda bulunmaktadır. Özellikle doğal ve adaptif bağışıklık sistemi hücreleri, yara bölgesindeki inflamatuvar yanıtı düzenleyerek keratinositler, fibroblastlar ve endotelial hücreler gibi

temel hücrelerin aktivitesini etkilemektedir. Bunun yanında adipositler, melanositler ve kutanöz sinir hücreleri gibi daha az araştırılmış hücre tiplerinin de yara onarımında rol oynadığı bildirilmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar, doku tamir mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacak yeni yaklaşımlar ve tedavi stratejileri geliştirmeye odaklanmaktadır (Peña ve Martin 2024). Bu yara tedavisinde; negatif basınç uygulamaları, hiperbarik oksijen terapisi, eksozom temelli tedavi yöntemleri, biyomateryal içerikli sistemler, nanohidrojel teknolojileri ve mikroigne destekli ilaç taşıma yaklaşımları gibi modern uygulamalar giderek önem kazanmaktadır. Bununla birlikte yara tiplerinin farklılık göstermesi, konak ve mikroorganizma arasındaki etkileşimler ile deneysel çalışmaların klinik uygulamalara aktarılmasındaki güçlükler, tedavi süreçlerinde halen önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. Bu nedenle inflamatuvar yanıtın kontrollü biçimde sürdürülmesi ve immün dengenin korunması, başarılı yara onarımının temel unsurları arasında yer almaktadır. Ayrıca bireye özgü geliştirilen tedavi yaklaşımlarının, yara iyileşme sürecinde daha etkili ve olumlu klinik sonuçlar sağlayabileceği bildirilmektedir (Liu vd. 2025).

2.5 Kanser

Vücudu oluşturan hücreler birleşerek dokuları, dokular ise bir araya gelerek organ sistemlerini meydana getirmektedir. Doku ve organların oluşumu sırasında hücreler belirli bir düzen ve görev dağılımı içerisinde faaliyet göstermektedir. Organizmanın temel yapı taşı olan hücreler, normal koşullarda kontrollü biçimde çoğalmakta ve yaşlanan hücreler belirli mekanizmalar aracılığıyla yok edilmektedir. Ancak bu kontrol mekanizmalarının bozulması sonucunda hücreler kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlamaktadır. Kanser, en genel tanımıyla hücrelerin denetimsiz çoğalmasıyla ortaya çıkan bir hastalık grubudur (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanserleşme sürecinde hücrelerde hem yapısal hem de fonksiyonel değişiklikler meydana gelmektedir. Bu hücreler bazı normal görevlerini yerine getiremezken, normalde göstermedikleri farklı özellikler de kazanabilmektedir. Kontrolsüz çoğalan kanser hücreleri zamanla bulundukları doku ve organları istila etmekte, ayrıca çevre ve uzak dokulara yayılarak metastaz oluşturabilmektedir. Bu durum, ilgili organların normal

fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011).

Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar, kanserin ortaya çıkışı ve ilerlemesinin anlaşılmasına biyokimyasal ve moleküler düzeyde önemli katkılar sağlamıştır (Hanahan ve Weinberg 2011). Kanser, genetik ve fenotipik değişimlerin birikmesiyle gelişen, çok aşamalı ve uzun süreli bir hastalık sürecidir.

Günümüzde hücre çoğalması ve büyümesini düzenleyen biyokimyasal olaylar, büyümeyi tetikleyen moleküller, bu süreçleri denetleyen proteinler ile hücre proliferasyonunu sınırlandıran gen ve mekanizmalar ayrıntılı olarak incelenmektedir. Kanser oluşumu ve ilerleyişi moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmakta; elde edilen yeni bilgiler doğrultusunda gelecekte geleneksel tedavi yaklaşımlarının yerini daha hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin alması beklenmektedir (Yokuş ve Çakır 2012).

Kemoterapi, günümüzde kanser tedavisinde en sık başvuru ve etkinliği kanıtlanmış yöntemlerden biridir. Temel amacı, kanser hücrelerinin genetik yapısında hasar oluşturarak çoğalmalarını engellemektir (Gielecińska vd. 2023). Tıp alanındaki gelişmelere paralel olarak kanser üzerine yürütülen araştırmaların sayısı artmakta, bu da hastaların yaşam süresini olumlu yönde etkilemektedir. Bununla birlikte kemoterapi ve radyoterapi gibi standart tedavi yöntemlerinin etkili olmasına karşın, tedavi sürecinde hastaların büyük bir kısmında ağız mukozasında hasar, sindirim sistemine ait toksik etkiler, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında bozulma, kalp ve sinir sistemine yönelik olumsuz etkiler ortaya çıkabilmektedir; bu durum tedavinin sürdürülebilirliğini zaman zaman kısıtlayabilmektedir (Akbaş vd. 2023). Buna ek olarak yorgunluk hissi de kanser hastalarının önemli bir kısmında karşılaşılan bir sorundur.

Söz konusu yan etkilerin azaltılmasına yönelik yaklaşımlardan biri olan palyatif bakım, özellikle hastalığın ileri evrelerinde bulunan bireyler açısından kritik bir destek mekanizması olarak görülmektedir. Aynı zamanda bu hastalarda sıkça gözlenen basınç yaralarının tedavisinde geleneksel yöntemlerin çoğu zaman yetersiz kaldığı da bilinmektedir (Akbaş vd.2023). Bu çerçevede, palyatif bakım uygulamalarının temel hedefi, ölümcül seyirli hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkan belirtilerin sıklığını

düşürmek ve böylece hastanın genel yaşam kalitesini yükseltmektir.

Bitkiler, terapötik özellik gösteren doğal bileşikler bakımından oldukça zengin kaynaklardır (Gielecińska vd. 2023). Tarih boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış, günümüzde ise tıp ve farmakoloji alanlarında önemli bir yer edinmişlerdir. Bitkilerden elde edilen doğal bileşikler, özellikle sağlık alanındaki uygulamaları nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu maddelerin sahip olduğu biyolojik aktiviteler, kanser dahil birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde değerlendirilmelerine olanak sağlamaktadır (Gielecińska vd. 2023).

Günümüzde kullanılan bazı antikanser ilaçların bitki kökenli olduğu bilinmektedir. Ayrıca çok sayıda bitki türünün kanseri önleyici veya tedaviyi destekleyici özelliklere sahip olabileceği bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bitkisel bileşiklerin tümör oluşumu ve gelişiminde rol oynayan çeşitli biyolojik süreçleri etkileyebildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, doğal kaynaklı bileşiklerin hem koruyucu hem de tedaviye yardımcı ajanlar olarak önemini artırmaktadır (Gielecińska vd. 2023).

Yapılan bir araştırmaya göre kanser hastalarının yarısından fazlası tamamlayıcı tedavi yöntemlerine başvurmaktadır; bu hastaların büyük çoğunluğu en az bir bitkisel ürün kullanmış, önemli bir bölümü ise bunu kemoterapi ilaçlarıyla eş zamanlı olarak uygulamıştır (Akbaş vd.2023). Bitkisel ürünlere yönelik bu artan ilginin temel nedeni, bazı fitoterapötik maddelerin kemoterapi ve radyoterapinin yol açtığı yan etkileri hafifletebildiğine dair hem hayvan deneylerinde hem de insanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalarda kanıt bulunmasıdır (Akbaş vd.2023).

Paliurus spina-christi Miller ile aynı familyadan *Rhamnus cathartica* L. bitkisi ile yapılan çalışmada bitkinin kabuğu, yaprağı ve meyvesinin heksan, etil asetat ve etanol özütlerinin biyokimyasal bileşimini değerlendirilmiş ve antimikrobiyal, antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri belirlenmiştir. Özütlerin MCF-7, A549, C6 ve WI-38 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi XTT testi ile ölçülmüştür. Meyve etil asetat ekstresi, seçicilik indeksi tablosuna göre (WI-38/MCF-7: 12.67, WI38/C6: 31.38, WI-38/A549: 8.55) en güçlü antikanser aktivitesine sahip olduğu bildirilmektedir (Alimova vd. 2025).

2.6 ICP /OES

İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometrisi (ICP-OES), farklı örneklerde bulunan ana ve iz elementlerin aynı anda, hızlı ve güvenilir şekilde belirlenmesine olanak sağlayan analitik bir tekniktir. Günümüzde çevre, gıda, tarım, biyoloji, jeoloji ve farmasötik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş doğrusal çalışma aralığı, yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlaması, çok sayıda elementi tek analizde belirleyebilmesi ve düşük tayin limitlerine sahip olması nedeniyle element analizlerinde en çok tercih edilen yöntemlerden biridir (Hou ve Jones 2000, Santos vd. 2024).

ICP-OES tekniğinin çalışma prensibi, yüksek frekanslı elektromanyetik alan yardımıyla oluşturulan argon plazmasına dayanmaktadır (Boss ve Fredeen 2004). Analiz edilecek numune uygun bir nebulizatör yardımıyla ince damlacıklar hâlinde plazmaya gönderilir. Yaklaşık 6000–10000 K sıcaklığa ulaşabilen plazma ortamında çözücü hızla uzaklaşırken numunedeki atomlar buharlaşır, atomlaşır ve uyarılmış enerji seviyelerine geçer. Uyarılmış atom ve iyonlar temel enerji düzeylerine dönerken her elemente özgü dalga boylarında elektromanyetik ışıınım yayar. Oluşan bu emisyon çizgileri spektrometre tarafından algılanır ve ışık şiddeti ölçülerek element konsantrasyonu hesaplanır. Bu nedenle ICP-OES hem nitel hem de nicel element analizlerinde güvenilir sonuçlar sağlayabilmektedir (Santos vd. 2024).

ICP-OES'in en önemli avantajlarından biri aynı analiz sırasında birçok elementi belirleyebilmesidir. Ayrıca geniş konsantrasyon aralığında çalışabilmesi, matris etkilerinin görece düşük olması, yüksek analiz hızı ve farklı örnek türlerine uygulanabilmesi yöntemin kullanım alanını genişletmektedir. Toprak, su, bitki, gıda, biyolojik örnekler ve çeşitli endüstriyel materyaller ICP-OES ile analiz edilebilmektedir. Özellikle bitki örneklerinde makro ve mikro besin elementlerinin belirlenmesinde güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle tarımsal ve farmasötik araştırmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir (Hou ve Jones 2000).

Analitik sonuçların doğruluğunu etkileyen en önemli aşamalardan biri numune

hazırlamadır. ICP-OES analizinde numunenin plazmaya sıvı formda verilmesi gerektiğinden, katı örneklerin uygun işlemlerden geçirilerek çözelti hâline getirilmesi zorunludur. Bitki örneklerinde ilk olarak analiz edilecek materyalin çalışma alanını temsil edecek şekilde toplanması gerekir. Temsili örnekleme, elde edilen sonuçların güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir. Toplanan örnekler yüzeylerinde bulunan toprak, toz ve diğer yabancı maddelerden arındırılmak amacıyla önce musluk suyu, ardından saf veya deiyonize su ile dikkatlice yıkanmaktadır (Santos vd. 2024).

Temizlenen örnekler nem içeriğinin giderilmesi amacıyla hava ortamında veya etüvde uygun sıcaklıklarda kurutulur. Kurutma işlemi, örneklerin sabit ağırlığa ulaşmasını sağlayarak analiz sırasında oluşabilecek değişkenlikleri azaltmaktadır. Kurutulan örnekler daha sonra öğütülerek homojen ince toz hâline getirilir. Gerekli durumlarda elekten geçirilerek tane büyüklüğü standart hâle getirilir ve böylece analiz edilecek kısmın tüm numuneyi temsil etmesi sağlanır (Santos vd. 2024).

Öğütülmüş bitki örneklerinden belirli miktarda tartılan numuneler asit sindirim işlemine tabi tutulur. Bu aşamanın amacı organik yapının parçalanarak elementlerin tamamen çözelti fazına geçirilmesini sağlamaktır. En yaygın kullanılan sindirim reaktifi nitrik asittir (HNO_3). Bunun yanında hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroklorik asit (HCl), perklorik asit (HClO_4), hidroflorik asit (HF) ve sülfürik asit (H_2SO_4) gibi reaktifler de örnek yapısına bağlı olarak kullanılabilir. Özellikle HNO_3 - H_2O_2 karışımı bitki örneklerinin mineralizasyonunda yaygın şekilde tercih edilmektedir. Asit sindirimi sonunda organik yapı büyük ölçüde parçalanır ve elementler çözeltiye aktarılır (Kingston ve Jassie 1988, Santos vd. 2024).

Sindirim tamamlandıktan sonra çözeltiler gerektiğinde filtre edilir, hacimleri deiyonize su ile belirlenen seviyeye tamamlanır ve analiz için uygun konsantrasyona getirilir. Hazırlanan çözelti nebülizatör aracılığıyla aerosol hâline dönüştürülerek argon plazmasına taşınır. Plazma ortamında uyarılan atom ve iyonların yaydığı karakteristik emisyon çizgileri spektrometre tarafından ölçülerek elementlerin miktarları hesaplanmaktadır (Boss ve Fredeen 2004).

ICP-OES yöntemi, yüksek analiz hızı, çok elementli analiz kapasitesi ve güvenilir

sonuçlar sağlaması nedeniyle günümüzde element analizlerinde önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte bazı durumlarda ICP-MS gibi farklı analitik tekniklerle birlikte kullanılarak sonuçların doğrulanması mümkün olmaktadır. Farklı analiz tekniklerinden elde edilen verilerin karşılaştırılması, özellikle karmaşıık örneklerde analiz güvenilirliğini artırmakta ve olası girişimlerin belirlenmesine katkı sağlamaktadır (Ouweltjes vd. 2015).

2.7 Madde Minarel Analizleri

Mineral elementler, bitkilerin büyüme ve gelişmesinde görev almanın yanı sıra insan sağlığı açısından da büyük öneme sahip temel besin öğeleridir (Senila 2024). Bitkiler, potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve sodyum (Na) gibi makro elementler ile demir (Fe), inko (Zn), mangan (Mn), bakır (Cu), krom (Cr) ve kobalt (Co) gibi iz elementlerin önemli doğal kaynakları arasında yer almaktadır (Vinodkumar vd. 2025). Bu elementler; enzim aktivasyonu, metabolik olayların düzenlenmesi, kemik ve bağ dokusunun oluşumu, sinir iletimi, oksijen taşınması ve bağışıklık sisteminin desteklenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte görev almaktadır ( zcan vd. 2019). Mineral elementlerin eksikliği veya fazlalığı çeşitli metabolik bozukluklara ve sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Senila 2024). Ayrıca kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), cıva (Hg) ve arsenik (As) gibi toksik elementlerin belirlenmesi, bitkisel ürünlerin güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır (Senila 2024).

Son yıllarda fonksiyonel gıdalara ve tıbbi bitkilere olan ilginin artmasıyla birlikte, bu bitkilerin yalnızca organik bileşenleri değil, mineral madde içerikleri de ayrıntılı olarak araştırılmaktadır (Vinodkumar vd. 2025). Tıbbi ve aromatik bitkiler; vitamin, protein, amino asit ve fenolik bileşiklerin yanı sıra zengin mineral içerikleri nedeniyle de beslenmede önemli bir yere sahiptir ( zcan vd. 2019). Bu nedenle bitkilerin mineral profillerinin ortaya konulması, besin değerlerinin değerlendirilmesi ve kalite kontrol çalışmalarının gerçekleştirilmesi açısından önem taşımaktadır (Vinodkumar vd. 2025). Bitkilerde en fazla bulunan makro elementler arasında potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve sodyum (Na) yer almaktadır ( zcan vd. 2019). Potasyumun

ozmotik dengenin korunması, enzim aktivasyonu ve fotosentez olaylarında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ve kalsiyum hücre duvarının yapısında bulunmakta ve hücreler sinyal mekanizmalarında görev almaktadır. Magnezyum ise klorofil molekülünün merkez atomu olması nedeniyle fotosentez için vazgeçilmez elementlerden biridir (Özcan vd. 2019). Demirin oksijen taşınması ve elektron transferinde, çinkonun çok sayıda enzimin kofaktörü olarak metabolik faaliyetlerde, manganın ise çeşitli enzimatik reaksiyonlarda görev aldığı bildirilmektedir (Özcan vd. 2019). Bunun yanında krom, bakır ve kobalt gibi eser elementler de normal fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (Vinodkumar vd. 2025).

Bitkilerde mineral elementlerin doğru ve güvenilir şekilde belirlenebilmesi için numune hazırlama basamağı analiz sürecinin en kritik aşamalarından biri olarak kabul edilmektedir (Senila 2024). Analiz öncesinde numuneler yabancı maddelerden arındırılmakta, kurutulmakta ve homojen yapı elde edilmesi amacıyla ince toz hâline getirilmektedir. Daha sonra organik matriksin parçalanması amacıyla çoğunlukla nitrik asit ve hidrojen peroksit kullanılarak mikrodalga destekli asit sindirimi uygulanmaktadır. Mikrodalga sindirimi, element kayıplarını azaltması, kontaminasyon riskini en aza indirmesi ve kısa sürede etkili sindirim sağlaması nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir (Senila 2024).

Mineral madde analizlerinde en yaygın kullanılan tekniklerden biri İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometrisi (ICP-OES)'dir (Senila 2024). ICP-OES tekniğinde numune çözelti hâlinde argon plazmasına gönderilmekte ve yüksek sıcaklıkta atomlar ile iyonlar uyarılmaktadır. Uyarılan atomların temel enerji seviyesine dönerken yaydığı karakteristik emisyon ışınları ölçülerek elementlerin türü ve miktarı belirlenmektedir (Senila 2024). Her element kendine özgü dalga boyunda ışıınım oluşturduğu için aynı anda çok sayıda element analiz edilebilmektedir. ICP-OES; yüksek doğruluk, düşük tespit limitleri, geniş doğrusal çalışma aralığı ve kısa analiz süresi gibi avantajları nedeniyle bitki mineral analizlerinde en yaygın kullanılan tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir (Senila 2024). Farklı bitki türleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda ICP-OES kullanılarak makro ve iz elementlerin başarılı bir şekilde belirlendiği rapor edilmiştir (Vinodkumar vd. 2025, Özcan vd. 2019). Elde edilen

sonuçlar, bitkilerin besin değerlerinin ortaya konulması, kalite kontrolünün sağlanması, çevresel kirlenmenin değerlendirilmesi ve güvenli tüketimlerinin belirlenmesine önemli katkılar sağlamaktadır (Senila 2024)

2.8 *Paliurus spina-christi* Miller (Karaçalı) ile Yapılan Bilimsel alışmalar

Bitkiler, doğal sıcaklık, su mevcudiyeti, toprak bileşimi, zararlılar ve antropojenik uygulamalardan kaynaklanan çevresel zorluklarla karşı karşıyadır. Polifenoller, flavonoidler ve terpenoidler gibi ikincil metabolitler de farklı çevresel streslere karşı detoksifikasyonuna katılırlar. Bu sekonder metabolitlerin miktarı ve kalitesi, bitki özellikleri ve evre tarafından belirlenir. Çevresel faktörler antioksidanların ve ikincil metabolitlerin üretimini etkileyebileceğinden, bu da bitkinin insan sağlığı açısından besinsel ve tıbbi değerini etkilemektedir. Bitkilerde bulunan sekonder metabolitler, bitkilerin iklime alışmasında ve çevresel zorluklara adaptasyonunda önemli rol oynarlar ve insan sağlığına da faydalıdırlar (Liu vd. 2015, Mahajan vd. 2020, Khare vd. 2020).

Bitkinin anatomik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada ise karaçalı bitkisinin gövde, yaprak, yaprak sapı, ta yaprak ve meyve kısımlarının anatomik yapıları incelenmiştir. Araştırma kapsamında bitki rnekleri Erzurum-Uzundere bölgesinden toplanmış ve mikroskobik incelemeler yapılmıştır. Çalışma sonucunda bitkinin yaprak epidermisinde bifasiyal yapı bulunduğu ve alt epidermiste anomositik stomaların yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca gövde, yaprak ve yaprak sapı dokularında yoğun kalsiyum oksalat kristallerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bitki dokularında ayrıca trakeitler, sklerenkima hücreleri ve iletim demetleri gibi vasküler yapı elemanlarının varlığı gözlenmiştir. Bunun yanında mukilaj hücrelerinin varlığı da belirlenmiş olup bu yapıların bitkinin su dengesinin korunmasında rol oynayabileceği ifade edilmiştir (Yuca vd. 2023).

Bitkinin antioksidan özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada meyve ve yaprak ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve ekstraktların antioksidan kapasitesinin konsantrasyon artışıyla birlikte yükseldiği belirlenmiştir (Ceylan vd. 2020). Aynı çalışmada antioksidan aktivite sıralaması Trolox (suda çözülebilen E vitamini > BHT(btil hidroksitoluen, sentetik antioksidan) > WEF (meyve

suyu ekstraktı) > EEL (yaprak etanol ekstraktı > WEL (yaprak su ekstraktı) > EEF(meyve etanol ekstraktı) şeklinde rapor edilmiştir. Bu sonuçlar bitkinin özellikle su ekstraktının önemli antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Ceylan vd. 2020).

Kasap (2024) tarafından bitkinin kimyasal içeriği üzerine yapılan tez çalışmasında ise *Paliurus spina-christi*'nin fenolik bileşikler ve flavonoidler açısından zengin olduğu ve bu bileşiklerin antioksidan aktiviteye katkı sağladığı belirtilmiştir (Kasap 2024). Rutin miktar tayini HPLC-DAD yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Yaprak droğunda rutin ortalama 2961.1667 µg/g, meyve droğunda ise ortalama 3593.8333 µg/g olarak bulunmuştur. İki ekstrede de apigenin saptanamamıştır. Antikolinesteraz ve antibütirikolinesteraz aktivite çalışmaları in vitro koşullarda yapılmıştır. En yüksek inhibisyonu gösteren meyve ekstresinin AChE ve BchE inhibisyon yüzdesi değerleri sırasıyla % 40.9091 ve % 44.9050 olarak bulunmuştur. Hücre canlılığı çalışmaları sonucunda hidrojen peroksitle indüklenmiş oksidatif stres modelinde 1 ve 10 µg/mL meyve ve yaprak ekstreleri uygulanmış hücreler H₂O₂ uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı artış görülmüştür (p<0.05). Antioksidan enzim aktivitesi çalışmaları sonucunda hidrojen peroksitle (200 µM) indüklenmiş SH-SY5Y hücreleri ile 1 µg/mL meyve ve yaprak ekstreleri uygulanmış hücreler karşılaştırıldığında total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) üzerine anlamlı değişim (p<0.05) görülmüştür.

Başka bir çalışmada ise bitki ekstraktının α-glukozidaz enzimi üzerinde inhibitör etki gösterdiğini ve bu nedenle antidiyabetik potansiyele sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Ekstre/fraksiyonların antidiyabetik aktiviteleri α-glukozidaz yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca, aktif ekstrenin fraksiyonlarının antioksidan etkileri DPPH/ABTS radikal süpürme yöntemi ile test edilmiştir. Toplam fenolik, flavonoit ve triterpen içerikleri belirlenmiştir. Aktif ekstreden madde kromatografik yöntemlerle izole edilmiş ve yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Ekstreler arasında *Paliurus spina-christi* dalları ekstraktı ve fraksiyonlar arasında *Paliurus spina-christi* dallarına ait etanol ekstresinin etil asetat fraksiyonların, standart akarboz (261.70 µg/mL) ile karşılaştırıldığında 108.20 ve 97.45 µg/mL IC₅₀ değerleri ile güçlü bir antidiyabetik etki sergilemiştir. *Paliurus spina-christi* dallarına ait etanol ekstresinin etil asetat

fraksiyonların (PSCEA) dan biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma ve izolasyon sonucunda 50.13 µg/mL IC50 değerine sahip sukroz bileşiği elde edilmiştir. ABTS ve DPPH radikallerine karşı en iyi antioksidan aktivite de sırasıyla 0.82 ve 1.21 µg/mL IC50 değerleri ile PSCEA'da tespit edilmiştir. En yüksek toplam fenolik, flavonoit ve triterpen içeriği sırasıyla 103,1 mg/g, 98,19 mg/g, ve 736,30 mg/g ile PSCEA'da hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, PSCEA'nın α-glukozidaz inhibitör aktivite ile test edilen antidiyabetik etkisine fraksiyondaki diğer bileşiklerle birlikte önemli ölçüde sukroz bileşiğinin katkı sağladığını göstermektedir (Dinç 2024).

Küçükğünay ve ark. (2025) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Paliurus spina-christi* tohum ekstraktının fenolik ve flavonoid bileşikler bakımından zengin olduğunu ve bu bileşiklerin antioksidan özelliklere katkı sağladığını ortaya koymuştur. Ayrıca bitkinin böbrek fonksiyonları üzerinde olumlu etkiler gösterebileceği ve doğal bir diüretik kaynak olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte bitkinin metabolik, hormonal ve toksik etkilerinin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerektiği ifade edilmiştir (Küçükğünay vd. 2025).

Bitkinin tohum ekstraktlarının fitokimyasal özelliklerini ve diüretik etkisini inceleyen bir çalışmada deney hayvanı olarak Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Araştırmada bitki ekstraktının antioksidan potansiyeli DPPH, FRAP ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları bitki tohum ekstraktının fenolik ve flavonoid bileşikler bakımından zengin olduğunu ve önemli düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Aynı çalışmada ekstraktın 20, 40 ve 60 mg/kg dozlarında uygulanması sonucunda idrar miktarında artış meydana geldiği ve diüretik etkinin doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar bitkinin doğal bir diüretik kaynak olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Küçükğünay vd. 2025).

Bitkinin antioksidan aktivitesini araştıran çalışmalardan birinde (Jukic vd. 2012), bitkiden elde edilen metanol, kloroform ve etil asetat ekstraktlarının DPPH radikalini süpürme kapasitesini incelemiş ve bu ekstraktların IC₅₀ değerlerini sırasıyla 1.75, 4.15 ve 4.35 mg/mL olarak belirlemiştir. Aynı çalışmada söz konusu ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerinin ise sırasıyla 64.85, 10.27 ve 5.99 mg/g olduğu rapor edilmiştir (Jukic

vd. 2012).

Farklı bir araştırmada ise bitkinin çiçek ve yapraklı dallarından elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri değerlendirilmiş ve DPPH radikaline karşı IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 0,211 mg/mL ve 0,302 mg/mL olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, çiçek ve yapraklı dal ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırasıyla 91,20 mg/g ve 75,50 mg/g olarak tespit edilmiştir (Kırca ve Arslan 2008).

Kayalar vd. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Paliurus spina-christi* meyvelerinden elde edilen metanol ekstraktının DPPH radikaline karşı gl bir giderme aktivitesi gösterdiği ve IC₅₀ değerinin 0,062 mg/mL olduğu belirtilmiştir. Ayrıca söz konusu ekstraktın toplam fenolik madde içeriği 109,54 mg/g olarak belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin bitkilerde önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ve özellikle güçlü antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir (Kapewangolo vd. 2015). Bunun yanında bitkinin farklı kısımlarına yönelik gerçekleştirilen fitokimyasal araştırmalar, bu türün flavonoidler ve tanenler başta olmak üzere çeşitli fenolik bileşikler bakımından zengin olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum göz önüne alındığında, elde edilen ekstraktlarda belirlenen yüksek antioksidan aktivitenin büyük ölçüde yüksek toplam fenolik madde içeriği ile ilişkili olabileceği düşünüldüğü belirtilmektedir (Kayalar vd. 2016).

Grande vd. (2024) *Paliurus spina-christi* bitkisinin yaprak ve meyvelerinden elde edilen metanol ekstrelerinin antioksidan ve lipaz inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır. Bitkinin meyvelerinin daha iyi antioksidan aktivite (DPPH süpürücü aktivite testi [IC₅₀]: 53.41 g/mL; -karoten ağartma testi [IC₅₀]: 11.45-17.38 g/mL) ile pankreatik lipaz inhibitör aktiviteye (IC₅₀: 2.19 mg/mL) sahip olduğu görülmüştür (Grande vd. 2024).

Zengin vd. (2023) *Paliurus spina-christi* türünün meyve, yaprak ve dallarından maserasyon yöntemiyle n-hekzan, etil asetat, diklorometan, metanol; infüzyon yöntemiyle ise su ekstreleri hazırlanmıştır. Bu ekstrelerin biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bitkinin dallarının metanol ekstresinin DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP ve PBD, diklorometan ekstresi ise MCA metotları kullanılarak gerçekleştirilen

antioksidan aktivite deneylerinde en iyi antioksidan aktiviteyi sergilemiştir. En iyi asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör etkiyi bitkinin dallarının hekzan ekstresi, en iyi bütirilkolinesteraz (BChE) inhibitor etkiyi ise bitkinin dallarına ait metanol ekstresi göstermiştir. Tirozinaz inhibisyon aktivitesi en yüksek ekstre ise bitkinin dallarına ait metanol ekstresidir. Bitkinin meyvesine ait etil asetat en yüksek α -amilaz inhibisyonu gösterirken ve dallarına ait diklorometan ekstraktları ise en yüksek α -glukozidaz inhibitor aktivite sergilemiştir göstermiştir. Dalların metanol ekstresi en yüksek total fenolik bileşik miktarına, yapraklara ait metanol ekstresinin ise en yüksek total flavonoid bileşik miktarına sahip olduğu belirtilmektedir (Zengin vd. 2023).

Sonuç olarak *Paliurus spina-christi* türünün biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan araştırmalar da bitkinin önemli farmakolojik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmalar değerlendirildiğinde *Paliurus spina-christi* türünün anatomik özellikleri bakımından iyi tanımlanmış bir bitki olduğu ve fenolik bileşikler ile flavonoid içerikleri sayesinde önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmektedir. Bitkinin antioksidan, antimikrobiyal ve diüretik etkilerinin bulunması, bu türün tıbbi ve farmakolojik araştırmalar açısından önemli bir potansiyel taşıdığını göstermektedir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan *Paliurus spina-christi* bitkisinin tohumları, Bursa ilinden 2023 yılı Eylül ayında toplanmıştır. Bitki materyali, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Kargıoğlu tarafından teşhis edilmiştir.



Resim 3.1 *Paliurus spina-christi* pulu ve toz haline getirilmiş hali

Toplanan örnekler laboratuvara getirildikten sonra önce musluk suyu ile temizlenmiş, ardından saf sudan geçirilmiştir. Yıkama işleminin ardından bitkinin meyve/tohum kısımları küçük parçalara ayrılmış ve doğrudan güneş ışığı almayan, gölge bir ortamda oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra bitki örnekleri blender (Waring 32BL80, Connecticut, USA) kullanılarak ince toz haline getirilmiştir. Elde edilen bu toz materyalden sulu ekstraktlar hazırlanarak analizlerde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

3.2 *Paliurus spina-christi* tohumu sulu ekstraktının hazırlanması

Paliurus spina-christi bitkisinin pul kısmından ekstrakt elde edilmesi amacıyla ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında bitki materyali yabancı

maddelerden arındırılmış, ardından uygun ortam koşullarında kurutulmuştur. Kurutma işlemi, bitki bünyesindeki nem oranının azaltılması ve ekstraksiyon veriminin artırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Kurutulan bitki örnekleri daha sonra öğütülerek ince partikül boyutuna getirilmiş ve böylece yüzey alanı artırılarak çözücü ile temasın maksimum düzeye çıkarılması hedeflenmiştir.

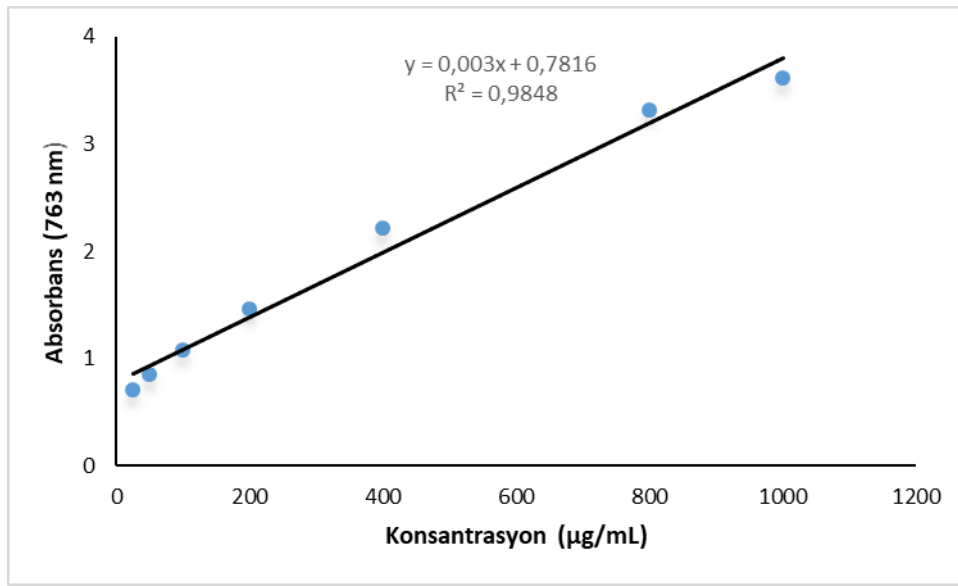
Hazırlanan bitki materyali saf su ile karıştırılarak oda sıcaklığında yaklaşık 24 saat süreyle bekletilmiştir. Bu işlem sırasında bitki hücre duvarları ile çözücü arasında gerçekleşen difüzyon mekanizması sayesinde suda çözünebilir fenolik bileşikler, flavonoidler ve diğer polar karakterli biyoaktif bileşenlerin sıvı faza geçişi sağlanmıştır. Bekletme süresince çözücü ile bitki materyali arasındaki temasın devam etmesi, hücre içeriğindeki bileşiklerin çözücü ortamına aktarılmasını kolaylaştırmıştır. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen ekstraksiyon aşaması, özellikle ısıya duyarlı bileşiklerin korunması açısından önem taşımaktadır.

Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen sıvı faz ayrılmış ve geriye kalan ekstrakt oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi sırasında çözücünün uzaklaşmasıyla birlikte ekstrakt içerisinde bulunan bazı çözülmüş bileşenlerin kristalimsi yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Oluşan bu kristal yapılar dikkatli bir şekilde yüzeyden kazınarak toplanmış ve analizlerde kullanılmak üzere uygun saklama koşullarında muhafaza edilmiştir. Bu doğrultuda uygulanan ekstraksiyon yöntemi, *Paliurus spina-christi* bitkisinin biyoaktif bileşenlerinin elde edilmesi ve sonraki biyolojik analizlerde kullanılmasına yönelik uygun bir hazırlık aşaması olarak değerlendirilmiştir.

3.3 Ekstraktta Total Fenolik Madde Miktarı Tayini

Toplam fenolik madde miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ekstrakttaki fenolik içeriklerin karşılaştırılabilmesi amacıyla, fenolik özellik gösteren bir antioksidan olan kafeik asit için de toplam fenolik madde tayini gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde, gallik asit kullanılarak bir standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu doğrultuda, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gallik asit

standart çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Deney aşamasında, bitki ekstraktları, kafeik asit ve standart çözeltilere Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş, 5 dakikalık bekleme süresinin ardından sodyum karbonat (Na_2CO_3) ilave edilmiştir. Elde edilen karışımlar oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorbans değerleri, saf suya karşı 763 nm dalga boyunda UV-spektrofotometre (Nuve NF 400) kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, gallik asit standart eğrisinden türetilen doğrusal denklem yardımıyla değerlendirilmiş ve ekstraktın toplam fenolik içerikleri gallik asit eşdeğeri (μg GAE/mg ekstrakt) cinsinden ifade edilmiştir (Balkir vd. 2023).



Şekil 3.1 Total fenolik madde miktarlarının hesaplanmasında kullanılan gallik asite ait kalibrasyon eğrisi.

3.4 Ekstrakt Fitokimyasal Profillerinin LC-MS/MS Analizleri ile Belirlenmesi

Bitki ekstraktında yer alan fenolik bileşiklerin nitel ve nicel belirlenmesi, Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından daha önce geçerliliği doğrulanmış bir yöntem ve buna ait kromatogram temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sürecinde, toplam 53 farklı fitokimyasal bileşiğin miktar tayini amacıyla Shimadzu Nexera UHPLC sistemine entegre edilmiş tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılmıştır (Yılmaz 2020).

Bu çalışmada; üç adet fenolik olmayan asit, üç adet fenolik aldehit, bir adet benzopiron türevi, bir adet stilbenoid glikozit, bir adet biflavonoid, 17 fenolik asit ve 27 flavonoid yapısına sahip bileşik olmak üzere toplam 53 standart maddeye dayalı bir kromatogram oluşturulmuştur. LC-MS/MS sistemi aracılığıyla, her bir standardın numune içerisindeki miktarları ayrı ayrı belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan standart bileşiklerin adları ve ait oldukları gruplar şu şekildedir: Quinik asit, fumarik asit, akonitik asit (**Non-fenolik asit**); prokatekuik aldehit, sirinjik aldehit, vanilin (**Fenolik aldehit**); Kumarin (**Benzopron**); Piseik (**Stilbenoid glikozid**); Amentoflavone (**Biflavanoid**); Gallik asit, prokatekuik asit, gentisik asit, klorogenik asit, tannik asit, 1.5-dikafeoilquinik asit, 4-OH Benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, sirinjik asit, p-kumaric asit, ferulik asit, sinapik asit, salisilik asit, o-kumarik asit, rosmarinik asit, ellagik asit (**Fenolik asit**); Epigallokateşin, kateşin, epigallokteşin gallat, epikateşin, daidzin (daidzein 7-O-glukosit), epikateşin gallat, sinarozid (luteolin 7-O-glukosit), mikuelianin (kuarsetin 3-O-glukuronit), rutin (kuarsetin-3-O-rutinoside), izokuersetin (kuarsetin-3-O-glukozit), hesperidin (hesperidin 7-rutinoside), genistin (genistein-7-glukozit), cosmosiin (apigenin 7-glukozit), kuarcitrin (kuarsetin-3-ramnosit), astragalin (kamferol-3-O-glukozit), nikotiflorin (kamferol-3-O-rutinosit), fisetin, daidzein, kuarsetin, naringenin, hesperedin, luteolin, genistein, kamferol, apigenin, kirizin, akasetin (**Flavanoid**).

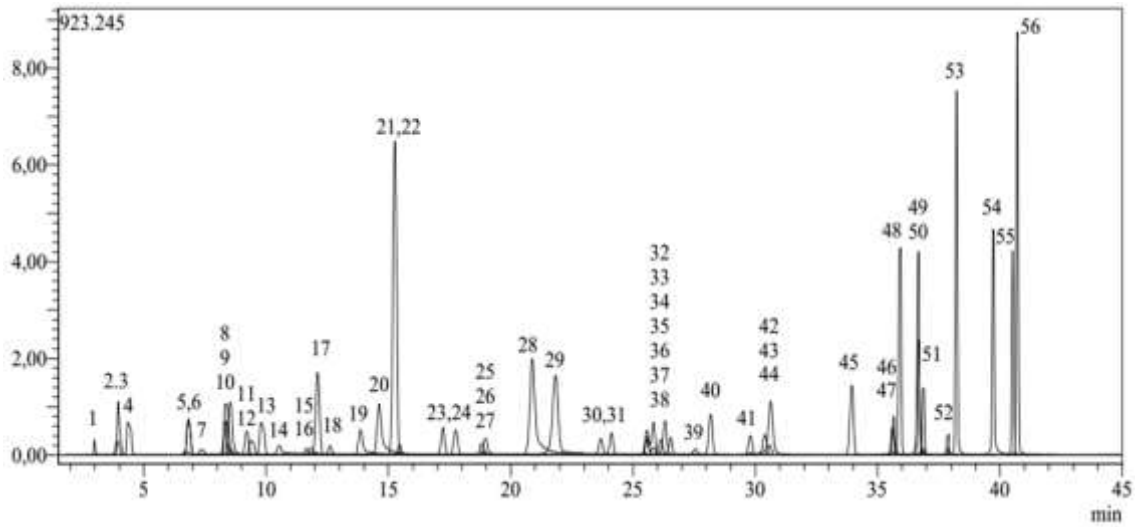
3.5 Kütle Spektrometre ve Kromatografi Şartları

Bitki ekstraktının içeriğinde yer alan toplam 53 farklı bileşiğin varlığı hem kalitatif hem de kantitatif açıdan incelenmiştir. Bu kapsamda, söz konusu fitokimyasal bileşiklerin miktar tayini için (Yılmaz, 2020) çalışmasına dayalı olarak Shimadzu Nexera UHPLC sistemine entegre tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılmıştır.

Kullanılan ters faz UHPLC sistemi; otoörnekleyici (SIL-30AC), kolon fırını (CTO-10ASvp), gradyan pompa (LC-30AD) ve degazör (DGU-20A3R) ünitelerinden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım işlemi, Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mm × 2.1 mm, 2.7 µm) kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kolon sıcaklığı 40°C olarak sabitlenmiştir.

Elüsyon işlemi, mobil faz A (ultrasaf su + 5 mM amonyum format + %0.1 formik asit)

ve mobil faz B (ultrasaf su + 5 mM amonyum format + %0.1 formik asit) kullanılarak gradyan modda yürütülmüştür. Uygulanan gradyan programı şu şekildedir: %20–100 B (0–25 dk), %100 B (25–35 dk) ve %20 B (35–45 dk). Bunun yanı sıra, mobil faz akış hızı 0.5 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 5 µL olarak ayarlanmıştır (Yılmaz 2020). Şekil 3.2 de Numunelerde miktarsal tayini yapılan 53 fitokimyasal standarda ait kromatogramı sunulmuştur.



Şekil 3.2 Numunelerde miktarsal tayini yapılan 53 fitokimyasal standarda ait kromatogram

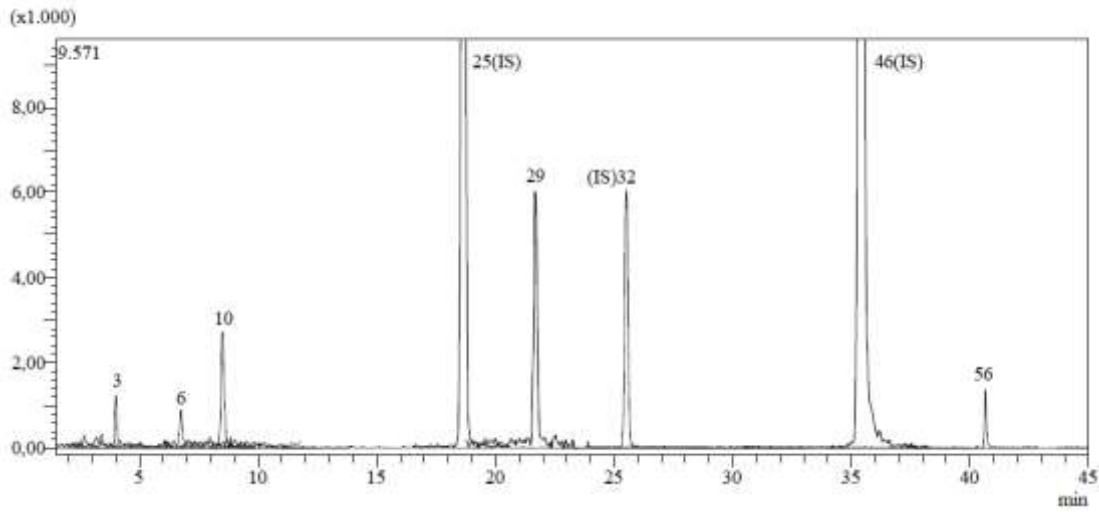
(1; Kuinik asit, 2; Fumarik asit, 3; Akonitik asit, 4; Gallik asit, 5; Epigallokateşin, 6; Protokatekuik asit, 7; Kateşin, 8; Gentisik asit, 9; Klorogenik asit, 10; Protokatekuik aldehit, 11; Tannik asit, 12; Epigallokateşin gallat, 13; 1,5-dicaffeoilkuinik asit, 14; 4-OH Benzoik asit, 15; Epikateşin, 16; Vanilik asit, 17; Kafeik asit, 18; Sirinjik asit, 19; Vanilin, 20; Sirinjik aldehit, 21; Daidzin, 22; Epikateşin gallat, 23; Piseid, 24; p-Kumarik asit, 25; Ferulik asit-D3-IS^h, 26; Ferulik asit, 27; Sinapik asit, 28; Kumarin, 29; Salisilik asit, 30; Sinarozid, 31; Mikuelianin, 32; Rutin-D3-IS^h, 33; Rutin, 34; isokuarsitrin, 35; Hesperidin, 36; o-Kumarik asit, 37; Genistin, 38; Rosmarinic acid, 39; Ellagic acid, 40; Kosmosiin, 41; Kuarsitrin, 42; Astragalın, 43; Nicotiflorin, 44; Fisetin, 45; Daidzein, 46; Kuarsetin-D3-IS^h, 47; Kuarsetin, 48; Naringenin, 49; Hesperedin, 50; Luteolin, 51; Genistein, 52; Kamferol, 53; Apigenin, 54; Amentoflavon, 55; Kirişin, 56; Akasetin).

Analizlerde kullanılan LC-MS/MS sisteminin kütle spektrometresi dedeksiyon aşamasında, hem pozitif hem de negatif iyon modunda çalışabilen elektrosprey iyonlaşma (ESI) kaynağına sahip Shimadzu LCMS-8040 tercih edilmiştir. Elde edilen LC-ESI-MS/MS verileri, LabSolutions programı aracılığıyla toplanmış ve değerlendirilmiştir. Fitokimyasal bileşiklerin miktar tayininde, çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılmıştır. Bu yöntem, seçilen ana iyon ile buna karşılık gelen parçalanma iyonları

arasındaki geçişlerin izlenmesine dayanarak bileşiklerin seçici biçimde tanımlanmasını ve nicel olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Uygun fragmentasyonun sağlanması ve hedef iyon geçişlerinin maksimum düzeyde elde edilmesi amacıyla çarpışma enerjileri (CE) optimize edilmiştir.

Kütle spektrometresi için belirlenen çalışma koşulları şu şekildedir: kurutucu gaz (N₂) akış hızı 15 L/dk, nebulizer gaz (N₂) akış hızı 3 L/dk, DL sıcaklığı 250°C, ısı bloğu sıcaklığı 400°C ve ara yüzey sıcaklığı 350°C olarak ayarlanmıştır.

Şekil 3.1’de sunulan standart kromatogramda toplam 56 bileşiğe ait pik tanımlanmıştır. Bu piklerden 53’ü ekstraktlarda araştırılan bileşiklere ait standartları temsil ederken, kalan üç pik (Ferulic acid-D3-IS, Rutin-D3-IS ve Quercetin-D3-IS) cihaz performansının kontrolü ve yöntemin optimizasyonu amacıyla kullanılan iç standartlara aittir. Şekil 3.2 de *Paliurus spina-christi* türüne ait kromatogram verilmiştir.



Şekil 3.3 *Paliurus spina-christi* türüne ait kromatogram

Çizelge 3.1 LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri sunulmuştur.

Çizelge 3.1. LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri

No	Analytes	RT ^a	M.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	Equation	r^{2d}	RSD% ^e		Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^f	Recovery (%)		U ^g	Gr. No ⁱ
								Interday	Intraday			Interday	Intraday		
1	Quinic acid	3.0	190.8	93.0	Neg	$y=-0.0129989+2.97989 \times$	0.996	0.69	0.51	0.1-5	25.7/33.3	1.0011	1.0083	0.0372	1
2	Fumaric aid	3.9	115.2	40.9	Neg	$y=-0.0817862+1.03467 \times$	0.995	1.05	1.02	1-50	135.7/167.9	0.9963	1.0016	0.0091	1
3	Aconitic acid	4.0	172.8	129.0	Neg	$y=-0.7014530+32.9994 \times$	0.971	2.07	0.93	0.1-5	16.4/31.4	0.9968	1.0068	0.0247	1
4	Gallic acid	4.4	168.8	79.0	Neg	$y=0.0547697+20.8152 \times$	0.999	1.60	0.81	0.1-5	13.2/17.0	1.0010	0.9947	0.0112	1
5	Epigallocatechin	6.7	304.8	219.0	Neg	$y=-0.00494986+0.0483704 \times$	0.998	1.22	0.73	1-50	237.5/265.9	0.9969	1.0040	0.0184	3
6	Protocatechuic acid	6.8	152.8	108.0	Neg	$y=0.211373+12.8622 \times$	0.957	1.43	0.76	0.1-5	21.9/38.6	0.9972	1.0055	0.0350	1
7	Catechin	7.4	288.8	203.1	Neg	$y=-0.00370053+0.431369 \times$	0.999	2.14	1.08	0.2-10	55.0/78.0	1.0024	1.0045	0.0221	3
8	Gentisic acid	8.3	152.8	109.0	Neg	$y=-0.0238983+12.1494 \times$	0.997	1.81	1.22	0.1-5	18.5/28.2	0.9963	1.0077	0.0167	1
9	Chlorogenic acid	8.4	353.0	85.0	Neg	$y=0.289983+36.3926 \times$	0.995	2.15	1.52	0.1-5	13.1/17.6	1.0000	1.0023	0.0213	1
10	Protocatechuic aldehyde	8.5	137.2	92.0	Neg	$y=0.257085+25.4657 \times$	0.996	2.08	0.57	0.1-5	15.4/22.2	1.0002	0.9988	0.0396	1
11	Tannic acid	9.2	182.8	78.0	Neg	$y=0.0126307+26.9263 \times$	0.999	2.40	1.16	0.05-2.5	15.3/22.7	0.9970	0.9950	0.0190	1
12	Epigallocatechin gallate	9.4	457.0	305.1	Neg	$y=-0.0380744+1.61233 \times$	0.999	1.30	0.63	0.2-10	61.0/86.0	0.9981	1.0079	0.0147	3
13	1,5-dicaffeoylquinic acid	9.8	515.0	191.0	Neg	$y=-0.0164044+16.6535 \times$	0.999	2.42	1.48	0.1-5	5.8/9.4	0.9983	0.9997	0.0306	1
14	4-OH Benzoic acid	10.5	137.2	65.0	Neg	$y=-0.0240747+5.06492 \times$	0.999	1.24	0.97	0.2-10	68.4/88.1	1.0032	1.0068	0.0237	1
15	Epicatechin	11.6	289.0	203.0	Neg	$y=-0.0172078+0.0833424 \times$	0.996	1.47	0.62	1-50	139.6/161.6	1.0013	1.0012	0.0221	3
16	Vanilic acid	11.8	166.8	108.0	Neg	$y=-0.0480183+0.779564 \times$	0.999	1.92	0.76	1-50	141.9/164.9	1.0022	0.9998	0.0145	1
17	Caffeic acid	12.1	179.0	134.0	Neg	$y=0.120319+95.4610 \times$	0.999	1.11	1.25	0.05-2.5	7.7/9.5	1.0015	1.0042	0.0152	1
18	Syringic acid	12.6	196.8	166.9	Neg	$y=-0.0458599+0.663948 \times$	0.998	1.18	1.09	1-50	82.3/104.5	1.0006	1.0072	0.0129	1
19	Vanillin	13.9	153.1	125.0	Poz	$y=0.00185898+20.7382 \times$	0.996	1.10	0.85	0.1-5	24.5/30.4	1.0009	0.9967	0.0122	1
20	Syringic aldehyde	14.6	181.0	151.1	Neg	$y=-0.0128684+7.90153 \times$	0.999	2.51	0.77	0.4-20	19.7/28.0	1.0001	0.9964	0.0215	1
21	Daidzin	15.2	417.1	199.0	Poz	$y=9.45747+152.338 \times$	0.996	2.25	1.32	0.05-2.5	7.0/9.5	0.9955	1.0017	0.0202	2
22	Epicatechin gallate	15.5	441.0	289.0	Neg	$y=-0.0142216+1.06768 \times$	0.997	1.63	1.28	0.1-5	19.5/28.5	0.9984	0.9946	0.0229	3
23	Piceid	17.2	391.0	135/106.9	Poz	$y=0.00772525+25.4181 \times$	0.999	1.94	1.16	0.05-2.5	13.8/17.8	1.0042	0.9979	0.0199	1
24	p-Coumaric acid	17.8	163.0	93.0	Neg	$y=0.0249034+18.5180 \times$	0.999	1.92	1.43	0.1-5	25.9/34.9	1.0049	1.0001	0.0194	1
25	Ferulic acid-D3-IS ^h	18.8	196.2	152.1	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.0170	1
26	Ferulic acid	18.8	192.8	149.0	Neg	$y=-0.0735254+1.34476 \times$	0.999	1.44	0.53	1-50	11.8/15.6	0.9951	0.9976	0.0181	1
27	Sinapic acid	18.9	222.8	193.0	Neg	$y=-0.0929932+0.836324 \times$	0.999	1.45	0.52	0.2-10	65.2/82.3	1.0031	1.0037	0.0317	1
28	Coumarin	20.9	146.9	103.1	Poz	$y=0.0633397+136.508 \times$	0.999	2.11	1.54	0.05-2.5	214.2/247.3	0.9950	0.9958	0.0383	1

^aRT.: Retention time, ^bMI (m/z): Molecular ions of the standard analytes (m/z ratio), ^cFI (m/z): Fragment ions ^d r^2 : Coefficient of determination, ^eRSD: Relative standard deviation, ^fLOD/LOQ (µg/L): Limit of detection/quantification, ^gU (%): percent relative uncertainty at 95% confidence level ($k = 2$), ^hIS: Internal standard, ⁱGr. No: Represents grouping of internal standards, these numbers indicate which IS stands for which phenolic compound.

No	Analytes	RT ^a	M.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	Equation	r^{2d}	RSD% ^e		Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^f	Recovery (%)		U ^g	Gr. No
								Interday	Intraday			Interday	Intraday		
29	Salicylic acid	21.8	137.2	65.0	Neg	$y=0.239287+153.659 \times$	0.999	1.48	1.18	0.05-2.5	6.0/8.3	0.9950	0.9998	0.0158	1
30	Cynaroside	23.7	447.0	284.0	Neg	$y=0.280246+6.13360 \times$	0.997	1.56	1.12	0.05-2.5	12.1/16.0	1.0072	1.0002	0.0366	2
31	Miquelianin	24.1	477.0	150.9	Neg	$y=-0.00991585+5.50334 \times$	0.999	1.31	0.95	0.1-5	10.6/14.7	0.9934	0.9965	0.0220	2
32	Rutin-D3-IS ^h	25.5	612.2	304.1	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	2
33	Rutin	25.6	608.9	301.0	Neg	$y=-0.0771907+2.89868 \times$	0.999	1.38	1.09	0.1-5	15.7/22.7	0.9977	1.0033	0.0247	2
34	isoquercitrin	25.6	463.0	271.0	Neg	$y=-0.111120+4.10546 \times$	0.998	2.13	0.78	0.1-5	8.7/13.5	1.0057	0.9963	0.0220	2
35	Hesperidin	25.8	611.2	449.0	Poz	$y=0.139055+13.2785 \times$	0.999	1.84	1.35	0.1-5	19.0/26.0	0.9967	1.0043	0.0335	2
36	<i>o</i> -Coumaric acid	26.1	162.8	93.0	Neg	$y=0.00837193+11.2147 \times$	0.999	2.11	1.46	0.1-5	31.8/40.4	1.0044	0.9986	0.0147	1
37	Genistin	26.3	431.0	239.0	Neg	$y=1.65808+7.57459 \times$	0.991	2.01	1.28	0.1-5	14.9/21.7	1.0062	1.0047	0.0083	2
38	Rosmarinic acid	26.6	359.0	197.0	Neg	$y=-0.0117238+8.04377 \times$	0.999	1.24	0.86	0.1-5	16.2/21.2	1.0056	1.0002	0.0130	1
39	Ellagic acid	27.6	301.0	284.0	Neg	$y=0.00877034+0.663741 \times$	0.999	1.57	1.23	0.4-20	56.9/71.0	1.0005	1.0048	0.0364	1
40	Cosmosiin	28.2	431.0	269.0	Neg	$y=-0.708662+8.62498 \times$	0.998	1.65	1.30	0.1-5	6.3/9.2	0.9940	0.9973	0.0083	2
41	Quercitrin	29.8	447.0	301.0	Neg	$y=-0.00153274+3.20368 \times$	0.999	2.24	1.16	0.1-5	4.8/6.4	0.9960	0.9978	0.0268	2
42	Astragalin	30.4	447.0	255.0	Neg	$y=0.00825333+3.51189 \times$	0.999	2.08	1.72	0.1-5	6.6/8.2	0.9968	0.9957	0.0114	2
43	Nicotiflorin	30.6	592.9	255.0/284.0	Neg	$y=0.00499333+2.62351 \times$	0.999	1.48	1.23	0.05-2.5	11.9/16.7	0.9954	1.0044	0.0108	2
44	Fisetin	30.6	285.0	163.0	Neg	$y=0.0365705+8.09472 \times$	0.999	1.75	1.19	0.1-5	10.1/12.7	0.9980	1.0042	0.0231	3
45	Daidzein	34.0	253.0	223.0	Neg	$y=-0.0329252+6.23004 \times$	0.999	2.18	1.73	0.1-5	9.8/11.6	0.9926	0.9963	0.0370	3
46	Quercetin-D3-IS ^h	35.6	304.0	275.9	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	3
47	Quercetin	35.7	301.0	272.9	Neg	$y=+0.00597342+3.39417 \times$	0.999	1.89	1.38	0.1-5	15.5/19.0	0.9967	0.9971	0.0175	3
48	Naringenin	35.9	270.9	119.0	Neg	$y=-0.00393403+14.6424 \times$	0.999	2.34	1.69	0.1-5	2.6/3.9	1.0062	1.0020	0.0392	3
49	Hesperetin	36.7	301.0	136.0/286.0	Neg	$y=+0.0442350+6.07160 \times$	0.999	2.47	2.13	0.1-5	7.1/9.1	0.9998	0.9963	0.0321	3
50	Luteolin	36.7	284.8	151.0/175.0	Neg	$y=-0.0541723+30.7422 \times$	0.999	1.67	1.28	0.05-2.5	2.6/4.1	0.9952	1.0029	0.0313	3
51	Genistein	36.9	269.0	135.0	Neg	$y=-0.00507501+12.1933 \times$	0.999	1.48	1.19	0.05-2.5	3.7/5.3	1.0069	1.0012	0.0337	3
52	Kaempferol	37.9	285.0	239.0	Neg	$y=-0.00459557+3.13754 \times$	0.999	1.49	1.26	0.05-2.5	10.2/15.4	0.9992	0.9990	0.0212	3
53	Apigenin	38.2	268.8	151.0/149.0	Neg	$y=0.119018+34.8730 \times$	0.998	1.17	0.96	0.05-2.5	1.3/2.0	0.9985	1.0003	0.0178	3
54	Amentoflavone	39.7	537.0	417.0	Neg	$y=0.727280+33.3658 \times$	0.992	1.35	1.12	0.05-2.5	2.8/5.1	0.9991	1.0044	0.0340	3
55	Chrysin	40.5	252.8	145.0/119.0	Neg	$y=-0.0777300+18.8873 \times$	0.999	1.46	1.21	0.05-2.5	1.5/2.8	0.9922	1.0050	0.0323	3
56	Acacetin	40.7	283.0	239.0	Neg	$y=-0.559818+163.062 \times$	0.997	1.67	1.28	0.02-1	1.5/2.5	0.9949	1.0011	0.0363	3

^aR.T.: Retention time, ^bMI (m/z): Molecular ions of the standard analytes (m/z ratio), ^cFI (m/z): Fragment ions ^d r^2 : Coefficient of determination, ^eRSD: Relative standard deviation, ^fLOD/LOQ (µg/L): Limit of detection/quantification, ^gU (%): percent relative uncertainty at 95% confidence level ($k = 2$), ^hIS: Internal standard, ⁱGr. No: Represents grouping of internal standards, these numbers indicate which IS stands for which phenolic compound.

3.6 *Paliurus spina-christi* pulunun Antimikrobiyal Aktivitesini Belirlemeye Yönelik Çalışmalar

Paliurus spina-christi türüne ait tohumların ekstraktının antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasında disk difüzyon testi uygulanmıştır. Çalışmada test mikroorganizmaları olarak gram pozitif özellik gösteren *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), gram negatif bakteri *Escherichia coli* (ATCC 25292) ve maya türü *Candida albicans* (ATCC 90028) tercih edilmiştir. Referans mikroorganizma kültürleri, seri dilüsyon yöntemi kullanılarak 10^6 – 10^7 kob/mL yoğunluğa ulaşacak biçimde hazırlanmıştır.

3.6.1 Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkinliğin Belirlenmesi

Paliurus spina-christi ekstraktın antimikrobiyal özelliklerini ortaya koymak amacıyla disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Bu kapsamda, Mueller-Hinton agar (Oxoid CM337) bulunan petri kaplarına bakteri ve mantar süspansiyonları inoküle edilmiştir. Hazırlanan disklere bitki ekstraktının farklı derişimleri (0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL ve 5 µg/mL) emdirilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak gentamisin kullanılmıştır. Petri kapları 24 saat ve 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, disklerin çevresinde meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek antimikrobiyal aktivite değerlendirilmiştir (Bauer vd. 1966).

3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültüründe gerçekleştirilen in-vitro çalışma kapsamında üç farklı hücre hattı kullanıldı. Kullanılan hücreler, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücreleri, fare fibroblast (L929) hücreleri ve insan malign melanoma (G361) hücreleridir. Deneyisel çalışmalarda kullanılan hücre hatları, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı stoklarından sağlanmıştır. Hücre kültürü uygulamalarına başlanmadan önce, hücrelerin gelişim ve canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun besiyerleri steril koşullar altında hazırlanmıştır. Araştırma süresince hücrelerin ihtiyaç duyduğu 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ ortamını sağlayan Nüve EC 160 model inkübatör kullanılmıştır. Deney protokollerinde belirtilen uygulamalar hücrelere gerçekleştirildikten sonra, inkübasyon işlemlerinin tamamı kontrollü inkübatör

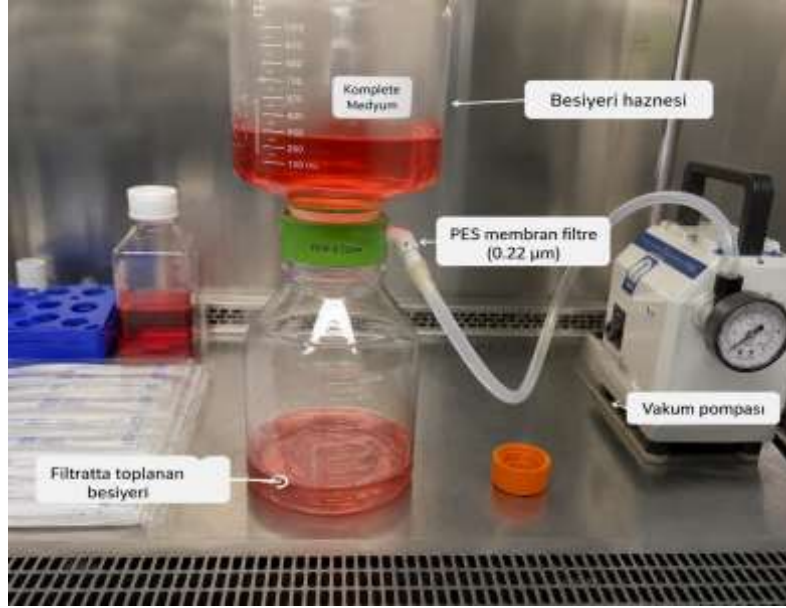
ortamında yürütülmüştür.

3.7.1 Hücrelerin Çoğaltılması için Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan G361 hücre hattının kültür ortamının hazırlanmasında RPMI 1640 (Gibco) besiyeri tercih edilmiştir. A549 ve L929 hücrelerinin çoğaltılmasında ise DMEM (Sigma) kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak komple besiyeri, 0,22 µm gözenek çapına sahip PES membran filtreler (WVR) yardımıyla steril koşullarda hazırlanmıştır. Tüm işlemler laminar akış kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir.

500 mL hacminde besiyeri hazırlamak amacıyla ortama %10 (v/v) oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal bovine serum (FBS), %1 (v/v) penisilin-streptomisin ve %1 (v/v) sodyum piruvat ilave edilmiştir. Daha sonra glutamin içeren yüksek glukozlu DMEM veya RPMI 1640 eklenerek toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım, vakum sistemi kullanılarak 0,22 µm PES membran filtreden geçirilmiş ve sterilizasyon işlemi sağlanmıştır. Vakum pompasına ait bağlantı hortumu işlem öncesinde %70 etanol ile dezenfekte edilmiştir. Filtrasyon sonrasında elde edilen besiyeri steril şişelere aktarılmış ve kapakları kapatılarak muhafaza edilmiştir.

Hücrelerin çözündürülmesi, pasajlanması, yıkanması ve kültüre alınması aşamalarında kullanılacak besiyerleri steril 50 mL'lik tüplere paylaştırılmış ve kullanım zamanına kadar +4 °C'de saklanmıştır. Kullanım öncesinde ise besiyerleri 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda yaklaşık 20–30 dakika bekletilerek uygun sıcaklığa ulaştırılmıştır.



Resim 3.2 Hücre kültürü analizinde besiyerler hazırlanmak için kullanılan pes membran filtre düzeneği

3.7.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Çalışmada kullanılan A549, L929 ve G361 hücre hatları kriyotüpler içerisinde sıvı azot ortamında muhafaza edilerek laboratuvara taşınmıştır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücreleri başta olmak üzere tüm hücreler çözündürme işlemi öncesinde sıvı azot tankından çıkarılarak kısa süreliğine -20 °C ortamına alınmış ve yaklaşık 10 dakika bekletilmiştir. Ardından kriyotüpler, hücrelerin kontrollü şekilde çözünmesini sağlamak amacıyla 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda 1-2 dakika inkübe edilmiştir.

Bu süreçte steril koşullar altında 15 mL’lik santrifüj tüplerine 5 mL besiyeri eklenmiştir. Çözünme işlemi tamamlanmak üzere olan hücre süspansiyonu kriyotüpten alınarak hazırlanan tüplere aktarılmıştır. Hücreler pipetaj işlemi sonrasında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp tabanında oluşan hücre peletine zarar verilmeden üst faz dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine yeniden 2 mL taze besiyeri eklenmiş ve hücreler hafif pipetaj ile süspanse edilerek ikinci yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci santrifüj aşamasının ardından üstte kalan sıvı tekrar uzaklaştırılmış ve böylece hücrelerin dondurulması sırasında kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) ortamdan büyük ölçüde elimine edilmiştir. Son olarak hücre peleti 1 mL besiyeri içerisinde yeniden süspanse

edilerek kültür flasklarına ekim yapılmaya hazır hale getirilmiştir.

Hücreler dondurulup çözüldüklerinde strese girerler. Hücrelerin stresten daha kolay çıkarak tekrar kısa zamanda bölünme yeteneğine kavuşabilmesi için hücrelerin besiyerinin temel protein unsuru olan FBS oranı %15-20 oranında olmalıdır. Halbuki standart olarak kullanılan besiyerinin FBS oranı %10'dur. Bu nedenle mevcut olan besiyerinden belirli bir hacimde alınarak, üzerine enjektör filtresinden geçirilerek steril hale getirilen FBS eklenerek, besiyeri içindeki FBS oranının %20 olması sağlandı. İlk ekim için hazırlanan ve %20 FBS içeren 37°C'deki besiyeri 75cm²'lik flaska 10 mL hacminde eklenir. Bu şekilde ekim için hazır hale getirilen flaska, ekim için çözdürülerek DMSO'dan arındırılarak hazırlanan A549 hücreleri yavaşça eklendi. Ekimi yapılacak hücre sayısı 500-600 binden az ise hücreler eklendikten sonra, hücreler fazla ayrı düşmesin diye flask fazla sallanmaz. Çünkü hücrelerin birbirine yakın olması adherent hücre kültüründe özellikle hücre sayısının az olduğu durumlarda, hücre bölünmesini pozitif yönde etkiler. Hücre sayısının çok olması durumunda (özellikle de 1-2 milyondan fazla) ekim yapılan 75cm²'lik flask ekim sonrası kibarca sallanarak hücrelerin flask içine homojen dağılması sağlanabilir. Bu işlem hücrelerin daha kısa sürede konfluent olmasına katkı sağlar. Bununla birlikte çözdürülerek ekilmesi düşünülen hücre sayısı çok ise ilk pasaj iki tane 75 cm²'lik flaska da yapılabilir. 75 cm² yüzey alanına sahip flasklara ekimi gerçekleştirilen hücreler, çoğalmalarının sağlanması amacıyla 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatörde kültüre alınmıştır. Hücre gelişimi günlük olarak mikroskopik incelemeler ile takip edilmiş ve kültür ortamındaki besiyeri, hücreler yaklaşık %80–90 konfluens seviyesine ulaşınca kadar iki günde bir yenilenmiştir. Hücre yoğunluğu istenen konfluens düzeyine ulaştığında, hücrelerin çoğaltılması amacıyla pasajlama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücreler yeni 75 cm²'lik kültür flasklarına aktarılmıştır.

3.7.3 Sitotoksite ve Antikanserojen Etkinliğin Belirlenmesi

Bitki ekstresinin sitotoksik etkileri sağlıklı L929 hücre hattı kullanılarak değerlendirilirken, antikanser aktiviteleri ise A549 hücre hattı ve G361 hücre hattı kanser hücreleri üzerinde gerçekleştirilen MTT analizi ile belirlenmiştir. MTT testlerinde bitki ekstraktının 25-2000 µg/mL aralığında yedi farklı konsantrasyonda uygulanmıştır.

Hücrelere verilen ekstrakt çözeltileri, her hücre hattına uygun kültür ortamında hazırlanmış ve ardından MTT analiz prosedürüne geçilmiştir.

3.7.3.1 MTT Analizi

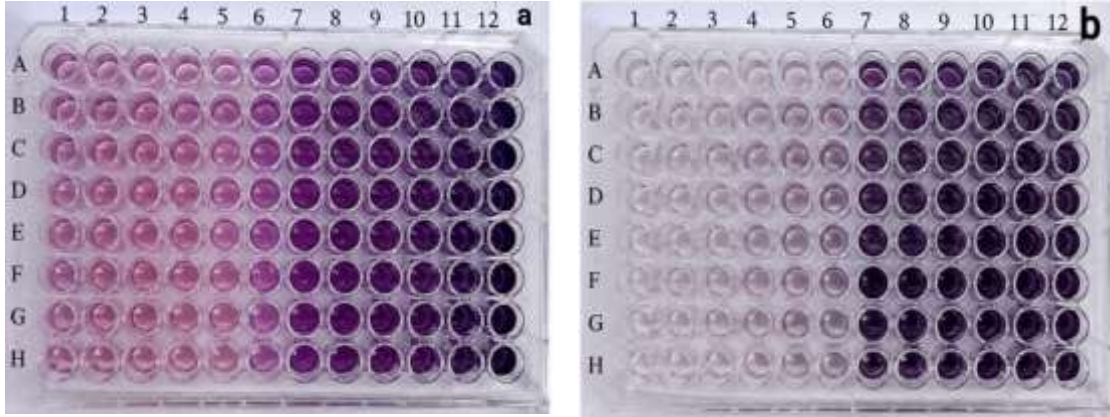
Hücre kültürü çalışmalarında aktif bileşiklerin, toksik ajanların, ilaçların veya bitki ekstraktının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür*) yöntemidir. MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup ökaryotik hücre zarını kolaylıkla geçebilmekte ve canlı hücreler içerisinde metabolik olarak indirgenebilmektedir. Bu indirgenme sonucunda oluşan formazan kristalleri suda çözünmeyen yapıda olup hücre içerisinde birikmektedir. Metabolik olarak aktif, yani canlı hücreler MTT'yi mor renkli formazana dönüştürerek belirgin bir renk değişimi oluşturur. Meydana gelen bu renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi sayesinde hücre canlılığı değerlendirilmekte ve canlı ile ölü hücre oranları belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada MTT analizi uygulamalarını gerçekleştirmek amacıyla 96 kuyucuklu mikropate kültür kapları kullanılmıştır. Flasklarda yeterli düzeyde çoğaltılan L929 hücre hattı, A549 hücre hattı ve G361 hücre hattı hücreleri, her kuyucukta 10^4 hücre bulunacak şekilde mikropate kuyucuklarına ekilmiştir. Deney öncesinde her mikropate için uygun well planı hazırlanmıştır. Hücrelerin ekiminden 24 saat sonra, ekstraktın yedi farklı konsantrasyondaki çözeltileri, önceden belirlenen kuyucuklara en az üç tekrar olacak biçimde uygulanmıştır. Hücreler ekstrakt uygulamasının ardından 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda her kuyucuğa, fosfat tamponu (pH=7,4) içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış MTT çözeltisinden 20 µL ilave edilmiştir. Hücreler inkübatörde 4 saat bekletildikten sonra, kuyucuk tabanında oluşan mor renkli formazan kristallerine zarar vermeden besiyerleri aspire edilmiştir. Daha sonra her kuyucuğa 200 µL Dimethyl sulfoxide eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Son aşamada her kuyucuğun absorbans değeri 540 nm dalga boyunda, Biotek ELx800 multiplate okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak herhangi bir madde

uygulanmayan kuyucuklardaki hücre canlılığı %100 kabul edilmiş ve uygulanan dozların hücre canlılığı üzerindeki etkileri ilgili formül kullanılarak hesaplanmıştır (Hazman vd. 2021).

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = [(\text{Numune Absorbansı}) / (\text{Kontrolün Absorbansı})] \times 100$$



Resim 3.3 L929 hücrelerinde MTT analizi, a; L929 hücrelerine ekstraktlar uygulandıktan 24 saat sonraki durum b; MTT eklendikten 4 saat sonraki durum

3.8 Bitki Ekstraktının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan materyallerin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, in vitro hücre çizik testi yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (Akdağ vd. 2024). Yara iyileşme modeli oluşturulurken 24 kuyucuklu doku kültürü kapları tercih edilmiştir. Her bir kuyucuğa, 800 µL besiyeri içerisinde 10^5 hücre bulunacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler, kültür kabı tabanında neredeyse tamamen boşluk kalmayacak biçimde tek tabaka halinde çoğalana kadar inkübasyonda tutulmuştur. Konfluent hale ulaşan hücre tabakası üzerinde, steril 200 µL'lik plastik pipet ucu kullanılarak doğrusal bir çizik oluşturulmuş ve böylece deneysel yara modeli meydana getirilmiştir. Hücre çizik yöntemi ile yara modeli oluşturulduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar taze besiyeri ile yıkanmıştır. Ekstraktlar, MTT analizi sonuçlarına göre sitotoksik etki göstermeyen en düşük konsantrasyon olan 25 µg/mL'de hazırlanmıştır. Hazırlanan aktif madde çözeltileri, içerisinde 800 µL besiyeri bulunan kuyucuklara uygulanmıştır. Kontrol grubundaki kuyucuklara ise aynı hacimde yalnızca medium

eklenmiştir.

Uygulama sonrasında her bir kuyucuk tabanında oluşturulan yara modellerinin başlangıç görüntüleri kaydedilmiş ve hücreler 24 saat süreyle Nüve EC 160 inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki yara bölgeleri tekrar görüntülenmiş ve yara kapanma durumları değerlendirilmiştir. Tüm deneysel çalışmalar en az üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süreci sonunda elde edilen görüntüler, ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında yara bölgesini oluşturan hücresiz alanların sınırları belirlenmiş ve ilgili bölgeler konturlanmıştır. Ardından piksel tabanlı ölçüm yöntemi kullanılarak hücre içermeyen alanların yüzdesel değerleri hesaplanmıştır.

Başlangıç anındaki hücresiz alan miktarı ($Area_{t0}$) ile 24. saat sonunda belirlenen hücresiz alan miktarı ($Area_{t24}$) esas alınarak, her çalışma grubuna ait yara kapanma oranları (closure rate) aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanmıştır (Akdağ vd. 2024).

$$\text{Kapanma Oranı} = [(Area_{t0} - Area_{t24}) / Area_{t0}] \times 100$$

Çalışmada hücrelere uygulanan her bir materyalin yara iyileşmesi üzerindeki olası etkileri, kontrol grubuna ait yara kapanma oranları ile deney gruplarından elde edilen yara kapanma oranlarının karşılaştırılması yoluyla değerlendirilmiştir.

3.9 İstatistiksel Yöntem

Fitokimyasal bileşenlerin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen LC-MS/MS analizi çalışmaları dışında, tez kapsamında yapılan tüm analizler en az üç tekrar halinde yürütülmüş ve sonuçlar “ortalama $\pm$ standart sapma” biçiminde sunulmuştur. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS Statistics 20 paket programı kullanılmıştır. Deney grupları arasındaki anlamlı farklılıkların belirlenmesinde ise ANOVA analizi ile Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Sunulan çalışma kapsamında karaçalı pulu olarak bilinen tohumların total fenolik madde miktarı ve fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Yapısında bulunan fenolik maddeler LC-MS/MS ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Antikanserojenik aktivite kapsamında L929, A549 ve G361 hücreleri kullanılmıştır. Yara oluşumu için L929 hücreleri ve çizik modeli uygulanmıştır. Karaçalı pulu biyoelement içeriği ise ICP-OES ile belirlenmiştir.

4.1 Çalışmada kullanılan ekstraktın toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Fenolik maddeler, bitkileri UV radyasyonundan ve hastalık saldırılarından korumada hayati rol oynayan ikincil bitki metabolitleridir. Epidemiyolojik araştırmalara ve ilgili meta-analizlere göre, bitki polifenollerini açısından zengin diyetlerin uzun süreli tüketimi kanser, kardiyovasküler hastalık, diyabet, osteoporoz ve nörolojik hastalıklara karşı koruma sağlar. Polifenoller, gıdalara acılık, burukluk, renk, lezzet, koku ve oksidatif stabilite gibi özellikler kazandırır. Diyetteki bitki polifenollerini çok sayıda sağlık yararına sahiptir. Bu bileşikler, vücuttaki metabolik aktiviteler tarafından üretilen istenmeyen reaktif oksijen/azot türlerinin olumsuz reaktivitesini önleyebilir. Potansiyel sağlık yararları nedeniyle, polifenoller ve diğer diyet fenolikleri bilim dünyasında büyük ilgi görmektedir (Rahman vd. 2021).

Sunulan çalışma kapsamında ekstraktın total fenolik madde miktarı belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar fenolik özellik gösteren standart bir bileşik olan kafeik asit ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan ekstraktın total fenolik madde düzeyleri Çizelge 4.1. de sunulmuştur. Analiz sonuçlarına göre ekstraktının total fenolik madde miktarı $11,46 \pm 1,05$ µg GAE/mg ekstrakt olarak belirlenmiştir. Kafeik asitte ise 1000 µg dan 500 µg alınarak değeri hesaplanmıştır. Bu değer $329,47 \pm 18,72$ µg GAE/mg olarak saptanmıştır. Elde edilen veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan ekstraktın total fenolik madde düzeyleri

Deney Grupları	Total Fenolik Madde Miktarı (µg Gallic Acid Ekiivalent / mg-extract)
<i>Paliurus spina-christi</i> tohum ekstraktı	11,46±1,05 ^b
Kafeik asit	329,47±18,72 ^a
P	0,000

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n≥3). ^{a, b} : Aynı sütunda ortak üst simgeyi taşımayan veriler (deney grupları) arasında istatistiki fark bulunmaktadır. (p < 0.05).

Konya, Burdur, Muğla ve Balıkesir illerinden toplanan *Paliurus spina-christi* nin tohumlarının metanol ekstraktının total fenolik madde miktarının belirlendiği bir çalışmada total fenolik madde içeriklerinin 6,84±1,06 ile 15,48±2,89 mg GAE /g ekstrakt arasında değişen miktarlarda belirlenmiştir (Çelebi ve Duman 2026). Benzer şekilde sunulan tez çalışmasında da ekstraktının total fenolik madde miktarı 11,46±1,05 µg GAE/mg ekstrakt olarak ölçülmüştür.

Bitki ekstraktının fenolik madde içeriğinin kafeik aside kıyasla daha düşük bulunması sıklıkla bir durumdur. Kafeik asit fenolik yapıda bir standart bileşik iken, bitki ekstraktları çok sayıda farklı kimyasal bileşiğin bir arada bulunduğu kompleks karışımlardır. Buna rağmen elde edilen sonuçlar, *Paliurus spina-christi* tohum ekstraktının belirli düzeyde fenolik bileşik içerdiğini ve bu değerlerin literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermektedir. Ekstraktın fenolik madde bakımından zenginliği, ileride gerçekleştirilecek fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarına da temel oluşturabilecek niteliktedir.

4.2 Ekstrakt Fitokimyasal Profilinin Değerlendirilmesi

Paliurus spina-christi tohum ekstraktının fitokimyasal profilinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen LC-MS/MS analizleri sonucunda ekstrakt içerisinde çeşitli fenolik asitler, fenolik aldehitler ve flavonoid yapısındaki bileşiklerin bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 de Ekstraktın içerisinde varlığı belirlenen bileşen maddeler ve konsantrasyonları görülmektedir. Analiz sonuçlarına göre ekstraktta en yüksek miktarda bulunan bileşiğin prokatekuik aldehit (0,041 mg analit/g ekstrakt) olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla salisilik asit (0,028 mg analit/g ekstrakt), prokatekuik asit (0,021 mg analit/g ekstrakt), akonitik asit (0,008 mg analit/g ekstrakt) ve akasetin (0,007 mg analit/g ekstrakt) takip etmektedir.

Belirlenen bileşiklerin büyük çoğunluğunun fenolik karakter göstermektedir. Özellikle prokatekuik asit ve salisilik asit gibi fenolik bileşiklerin literatürde antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Adamczak vd. 2020). Ayrıca flavonoid yapısındaki akasetin bileşiğinin de biyolojik aktivite açısından önemlidir. Bu durum, ekstraktın sahip olduğu biyolojik etkinliğin fitokimyasal içeriği ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Analiz edilen standart maddelerden tabloda yer verilmeyen 48 bileşiğin ekstrakt içerisinde oranları tam saptanamaması, bitkinin kendine özgü bir fitokimyasal profile sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, *Paliurus spina-christi* ekstraktının fenolik bileşikler bakımından belirli bir zenginliğe sahip olduğu ve bu bileşiklerin ekstraktın biyolojik aktivitelerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.2 *Paliurus spina-christi* ekstraktının içerisinde varlığı belirlenen bileşen maddeler ve konsantrasyonları

Standart No	Bileşen Türü*	<i>Paliurus spina-christi</i> ekstraktı (mg analit/g ekstrakt)
3	Akonitik asit	0,008
6	Protocatechuic acid	0,021
10	Protocatechuic aldehid	0,041
29	Salisilik asit	0,028
56	Acacetin	0,007

*Tabloda analizi gerçekleştirilen fakat verilmeyen 48 standart maddenin ekstraktlar içerisinde bulunmadığı

tespit edilmiştir.

Akonitik asit, trikarboksilik asitler grubunda yer alan ve özellikle hücresel enerji metabolizmasında önemli rol oynayan organik bir bileşiktir. Sitrik asit döngüsünde (Krebs döngüsü) sitratın izositrate dönüşümü sırasında ara ürün olarak oluşur. Bitkilerde doğal olarak bulunabilmekte ve çeşitli metabolik süreçlerde görev almaktadır. Özellikle antioksidan özellik gösterdiği ve serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarın azaltılmasına katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (Bruni ve Klasson 2022).

Bitkisel ekstraktlarda akonitik asit varlığı, ilgili bitkinin metabolik aktivitesinin yüksek olduğuna işaret edebilir. Bunun yanında bazı çalışmalarda antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkiler gösterebildiği belirtilmiştir. Oksidatif stresin azaltılması ve hücrelerin korunmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca hücresel enerji üretiminde yer alması nedeniyle fibroblast proliferasyonu ve hücre yenilenmesi süreçlerine destek sağlayabilecek metabolitlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Bruni ve Klasson 2022).

Protokatekuik asit, fenolik asitler sınıfında yer alan ve güçlü biyolojik aktivitelere sahip doğal bir bileşiktir. Birçok tıbbi ve aromatik bitkide doğal olarak bulunur. Özellikle antioksidan kapasitesi yüksek bir bileşik olması nedeniyle bilimsel çalışmalarda yoğun şekilde araştırılmıştır (Kakkar ve Bais 2014). Serbest radikalleri nötralize ederek hücre hasarını azaltabildiği ve böylece hücreleri oksidatif strese karşı koruyabildiği bilinmektedir. Protokatekuik asit'in antiinflamatuvar özellik gösterdiği, inflamasyon sırasında salgılanan bazı proinflamatuvar mediyatörlerin baskılanmasına yardımcı olabildiği bildirilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve hücresel korunma çalışmalarında önemli görülmektedir. Ayrıca fibroblast hücre proliferasyonunu desteklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Fibroblast aktivitesinin artması kollajen sentezini destekleyerek yara kapanma sürecinin hızlanmasına katkı sağlayabilmektedir (Kakkar ve Bais 2014, Son vd. 2018). Antimikrobiyal aktivite göstermesi de bu bileşiğin dikkat çeken özelliklerinden biridir. Bazı bakteri ve mantar türlerine karşı inhibitör etki gösterebildiği belirtilmektedir. Bu durum yara bölgesinde enfeksiyon riskinin azaltılması açısından önemli olabilir. Aynı zamanda hücre ölümünü azaltıcı ve hücre canlılığını koruyucu etkileri nedeniyle bitkisel ekstrakt çalışmalarında

sıklıkla değeriendirilen fenolik bileşiklerden biridir (Kakkar ve Bais 2014).

Protokatekuik aldehit, fenolik yapı taşıyan doğal bir aldehit türevidir ve çeşitli bitkisel kaynaklarda bulunabilmektedir. Güçlü antioksidan özellik göstermesi nedeniyle biyolojik aktivitesi yüksek bileşikler arasında yer almaktadır. Hücrelerde oluşan oksidatif hasarın azaltılmasına katkı sağlayarak hücresel bütünlüğün korunmasına yardımcı olabilmektedir. Bu bileşiğin özellikle antiinflamatuvar ve sitoprotektif etkileri üzerinde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. İnflamasyon sırasında ortaya çıkan hücresel stresin azaltılması ve inflamatuvar yolların baskılanması üzerinde etkili olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca fibroblast migrasyonu ve hücre proliferasyonu üzerinde olumlu etkiler gösterebildiği bildirildiğinden yara iyileşme çalışmaları açısından önemli bir bileşik olarak değeriendirilmektedir (Ding vd. 2020). Protokatekuik aldehit aynı zamanda bazı kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterebildiği için farmakolojik araştırmalarda da incelenmektedir. Bunun yanı sıra hücre içi sinyal mekanizmalarını düzenleyerek doku yenilenmesi süreçlerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Zhang vd. 2021).

Salisik asit, bitkilerde doğal olarak bulunan fenolik karakterli önemli bir organik asittir. Bitkilerde savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde görev alan bir sinyal molekülü olarak bilinmektedir. Farmasötik ve kozmetik alanlarda da oldukça yaygın kullanılan bir bileşiktir. Özellikle antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve keratolitik özellikleri ile dikkat çekmektedir. Salisik asit'in inflamasyonu azaltıcı etkisi sayesinde yara iyileşme süreçlerinde olumlu katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca mikroorganizmalara karşı inhibitör etki göstermesi yara bölgesinde enfeksiyon gelişiminin önlenmesine yardımcı olabilir. Hücre yenilenmesini destekleyebilmesi ve doku temizliğini kolaylaştırması nedeniyle dermatolojik ürünlerde sıkça kullanılmaktadır (Arif 2015). Bunun yanında salisilik asit, oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunabilmekte ve hücresel hasarın önlenmesinde rol oynayabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda hücre yenilenmesini destekleyici etkiler gösterebilirken yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkiler oluşturabileceği için dikkatli kullanılması gereken bileşiklerden biridir (Poór 2020).

Akasetin, flavonoidler sınıfında yer alan doğal bir fenolik bileşiktir ve birçok tıbbi bitkide bulunmaktadır. Güçlü antioksidan aktivite göstermesi nedeniyle biyolojik açıdan önemli bileşiklerden biri kabul edilmektedir. Serbest radikalleri temizleyerek hücrelerin oksidatif stresten korunmasına yardımcı olur. Akasetinin en dikkat çekici özelliklerinden biri antiinflamatuvar aktivitesidir. İnflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayarak doku hasarının azaltılmasına katkı sağlayabilmektedir. Bu nedenle yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu çalışmalarında önemli bir flavonoid olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezini destekleyebileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Singh vd. 2020). Antikanser, antimikrobiyal ve kardiyoprotektif etkileri üzerine de çok sayıda araştırma yapılmıştır. Hücre içi sinyal yollarını düzenleyebilmesi sayesinde hücre canlılığının korunmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Yara iyileşmesi açısından değerlendirildiğinde ise inflamasyonun baskılanması, oksidatif stresin azaltılması ve hücre yenilenmesinin desteklenmesi bakımından önemli katkılar sağlayabilecek biyoaktif flavonoidlerden biridir (Zhou vd. 2025, Wu vd. 2022).

Literatürde yapılan bir çalışmada, *Paliurus spina-christi* meyvelerinin metanolik özütünde hazırlanmış kateşinler, gallokateşin ve rutin yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Bileşikler, kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerle izole edilmiş, saflaştırılmış ve aydınlatılmıştır. Comet testi kullanılarak yapılan antigenotoksik çalışmalar, *Paliurus spina-christi* meyvelerinden izole edilen bileşiklerin oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir; bu da *Paliurus spina-christi* 'nin etnofarmakolojik özelliklerini ve geleneksel kullanımlarını desteklemektedir. *Paliurus spina-christi* meyvesinin, oksidatif DNA hasarıyla ilgili hastalıkların tedavisi üzerine klinik araştırmalar için iyi bir kaynak olabileceği görülmektedir (Zor vd. 2017).

Yapılan bir başka çalışmada ise *Paliurus spina-christi* toumlarının metanolik ekstraktında en yüksek konsantrasyonda bileşikler arasında kinik asit, gallik asit, protokatekuik asit, tanik asit ve kozmosin yer almaktadır. Ayrıca, genistin, amentoflavon ve akasetin gibi flavonoid bileşikleri düşük miktarlarda tespit edilmiştir (Çelebi ve Duman 2026).

Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen *P. spina-christi* meyve ekstraktlarıyla yapılan bir başka çalışmada 53 fenolik bileşiği incelenmiş ve 30 fenolik

bileşen tanımlanmıştır. En çok bulunan fitokimyasallar; rutin (66.778,5 µg/g), kateşin (43.696,5 µg/g), hesperidin (36.698,4 µg/g), epigallokateşin (5749 µg/g), epikateşin (8024,4 µg/g), vanilik asit (9046,3 µg/g), malik asit (17.536,8 µg/g), kinik asit (28.388,3 µg/g) ve nikotiflorin (2081,0 µg/g) olarak belirlenmiştir (Brantner ve Males 1999).

4.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

Paliurus spina-christi tohumları sulu ekstraktının antimikrobiyal etkinliği belirlenirken disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Analizlerde karşılaştırma yapmak amacıyla pozitif kontrol olarak gentamisin antibiyotiği kullanıldı. Disk difüzyon yönteminde ekstrakta ait dört farklı dilüsyon (0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL ve 5 µg/mL) ve antibiyotik için belirlenen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.3’de ve Çizelge 4.4’de sunulmuştur. Çalışmada kontrol amacıyla kullanılan gentamisin antibiyotiklerine ait inhibisyon zon çapları incelendiğinde, farklı oranlarda inhibisyon oranlarının tüm mikroorganizmalarda görülmesi, disk difüzyon yöntemiyle oluşturulan antimikrobiyal aktivite belirleme analiz modelimizin doğru bir şekilde çalıştığını göstermektedir.

Çizelge 4.3’te verilen disk difüzyon sonuçlarına göre, antimikrobial aktivite açısından *P. spina* ekstraktının farklı mikroorganizmalar üzerinde değişken düzeylerde etki gösterdiği belirlenmiştir. Ekstraktın 24. saat sonunda özellikle *C. albicans* üzerinde daha yüksek inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüştür. En yüksek antifungal etkinlik 0,1 µg/mL konsantrasyonunda 14,08±1,2 mm olarak tespit edilmiştir. Konsantrasyon artışıyla birlikte antifungal etkinlikte belirgin bir artış gözlenmemiş, bazı konsantrasyonlarda inhibisyon zon çapında azalma meydana gelmiştir. *E. coli* üzerinde ekstraktın 0,5 µg/mL konsantrasyonunda en fazla antimikrobiyal etki gösterdiği görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise *E. Coli* üzerinde etkisi saptanmamaktadır.. *S. aureus* üzerinde elde edilen inhibisyon zonlarının diğer mikroorganizmalara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. En yüksek etki 1 µg/mL konsantrasyonunda 10,24±1,2 mm olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, Gram pozitif bakterilerin ekstrakta karşı daha dirençli olabileceğini göstermektedir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin incelendiğinde ise özellikle *E. coli* üzerinde

oldukça yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve $24,27 \pm 1,8$ mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, *P. spina* ekstraktının 24. saatte özellikle *C. albicans* üzerinde dikkat çekici antifungal aktivite gösterdiği, bakteriler üzerindeki etkisinin ise sınırlı kaldığı söylenebilir.

Çizelge 4.3 Çalışmada kullanılan ekstraktın disk difüzyon yöntemine göre 24. saatte antimikrobiyal etkinliği

Grup	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>P. spina</i>	0,1 $\mu\text{g/mL}$	$11,08 \pm 1,2^{a,b}$	$9,95 \pm 0,8^a$	$14,08 \pm 1,2^a$
	0,5 $\mu\text{g/mL}$	$11,62 \pm 1,1^a$	$9,40 \pm 0,8^{a,b}$	$12,24 \pm 1,4^b$
	1 $\mu\text{g/mL}$	$10,88 \pm 0,6^{a,b}$	$10,24 \pm 1,2^c$	$10,75 \pm 0,8^c$
	5 $\mu\text{g/mL}$	$9,59 \pm 0,8^b$	$8,9 \pm 1,0^b$	$12,07 \pm 1,2^b$
Gentamisin	10 μg	$24,27 \pm 1,8^c$	$11,09 \pm 1,2^c$	$11,21 \pm 0,9^c$

Paliurus spina-christi tohumları sulu ekstraktının *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinde inhibisyon bölgesi çapları (mm) olarak ifade edilmiştir. Karşılaştırma için pozitif kontrol olarak ticari bir gentamisin diski kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) olarak sunulmuştur. Her bir mikroorganizmaya uygulandıktan sonra elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklılıklar üst simgelerle (a, b, c) ifade edilmiştir. Aynı mikroorganizmanın verileri içindeki farklı üst simgelere sahip parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) farklılıklar tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4'te verilen 48. saat disk difüzyon sonuçları incelendiğinde, *P. spina* ekstraktının mikroorganizmalar üzerinde farklı düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, ekstraktın özellikle *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde daha belirgin etki oluşturduğunu göstermektedir.

E. coli açısından değerlendirildiğinde, ekstraktın tüm konsantrasyonlarda düşük düzeyde etkili olduğu görülmüştür. En yüksek aktivite 0,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda $11,41 \pm 1,1$ mm olarak belirlenirken, konsantrasyon arttıkça inhibisyon zon çapında azalma gözlenmiştir. Özellikle 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda etkinliğin $9,23 \pm 0,9$ mm'ye düştüğü saptanmıştır. Bu durum, ekstraktın düşük konsantrasyonlarda daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. *S. aureus* üzerinde ise ekstraktın 24. saate kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği dikkat çekmektedir. En yüksek inhibisyon zonu 0,5

$\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda $14,50 \pm 0,8$ mm olarak ölçülmüştür. Diğer konsantrasyonlarda da 12 mm'nin üzerinde inhibisyon zonu oluşması, ekstraktın Gram pozitif bakterilere karşı belirgin bir aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. *C. albicans* üzerinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek antifungal etkinliğin $0,1 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda $14,71 \pm 1,2$ mm olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça antifungal etkinlikte genel olarak azalma meydana geldiği görülmektedir.

P. spina ekstra *Paliurus spina-christi* tohumları sulu ekstraktının 48. saatte özellikle *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları değerlendirildiğinde, bitki ekstraktının anlamlı düzeyde antibakteriyel ve antifungal potansiyele sahip olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.4 Çalışmada kullanılan ekstraktın disk difüzyon yöntemine göre 48. saatte antimikrobiyal etkinliği

Grup	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>P. spina</i>	0,1 $\mu\text{g/mL}$	$10,77 \pm 1,2^a$	$14,20 \pm 1,1^a$	$14,71 \pm 1,2^c$
	0,5 $\mu\text{g/mL}$	$11,41 \pm 1,1^a$	$14,50 \pm 0,8^a$	$10,83 \pm 1,0^b$
	1 $\mu\text{g/mL}$	$10,19 \pm 0,9^{a,b}$	$12,03 \pm 1,2^b$	$9,03 \pm 1,2^a$
	5 $\mu\text{g/mL}$	$9,23 \pm 0,9^b$	$12,02 \pm 1,0^b$	$10,63 \pm 1,1^b$
Gentamisin	10 μg	$24,03 \pm 1,6^c$	$11,70 \pm 1,2^b$	$15,73 \pm 1,3^c$

Paliurus spina-christi tohumları sulu ekstraktının *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinde inhibisyon bölgesi çapları (mm) olarak ifade edilmiştir. Karşılaştırma için pozitif kontrol olarak ticari bir gentamisin diski kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) olarak sunulmuştur. Her bir mikroorganizmaya uygulandıktan sonra elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklılıklar üst simgelerle (a, b, c) ifade edilmiştir. Aynı mikroorganizmanın verileri içindeki farklı üst simgelere sahip parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) farklılıklar tespit edilmiştir.

Genel olarak 48. saat sonuçları, ekstraktın zamana bağlı olarak bazı mikroorganizmalarda etkinliğini koruduğunu ve özellikle düşük konsantrasyonlarda daha etkili sonuçlar verebildiğini göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada bitki ekstraktlarının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Pasteurella multocida* (ATCC 12945), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 27729) ve *Candida albicans*

(ATCC 10231)'den oluşan standart suşlar, *P. spina-christi* meyve ve yaprak özlerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Antimikrobiyal çalışmalardan elde edilen verilere göre *Pasteurella multocoda* ve *Bacillus cereus* bakterileri dışında tüm mikroorganizmalar üzerinde meyve ve yaprak kısmından elde edilen etanol ekstratlarının en yüksek zon çapına sahip olduğu, bitkinin meyve kısmının etanol ekstresi ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Candida albicans*'da daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Arslan ve Kaya 2021). Benzer şekilde yaptığımız çalışmada da meyve ekstraktlarının *Candida albicans* 'a karşı antifungal etkili belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada, *Paliurus spina-christi* türünün çiçek, kabuk, kök meyve ve yapraklarının etanol ile hazırlanan ekstraktlarında değerlendirilen tüm Gram-pozitif bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Micrococcus luteus*) karşı 8.5-14.0 mm çapında net inhibisyon zonları oluşturarak aktivite gösterdiği bulunmuştur. En yüksek aktivitenin kök ekstratlarında bulunduğu bildirilmiştir. Ekstrelerin *Shigella sonnei* suşuna karşı antibakteriyel aktivitesi ise 8.5 ila 10.0 mm çapında ölçülmüştür. Diğer Gram-negatif bakterilere (*Proteus mirabilis* ve *Escherichia coli*) karşı herhangi bir aktivite gözlenmediği rapor edilmektedir (Brantner ve ark., 1996). Sunulan çalışmada da ekstraktın, Gram pozitif bakteriye karşı etkisi görülürken, Gram negatif bakterisi olan *Escherichia coli* karşı antibakteriyel etkili olmadığı görülmüştür.

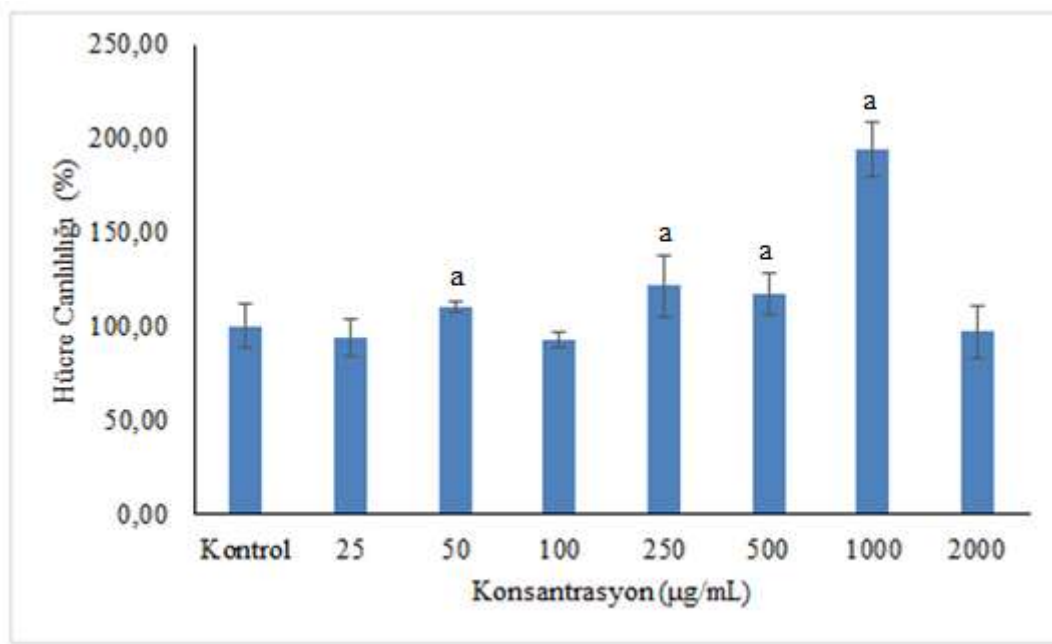
4.4 *Paliurus spina-christi* tohumu sulu ekstraktının sitotoksik ve antikanserojenik etkinliğinin değerlendirilmesi

Paliurus spina-christi ait ekstraktın L929, A549 ve G361 hücrelerindeki sitotoksikite düzeyleri Şekil 4.1, Şekil 4.2, ve Şekil 4.3 gösterilmiştir. Şekil 4.1 de L929 hücrelerine aittir. L929 hücreleri üzerinde ekstraktın farklı konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ekstraktın düşük ve orta konsantrasyonlarda (25–100 µg/mL) L929 hücre canlılığı üzerinde belirgin bir sitotoksik etki oluşturmadığı görülmüştür. Bununla birlikte 50 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığında kontrol grubuna göre hafif bir artış meydana geldiği belirlenmiştir.

Ekstraktın 250, 500 ve özellikle 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığını

artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0,05$). En yüksek hücre canlılığı yaklaşık %190 düzeyi ile 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda gözlenmiştir. Bu durum, ekstraktın belirli konsantrasyonlarda L929 hücre proliferasyonunu destekleyebileceğini düşündürmektedir. Ancak 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hücre canlılığının yeniden kontrol seviyelerine yaklaştığı görülmüştür.

Genel olarak değerlendirildiğinde, ekstraktının L929 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki göstermediği, aksine belirli konsantrasyonlarda hücre canlılığını artırıcı etki gösterebildiği söylenebilir.



Şekil 4.1 *Paliurus spina-christi* ait ekstraktının L929 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, a; Kontrole göre hücre canlılığını artıran konsantrasyonları gösterir.

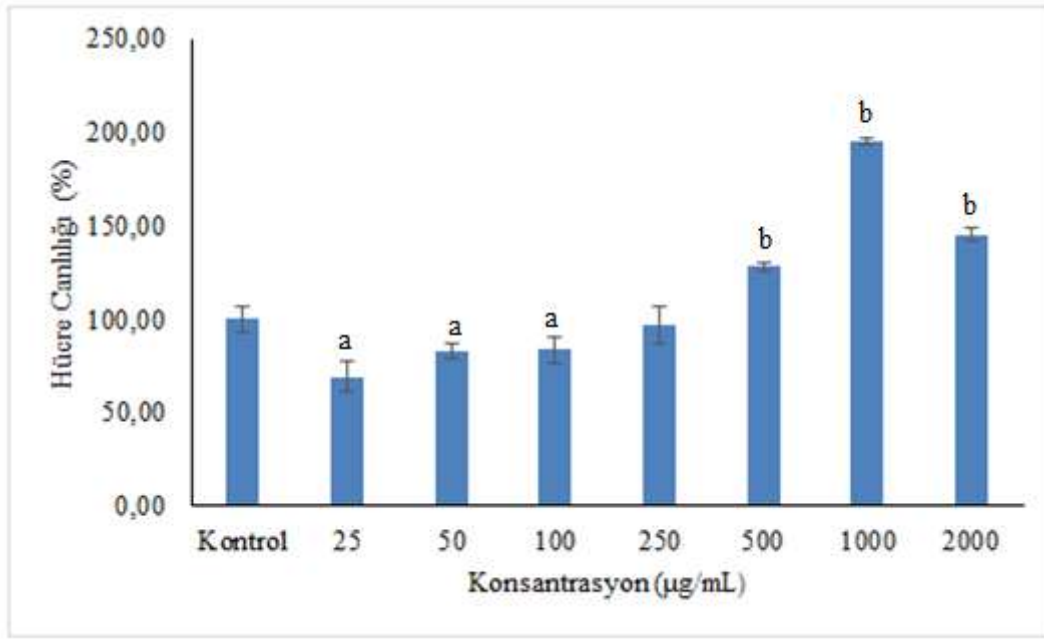
Paliurus spina-christi Miller gibi Rhamnaceae familyası dahil olan tür olan *Ziziphus spina-christi* ile bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, *Z. spina-christi*'den elde edilen saponin açısından zengin fraksiyonu (SRF) kullanarak SRF yüklü nanofitosomlar (saponinozomlar) hazırlamak ve bu taşıyıcıların in vitro ve in vivo etkilerini gözlemlemektir. Farklı formülasyonların hücre sitotoksitesi, hem fare melanom hücreleri (B16F10) hem de fibroblastlar (L929) üzerinde 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılarak değerlendirilmiştir. MTT testi sonuçları, SRF ve saponinozomların B16F10 melanom hücreleri üzerinde yüksek

toksisiteye sahip olduğunu, ancak saponinozomların L929 fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin SRF'ye kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Sonuçlar, *Z. spina-christi*'den elde edilen SRF'nin antikanser aktiviteye sahip olduğunu ve bu çalışmada hazırlanan saponinozomların tümör büyümesini kontrol edebileceğini, tedavi etkinliğini artırabileceğini ve saponinlerin yan etkilerini azaltabileceğini göstermektedir (Nazemoroaya vd. 2022).

Şekil 4.2'de A549 akciğer adenokarsinom hücreleri üzerinde ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular incelendiğinde, ekstraktın hücre canlılığı üzerinde konsantrasyona bağlı olarak değişen etkiler oluşturduğu görülmüştür. Özellikle düşük konsantrasyonlarda (25–100 µg/mL) hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla azaldığı belirlenmiştir. En belirgin düşüşün 25 µg/mL konsantrasyonda meydana geldiği ve hücre canlılığının yaklaşık %70 düzeyine gerilediği gözlenmiştir. Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olması ($p < 0,05$), ekstraktın düşük dozlarda A549 hücreleri üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etki gösterebildiğini düşündürmektedir.

Düşük konsantrasyonlarda gözlenen bu baskılayıcı etkinin, ekstrakt içerisinde bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatürde fenolik asitler ve flavonoidlerin kanser hücrelerinde oksidatif stres oluşturabildiği, hücre döngüsünü baskılayabildiği ve apoptotik mekanizmaları aktive edebildiği bildirilmektedir. Bu nedenle ekstraktın özellikle düşük dozlarda kanser hücre çoğalmasını baskılayıcı yönde etki göstermesi, antikanserojen potansiyel açısından önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Bununla birlikte ekstrakt konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığında belirgin artışlar meydana geldiği görülmüştür. Özellikle 500, 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığının kontrol grubunun üzerine çıktığı belirlenmiştir. En yüksek hücre canlılığı yaklaşık %190 düzeyi ile 1000 µg/mL konsantrasyonunda saptanmıştır. Bu durum, yüksek dozlarda ekstraktın hücre proliferasyonunu destekleyici etki gösterebileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.2 *Paliurus spina-christi* ait ekstraktının A549 hücrelerindeki antikanserojenik etkisi.

a; Kontrole göre hücre canlılığını azaltan konsantrasyonları, b; Kontrole göre hücre canlılığını artıran konsantrasyonları gösterir.

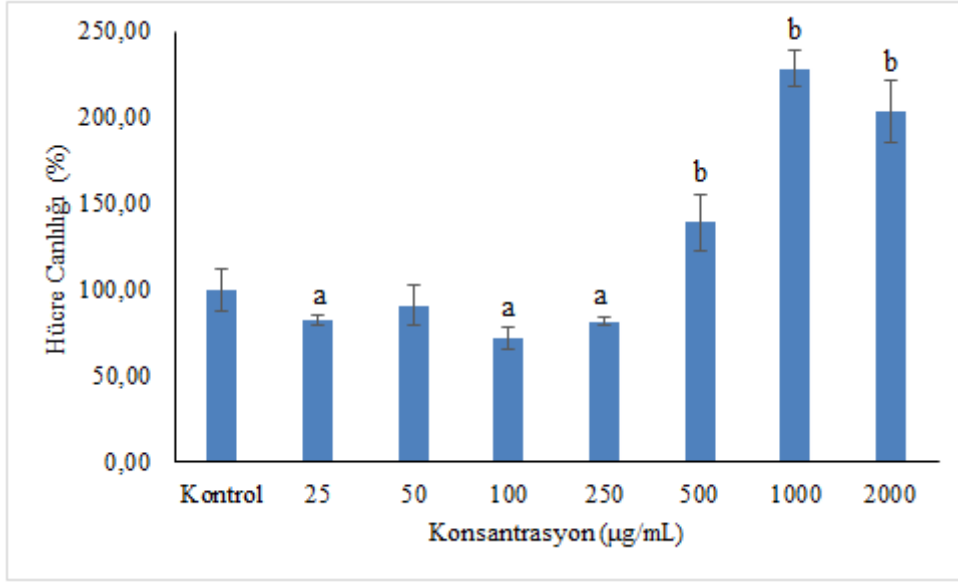
Bitkisel ekstraktların düşük dozlarda yararlı veya baskılayıcı etki gösterirken, yüksek dozlarda farklı metabolik yolları aktive ederek hücreler üzerinde ters etki oluşturabildiği bilinmektedir (Redding vd. 2023). Ekstraktın düşük konsantrasyonlarda A549 hücrelerinin canlılığını azaltması, antikanserojen etki açısından olumlu değerlendirilirken; yüksek konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını artırması, ekstraktın biyolojik etkisinin doza bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu nedenle *Paliurus spina-christi* ekstraktının olası terapötik kullanımında uygun doz aralığının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ekstraktın özellikle düşük konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, ancak yüksek konsantrasyonlarda proliferatif etki oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Şekil 4.3'te G361 melanoma hücreleri üzerinde ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki antikanserojen etkileri gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde ekstraktın hücre canlılığı üzerinde doza bağlı değişken etkiler oluşturduğu görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda (25–250 µg/mL) ekstraktın G361 hücre canlılığını kontrol grubuna

kıyasla azalttığı belirlenmiştir. Özellikle 100 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığının yaklaşık %70 seviyelerine kadar düştüğü ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Benzer şekilde 25 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında da hücre canlılığında belirgin azalmalar meydana gelmiştir. Bu sonuçlar, ekstraktın düşük ve orta konsantrasyonlarda G361 melanoma hücreleri üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etki gösterebildiğini düşündürmektedir.

Düşük konsantrasyonlarda gözlenen bu baskılayıcı etkinin, yine ekstrakt içerisinde bulunan fenolik asitler ve flavonoid bileşiklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fenolik bileşiklerin kanser hücrelerinde oksidatif dengeyi bozarak hücre proliferasyonunu baskıladığı, apoptotik mekanizmaları aktive ettiği ve hücre döngüsünü durdurabildiği literatürde bildirilmektedir (Kaushik vd. 2021). Çalışmada özellikle düşük konsantrasyonlarda elde edilen hücre canlılığı azalması, ekstraktın melanoma hücreleri üzerinde potansiyel antikanserojen aktivite gösterebileceğini desteklemektedir.

Bununla birlikte konsantrasyon arttıkça ekstraktın etkisinin değiştiği görülmüştür. Özellikle 500 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında belirgin artış meydana gelmiştir. En yüksek hücre canlılığı yaklaşık %220 düzeyi ile 1000 µg/mL konsantrasyonunda tespit edilmiştir. 2000 µg/mL konsantrasyonda da hücre canlılığının kontrol grubunun oldukça üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum, yüksek konsantrasyonlarda ekstraktın hücre proliferasyonunu destekleyici yönde etki gösterdiği söylenilebilir. Bitkisel ekstraktların biyolojik etkilerinin doza bağlı olarak değişebilmesi sık karşılaşılan bir durumdur. Düşük dozlarda sitotoksik veya antiproliferatif etki gösteren bazı bileşikler, yüksek dozlarda hücrel savunma mekanizmalarını aktive ederek hücre canlılığını artırabilmektedir.

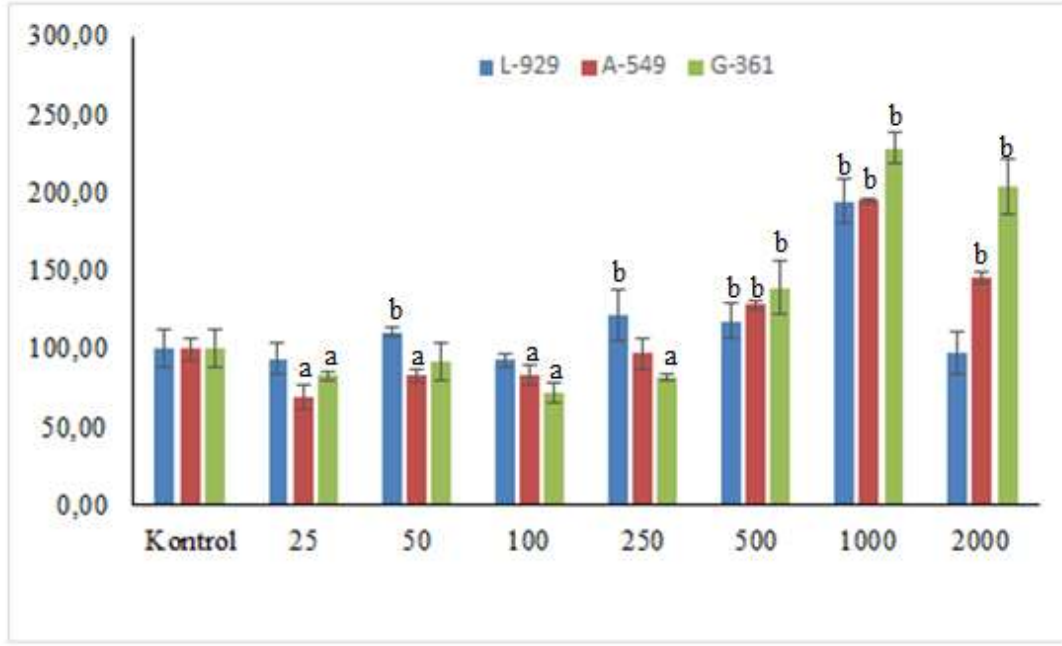


Şekil 4.3 *Paliurus spina-christi* ait ekstraktının G361 hücrelerindeki antikanserojenik etkisi.

a; Kontrole göre hücre canlılığını azaltan konsantrasyonları, b; Kontrole göre hücre canlılığını artıran konsantrasyonları gösterir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, ekstraktının G361 melanoma hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı çift yönlü etki gösterdiği söylenebilir. Düşük konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını baskılayıcı ve antikanserojen etki gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda proliferatif etkinin ortaya çıktığı görülmüştür. Bu nedenle ekstraktın biyolojik etkilerinin doğru değerlendirilebilmesi için uygun doz aralığının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar, ekstraktın özellikle düşük konsantrasyonlarda melanoma hücreleri üzerinde potansiyel terapötik etki göstermektedir.

Paliurus spina-christi ait ekstraktının çalışılan tüm hücrelerdeki (L929, A549 ve G361) hücre canlılığına etkisi Şekil 4.4 de topluca sunulmuştur.



Şekil 4.4 *Paliurus spina-christi* ait ekstraktının L929, A549 ve G361 hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi. a; Kontrole göre hücre canlılığını azaltan konsantrasyonları, b; Kontrole göre hücre canlılığını artıran konsantrasyonları gösterir

Literatürde *Paliurus spina-christi* ile yapılan bir çalışmada türün çiçek ve yaprak kısımları ile hazırlanan etanol ekstraktlarının antikanserojenik aktivite insan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde araştırılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen veriler, yaprak ve çiçek ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip oldukları belirtilmektedir (Oğuz vd. 2022).

4.5 *Paliurus spina-christi* Tohumu Sulu Ekstraktının L929 Hücrelerinde Yara İyileştirici Etkinliği

Yara çalışmalarında in-vitro model oluşturulmasında en yaygın olarak tercih edilen hücreler fibroblast hücreleridir. Bunun temel nedeni, fibroblastların yara iyileşme sürecinde görev alan birçok protein ve metabolitin sentezlenmesinde aktif rol oynamasıdır. Yara oluşumunun ardından fibroblastların aktivasyonu ile birlikte çeşitli biyomoleküllerin sentez ve salınımı gerçekleşmekte, bu süreç de epitelyal onarımın desteklenmesine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında, *Paliurus*

spina-christi ekstraktının yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla bir fibroblast hücre hattı olan L929 hücreleri kullanılmıştır. Yöntem bölümünde ayrıntılı olarak açıklanan in-vitro hücre çizik yara modeli oluşturulduktan sonra, *Paliurus spina-christi* ekstraktları hücrelere uygulanmıştır.

Çizelge 4.5’de L929 hücreleri üzerinde *Paliurus spina-christi* pulunun sulu ekstraktının yara iyileştirici etkinliği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, ekstrakt uygulanan grupta yara alanı kapanma oranının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılıkta yüksek ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Başlangıç yara alanı değerleri kontrol ve ekstrakt gruplarında benzer bulunmuş olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, deney başlangıcında hücresiz alanların birbirine yakın olduğunu ve uygulamanın etkisinin daha sağlıklı değerlendirilebildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan ekstraktın yara iyileştirici etkinliği

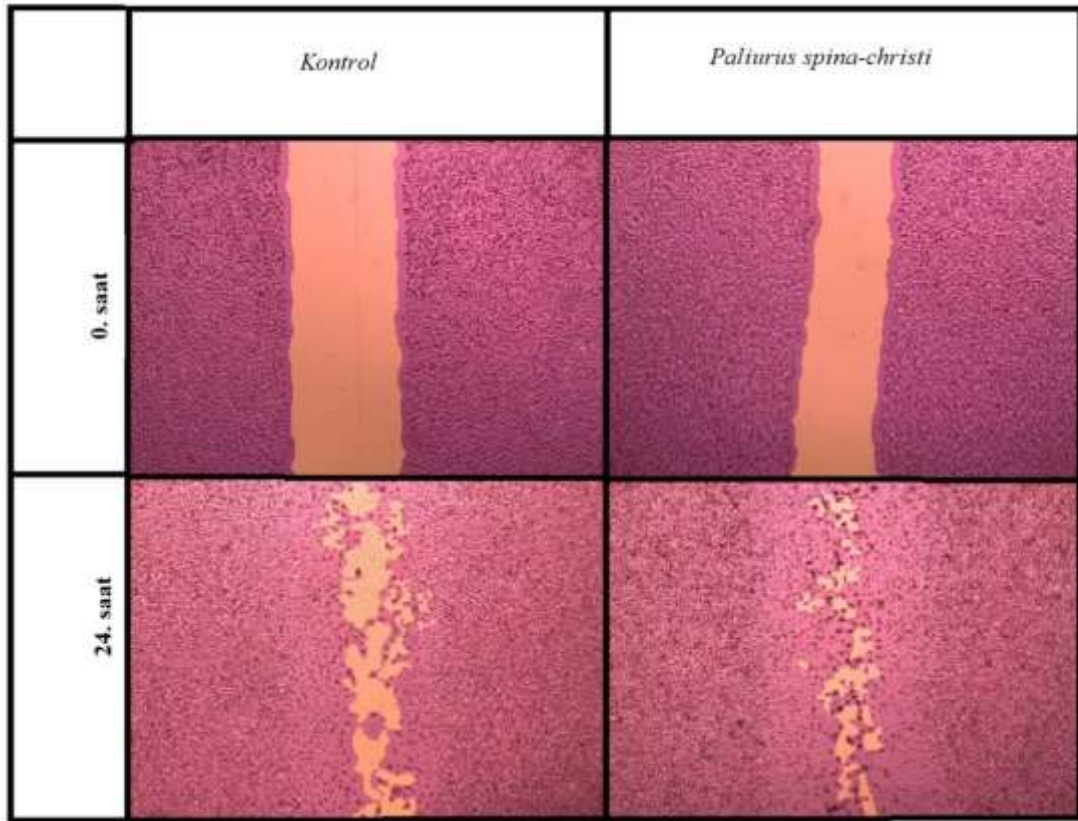
Deney Grupları	Hücresiz alan (Yara alanı) (%)		Yara alanı kapanma oranı (%)
	Başlangıç	24. saat	
Kontrol	51,23±5,72	14,643±1,64	72,423±2,66
<i>Paliurus spina</i>	48,123±3,47	9,213±1,39*	80,863±3,35*
P	0,062	0,001	0,001

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir ($n\geq 3$). *Aynı sütundaki veriler arasında kontrol grubuna göre istatistiki farklılık gösteren veriyi göstermektedir ($p<0,05$).

24 saat sonunda kontrol grubunda hücresiz alan oranı %14,643±1,64 olarak belirlenirken, *Paliurus spina-christi* ekstraktı uygulanan grupta bu değerin %9,213±1,39’a düştüğü görülmüştür. Hücresiz alanın azalması, hücre migrasyonu ve proliferasyonunun arttığını göstermekte olup, ekstraktın yara kapanmasını desteklediğini düşündürmektedir. Ayrıca yara alanı kapanma oranı değerlendirildiğinde, kontrol grubunda bu oran %72,423±2,66 iken ekstrakt uygulanan grupta %80,863±3,35 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çalışmada elde edilen bulgular, *Paliurus spina-christi* ekstraktının L929 hücreleri üzerinde yara iyileşmesini destekleyici etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Ekstraktın içerdiği fenolik bileşikler ve flavonoid yapısındaki maddelerin antioksidan

özellikleri sayesinde hücresel hasarı azaltabileceği, hücre çoğalmasını ve hücre göçünü destekleyerek yara kapanma sürecini hızlandırabileceği düşünülmektedir. Literatürde bitkisel ekstraktlarının fenolik içeriğinin fibroblast aktivitesini artırarak doku yenilenmesini desteklediği bildirilmektedir (Merecz-Sadowska vd. 2021). Bu nedenle çalışmada elde edilen sonuçlar, ekstraktın potansiyel yara iyileştirici aktiviteye sahip olabileceğini desteklemektedir. Şekil 4.5 de *Paliurus spina-christi* tohumlarının sulu ekstraktının yara iyileştirici etkisinin mikroskopik görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.5 *Paliurus spina-christi* ekstraktının yara iyileştirici etkisi

4. 6 Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi

Paliurus spina-christi türünün biyoelement konsantrasyonu ICP-OES ile belirlendi. Standart çözelti içerisinde var olan Sb, As, Be, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Sr, Ti, V, ve Zn elementlerinin varlığı ve konsantrasyonu araştırılmıştır.

Çizelge 4.6’de *Paliurus spina-christi* türüne ait ekstraktın içerdiği biyoelementler ve bunların konsantrasyonları verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, ekstrakt içerisinde en yüksek miktarda bulunan elementlerin kalsiyum (Ca), potasyum (K) ve magnezyum (Mg) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 *Paliurus spina-christi* türünün içerdiği biyoelementler ve konsantrasyonları

Biyoelement	Konsantrasyon (ppm)	Biyoelement	Konsantrasyon (ppm)
Be	0,048	Mg	1303,83
Ca	4542,38	Mn	26,903
Cr	0,33	Ni	3,837
Cu	18,86	Sr	22,496
Fe	47,291	Ti	2,564
K	3564,99	Zn	15,306
Li	1,27		

Literatürde bir çalışmada ise *Paliurus spina-christi* meyvelerindeki mineral içeriklerini incelenmiştir. Fitokimyasal analizde, toplam 31 farklı fenolik bileşik tanımlanmıştır. Başlıca bileşenleri (analit/g ekstrakt olarak) şunlardır: rutin ($98753,4 \pm 24,39 \mu\text{g}$), kateşin ($58695,3 \pm 12,971 \mu\text{g}$), hesperidin ($47445,2 \pm 15,894 \mu\text{g}$), kinik asit ($38279,5 \pm 14,239 \mu\text{g}$) ve malik asit ($17536,8 \pm 2,279 \mu\text{g}$). Mineral analizinde ise; sodyum, kalsiyum, magnezyum ve fosfor elementleri makro düzeyde, Zn ve Cr^{3+} mineralleri ise eser düzeyde bulunmuştur (Takım 2021).

Bir başka çalışmaa ise *Paliurus spina-christi* bitkisinin dal, yaprak ve meyve gibi topraküstü kısımlarından mineral madde içeriğini araştıran bir çalışmada, biyoelement düzeyleri Al (117.940 ± 4.45), B (62.911 ± 2.29), Ca (2593.971 ± 29.40), Cd (0.090 ± 0.01), Cr (0.893 ± 0.03), Cu (60.053 ± 1.42), Fe (863.705 ± 22.92), K (2914.821 ± 41.26), Mg (595.191 ± 20.11), Mn (135.145 ± 5.10), Na (290.996 ± 4.28), Ni (26.615 ± 0.51), Pb (17.162 ± 0.52), Zn (177.784 ± 6.91) şeklinde belirlenmiş ve en yüksek konsantrasyonların Ca, K, Mg, Na, Zn ve Al olduğunu bulmuştur (Karahan vd. 2020). Sunulan tez çalışmasında da en yüksek miktarda bulunan elementlerin Ca, K ve Mg dur.

Özellikle kalsiyumun 4542,38 ppm ve potasyumun 3564,99 ppm düzeyinde bulunması, bitkinin mineral bakımından zengin bir içeriğe sahip olduğunu göstermektedir. Bu elementler hücrel metabolizma, enzim aktivitesi ve doku yenilenmesi gibi biyolojik süreçlerde önemli görevler üstlenmektedir. Magnezyumun da yüksek miktarda bulunması dikkat çekicidir. Magnezyum, protein sentezi, hücre çoğalması ve enerji metabolizmasında rol oynayan önemli bir elementtir. Bu nedenle bitkinin biyolojik aktivitesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu) ve mangan (Mn) gibi eser elementlerin varlığı da ekstraktın biyolojik açıdan değerli olduğunu göstermektedir. Özellikle çinko ve bakırın yara iyileşmesi, antioksidan savunma sistemi ve bağışıklık mekanizmalarında önemli roller üstlendiği bilinmektedir. Demir elementi, oksijen taşınması ve hücrel metabolik faaliyetler açısından önem taşımaktadır. Çinko ve mangan gibi eser elementler ise antioksidan enzimlerin yapısında yer alarak serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu rol oynayabilmektedir. Bunun yanında krom (Cr), nikel (Ni), titanyum (Ti) ve berilyum (Be) gibi elementlerin düşük konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir. *Paliurus spina-christi* nin zengin mineral ve eser element içeriğine sahip olduğu, bu durumun bitkinin biyolojik aktivitelerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Organizma, enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bu savunma mekanizması, dokular üzerinde zararlı etkilere neden olabilen serbest radikallere karşı koruyucu görev üstlenmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx), hücre

içerisinde serbest radikallere karşı görev yapan başlıca antioksidan enzimler arasında yer almaktadır. Serbest radikaller ise özellikle mitokondriyal enerji üretim süreçleri sırasında sürekli olarak meydana gelmektedir (Aslankoç vd. 2019). Çizelge 4.6 belirlenen Fe, Cu, Mn ve Zn gibi eser elementler, organizmada bulunan antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenleri arasında yer almaktadır. Özellikle bu elementler, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin yapısına katılarak enzimatik aktivitenin sürdürülmesinde görev almaktadır. Demir (Fe), katalaz enziminin yapısında bulunan temel elementlerden biridir. Katalaz enzimi, hücrelerde oluşan hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalayarak oksidatif hasarın önlenmesine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle ekstraktta Fe elementinin bulunması, antioksidan kapasite açısından önemli kabul edilmektedir. Bakır (Cu) ve çinko (Zn) ise özellikle Cu/Zn-SOD enziminin yapısında yer almaktadır. Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit radikallerini daha az zararlı bileşiklere dönüştürerek hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır. Bu nedenle Cu ve Zn varlığı, bitkinin antioksidan savunma mekanizmalarına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Mangan (Mn) elementi ise mitokondride bulunan Mn-SOD enziminin temel bileşenidir. Mn-SOD enzimi, mitokondriyal enerji üretimi sırasında oluşan serbest radikallerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır. Böylece hücresel hasarın azaltılmasına ve hücre bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır. Genel olarak değerlendirildiğinde, ekstrakt içerisinde bulunan Fe, Cu, Mn ve Zn gibi biyoelementlerin antioksidan enzim sistemleriyle ilişkili olduğu ve bitkinin antioksidan aktivitesine destek sağlayabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Paliurus spina-christi Miller, Türkiye’de yaygın olarak yetişen ve halk arasında kullanımı bulunan bitkidir. Meyve kısmı göz hastalıklarında, taze yaprakları çıban üzerine sarılarak kullanılmaktadır. Meyvelerinin mide ağrısı, akne, soğuk algınlığı, grip, astım rahatsızlıklarında, kabızlık probleminde diüretik etki için, boğaz ağrılarında, böbrek taşı ve karın ağrısı rahatsızlıklarında kullanımı da mevcuttur. Bitkinin çeşitli kısımlar ile yapılan kimyasal içerik çalışmalarında, flavonoidler, tanenler, fenolik asitler, flavonoid glikozitleri, yağ asitleri, alkaloidler, steroller, amino asitler, şeker bileşikler ve mineraller içerdiği bulunmuştur. İçerdiği bileşikler sebebiyle yürütülen biyoaktivite çalışmaları incelendiğinde antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antidiyabetik, enzim inhibitör (kolinesteraz, tirozinaz, α -amilaz ve α -glukozidaz), antifungal ve antigenotoksik özellikleri belirlenmiştir (Kasap, 2024).

Bu tez çalışmasında *Paliurus spina-christi* ekstraktının biyolojik aktiviteleri kapsamlı şekilde araştırılmış, total fenolik madde miktarı, antimikrobiyal, yara iyileştirici ve sitotoksik etkileri farklı analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *Paliurus spina-christi* ekstraktının fenolik bileşikler, biyoelementler ve çeşitli biyoaktif metabolitler bakımından zengin bir içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu zengin içeriğin bitkinin biyolojik aktivitesine önemli ölçüde katkı sağladığı düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen total fenolik madde tayini sonuçları, ekstraktın belirli düzeyde fenolik bileşik içerdiğini göstermiştir. Fenolik bileşikler, bitkilerde antioksidan aktiviteden sorumlu temel sekonder metabolitler arasında yer almaktadır. Bu bileşikler serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri oksidatif strese karşı korumakta ve hücresel hasarın azaltılmasına katkı sağlamaktadır. Oksidatif stres; lipid peroksidasyonu, protein hasarı ve DNA bozulmaları gibi olumsuz durumlara neden olarak hücre fonksiyonlarını bozabilmektedir. Bu nedenle fenolik bileşikler bakımından zengin bitki ekstraktlarının koruyucu biyolojik aktivite gösterebildiği bilinmektedir. Çalışmada elde edilen total fenolik içerik sonuçları, *Paliurus spina-christi* ekstraktının güçlü bir biyolojik aktiviteye sahip olabileceğini yönündedir.

LC-MS/MS analizleri sonucunda ekstrakt içerisinde akonitik asit, protokatekuik asit, protokatekuik aldehit, salisik asit ve akasetin gibi biyolojik açıdan önemli bileşiklerin bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle protokatekuik asit ve akasetin gibi fenolik yapıdaki bileşiklerin güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu bileşiklerin serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarın azaltılmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Ayrıca salisik asitin antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özellikleri sayesinde yara iyileşme süreçlerinde etkili olabileceği bilinmektedir. Elde edilen bu bulgular, *Paliurus spina-christi* ekstraktının biyolojik aktivitesinin içerdiği biyoaktif bileşiğin sinerjik etkisinden de kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite analizlerinde ekstraktın *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde farklı düzeylerde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle *C. albicans* üzerinde elde edilen inhibisyon zonlarının daha yüksek olması, ekstraktın antifungal aktivitesinin dikkat çekici olduğunu göstermektedir. 24. ve 48. saat sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, ekstraktın zamana bağlı olarak etkinliğini koruyabildiği ve özellikle düşük konsantrasyonlarda daha etkili sonuçlar verebildiği görülmüştür. Bunun yanında *S. aureus* üzerinde de belirgin inhibisyon zonları oluştuğu belirlenmiştir. *E. coli* üzerinde ise antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır. Bu sonuçlar, ekstraktın özellikle fungal mikroorganizmalara karşı daha güçlü aktivite gösterdiği görülmektedir.

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin, içerdiği fenolik bileşikler ve flavonoidlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fenolik bileşiklerin mikroorganizma hücre duvarında geçirgenlik değişikliklerine neden olarak hücre bütünlüğünü bozabildiği bilinmektedir. Ayrıca bazı fenolik bileşiklerin mikrobiyal enzim sistemlerini inhibe ederek hücre metabolizmasını baskılayabildiği bildirilmektedir. Çalışmada belirlenen protokatekuik asit, salisilik asit ve akasetin gibi bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteye katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sitotoksikite analizleri sonucunda ise ekstraktın belirli konsantrasyonlarda hücre canlılığını koruduğu ve biyoyumlu özellik gösterebildiği belirlenmiştir. Özellikle düşük ve orta konsantrasyonlarda hücre canlılığının yüksek olması, ekstraktın güvenli kullanım

potansiyeli açısından önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda meydana gelen hücre canlılığı değişimlerinin, ekstrakt içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin doz bağımlı etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yara iyileşme çalışmaları kapsamında fibroblast hücre hattı kullanılarak in-vitro hücre çizik modeli oluşturulmuştur. Fibroblast hücreleri yara iyileşme sürecinde kollajen sentezi, hücre proliferasyonu ve doku yenilenmesinde önemli görevler üstlenmektedir. Çalışmada ekstrakt uygulanan hücre gruplarında hücre migrasyonunun desteklendiği ve yara kapanmasının hızlandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, *Paliurus spina-christi* ekstraktının yara iyileştirici potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Özellikle ekstraktın içerdiği antioksidan ve antiinflamatuvar bileşiklerin hücresel yenilenmeyi destekleyerek yara iyileşme sürecine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada gerçekleştirilen biyoelement analizleri sonucunda ekstraktın özellikle kalsiyum (Ca), potasyum (K) ve magnezyum (Mg) bakımından zengin olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında Fe, Cu, Zn ve Mn gibi eser elementlerin varlığı dikkat çekmiştir. Bu biyoelementlerin organizmada önemli biyokimyasal süreçlerde görev aldığı bilinmektedir. Özellikle Fe, Cu, Zn ve Mn elementleri antioksidan savunma sisteminde görev yapan enzimlerin yapısına katılmaktadır. Bakır ve çinko, Cu/Zn-SOD enziminin yapısında bulunurken mangan ise Mn-SOD enziminin temel bileşenlerinden biridir. Demir elementi ise katalaz enziminin yapısında yer almakta ve hidrojen peroksidin parçalanmasında görev almaktadır. Bu nedenle ekstraktta bulunan biyoelementlerin antioksidan savunma sistemine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Organizmada meydana gelen oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin artışı sonucunda oluşmakta ve hücresel yapılarda hasara neden olabilmektedir. Organizma ise bu zararlı etkilere karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri geliştirmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) hücrede serbest radikallere karşı görev yapan temel antioksidan enzimler arasında yer almaktadır. Çalışmada belirlenen fenolik bileşikler ve biyoelement içerikleri birlikte değerlendirildiğinde, *Paliurus spina-christi* ekstraktının antioksidan savunma mekanizmalarını destekleyebilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *Paliurus spina-christi* tohumlarının sulu ekstraktının fenolik içerik, zengin biyoelement profili ve içerdği biyoaktif bileşikler sayesinde önemli biyolojik aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen antimikrobiyal, antikanserojen ve yara iyileştirici aktivite sonuçları, bu bitkinin doğal biyolojik ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Özellikle antioksidan savunma sistemini destekleyebilecek biyoelementler ve fenolik bileşikler bakımından zengin olması, ekstraktın farmakolojik açıdan önemli bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir. *Paliurus spina-christi* ekstraktının biyolojik aktiviteler açısından umut verici özellikler gösterdiği belirlenmiş olup, ilerleyen çalışmalarda moleküler mekanizmalarının daha ayrıntılı araştırılması ve in-vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir. Bunun yanında ekstraktın içerdği aktif bileşiklerin saflaştırılması ve farmasötik uygulamalarda değerlendirilmesi, gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalar açısından önemli katkılar sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abubakar A R, Haque M, 2020, Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12, 1-10.
- Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM, 2019, Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *The Journal of Clinical Medicine*, 31, 9, 109.
- Akbaş M N, Akçakaya A, Kartal M, 2023, Kanser Hastalarında Palyatif Bakım ve Fitoterapi, *Bezmialem Science*, 11, 132-137.
- Akdağ G, Hazman Ö, Aksoy L, Savrık M, Büyükben A, Yılmaz MA, vd., 2024, Phytochemical composition, antimicrobial, antioxidant, and wound healing activities of *Thermopsis turcica*. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of biosciences*, 80, 261-274.
- Alara O R, Abdurahman N H, Olalere O A, 2018, Optimization of Soxhlet extraction of total phenolics from *Vernonia cinerea* leaves using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 10, 124-135.
- Alimova S, Zura Y, Tunç T, Özpınar H, 2025, Investigation of biochemical properties, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activity of the *Rhamnus cathartica* L. extracts collected from Kazakhstan, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University* 49, 3, 743-755.
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson D G, Lightfoot D A, 2017, Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts, *Plants*, 6, 42.
- Altemimi A, Lightfoot D A, Kinsel M, Watson D G, 2015, Employing Response Surface Methodology for the Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Lutein and β -Carotene from Spinach, *Molecules*, 20, 6611-6625.
- Arslan L, Kaya E, 2021, Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Paliurus spina-christi* Mill. in Kahramanmaraş, Turkey, *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 24, 1161-1169.

- Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, vd., 2019, Oksidatif Stres Durumunda Antioksidan Enzimlerin Rolü - Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutatyon Peroksidaz (GPX), Medical Journal of Süleyman Demirel University, 26, 362-369.
- Atanasov A G, Zotchev S B, Dirsch V M, International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran C T, 2021, Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities, Nature Reviews Drug Discovery, 20, 200-216.
- Azwanida N N, 2015, A Review on the Extraction Methods Used in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, Medicinal & Aromatic Plants, 4, 1-6.
- Babu K G D, Kaul V K, 2007, Variation in Essential Oil Composition of Rose-Scented Geranium (*Pelargonium* sp.) Distilled by Different Systems, Industrial Crops and Products, 25, 286-293.
- Baghdikian B, Filly A, Fabiano-Tixier A S, Petitcolas E, Mabrouki F, Chemat F, vd., 2016, Extraction by Solvent Using Microwave and Ultrasound-Assisted Techniques Followed by HPLC Analysis of Harpagoside from *Harpagophytum procumbens* and Comparison with Conventional Solvent Extraction Methods, Comptes Rendus Chimie, 19, 692-698.
- Bakhshabadi H, Mirzaei H, Ghodsvali A, Jafari S M, Ziiaifar A M, 2017, The Influence of Pulsed Electric Fields and Microwave Pretreatments on Some Selected Physicochemical Properties of Oil Extracted from Black Cumin Seed, Food Science & Nutrition, 6, 111-118.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M, 2008, Biological Effects of Essential Oils—A Review, Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.
- Balkir S, Hazman Ö, Aksoy L, Yılmaz M A, Cakir O, Erol İ, 2023, Phytochemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Potency of Aerial Parts of *Salvia tomentosa* Miller, Acta Chimica Slovenica, 70, 218-225.
- Barba F, Koubaa M, Grimi N, Vorobiev E, 2016, Selective Extraction of Biocompounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves Using Electrotechnologies, 1-11.
- Bashi D S, Mortazavi S A, Rezaei K, Rajaei A, Karimkhani M M, 2012, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Yarrow (*Achillea biebersteinii*) by Response Surface Methodology, Food Science and Biotechnology, 21, 1005-1011.

- Bauer R W, Kirby M D K, Sherris J C, Turck M, 1966, Antibiotic Susceptibility Testing by Standard Single Disc Diffusion Method, American Journal of Clinical Pathology, 45, 493-496.
- Bensalem S, Pareau D, Cinquin B, Français O, Le Pioufle B, Lopes F, 2020, Impact of Pulsed Electric Fields and Mechanical Compressions on the Permeability and Structure of *Chlamydomonas reinhardtii* Cells, Scientific Reports, 10, 1-11.
- Bhadange Y A, Carpenter J, Saharan V K, 2024, A Comprehensive Review on Advanced Extraction Techniques for Retrieving Bioactive Components from Natural Sources, ACS Omega, 9, 31274-31297.
- Bhan M, 2017, Ionic Liquids as Green Solvents in Herbal Extraction, International Journal of Advanced Research and Development, 2, 10-12.
- Boss C B, Fredeen K J, 2004, Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, 3rd Edition, PerkinElmer, Norwalk, Connecticut.
- Brantner A H, Males Z, 1999, Quality Assessment of *Paliurus spina-christi* Extracts, Journal of Ethnopharmacology, 66, 175-179.
- Brantner A, Males Z, Pepeljnjak S, Antolić A, 1996, Antimicrobial Activity of *Paliurus spina-christi* Mill. (Christ's Thorn), Journal of Ethnopharmacology, 52, 119-122.
- Bruni G O, Klasson K T, 2022, Aconitic Acid Recovery from Renewable Feedstock and Review of Chemical and Biological Applications, Foods, 11, 573.
- Butler M S, 2004, The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery, Journal of Natural Products, 67, 2141-2153.
- Carullo D, Pataro G, Donsi F, Ferrari G, 2020, Pulsed Electric Fields-Assisted Extraction of Valuable Compounds From *Arthrospira platensis*: Effect of Pulse Polarity and Mild Heating, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 551272.
- Ceylan S, Harsit B, Saral O, Ozcan M, Demir I, 2020, Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Plant Extracts *Centaury* (*Hypericum montbretii* and *Hypericum bupleuroides*) and Blackthorn (*Paliurus spina-christi* Mill) in Artvin, Giresun Region of Turkey, Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 21, 13-20.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire A G, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier A S, Abert-Vian M, 2017, Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products:

- Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review, *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Chen S, Xing X H, Huang J J, Xu M S, 2011, Enzyme-Assisted Extraction of Flavonoids from *Ginkgo biloba* Leaves: Improvement Effect of Flavonol Transglycosylation Catalyzed by *Penicillium decumbens* Cellulase, *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 100-105.
- Chizzola R, Michitsch H, Franz C, 2008, Antioxidative Activities of Essential Oils from *Lamiaceae* Species, *Food Chemistry*, 108, 687-697.
- Conde-Hernandez L A, Guerrero-Beltran J A, 2014, Total Phenolics and Antioxidant Activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*, *Food Chemistry*, 142, 455-460.
- Cowan M M, 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- Çelebi R S, Duman E, 2026, Multifaceted Evaluation of *Paliurus spina-christi* Mill. Plant, Seeds, and Oils: Hydrogen Cyanide, Phytochemical, Bioactive, and Antimicrobial Insights from Türkiye Ecotypes, *Molecules*, 31, 87.
- Da Silva R P, Rocha-Santos T A, Duarte A C, 2016, Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.
- Das K, Tiwari R K, Shrivastava D K, 2010, Techniques for Evaluation of Medicinal Plant Products as Antimicrobial Agents: Current Methods and Future Trends, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 104-111.
- Dastangoo S, Hamed Mosavian M T, Yeganehzad S, 2020, Optimization of Pulsed Electric Field Conditions for Sugar Extraction from Carrots, *Food Science & Nutrition*, 8, 2025-2034.
- Deligöz A, Gültekin H, Yıldız D, Gültekin Ü, Genç M, 2009, Karaçalı (*Paliurus spina-christi* Mill.) ve Hünnap (*Zizyphus jujuba* Mill.) Tohumlarının Çimlendirilmesi Üzerine GA3, Çıtlatma ve Ekim Zamanının Etkileri, *Turkish Journal of Forestry*, 8, 51-60.
- Dinç F S, 2024, *Paliurus spina-christi* P. Mill. Türünden Biyoaktivite Rehberliğinde Antidiyabetik Etkili Bileşiklerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi.

- Ding Y, Jiratchayamaethasakul C, Lee S H, 2020, Protocatechuic Aldehyde Reduces UVA-Induced Photoaging in Human Dermal Fibroblast Cells by Suppressing MAPKs/AP-1 and NF- κ B Signaling Pathways, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4619.
- Dorman H J D, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen M J, 2003, Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species and Phenols: A Comparative Study, *Food Chemistry*, 80, 395-403.
- Doughari J H, 2012, *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents*, INTECH Open Access Publisher, Rijeka, Croatia.
- Ergen N, Coşkun S H, Orhan D D, Aslan M, Sezik E, Atalay A, 2018, Evaluation of the Lifespan Extension Effects of Several Turkish Medicinal Plants in *Caenorhabditis elegans*, *Turkish Journal of Biology*, 42, 163-173.
- Eskilsson C S, Björklund E, 2000, Analytical-Scale Microwave-Assisted Extraction, *Journal of Chromatography A*, 902, 227-250.
- Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis I P, Troganis A, Boskou D, 2002, Identification and Study of Antioxidant Compounds in Cultivated Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), *Phytochemistry*, 60, 623-627.
- Feng X, Zhu M, Xu J, Yin W, Hu F, 2019, Analysis of Factors Influencing the Transmembrane Voltage Induced in Filamentous Fungi by Pulsed Electric Fields, *Microorganisms*, 7, 307.
- Gielecińska A, Kciuk M, Mujwar S, Celik I, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, vd., 2023, Natural-Origin Substances in Medicine: Plants vs. Cancer, *Cells*, 12, 986.
- Goettel M, Eing C, Gusbeth C, Straessner R, Frey W, 2013, Pulsed Electric Field Assisted Extraction of Intracellular Valuables from Microalgae, *Algal Research*, 2, 401-408.
- Grande F, Marrelli M, Amodeo V, Occhiuzzi M A, Pinzaru I, Fucile M, vd., 2024, Molecular Docking Studies and In Vitro Activity of *Paliurus spina-christi* Mill Extracts as Pancreatic Lipase Inhibitors, *Antioxidants*, 13, 160.
- Guo S, DiPietro L A, 2010, Factors Affecting Wound Healing, *Journal of Dental Research*, 89, 219-229.

- Gurib-Fakim A, 2006, Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- Hanahan D, Weinberg R A, 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan D, Weinberg R A, 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144, 646-674.
- Handa S S, 2008, An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 1.
- Harborne J B, 1998, *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 3rd Ed., Thomson Science, New York, NY; London, UK, 21-29.
- Harbourne N, Marete E, Jacquier J C, O'Riordan D, 2013, Conventional Extraction Techniques for Phytochemicals, *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*, 1st Ed., Wiley, Chichester, 400-411.
- Hazman Ö, Aksoy L, Büyükben A, Kara R, Kargioğlu M, Kumral Z B, vd., 2021, Evaluation of Antioxidant, Cytotoxic, Antibacterial Effects and Mineral Levels of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, e20210865.
- Herrera M C, De Castro M L, 2005, Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Strawberries Prior to Liquid Chromatographic Separation and Photodiode Array Ultraviolet Detection, *Journal of Chromatography A*, 1100, 1-7.
- Hossain M A, Al-Hdhrami S S, Weli A M, Al-Riyami Q, Al-Sabahi J N, 2014, Isolation, Fractionation and Identification of Chemical Constituents from the Leaves Crude Extracts of *Mentha piperita* L Grown in Sultanate of Oman, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 368-372.
- Hussain M K, Saquib M, Khan M F, 2019, Techniques for Extraction, Isolation, and Standardization of Bio-Active Compounds from Medicinal Plants, *Natural Bioactive Compounds*, Springer, Singapore, 179-200.
- Hou X, Jones B T, 2000, Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, 9468–9485.
- Ingle K P, Deshmukh A G, Padole D A, Dudhare M S, Moharil M P, Khelurkar V C, 2017, *Phytochemicals: Extraction Methods, Identification, and Detection of*

- Bioactive Compounds from Plant Extracts, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6, 32-36.
- Jambrak A R, Mason T J, Paniwnyk L, Lelas V, 2007, Accelerated Drying of Button Mushrooms, Brussels Sprouts and Cauliflower by Applying Power Ultrasound and Its Rehydration Properties, *Journal of Food Engineering*, 81, 88-97.
- Jukic M, Burcul F, Carev I, Politeo O, Milos M, 2012, Screening for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Selected Plants from Croatia, *Natural Product Research*, 26, 1703-1707.
- Kakkar S, Bais S, 2014, A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential, *The Scientific World Journal*, 2014, 952943.
- Kapewangolo P, Omolo J J, Bruwer R, Fonteh P, Meyer D, 2015, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Ocimum labiatum* Extract and Isolated Labdane Diterpenoid, *Journal of Inflammation*, 12, 1-13.
- Karahan F, Ozyigit I I, Saracoglu I A, Yalcin I E, Ozyigit A H, Ilcim A, 2020, Heavy Metal Levels and Mineral Nutrient Status in Different Parts of Various Medicinal Plants Collected from Eastern Mediterranean Region of Turkey, *Biological Trace Element Research*, 197, 316-329.
- Kasap M, 2024, *Paliurus spina-christi* Bitkisinin Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi.
- Kataoka H, 2019, Pharmaceutical Analysis | Sample Preparation, *Encyclopedia of Analytical Science*, Academic Press, 231-255.
- Kaushik N, Oh H, Lim Y, Kumar Kaushik N, Nguyen L N, Choi E H, vd., 2021, Screening of Hibiscus and Cinnamomum Plants and Identification of Major Phytometabolites in Potential Plant Extracts Responsible for Apoptosis Induction in Skin Melanoma and Lung Adenocarcinoma Cells, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 779393.
- Kayalar E, Küçük S, Göğür F, 2016, Determination of Antioxidant Activity and Phenolic Profile of *Paliurus spina-christi* P. Mill., *Clinical and Experimental Pharmacology*, 6.
- Khare S, Singh N B, Singh A, Hussain I, Niharika K, Yadav V, vd., 2020, Plant Secondary Metabolites Synthesis and Their Regulations Under Biotic and Abiotic Constraints, *Journal of Plant Biology*, 63, 203-216.

- Kırca A, Arslan E, 2008, Türkiye'den Kayıtlı Örneklerde Antioksidan Aktivite ve Toplam Fenolik İçerik, *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2038-2046.
- Kingston H M, Jassie L B, 1988, *Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice*, American Chemical Society, Washington DC.
- Kunle O F, Egharevba H O, Ahmadu P O, 2012, Standardization of Herbal Medicines: A Review, *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4, 101-112.
- Küçükgünay S, Ergün D, Ergün F, 2025, *Paliurus spina-christi* Bitki Tohumlarının Fitokimyasal Özelliklerinin ve In Vivo Diüretik Aktivitesinin Araştırılması, *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 22, 806-815.
- Lie H, Chen B, Yao S, 2005, Application of Ultrasonic Technique for Extracting Chlorogenic Acid from *Eucommia ulmoides* Oliv., *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, 295-300.
- Liu Y, Zhang H, Wang X, Chen J, 2025, Inflammation and Wound Healing: A Comprehensive Overview, *Military Medical Research*, 12, 35.
- Liu Z, Benard O, Syeda M M, Schuster V L, Chi Y, 2015, Inhibition of Prostaglandin Transporter (PGT) Promotes Perfusion and Vascularization and Accelerates Wound Healing in Non-Diabetic and Diabetic Rats, *PLoS ONE*, 10, e0133615.
- Mahajan M, Kuiry R, Pal P K, 2020, Understanding the Consequence of Environmental Stress for Accumulation of Secondary Metabolites in Medicinal and Aromatic Plants.
- Majekodunmi S O, 2015, Review of Extraction of Medicinal Plants for Pharmaceutical Research, *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3, 521-527.
- Malkoç M, Kara Y, Özkök A, Ertürk Ö, Kolaylı S, 2019, Karaçalı (*Paliurus spina-christi* Mill.) Balının Karakteristik Özellikleri, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 19, 69-81.
- Masango P, 2005, Cleaner Production of Essential Oils by Steam Distillation, *Journal of Cleaner Production*, 13, 833-839.
- Mason T J, Paniwnyk L, Lorimer J P, 1996, The Uses of Ultrasound in Food Technology, *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, S253-S260.
- Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N, 2017, Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources, *Agronomy*, 7, 47.

- Mendez A S L, Garcia V C, Da Silva F E B, Paula F R, 2015, Identification and Quantification Methodologies for Active Substances in Natural Products: The Role of Chromatographic and Spectroscopic Techniques, *Current Chromatography*, 2, 2-19.
- Merecz-Sadowska A, Sitarek P, Kucharska E, Kowalczyk T, Zajdel K, Cegliński T, vd., 2021, Antioxidant Properties of Plant-Derived Phenolic Compounds and Their Effect on Skin Fibroblast Cells, *Antioxidants*, 10, 726.
- Nazemoroaya Z, Sarafbidabad M, Mahdiah A, Zeini D, Nyström B, 2022, Use of Saponinosomes from *Ziziphus spina-christi* as Anticancer Drug Carriers, *ACS Omega*, 7(32), 28421-28433.
- Nowosad K, Sujka M, Pankiewicz U, Kowalski R, 2021, The Application of PEF Technology in Food Processing and Human Nutrition, *Journal of Food Science and Technology*, 58, 397-411.
- Oğuz F, Çamlı Pulat Ç, İlhan S, Atmaca H, 2022, GC-MS Analysis and Potential Apoptotic Effect of *Paliurus spina-christi* Mill. Leaf and Flower Extracts Against Breast Cancer Cells, *Sakarya University Journal of Science*, 26, 357-364.
- Ouweltjes W, Krachler M, Alvarez-Sarandes R, Van Winckel S, 2015, Challenges in the Quality Assurance of Elemental and Isotopic Analyses in the Nuclear Domain Benefitting from High Resolution ICP-OES and Sector Field ICP-MS, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 304, 1201–1209.
- Özcan M M, Al Juhaimi F, Uslu N, Ghafoor K, Babiker E E, 2019, ICP-OES Determination of Essential and Non-Essential Elements in *Moringa oleifera*, *Salvia hispanica* and *Linum usitatissimum*, *Scientific African*, 5, e00149.
- Pandey A, Tripathi S, 2014, Concept of Standardization, Extraction, and Pre-Phytochemical Screening Strategies for Herbal Drug, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2, 115-119.
- Peña O A, Martin P, 2024, Cellular and Molecular Mechanisms of Skin Wound Healing, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25, 599-616.
- Poór P, 2020, Effects of Salicylic Acid on the Metabolism of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Plants, *Biomolecules*, 10, 341.
- Popova M, Bankova V, 2023, Contemporary Methods for the Extraction and Isolation of Natural Products, *BMC Chemistry*, 17, 68.

- Puri M, Sharma D, Barrow C J, 2012, Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives from Plants, *Trends in Biotechnology*, 30, 37-44.
- Rahman M M, Rahaman M S, Islam M R, Rahman F, Mithi F M, Alqahtani T, vd., 2021, Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects, *Molecules*, 27, 233.
- Ranjha M, Kanwal R, Shafique B, Arshad R N, Irfan S, Kieliszek M, vd., 2021, A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents, *Molecules*, 26, 4893.
- Redding A, Grabocka E, 2023, Stress Granules and Hormetic Adaptation of Cancer, *Trends in Cancer*, 9, 995-1005.
- Rocha-Guzmán N E, Gallegos-Infante J A, González-Laredo R F, Ramos-Gómez M, Rodríguez-Muñoz M E, Reynoso-Camacho R, vd., 2007, Antioxidant Activity of Phenolic Compounds of Oregano (*Lippia graveolens* HBK), *Food Chemistry*, 102, 330-335.
- Rodino S, Butu M, 2019, Herbal Extracts—New Trends in Functional and Medicinal Beverages, *Functional and Medicinal Beverages: Volume 11. The Science of Beverages*, Academic Press, 73-108.
- Sahraoui N, Vian M A, Bornard I, Boutekedjiret C, Chemat F, 2011, Improved Microwave Steam Distillation of Essential Oil from Orange Peel, *Journal of Chromatography A*, 1218, 3353-3359.
- Santos B L M, Oliveira M C, Silva J C J, 2024, Recent Advances in the Determination of Major and Trace Elements in Plants Using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, *Molecules*, 29(13), 3169.
- Senila M, 2024, Recent Advances in the Determination of Major and Trace Elements in Plants Using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, *Molecules*, 29, Article number 3169.
- Shanmugam K R, Shanmugam B, Subbaiah G V, Ravi S, Reddy K S, 2021, Medicinal Plants and Bioactive Compounds for Diabetes Management: Important Advances in Drug Discovery, *Current Pharmaceutical Design*, 27, 763-774.
- Sicker D, Zeller K P, Siehl H U, Berger S, 2019, *Natural Products: Isolation, Structure Elucidation, History*, John Wiley and Sons.

- Singh S, Gupta P, Meena A, Luqman S, 2020, Acacetin, a Flavone with Diverse Therapeutic Potential in Cancer, Inflammation, Infections and Other Metabolic Disorders, Food and Chemical Toxicology, 145, 111708.
- Skoog D A, West D M, Holler F J, Crouch S R, 2014, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th Ed., Cengage Learning.
- Son J H, Kim S Y, Jang H H, Lee S N, Ahn K J, 2018, Protective Effect of Protocatechuic Acid Against Inflammatory Stress Induced in Human Dermal Fibroblasts, Biomed Dermatology, 2, 9.
- Sousa A S, Araújo-Rodrigues H, Pintado M E, 2023, The Health-Promoting Potential of Edible Mushroom Proteins, Current Pharmaceutical Design, 29, 804-823.
- Spietelun A, Kloskowski A, Chrzanowski W, Namieśnik J, 2013, Understanding Solid-Phase Microextraction: Key Factors Influencing the Extraction Process and Trends in Improving the Technique, Chemical Reviews, 113, 1667-1685.
- Stalikas C D, 2007, Extraction, Separation, and Detection Methods for Phenolic Acids and Flavonoids, Journal of Separation Science, 30, 3268-3295.
- Takım K, 2021, Bioactive Component Analysis and Investigation of Antidiabetic Effect of Jerusalem Thorn (*Paliurus spina-christi*) Fruits in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin, Journal of Ethnopharmacology, 264, 113263.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, 2005, Antimicrobial and Antioxidative Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia multicaulis*, Food Chemistry, 90, 193-201.
- Tiwari B K, 2015, Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology, Trends in Analytical Chemistry, 71, 100-109.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H, 2011, Phytochemical Screening and Extraction: A Review, International Pharmaceutical Sciences, 1, 98-106.
- Tomlinson T R, Akerele O, 2015, Medicinal Plants: Their Role in Health and Biodiversity, University of Pennsylvania Press, Philadelphia.
- Tongnuanchan P, Benjakul S, 2014, Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation, Journal of Food Science, 79, R1231-R1249.
- Uddin M S, Ferdosh S, Haque Akanda M J, Ghafoor K, Rukshana A H, Ali M E, vd., 2018, Techniques for the Extraction of Phytosterols and Their Benefits in Human Health: A Review, Separation Science and Technology, 53, 2206-2223.

- Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Sordini B, Lorefice A, vd., 2019, Extra-Virgin Olive Oil Extracted Using Pulsed Electric Field Technology: Cultivar Impact on Oil Yield and Quality, *Frontiers in Nutrition*, 6, 134.
- Vian M A, Fernandez X, Visinoni F, Chemat F, 2008, Microwave Hydrodiffusion and Gravity, a New Technique for Extraction of Essential Oils, *Journal of Chromatography A*, 1190, 14-17.
- Vieira-da-Silva B, Barreira J C M, Oliveira M B P P, 2016, Natural Phytochemicals and Probiotics as Bioactive Ingredients for Functional Foods: Extraction, Biochemistry and Protected-Delivery Technologies, *Trends in Food Science and Technology*, 50, 144-158.
- Vinodkumar T, Dinesh T, Ghosh K, Ilavarasan R, 2025, A Comprehensive Analysis of Minerals in *Moringa oleifera* Leaves, Seeds, Stem Bark and Ash Using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES), *Discover Applied Sciences*, 7, Article number 115.
- Weggler B A, Gruber B, Teehan P, Jaramillo R, Dorman F L, 2020, Inlets and Sampling, *Separation Science and Technology*, 12, 141-203, Academic Press.
- Wu C, Yan J, Li W, 2022, Acacetin as a Potential Protective Compound Against Cardiovascular Diseases, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 6265198.
- Yang R F, Geng L L, Lu H Q, Fan X D, 2017, Ultrasound-Synergized Electrostatic Field Extraction of Total Flavonoids from *Hemerocallis citrina* Baroni, *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 571-579.
- Yılmaz M A, 2020, Simultaneous Quantitative Screening of 53 Phytochemicals in 33 Species of Medicinal and Aromatic Plants: A Detailed, Robust and Comprehensive LC-MS/MS Method Validation, *Industrial Crops and Products*, 149, 112347.
- Yokuş B, Çakır D Ü, 2012, Kanser Biyokimyası, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 7-18.
- Yolci-Ömeroğlu P, Acoğlu B, Özdal T, Tamer C E, Çopur Ö U, 2019, Extraction Techniques for Plant-Based Bio-Active Compounds, *Natural Bio-Active Compounds, Volume 2: Chemistry, Pharmacology and Health Care Practices*, Springer, 465-492.

- Young J L, Dean D A, 2015, Electroporation-Mediated Gene Delivery, *Advances in Genetics*, 89, 49-88.
- Yuca H, Karakaya S, Güvenalp Z, 2023, Anatomy of *Paliurus spina-christi* Mill. (Blackthorn) (Rhamnaceae), *Pharmata*, 3, 78-83.
- Zahari N A A R, Chong G H, Abdullah L C, Chua B L, 2020, Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Process on Thymol Concentration from *Plectranthus amboinicus* Leaves: Kinetic Modeling and Optimization, *Processes*, 8, 322.
- Zengin G, Fernández-Ochoa Á, Cádiz-Gurrea M D L L, Leyva-Jiménez F J, Segura-Carretero A, Elbasan F, vd., 2023, Phytochemical Profile and Biological Activities of Different Extracts of Three Parts of *Paliurus spina-christi*: A Linkage Between Structure and Ability, *Antioxidants*, 12, 255.
- Zhang Q W, Lin L G, Ye W C, 2018, Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33, 20-35.
- Zhang S, Gai Z, Gui T, Chen J, Chen Q, Li Y, 2021, Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde: Old Wine in a New Bottle, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 6139308.
- Zhou Z, Li T, Qin H, Wang X, He S, Fan Z, vd., 2025, Acacetin as a Natural Cardiovascular Therapeutic: Mechanisms and Preclinical Evidence, *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1493981.
- Zor M, Aydin S, Güner N D, Başaran N, Başaran A A, 2017, Antigenotoxic Properties of *Paliurus spina christi* Mill Fruits and Their Active Compounds, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 229.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma Beyza ÇAKAL
Doğum Yeri ve Tarihi : Afyonkarahisar 27.08.2001
Yabancı Dili :
İletişim (Telefon / e-posta) : 05425261310 / bcakal702@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Osmangazi Anadolu Lisesi (2014-2019)
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Kimya Böl.,(2019-2023)
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya ABD, (2023-2026)

Yayınları (SCI ve diğer)

:
Aksoy L, Hazman Ö, Yılmaz MA, Büyükben A, Kargioğlu
M, Çakal FB, Gümüş B, vd., 2025, Elucidating of the
Anticarcinogenic Effects, Antioxidative Features and
Phytochemical Components of a Newly Identified Species
Aubrieta alshehbazii Dönmez, Uğurlu & M.A. Koch, KSU
Journal of Agriculture and Nature, 28(3), 650–660