



**EJBACS**

**Eurasian Journal of  
Biological and Chemical Sciences  
(Eurasian J. Bio. Chem. Sci.)**



*Cilt:1    Volume: 1    Year: 2018*





# EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

**Cilt: 1    Volume: 1    Year: 2018**

**Published Biannually**

### **Corresponding Address**

Gaziantep University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Gaziantep, Turkey

E-mail: [eurasianbiochemjournal@gmail.com](mailto:eurasianbiochemjournal@gmail.com) / [mtdogan1@gmail.com](mailto:mtdogan1@gmail.com)

Web: <http://dergipark.gov.tr/ejbc>

### **Editor in Chief**

Assoc. Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

### **Editor (Associate)**

Dr. Muhammet DOĞAN

### **Editorial Board**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Prof. Dr. Anna PEKSA           | Wrocław University, Poland                                    |
| Prof. Dr. Elif LOLOĞLU         | Gazi University, Turkey                                       |
| Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL        | İnönü University, Turkey                                      |
| Prof. Dr. Issa SHARİFPOUR      | Iranian Fisheries Research Organization, Iran                 |
| Prof. Dr. İsmet YILMAZ         | İnönü University, Turkey                                      |
| Prof. Dr. Osman GÜLNAZ         | Cukurova University, Turkey                                   |
| Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR | Adnan Menderes University, Turkey                             |
| Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU     | Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey                      |
| Assoc. Prof. Dr. Elif ÖZTETİK  | Eskisehir Technical University, Turkey                        |
| Assoc. Prof. Dr. Erol ATAY     | Hatay Mustafa Kemal University, Turkey                        |
| Assoc. Prof. Dr. Şenay UĞUR    | Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey                      |
| Assoc. Prof. Dr. Utku AVCI     | Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey                       |
| Dr. Ardalan PASDARAN           | Shiraz University, Iran.                                      |
| Dr. Eva URGEOVÁ                | The University of St. Cyril and Methodius of Trnava, Slovakia |
| Dr. Mustafa PEHLİVAN           | Gaziantep University, Turkey                                  |
| Dr. Viera HORVATHOVA           | Slovak Medical University, Slovakia                           |

Dr. Demet DOĞAN

### **Language Editor**

Gaziantep University, Turkey

### **Technical Editor**

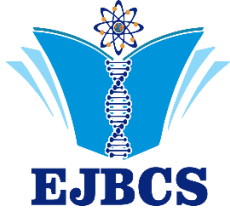
Dr. Mustafa SEVİNDİK

Owner / Publisher

Dr. Muhammet DOĞAN

This journal is peer-reviewed and published twice (June, December) a year.

All responsibility of the articles belongs to the authors.



## Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences



Journal homepage: [www.dergipark.gov.tr/ejbc](http://www.dergipark.gov.tr/ejbc)

### Characterization of the rheology of polymer/bioactive glass solutions and fabrication of nanocomposite materials

Melek Erol Taygun<sup>1\*</sup>, Gül Hatinoğlu<sup>2</sup>, Pelin Öztürk<sup>3</sup>, Nuray Yerli<sup>4</sup>, Sadriye Küçükbayrak<sup>5</sup>  
*İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye*

\*Corresponding author : [erolm@itu.edu.tr](mailto:erolm@itu.edu.tr)  
Orcid No: 0000-0002-5938-3101

**Abstract:** Nanotechnology is used in the fields of physics, chemistry, medicine, electronics, computers, materials, textiles and medicine, as well as in food and agriculture. In nanotechnological studies, nanofibers are defined as structures with diameters below 100 nanometers. Nanofibers can be produced by different methods and among these methods, electrospinning is the most common production technique. Nanofibers, which are produced by this technique, are widely used in applications such as food and tissue engineering. Synthetic and natural biopolymers are commonly used in the fabrication of nanofibers. The aim of this study is to produce polymer/glass nanocomposite material which can be used in different fields such as tissue engineering or food engineering by using electrospinning method. For this purpose, rheological characterization of the polymer solutions has been performed at the first stage. The effects of acetic acid and formic acid concentrations on rheological properties of gelatin/polycaprolactone (PCL) solution and the effect of alginate concentration on rheological properties of gelatin/PCL/alginate solution were investigated. Furthermore, the rheological properties of the gelatin/PCL and gelatin/PCL/alginate solution with the addition of bioactive glass were studied. Gelatin/PCL, gelatin/PCL/alginate solutions and the bioactive glass doped gelatin/PCL and gelatin/PCL/alginate solutions were resulted to be Newtonian type fluids. After the rheological characterization of the solutions, nano-composite materials were fabricated by electrospinning method and the morphology of the obtained materials was investigated by scanning electron microscopy (SEM). It was resulted that the gelatin/PCL nanocomposite, which was formed by using 100% formic acid without bioactive glass, is favorable to be used as a food packaging material. Accordingly, the average diameter of selected nanofiber is 315 nm. Bioactive glass doped nano-materials can be good candidates for bone tissue engineering applications. For this purpose, gelatin/PCL nanofiber containing 5% bioactive glass by weight was chosen. The average diameter of the selected nanofiber is 480 nm. As a result of this study, the produced nanofibers can be used in both bone tissue engineering and food engineering applications.

**Keywords:** Reology, Polymer, Bioactive glass, Nanocomposite

#### *Polimer/Biyoaktif Cam Çözeltilerinin Reolojik Karakterizasyonlarının Yapılması ve Nanokompozit Malzeme Üretimi*

**Özet:** Nanoteknoloji fizik, kimya, ilaç, elektronik, bilgisayar, malzeme, tekstil ve tıp alanında kullanıldığı gibi, gıda ve ziraat alanlarında da uygulanmaktadır. Nanoteknolojik çalışmalarda nanolifler, çapları 100 nanometrenin altında olan yapılar olarak ifade edilmektedir. Nanolifler, farklı yöntemler ile üretilebilmektedir. En yaygın olan yöntem elektrospinning (elektrodöndürme) yöntemi ile nanolif üretim tekniğidir. Bu teknik ile üretilen nanolifler, gıda ve doku mühendisliği gibi uygulama alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanolif üretiminde yaygın olarak sentetik polimerler ve doğal biyopolimerler kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, elektrospinning yönteminin uygulanması ile doku mühendisliği veya gıda mühendisliği gibi farklı alanlarda kullanılabilir polimer/cam nanokompozit malzeme üretiminin gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla, öncelikle hazırlanacak polimer çözeltilerinin reolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Gerçekleştirilen deneyler ile jelatin/Polikaprolakton (PCL) çözeltisinde çözücü olarak kullanılan asetik asit ve formik asitin derişiminin, jelatin/PCL/aljinat çözeltisinde aljinat derişiminin ve jelatin/PCL ile jelatin/PCL/aljinat çözeltilerine biyoaktif cam ilavesinin reolojik özelliklere etkisi incelenmiştir. Jelatin/PCL, Jelatin/PCL/aljinat çözeltileri, biyoaktif cam ilaveli jelatin/PCL ve jelatin/PCL/Aljinat çözeltilerinin Newtonian tipi akışkan olduğu saptanmıştır. Reolojik karakterizasyonu yapılan bu çözeltilerin elektrospinning cihazı yardımı ile nanokompozit malzeme üretimi gerçekleştirilmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) çalışmaları ile morfolojileri incelenmiştir. Gıda ambalaj maddesi olarak kullanımı için, biyoaktif cam ilavesiz %100 formik asit kullanılarak oluşturulan jelatin/PCL nanokompozit yapının en uygun olduğuna karar verilmiştir. Buna göre seçilen nanolifin ortalama çapı 315 nm'dir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere biyoaktif cam ilaveli numuneler tercih edilmiştir. Bu amaç için, ağırlıkça %5 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL nanolifi seçilmiştir. Seçilen nanolifin ortalama çapı 480 nm'dir. Yapılan çalışmalar sonucunda, üretilen nanoliflerin hem kemik doku mühendisliği hem de gıda mühendisliği alanlarında kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Reoloji, Polimer, Biyoaktif Cam, Nanokompozit

## 1. Giriş

Nanolif, çapları 100 nanometreden daha küçük olan lifler için kullanılan bir terimdir. Nanolifler, özel uygulamalara sahip malzemelerin mikro ve nano yapısal özellikleri nedeniyle, son yıllarda giderek önem kazanan bir araştırma konusu haline gelmişlerdir. Nanolifler, yüksek gözeneklilik, gözenek boyutlarının kontrol imkanı, yumuşak ve iyi bir tutum, çok yüksek yüzey alanı ve düşük özgül ağırlık göstermesi ile pek çok uygulama alanında avantaj sağlamaktadır. Nanoliflerle ilgili seramik, elektronik, sensör, doku mühendisliği, biyoloji ve tıp alanında çalışmalar yapılmaktadır. Nanoliflerin tarım ve gıda endüstrisinde kullanımı diğer alanlara göre yenidir (Loh ve ÇA, 2010).

Doku mühendisliği; kimya, fizik, mühendislik ve yaşam bilimleri yaklaşımıyla biyomalzemeler-hücreler-biyosinyaller ve biyoreaktörleri kullanarak, hasara uğramış dokunun biyolojik fonksiyonlarının geri kazandırılmasına ya da, tamamen bir doku veya organın yerini alabilecek özelliklere sahip eşleniklerinin üretilmesine yönelik çalışmaların gerçekleştirildiği disiplinler arası bir bilim dalıdır (Armentano ve ÇA, 2010). Kalıcı implant ihtiyacını ortadan kaldıran doku mühendisliği, hasarlı insan dokusunun onarımı ve yenilenmesinde alternatif bir yaklaşım sergilemektedir (Zhu ve Kaskel, 2009). Esas amaç, hasarlı dokuya biyolojik ve mekanik özelliklerini geri kazandırmaktır. Bu yaklaşımın avantajı, gerekli operasyon sayısının azalması ve hastanın iyileşme süresinin kısılmasıdır (Rezwan ve ÇA, 2006).

Kemik hücreleri, vücudun yenileyici mekanizmasını harekete geçiren malzemelere ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla, kemik mineralinin yapısına benzeyen, kemiğe bağlanan ve bazı durumlarda kemik gelişimini uyararak için, kemik hücrelerindeki genleri aktive eden yapı iskeleleri kullanılarak kemik yenilenebilir. Yapı iskeleleri, yerine geçecekleri organın yapısını ve özelliklerini taklit edecek şekilde tasarlanmaktadır (Jones ve Hench, 2003). Kemiğin hücre dışı matrisi, organik ve inorganik maddelerden oluşan bir nanokompozit olduğundan; kemiğin fiziksel, kimyasal ve işlevsel yapısını taklit edebilecek nano boyutlu, gözenekli, lifsi ve kompozit yapıları biyomalzemelerin araştırılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Gıda endüstrisinde; gıda bileşenleri içeren nanoliflerin temel kullanım amaçları enzim, DNA, vitamin, antioksidan gibi maddelerin taşınmasının gerçekleştirilmesidir. Nanolif yapımında kullanılan başlıca bileşenler; kitosan, aljinat, selüloz, kolajen, jelatin, buğday gluteni, yumurta kabuğu proteinleri, yumurta albümini ve bazı enzimlerdir (lipaz, katalaz, üreaz) (Moraru ve ÇA, 2003). Nanolifler tat verici ve antioksidan bileşenlerinin enkapsülasyonunda kullanılabilir. Bu şekilde bileşenlerin ürünler içindeki derişimlerinin azaltılarak etkinliklerinin artırılması hedeflenmektedir. Enkapsülasyon işleminde besleme çözeltisi bileşenlerinin nanolif yapısına dikkat edilmelidir. Gıdalarda uygun stabilitenin sağlanabilmesi gıdanın bileşimi, tane boyutu ve dağılımı ile ilgilidir. Emülsiyonlar, yağ içeriği yüksek olan bazı gıdalar, sineresis (su ayrılması)

problemi olan gıdalar için stabilite problemi tane boyutu açısından incelenecek olunursa, gıda bileşenlerinden elde edilen nanoliflerin kullanılması ile bu sorun giderilebilir (Moraru ve ÇA, 2003).

Elektrospinning yöntemi; lifsi yapıdaki nano boyutlu gözenekli malzemelerin üretilmesine ve geniş bir malzeme aralığında çalışılmasına olanak tanınması, pahalı ekipmanlara gereksinim duyulmaması ve işletme maliyetlerinin düşük olması gibi çeşitli üstünlükleri nedeniyle dikkat çekmektedir (Gao ve ÇA, 2013). Bu nedenle; bu çalışmada, elektrospinning yöntemi kullanılarak nanokompozit yapıda bir malzeme üretilmesi ve kemik doku mühendisliği ile gıda mühendisliği uygulamalarında kullanıma potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metod

Deneylerde jelatin/PCL çözelti sisteminde çözücü olarak kullanılan asetik asit ve formik asitin derişiminin, jelatin/PCL/aljinat çözeltisinde aljinat derişiminin, jelatin/PCL ve jelatin/PCL/aljinat çözeltilerine biyoaktif cam ilavesinin reolojik özelliklere etkisi incelenmiştir. Reolojik özelliklerin incelenmesi sonucunda, elektrospinning yöntemiyle nanolif üretimi için kullanılabilir en uygun çözelti belirlenmiştir. Çalışmaların ikinci aşamasında, seçilen çözeltiler ile yapı iskelesi ve gıda ambalaj maddesi için kullanılabilir nanolif üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çözücü derişiminin reolojik özelliklere etkisini belirleyebilmek için, Jelatin ve PCL biyopolimerleri %50 asetik asit, %50 formik asit, %25 asetik asit %75 formik asit ve %100 formik asit oranlarında çözülerek polimer çözeltileri elde edilmiştir. Elde edilen jelatin ve PCL numuneleri ağırlıkça %70 jelatin, %30 PCL içerecek şekilde karıştırılarak PCL/jelatin çözeltileri oluşturulmuştur. Bu çözeltilerin reolojik karakterizasyonu, RM180 Rheomat markalı reometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Jelatin/PCL/aljinat sisteminde, aljinat derişiminin reolojik özelliklere etkisini inceleyebilmek için, jelatin ve PCL biyopolimerleri %50 asetik asit, %50 formik asit oranlarında çözülerek numuneler elde edilmiştir. Aljinat biyopolimeri ise, distile su kullanılarak çözülmüştür. Bu işlemler sonunda, %4 ve %8 aljinat derişimine sahip jelatin/PCL/aljinat çözeltileri üretilmiştir. Oluşturulan bu çözeltilerin reolojik özellikleri belirlenmiştir.

Biyoaktif cam (45S5) derişiminin reolojik özelliklere etkisini incelemek için, öncelikle, ağırlıkça %45 SiO<sub>2</sub>, %24.5 Na<sub>2</sub>O, %24.5 CaO ve %6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> içeren biyoaktif cam numuneleri tane boyutu 45 µm'nin altına incek şekilde öğütme işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla, cam tozları agat havanda öğütülüp, 45 µm'lik elekten geçirilerek istenilen boyuta ulaşılmıştır. Daha sonra, %4 aljinat içeren jelatin/PCL/aljinat ve jelatin/PCL çözeltilerine biyocam ilave edilmiş ve %5 ile %10 biyocam derişimine sahip çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin reolojik karakterizasyonu yapılmıştır.

Çözeltilerin reolojik özellikleri ölçüldükten sonra, çözeltilerin akış tipi belirlenmiştir. Yapı iskelesi ve gıda ambalajında kullanılmak üzere nanolif üretimi için elektrospinning cihazı (Nanospinner 24 Touch, Inovenso Co.) kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilere 20 kV'luk gerilim, 10 cm'lik açıklık ve 3 ml/saat'lik akış hızı kullanılarak elektrospinning işlemi uygulanmıştır. Üretilen nanokompozit lif numuneleri 37°C'de 2 gün süreyle etüvde bekletilerek çözücü kalıntılarının giderilmesi sağlanmıştır. Elde edilen nanoliflerin morfolojileri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı (Zeiss Evo® Ma 10) kullanılarak incelenmiştir.

### 3. Sonuçlar ve Tartışma

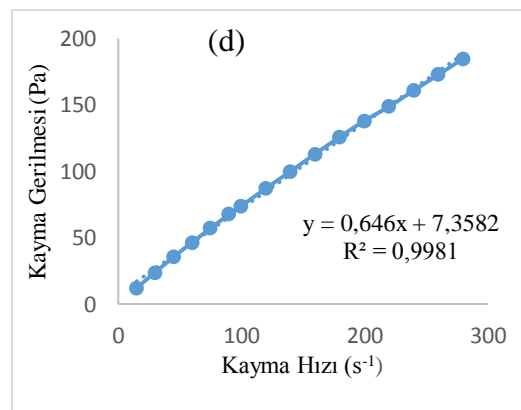
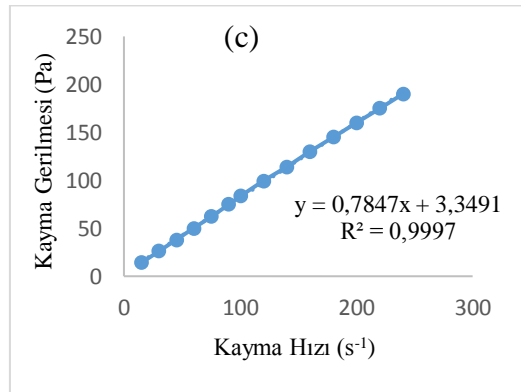
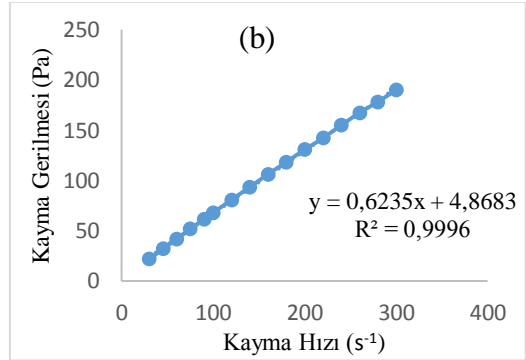
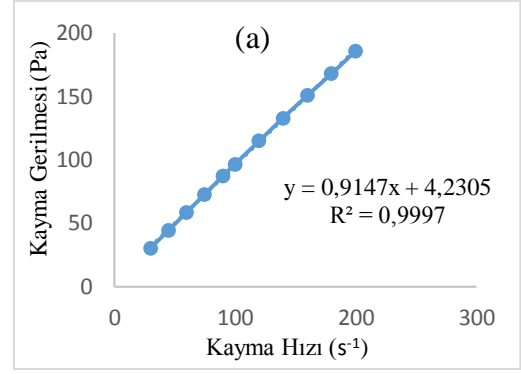
Çözücü olarak sadece asetik asit ve formik asit kullanılarak elde edilen jelatin/PCL çözeltisinin reolojik özellikleri ölçülmüş ve akış tipini belirlemek için, Şekil 1(a)'da verilen kayma hızına karşılık kayma gerilmesi grafiği hazırlanmıştır. Şekil 1(a)'dan da görüldüğü gibi, çözelti Newton tipi bir akışkandır. Farklı çözücüler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda; çözücünün akışkan tipini değiştirmedikleri ve jelatin/PCL polimer çözeltisinin Newton tipi bir akışkan olduğu belirlenmiştir. Ancak, formik asit miktarının artması ile birlikte, polimer çözeltisinin viskozitesinin azaldığı saptanmıştır.

Aljinat içeren jelatin/PCL/aljinat çözeltisinin reolojik özellikleri ölçülmüş ve akış tipini belirlemek için, Şekil 1(b)'de verilen kayma hızına karşılık kayma gerilmesi grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen grafikten, aljinat içeren polimer çözeltisinin de Newton tipi bir akışkan olduğu saptanmıştır. Aljinat miktarının artması, polimer çözeltisinin akışkan tipini değiştirmemiştir. Ancak, polimer çözeltisinin viskozitesi aljinat miktarının artması ile birlikte azalmıştır.

Biyoaktif cam içeren jelatin/PCL/biyoaktif cam çözeltisinin akış tipini belirlemek için hazırlanan grafik Şekil 1(c)'de verilmiştir. Şekil 1(c)'de görülen grafik incelendiğinde, polimer çözeltisinin Newton tipi bir akışkan olduğu saptanmıştır. Jelatin/PCL polimer çözeltisine cam ilavesi de akışkan tipini değiştirmemiş ancak, çözeltinin viskozitesini belirgin bir şekilde artırmıştır.

Biyoaktif cam içeren jelatin/PCL/aljinat/biyoaktif cam çözeltisinin reolojik özellikleri ölçülmüştür. Akış tipini belirlemek amacıyla çizilen kayma hızına karşılık kayma gerilmesi grafiği Şekil 1(d)'de görülmektedir. Biyoaktif cam katkılı jelatin/PCL polimer çözeltisinde olduğu gibi, bu çözeltinin de Newton tipi bir akışkan olduğu belirlenmiştir. Biyoaktif cam katkısının, çözeltinin viskozitesini çok fazla değiştirmedikleri gözlenmiştir.

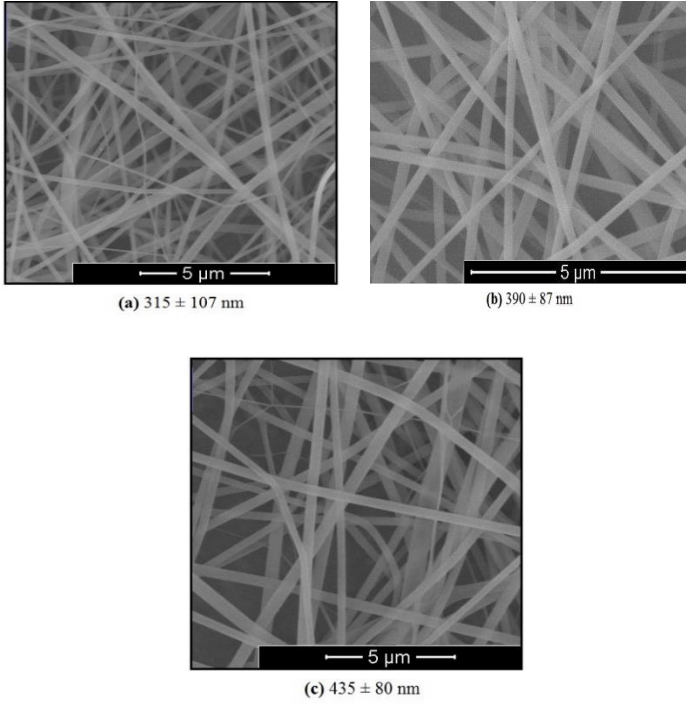
SEM analizleri, nanoliflerin farklı ölçekte büyütmelele morfolojilerinin incelenmesini sağlamaktadır. Jelatin/PCL çözeltisinden elektrospinning işleminden sonra elde edilen numunelerin SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmektedir. Şekil 2 (a)'dan da görüldüğü gibi, cam ilavesi içermeyen ve hacimce %100 formik asidin kullanıldığı jelatin/PCL numunesinde ince bir nanolif yapı oluşmuştur. Oluşan nanoliflerin çaplarının ortalama 315 nm olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 1.** Çözeltilere ait kayma hızı-kayma gerilmesi grafikleri a) hacimce %50 asetik asit - %50 formik asit içeren jelatin/ PCL çözeltisi, b) ağırlıkça %4 aljinat çözeltisi, c) ağırlıkça %5 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL/biyoaktif cam çözeltisi, d) ağırlıkça %10 biyoaktif cam içeren PCL/jelatin/aljinat/biyoaktif cam çözeltisi



Nanoliflerin yapı içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür. Şekil 2 (b)'de biyoaktif cam içermeyen, hacimce %25 asetik asit kullanılarak elde edilen jelatin/PCL numunesinin nano lif yapı görüntüsü verilmiştir. Bu numunedeki ortalama nanolif çapının 390 nm olduğu tespit edilmiştir. Şekil 2 (c)'de ise, hacimce %50 asetik asit kullanılarak oluşturulmuş jelatin/PCL numunesinin nanolif yapısı görülmektedir. %50 asetik asit kullanıldığı durumda oluşan nanoliflerin ortalama çapları 435 nm'dir.

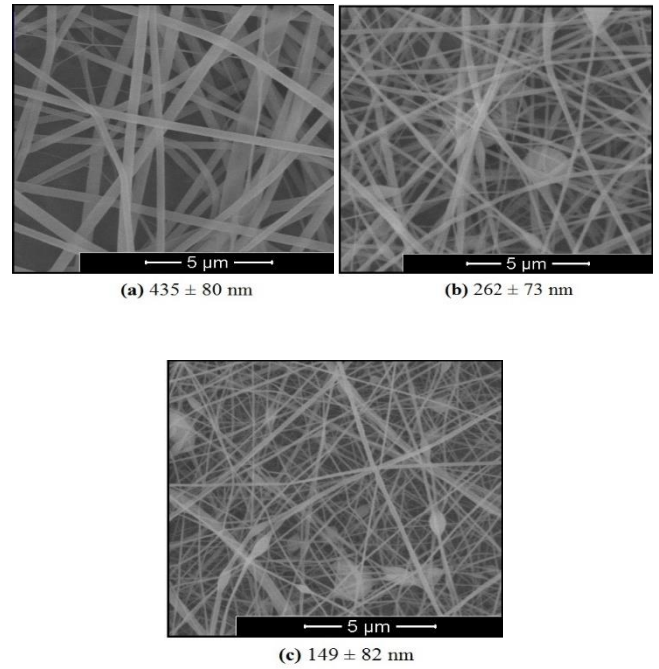


**Şekil 2.** Jelatin/PCL nanolifinin SEM Görüntüsü (a) hacimce %100 formik asit, (b) hacimce %25 asetik asit ve (c) hacimce %50 asetik asit

Hacimce 1:1 oranda asetik asit-formik asit kullanıldığı durumda, diğer numunelere oranla daha kalın nanolif yapısı oluşmuştur. Hacimce %100 formik asit kullanıldığı durumda daha yoğun ve homojen bir lif dağılırken, hacimce %25 ve %50 asetik asit kullanıldığı durumda daha az bir nanolif oluşumu gözlenmiştir. SEM çalışmaları sonucunda, hacimce %100 formik asit içeren jelatin/PCL numunesinin en düzgün nanolif yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Elektrospinning çalışmalarında, çözeltinin viskozitesi düzgün bir nanolif yapısı elde edebilmek için en önemli parametrelerden birisidir. Hacimce %100 formik asit içeren jelatin/PCL numunesinin viskozitesinin 0.65-0.70 Pa.s aralığında değiştiği belirlenmiştir. Bu viskozite aralığının nanolif üretimi için uygun olduğu saptanmıştır.

Aljinat içermeyen numunenin SEM fotoğrafı Şekil 3 (a)'da görülmektedir. Nanoliflerin ortalama çapları 435 nm'dir. Şekil 3(b)'de ağırlıkça %4 aljinat kullanılarak oluşturulan jelatin/PCL/aljinat numunesinin nanolif yapısı görülmektedir. SEM çalışmaları sonucunda, numunede oluşan nanolif yapısının yanı sıra aljinat kullanımından kaynaklanan boncuksu yapılar da belirlenmiştir. Ayrıca, liflerin üzerlerinde kümelenmiş olarak görünen boncuksu

yapılar düzgün nanolif yapısında bozulmalara yol açmıştır. Nanoliflerin çapları ortalama 262 nm'dir. Şekil 3 (c)'de ağırlıkça %8 aljinat kullanıldığı durumda elde edilen jelatin/PCL/aljinat numunesinin SEM fotoğrafı görülmektedir. SEM çalışmalarına göre ağırlıkça %8 aljinat polimeri kullanıldığı durumda liflerin arasında daha fazla boncuksu yapı oluşmuştur. Bu numunede daha ince nanolifler oluşmuş, nanoliflerin ortalama çapı 149 nm olarak tespit edilmiştir. Boncuksu yapıların fazlalığı, nanoliflerin daha fazla oranda bozulmasına neden olmaktadır. SEM çalışmaları sonucunda, aljinat ilavesinin düzgün nanolif yapısı oluşumunu olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir. %4 ve %8 aljinat içeren polimer çözeltisinin viskozitesinin 0.63-0.03 Pa.s aralığında olması, düzgün nanolif yapısının oluşmasına engel olmuştur.

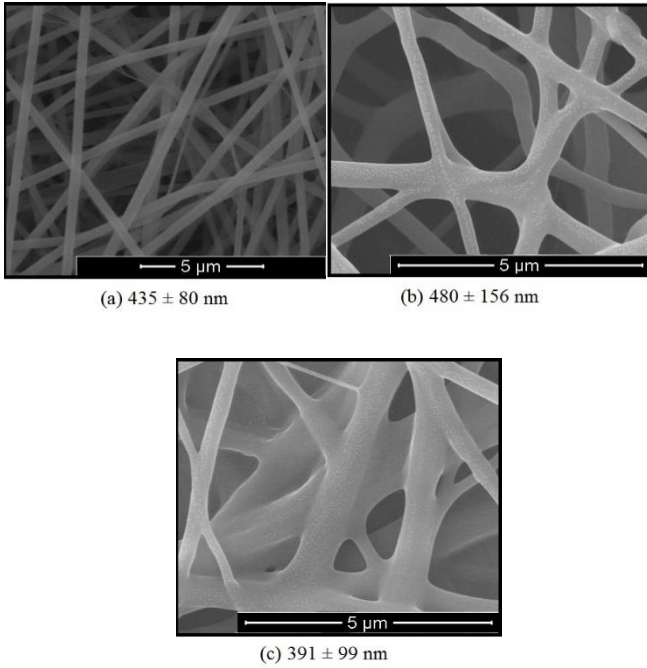


**Şekil 3.** Jelatin/PCL/aljinate Numunesinin SEM Görüntüleri (a) %0 aljinate, (b) %4 aljinate ve (c) %8 aljinate

Hacimce %0, %25 ve %50 asetik asit kullanılarak elde edilen Jelatin/PCL ve ağırlıkça %0, %4 ve %8 aljinate ilaveli jelatin/PCL/aljinate numuneleri karşılaştırıldığında, en iyi nanolif yapısının aljinate ilavesiz ve hacimce %100 formik asit kullanılarak elde edilen Jelatin/PCL numunesi olduğu belirlenmiştir. Uzun süre kullanım amaçlı gıda ambalaj maddesi üretimi için, hacimce %100 formik asit kullanılarak oluşturulan jelatin/PCL numunesinin potansiyel bir malzeme olduğu düşünülmektedir.

Elektrospinning yöntemi kullanılarak biyoaktif cam tozu içeren Jelatin/PCL çözeltisinden elde edilen numunenin SEM görüntüleri Şekil 4'de görülmektedir. Şekil 4 (a)'da biyoaktif cam tozu içermeyen Jelatin/PCL numunesinin SEM görüntüsü verilmiştir. Bu numunede elde edilen nanoliflerin ortalama çapları 435 nm'dir. Nanolif yapıda herhangi bir boncuksu oluşum görünmemektedir. Nanolifler yapı iskelesi içerisinde homojen olarak dağılmıştır. Ağırlıkça %5 biyoaktif cam tozu içeren jelatin/PCL numunesinin SEM fotoğrafı Şekil 4 (b)'de

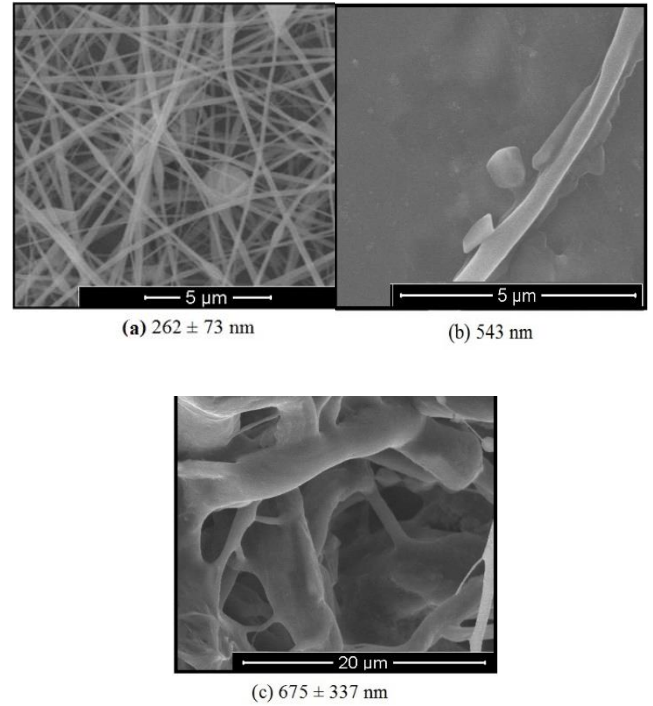
görülmektedir. Analiz sonucunda, numunede oluşan nanolif yapısının dışında herhangi bir boncuksu yapı görünmemektedir. Nanoliflerin çapları ortalama 480 nm'dir. Numunenin geneli incelendiğinde, istenen homojen nanolif yapının olduğu görülmüştür. Ayrıca, biyoaktif camların nanolif içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı tespit edilmiştir. Şekil 4 (c)'de ağırlıkça %10 cam tozu içeren numunenin SEM görüntüleri verilmektedir. Yapı içerisindeki cam parçacıklarından kaynaklanan herhangi bir boncuksu yapı ve bozulma olmadığı tespit edilmiştir. Biyoaktif cam ilaveli jelatin/PCL kompozitinin ortalama çapı 391 nm'dir. Ancak, %10 biyoaktif cam ilaveli numunede nanoliflerin homojen olarak dağılmadığı belirlenmiştir. %5 biyoaktif cam ilaveli numunenin daha düzgün bir nanokompozit yapı oluşturduğu saptanmıştır. Polimer çözeltilerinin viskozite sonuçları da oluşan düzgün nanolif yapısını doğrulamaktadır. %5 biyoaktif cam ilaveli numunenin viskozite değerleri 0.65-0.70 Pa.s aralığında değişirken, %10 biyoaktif cam ilaveli numunenin viskozite değerleri 0.50-6.98 Pa.s aralığındadır. Bu sonuç, hacimce %100 formik asit kullanılarak elde edilen en düzgün nanolif yapısına sahip jelatin/PCL numunesinde ölçülen viskozite değerlerini de doğrulamaktadır.



**Şekil 4.** Biyoaktif Cam İlaveli Jelatin/PCL Kompozitinin SEM Görüntüleri (a) %0 biyoaktif cam, (b) %5 biyoaktif cam ve (c) %10 biyoaktif cam

Elektrospinning yöntemi ile biyoaktif cam tozu içeren jelatin/PCL/aljinat çözeltilerinden elde edilen numunelerin SEM görüntüleri Şekil 5'de verilmektedir. Şekil 5 (a)'dan da görüldüğü gibi, biyoaktif cam ilavesiz jelatin/PCL/aljinat numunesinde ince bir nanolif yapı oluşmuştur. Oluşan nanoliflerin çaplarının ortalama 435 nm olduğu tespit edilmiştir. Nanoliflerin yapı içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür. Şekil 5 (b)'de ağırlıkça %5 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL/aljinat numunesinin nano lif yapısı görülmektedir. Bu kompozit yapının ortalama nanolif

çapının 543 nm olduğu tespit edilmiştir. Kompozitin nanolif yapısında boncuksu yapı oluşumu görülmektedir. Nanoliflerin üzerinde biyoaktif cam parçacıklarından ve aljinat kullanımından kaynaklanan boncuksu yapı oluştuğu için, nanolif yapısında bozulmalar da bulunmamaktadır. Şekil 5 (c)'de ise, ağırlıkça %10 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL/aljinat numunesinin nano lif yapısı görülmektedir. Oluşan nanoliflerin çaplarının ortalama 675 nm olduğu saptanmıştır. Bu yapıda aljinat ve biyoaktif camdan kaynaklı daha fazla boncuksu yapı oluşumu görülmektedir. Bununla birlikte, nanoliflerin homojen dağılmadığı da tespit edilmiştir. %5 biyoaktif cam ilaveli numunenin viskozite değerleri 0.65-0.52 Pa.s aralığında değişirken, %10 biyoaktif cam ilaveli numunenin viskozite değerleri 0.67-0.55 Pa.s aralığındadır. Bu numunelerde ölçülen viskozite değerlerinin, düzgün nanolif üretimi için gerekli viskozite aralığı olarak saptanan 0.65-0.70 Pa.s aralığının dışında kalması nedeniyle, biyoaktif cam ilaveli jelatin/PCL/aljinat numunelerinde uygun bir nanolif yapısı elde edilememiştir.



**Şekil 5.** Biyoaktif Cam İlaveli Jelatin/PCL/Aljinat Kompozitinin SEM Görüntüleri (a) %0 biyoaktif cam, (b) %5 biyoaktif cam ve (c) %10 biyoaktif cam

Ağırlıkça %0, %5 ve %10 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL ve ağırlıkça %0, %5 ve %10 cam ilaveli jelatin/PCL/aljinat numuneleri karşılaştırıldığında, en iyi nanokompozit yapının aljinat ilavesiz ve ağırlıkça %5 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL numunesi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kemik doku mühendisliği uygulamalarında nanolif çapının 250-500 nm aralığında olması tercih edilmektedir. Bu nedenle, en uygun lif yapısı ağırlıkça %5 cam içeren çözeltilere ait numunede gözlemlenmiştir. Ağırlıkça %5 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL numunesinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir potansiyel bir malzeme olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.Sonuçlar

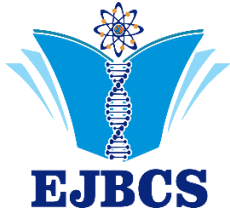
Kemik doku mühendisliğinin ve gıda mühendisliğinin nanoteknolojiden yararlanma potansiyeli yüksek olmasına rağmen, halen çok sınırlı sayıda çalışmalar yapılmaktadır. Nanoteknolojinin potansiyel uygulamalarından birisi de elektrospinning yöntemidir. Biyopolimerlerden elektrospinning yöntemiyle nanolif üretiminin artmasıyla birlikte, kemik doku mühendisliği ve gıda mühendisliği uygulamalarının da artacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada, kemik doku mühendisliği ve gıda mühendisliği uygulamaları için biyoaktif cam-polimer nanokompozit malzeme üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Reoloji çalışmaları sonucunda, düzgün bir nanolif yapısı üretebilmek için polimer çözeltilerinin viskozite değerlerinin 0.65-0.70 Pa.s aralığında olması gerektiği belirlenmiştir. SEM çalışmaları sonucunda, jelatin/PCL numunesinde asetik asit miktarı arttıkça nanoliflerin homojen dağılımı azalmış ve nanoliflerin ortalama çaplarının arttığı görülmüştür. Jelatin/PCL/aljinat numunesinde, aljinat derişimi arttıkça nanolif yapıda istenmeyen boncuksu yapıların daha fazla oluştuğu, nanolif yapıların daha çok bozulduğu ve nanoliflerin ortalama çapının küçüldüğü saptanmıştır. Gıda ambalaj maddesi olarak kullanılmak amacıyla, biyoaktif cam ilavesiz polimer çözeltileri tercih edilmiştir. Bu amaçla, hacimce %100 formik asit kullanılarak oluşturulan jelatin/PCL numunesi seçilmiştir. Bunun nedeni, bu numunedeki nanoliflerin ince olması, homojen dağılması ve boncuksu yapıların bulunmamasıdır. Kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere biyoaktif cam ilaveli numuneler tercih edilmiştir. Bu amaçla, ağırlıkça %5 biyoaktif cam içeren jelatin/PCL nanolifi seçilmiştir. Bunun nedeni, bu kompozitteki nanoliflerin homojen dağılımı ve biyoaktif cam ilavesinden kaynaklanan herhangi bir boncuksu yapı oluşmamasıdır.

#### Kaynaklar

- Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattoli S, Kenny JM 2010. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 95: 2126-2146.
- Gao C, Gao Q, Li Y, Rahaman MN, Teramoto A, Abe K 2013. In vitro evaluation of electrospun gelatin-bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 127: 2588-2599.
- Jones JR, and Hench LL 2003. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion Solid State and Materials Science*, 7: 301-307.
- Loh XJ, Peh P, Liao S, Sng C, Li J 2010. Controlled drug release from biodegradable thermoresponsive physical hydrogel nanofiber. *Journal of Controlled Release*, 143: 175-182.
- Moraru CI, Panchapakesan CP, Huang Q, Takhistov P, Liu S, Kokini JL 2003. Nanotechnology: A new frontier in food science. *Food Technology*, 57 (12): 24-29.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR, 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27: 3413-3431.
- Zhu Y. and Kaskel S 2009. Comparison of the in vitro bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses

(MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118: 176-182.





## Determination of total phenolic compounds and flavanoids in callus cultures of lemon grass (*Melissa Officinalis* L.) stimulated with different plant growth regulators

Aykut TOPDEMİR<sup>1\*</sup>, Nazmi GÜR<sup>1</sup>, Zümre DEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Corresponding author : atopdemir@gmail.com  
Orcid No: 0000-0002-9112-4767

**Abstract:** Lemon grass (*Melissa officinalis* L.) is a species used as a medicinal and aromatic plant, marketed on the domestic market and also exported. Lemon grass has many uses in the pharmaceutical, perfumery, cosmetics and food industries. The prominence of *M. officinalis* is due to the essential oils found in citronelal and citral. In addition to these two components, compounds such as linalool, geraniol,  $\alpha$ -pinene and terpinene are contained at a lower rate. Callus cultures and cell suspension cultures are in vitro propagation pathways for medical and aromatic plants. It is possible to obtain metabolites of plant secondary in the same quality and in high quantity. In this study, total phenolic substances and flavanoid amounts of calli produced in vitro were determined. *M. officinalis* nodes were used as explant source. Nodules were promoted with different plant growth regulator combinations for callus formation in Murashige Skoog medium. The highest phenolic substance content was determined from 1523 mg / g to 1.5 mg / L 2,4-D + 0.5 mg / L BAP-induced callus. 1.356 mg / g and the lowest phenolic substance was found in cultured calli containing 2 mg / L 2,4-D + 0.5 mg / L BAP. In the culture medium with the highest amount of flavanoid (4.392 mg / g), there is a plant growth regulator of 2 mg / L 2,4-D + 1 mg / L PIC + 0.5 mg / L KIN..

**Keywords:** *Melissa officinalis* L., phenolic compound, flavanoid, antioxidant, callus.

### Farklı bitki büyüme düzenleyicilerle stimule edilen limon otu (*Melissa officinalis* L.) kallus kültürlerindeki toplam fenolik bileşikler ve flavanoidlerin belirlenmesi

**Özet:** Limon otu (*Melissa officinalis* L.), tıbbi ve aromatik bir bitki olarak kullanılan türlerden olup, iç piyasada pazarlanmakta ve ihracatı yapılmaktadır. Limon otu eczacılık, parfümeri, kozmetik ve gıda sanayinde çok sayıda kullanım alanına sahiptir. *M. officinalis*'in önemi içerisinde bulunan uçucu yağlar olan citronelal ve citral'den kaynaklanmaktadır. Bu iki bileşenin yanında daha düşük oranlarda linalool, geraniol,  $\alpha$ -pinen, terpinen gibi bileşikler içermektedir. Kallus kültürleri ve hücre süspansiyon kültürleri tıbbi ve aromatik bitkilerin in vitro çoğaltım yollarıdır. Bu sayede aynı kalitede ve yüksek miktarda bitki sekonder metabolitlerini elde etmek mümkündür. Bu çalışmada in vitro olarak üretilen kallusların toplam fenolik madde ve flavanoid miktarları belirlenmiştir. Eksplant kaynağı olarak *M. Officinalis* nodları kullanılmıştır. Nodlar Murashige Skoog besiyerinde kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ile teşvik edilmiştir. En yüksek fenolik madde miktarı 1523 mg/g ile 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ile teşvik edilen kallusta tespit edilmiştir. 1.356 mg/g ile en düşük fenolik madde ise 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP içeren kültür ortamındaki kalluslarda görülmüştür. Flavanoid miktarının en yüksek olduğu (4.392 mg/g) kallusun bulunduğu kültür ortamında ise bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Melissa officinalis* L., fenolik bileşik, flavanoid, antioksidan, kallus.

### 1.Giriş

Tıbbi ve aromatik bitkilerin insan sağlığı üzerinde çok önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Bu bitkiler ilk çağlardan beri şifa kaynağı olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de bulunan 9000 civarındaki bitki türünün bunların yaklaşık bin kadarı tıbbi ve aromatik bitki olarak kabul edilmektedir (Arslan ve ark., 2002). Bu tıbbi aromatik bitkilerden biri de *Melissa officinalis*'tir. İnsanlar tarafından

uzun yıllardır tedavi amacıyla kullanılan bu bitki üzerinde yapılan in vitro, in vivo ve klinik çalışmalar, *M. officinalis* bitkisinin terapötik etkisinin esas olarak salgı tüylerindeki uçucu yağdan kaynaklandığını ve bu uçucu yağın çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir.

*M. officinalis* bitkisinin uçucu yağının antiviral, antibakteriyel ve antispazmodik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Farahani ve ark., 2009). Bitkinin uçucu yağı

iyi bilinen bir antimikrobiyal maddedir ve hafif antidepresif ve antispazmolitik özellikleri de bildirilmiştir (Basta vd., 2005; Hussain ve ark., 2011; Vitullo ve ark., 2011;). Ayrıca *Melissa officinalis*'in antioksidatif (Spiridon ve ark., 2011), antiinflamatuvar, ağrı dindirici (Birdane ve ark., 2007), antidiyabetik (Chung ve ark., 2010) ve gastrointestinal hastalıklardaki tedavi edici etkileri de (Beloued, 2009) yapılan araştırmalarla gösterilmiştir.

*M. officinalis* üzerindeki fitokimyasal araştırmalarla, terpenler (monoterpenler, seskiterpenler ve triterpenler) ve fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler) de dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasal maddelerin varlığını ve miktarları belirlenmiştir (Allahverdiyev ve ark., 2004; Moradkhani ve ark., 2010). *M. officinalis*'in ana aktif bileşenleri uçucu bileşikler (örneğin geranial, neral, sitronelal ve geraniol), triterpenler (örneğin ursolik asit ve oleanolik asit) ve fenoliklerdir (örneğin cis ve trans-RA izomerleri, kafeik asit türevleri, luteolin, naringin ve hesperidin) (Argyropoulos ve Müller, 2014; Awad ve ark., 2009). Bu bitkideki uçucu yağ oranı, %0.02 - %0.30 arasında değişmekte olup bu oran Lamiaceae ailesinin diğer üyeleriyle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Bu sebeple, uçucu yağın üretim maliyeti ve fiyatı piyasada çok yüksektir. Uçucu yağın temel bileşenleri, yağ içeriğinin yaklaşık %96'sını sitral (geranial ve neral), sitronelal, linalool, geraniol,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -karyofilen ve  $\beta$ -karyofilen oksit oluşturmaktadır (Sarı ve Ceylan, 2002; Sağlam ve ark., 2004).

Çalışmamızın amacı, *M. officinalis* bitkisi nodlarını farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle (BBD) uyararak, geliştirilen kallusların toplam fenolik ve toplam flavonoid kapasitesini belirlemektir.

## 2. Materyal ve Metot

Araştırmamızda, *M. officinalis* bitkisinin saksıda yetiştirilen fideleri kullanılmıştır. Fidelerin kurumaması için kültüre alınacakları gün yıpratılmadan toplanmıştır. Çalışmada kullanılan *M. officinalis* fideleri musluk suyuyla yıkandıktan sonra, eksplant kaynağı olarak kullanılacak olan nod kısımları bisturiyle alınmış ve %70 lik etil alkolde yavaşça karıştırılarak 30 saniye süreyle yüzey sterilizasyonu işlemine tabi tutulmuştur. Etil alkolenden çıkarılan eksplantlar 3 defa steril saf suda yıkandıktan sonra 5 dakika da %50 lik ticari sodyum hipokloritte (NaOHCl) bekletilmiştir. Sodyum hipoklorit olarak ticari çamaşır suyu (Ace) kullanılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu bittikten sonra çamaşır suyunun uzaklaştırılması için 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir.

### 2.1. Kallus Oluşumu

Çalışmada bitki doku kültüründe en yaygın olarak kullanılan MS ortamı kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). Besiyerleri hazırlanmasında 4.4 g/L MS, 30 g/L sakkaroz olacak şekilde tartılıp, çalkalayıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen besiyerleri pH değeri 5.7-5.8 şeklinde ayarlanmış ve katılaşması için 8 g/L plant agar eklenmiştir. Tablo 2.1 'de görüldüğü gibi 12 farklı BBD kombinasyonu içeren besiyerleri her bir kombinasyonda 5

paralel olacak şekilde (12×5= 60 petri besiyeri) hazırlanmıştır.

Çalışmada MS ortamında 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), Indol Asetik Asit (IAA), Kinetin (KIN) ve Picloram (PIC), 6-Benzylaminopürin (BAP) BBD' lerinin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılmıştır (Tablo 2.1.).

Ekimi gerçekleşen bitkiler  $\pm 22$  °C de, 2500 lux floresan ışık altında, 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık şartlarda iklim odalarında bekletilerek, günlük olarak kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu arada kontamine olan kültür kapları kültür ortamından uzaklaştırılıp, otoklavda steril edilmiştir.

**Tablo 2.1:** Bitki büyüme düzenleyicilerin yoğunlukları.

| Besiyeri ortamı | 2,4-D (mg/L) | IAA (mg/L) | BAP (mg/L) | KIN (mg/L) | PIC (mg/L) |
|-----------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| 1               | 1            | 1          | 0.5        | -          | -          |
| 2               | 1.5          | 1          | 0.5        | -          | -          |
| 3               | 2            | 1          | 0.5        | -          | -          |
| 4               | 1            | -          | 0.5        | -          | -          |
| 5               | 1.5          | -          | 0.5        | -          | -          |
| 6               | 2            | -          | 0.5        | -          | -          |
| 7               | 1            | -          | -          | 1          | 0.5        |
| 8               | 1.5          | -          | -          | 1          | 0.5        |
| 9               | 2            | -          | -          | 1          | 0.5        |
| 10              | -            | -          | 0.5        | -          | 1          |
| 11              | -            | -          | 0.5        | -          | 1.5        |
| 12              | -            | -          | 0.5        | -          | 2          |

### 2.2. Kallus Ekstraksiyonu

Besiyerinde yetiştirilen *M. officinalis* kallusları pens yardımıyla dikkatli bir şekilde petriden alınmıştır. Uygulanan bitki büyüme düzenleyicilere göre ayrılan kalluslar saf sudan geçirilerek 50 °C etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kalluslar hassas teraziyile 0.1 gram olacak şekilde tartılmış ve falkonlara aktarılmıştır. Kallusların üzerine 4 ml % 99.9 luk etanol pipetle eklenmiş ve falkonların etrafı parafimle sarılmıştır. Çözeltinin özdeşleşebilmesi için 72 saat buzdolabında saklanmıştır. Zamanı dolan çözeltiler blender yardımıyla 1-2 dk kadar parçalanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler huniye yerleştirilen Whatman filtre kağıtıyla süzülüş ve madde tayininde kullanılacak ekstraktlar elde edilmiştir.

### 2.3. Toplam Fenolik Madde Analizi

Toplam fenolik madde analizi Singleton ve Rossi (1965)'nin uyguladığı Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemde göre, 300 µl *M. officinalis* kallus ekstresi ve 1.5 ml 2 N 'lik Folin-Ciocalteu reaktifi cam tüplerde karıştırılmıştır. Bu karışım 1-2 dakika bekletildikten sonra %7.5 'lik sodyum karbonat çözeltisinden 1.2 ml eklenip, vortekste karıştırılmış ve 25 °C de karanlıkta 90 dk bekletildikten sonra UV-VİS spektrofotometrede 765 nm de absorpsiyon köre (su) karşı ölçülmüştür. Toplam fenol içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi gallik asidin 5 farklı konsantrasyonlarına (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 mg/ml) karşı hesaplanan absorpsiyon değerleriyle okunmuştur. Gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen  $y = 0,0471x + 0,0405$  formülüne göre sonuçlar hesaplanmıştır.

### 2.4. Toplam Flavonoid Analizi

Flavonoid içeriğinin saptanmasında metanolik form kullanılmıştır (Lamaison ve ark., 1990). Bu analiz için bitki ekstresinden 1 ml ve 1 ml %2 'lik  $AlCl_3$  çözeltisi karıştırılmıştır. Tepkime karışımı 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerin absorpsiyonları 394 nm dalga boyunda UV-VİS spektrofotometrede, kontrol örnek %2 lik  $AlCl_3$  'e karşı okunmuştur. Flavonoid derişimi kuersetinin kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi kuersetinin 5 farklı konsantrasyonlarına (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 mg/ml) karşı hesaplanan absorpsiyon değerleriyle okunmuştur. Kuersetinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen sonuçlar mg kuersetin eşdeğeri / g ekstre şeklinde ifade edilmiştir. Elde edilen grafik denklemi  $y = 0,0029x - 0,1044$  olarak bulunmuştur

### 3. Sonuçlar

Bu çalışmada *M. officinalis* bitkisinden elde edilen kallus ekstreslerinin toplam fenolik madde ve toplam flavonoid verileri hesaplanmıştır.

#### 3.1. Toplam Fenolik Madde Analizi

*M. officinalis* bitkisinden elde edilen kallus ekstreslerinin toplam fenolik madde içeriği analiz edilmiştir. Sonuçlar gallik asit kalibrasyon eğrisine göre mg gallik asit eşdeğeri / g ekstre şeklinde ifade edilmiştir (Tablo 3.1.1).

*M. officinalis* eksplantlarından 12 farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarıyla elde edilen kallusların her birinin toplam fenolik madde içeriği, çok yüksek değerler olmamakla beraber birbirlerinden farklı olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak, en yüksek toplam fenolik madde içeriği 1.523 mg GAE/ g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP hormon kombinasyonundaki kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik içeriği ise, 1.178 mg GAE/ g olarak 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyicisi

kombinasyonundaki kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir.

**Tablo 3.1.1.** Kallus etanol ekstreslerinin toplam fenolik madde miktarı.

| Besiyeri ortamı | Toplam fenolik madde<br>(µg GAE/mg) |
|-----------------|-------------------------------------|
| 1               | 1.493                               |
| 2               | 1.496                               |
| 3               | 1.395                               |
| 4               | 1.445                               |
| 5               | 1.442                               |
| 6               | 1.391                               |
| 7               | 1.498                               |
| 8               | 1.523                               |
| 9               | 1.356                               |
| 10              | 1.178                               |
| 11              | 1.392                               |
| 12              | 1.389                               |

#### 3.2. Toplam Flavonoid Analizi

*M. officinalis* kallus ekstreslerinde bulunan toplam flavonoid bileşiklerin konsantrasyonları analiz edilmiştir. *M. officinalis* kallus etanol ekstreslerinin farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre toplam flavonoid içerikleri tablo 3.2.1 de gösterilmiştir. Kuersetin kalibrasyon eğrisine göre kallus etanol ekstreslerinin toplam flavonoid içerikleri 2.709–4.930 mg kuersetin/g ekstre arasında olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.2.1 deki verilere göre toplam flavonoid içeriği karşılaştırıldığında, en yüksek içerik 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP hormon kombinasyonunda, en düşük içerik 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN hormon kombinasyonundan elde edilen *M. officinalis* kallus etanol ekstresinde saptanmıştır.

**Tablo 3.2.1.** Kallus etanol ekstralarının toplam flavonoid miktarı.

| Besiyeri ortamı | Toplam flavonoid madde (µg/mg) |
|-----------------|--------------------------------|
| 1               | 2.985                          |
| 2               | 4.157                          |
| 3               | 3.330                          |
| 4               | 3.137                          |
| 5               | 2.709                          |
| 6               | 4.392                          |
| 7               | 3.206                          |
| 8               | 3.288                          |
| 9               | 4.295                          |
| 10              | 4.199                          |
| 11              | 2.971                          |
| 12              | 4.930                          |

#### 4. Tartışma

Flavonoid ve diğer fenolik maddelerin içerikleri, kanser ve kalp hastalığının gelişiminde önleyici bir rol oynamaktadır (Kahkonen ve ark., 1999). Hücre kültürü ve kallus oluşumunda yapılan literatür araştırmasında, bitkinin gelişimini uyaran bitki büyüme düzenleyicileri, ışık etkisi, sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle fenolik ve antioksidan özelliklerinin değiştiği gözlenmiştir. Giri ve ark., yapmış oldukları çalışmada, MS ortamında BA ve metil jasmonat (MeJA) bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarında *Habenaria edgeworthii* bitkisinin kallusları üretmiş ve toplam fenolik içeriğinin BA hormonun konsantrasyon artışıyla yükseldiğini, MeJA hormon konsantrasyonu atışıyla ise düştüğünü tespit etmişlerdir. Toplam fenolik içeriğini en yüksek 14.70 mg GAE/ g olarak, 10 µM MeJA hormon takviyesindeki *H.edgeworthii* kallusunda elde etmişlerdir (Giri ve ark., 2012). Asteraceae familyasına ait şeker otu (*Stevia rebaudiana*) bitkisi kallusları farklı renklerde ışıkların etkisiyle üretilip, bitkide toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği incelenmiştir. Çalışma sonucunda, toplam fenolik içeriğin maksimum değeri mavi ışık altında yetiştirilen kalluslarda 0,102 mg GAE/ g olarak belirlenmiştir (Ahmad vd., 2016). Lamiaceae familyasına ait biberiye (*Rosmaricus officinalis*) kallus kültürleri

üzerine yapılan bir çalışmada ise, radyasyona maruz bırakılan kallusların toplam fenolik madde içeriği önemli miktarda artış göstermiştir. Bu çalışmaya göre, ışınlama yapılmayan biberiye kalluslarının (kontrol grup) toplam fenolik içeriği 0.89 mg GAE/ g olurken, ışınlama dozu (Gy) maksimum 20 Gy'de 4.38 mg GAE/ g ulaştığı tespit edilmiştir (El-Beltagi ve ark., 2011).

*M. officinalis*, fenolik bileşiklerinin zenginliği ile çok belirgin bir antioksidan potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Mabrouki ve ark., *M. officinalis* bitkisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini incelemiştir. Raporlarına göre toplam fenolik içeriği, en yüksek 63.00 mg GAE/ g kuru etanol ekstraktında, en düşük 1.01 mg GAE/ g kuru hekzan ekstraktında tespit etmişlerdir (Mabrouki ve ark., 2017). Capecka vd. taze *M. officinalis* bitkisinde, toplam fenolik maddeyi 2253 mg / 100 mg , L-Askorbikası 53.2 mg / 100 mg ve karotenoidi 46.3 mg / 100 mg şeklinde bulmuşlardır (Capecka ve ark., 2005). Ivanova ve ark. ise, *M. officinalis* ekstraktının ortalama 1370.09 mM toplam fenol içerdiğini ve 4.06 mM TEAC (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite) bir antioksidan kapasitesine sahip olduğunu bulmuşlardır (Ivanova ve ark., 2005).

#### 5. Sonuç

Yapılan bu çalışmada da tıbbi ve aromatik bitki olan *M. officinalis* bitkisinin in vitro koşullarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileriyle kallus üretimi sağlanarak toplam flavonoid ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde toplam flavonoid miktarının verilerinin sınır değerleri içerisinde, toplam fenolik madde verilerinin sınır değerlerin bir miktar altında olduğu görülmektedir. Ayrıca BBD' lerin kombinasyon ve konsantrasyon değişimlerinin hem toplam fenolik madde hem de toplam flavonoid miktarını etkilediği görülmüştür. Bitki çeşidi, bitkiden alınan miktar, ekstraksiyon seçimi, çözücü ve çözünen polaritesi gibi seçeneklerin farklılığı bu sonucun nedenleri olarak sayılabilir.

#### Teşekkür

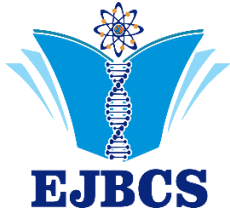
Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'nin MF 15.39 nolu projesi ile desteklenmiştir.

#### Kaynaklar

- Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M and Koltas S 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine* 11:(7-8) 657-661.
- Ahmad N, Rab A 2016. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 154: 51-56.
- Argyropoulos D, Müller J 2014. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*. 52: 118-224.
- Arslan N, Gürbüz B, Gümüşçü A, 2002. Tıbbi Bitkiler İsim Kılavuzu. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No:1530, p 180.

- Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VT, Arnason JT 2009. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy Research*, 23: 1075-1081.
- Basta A, Tzakou O and Couladis M 2005. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* sl from Greece. *Flavour and fragrance journal* 20:(6), 642-644.
- Beloued A 2009. *Plantes médicinales d'Algérie*. Alger: Office des Publications Universitaires p 134.
- Birdane YO, Buyukokuroglu ME, Birdane FM, Cemek M, Yavuz H 2007. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Melissa officinalis* L. in rodents. *Rev Méd Vét* 158:75-81.
- Capecka E, Mareczek A and Leja M 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry* 93:(2), 223-226.
- Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJH, Kim KH, Lee SJ 2010. Antidiabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose and lipid regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Brit J Nutr*.104: 180-188.
- El-Beltagi HS, Ahmed OK and El-Desouky W 2011. Effect of low doses  $\gamma$ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry* 80:(9), 968-976.
- Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian J and Khalvati MA 2009. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:(5), 329-333.
- Giri L, Dhyani P, Rawat S, Bhatt ID, Nandi SK, Rawal RS and Pande V 2012. In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: a rare Himalayan medicinal orchid. *Industrial Crops and Products* 39: 1-6.
- Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Saker SD, Moore JE, Rao JR et al. 2011. Antimicrobial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT* 44:1199-206.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T and Yankova T 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 96:(1-2), 145-150.
- Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha, JP, Pihlaja K, Kujala, TS and Heinonen M 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 47:(10), 3954-3962.
- Lamaison JL, Carnat A and Petitjean-Freytet C 1990. Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae. In *Annales pharmaceutiques francaises* Vol. 48 No. 6 pp. 335-340.
- Mabrouki H, Duarte CM M and Akretche DE 2017. Estimation of Total Phenolic Contents and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts of *Melissa officinalis* L.. *Arabian Journal for Science and Engineering* 1-9.
- Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A and Meftahizade H 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4:(25), 2753-2759.
- Murashige T and Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:(3), 473-497.
- Saglam C, Atakisi I, Turhan H, Kaba S, Arslanoglu F and Onemli F 2004. Effect of propagation method, plant density, and age on lemon balm (*Melissa officinalis*) herb and oil yield.
- Sarı AO and Ceylan A 2002. Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 26:(4), 217-224.
- Singleton VL and Rossi JA 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16:(3), 144-158.
- Spiridon I, Colceru S, Anghel N, Teaca CA, Bodirlau R, Armatu A 2011. Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania, *Nat Prod Res.*, Oct 25 (17): 1657-1661.
- Vitullo M, Ripabelli I, Fanelli I, Tamburro M, Delfine S, Sammarco L 2011. Microbiological and toxicological quality of dried herbs *Lett Appl Microbiol.* 52: 573-580.





## Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: [www.dergipark.gov.tr/ejbc](http://www.dergipark.gov.tr/ejbc)



### Antioxidant properties of *Melissa officinalis* L. callus cultures

Aykut TOPDEMİR<sup>1\*</sup>, Zümre DEMİR<sup>1</sup>, Nazmi GÜR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Corresponding author : [atopdemir@gmail.com](mailto:atopdemir@gmail.com)  
Orcid No: 0000-0002-9112-4767

**Abstract:** *Melissa officinalis* L. is a Mediterranean plant from the family of the Labitae, and has lemon fragrance. Melissa is a perennial herbaceous plant that forms the plant size between 60-100 cm. It is a known and used plant for a long time, because of its pleasant smell. Because it is effective in beekeeping, this plant is called as the swarm plant. It is a medicinal and aromatic plant, since it contains essential oils containing citral, stranellal, linalool and pinemia and flavonoid and resin. The antioxidant activity of the in vitro produced calli was determined in this study, which was also determined by previous studies. *Melissa officinalis* L. nodals were used as an explant source. Nodules were promoted with different plant growth regulator combinations for callus formation in Murashige Skoog medium. The antioxidant activity of the resulting callus was determined by the ABTS method and the results were given as "TEAC (troloxyl equivalent antioxidant capacity) equivalent". The highest antioxidant capacity (0.365 mmol / L) was seen in 1.5 mg / L 2,4-D + 1 mg / L PIC + 0.5 mg / L KIN-induced callus. The lowest value (0.191 mmol / L) was obtained from calli promoted with 1.5 mg / L 2,4-D + 0.5 mg / L BAP.

**Keywords:** *Melissa officinalis* L, callus, antioxidant.

### *Melissa officinalis* L. kallus kültürlerinin antoksidan özellikleri

**Özet:** *Melissa officinalis* L., Labitae familyasından, Akdeniz bitkisi olup limon kokuludur. Melisa 60-100 cm arasında bitki boyu oluşturan çok yıllık otsu bir bitkidir. Hoş kokusu nedeniyle uzun zamandır bilinen ve kullanılan bir bitkidir. Arıcılıkta oğul ekmeye etkili olduğu için, halk arasında bu bitkiye oğul otu da denilmektedir. Sitral, stranellal, linalol ve pinemi içeren uçucu yağlar ile flavonoid ve reçine içerdiğinden dolayı tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Çalışmamızda antoksidan özelliği olduğu da daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiş olan bu bitkiden, in vitro olarak üretilen kallusların antoksidan aktivitesi belirlenmiştir. Explant kaynağı olarak *Melissa officinalis* L. nodları kullanılmıştır. Nodlar Murashige Skoog besiyerinde kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ile teşvik edilmiştir. Sonuçta oluşan kallusların antoksidan aktivitesi ABTS yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar "TEAC (trolox eşdeğer antoksidan kapasite) eşdeğeri" olarak verilmiştir. En yüksek antoksidan kapasite (0.365 mmol/L), 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN ile indüklenmiş kalluslarda görülmüştür. En düşük değer ise (0.191 mmol/L), 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ile teşvik edilmiş kalluslardan elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Melissa officinalis* L, kallus, antoksidan.

© EJBCS. All rights reserved.

#### 1.Giriş

*Melisa officinalis* L. Lamiaceae familyasına mensup, çok yıllık limon kokulu bir bitkidir. Lamiaceae (eski adıyla Labiatae) ailesinin üyelerinden *Melisa officinalis* L. (*M. officinalis*) yurdumuzda Akdeniz bölgesinde yetişen yenilebilir bir bitkidir. Bitki, dünyanın çeşitli bölgelerinde özellikle de Batı Asya, güney batı Sırbistan ve Kuzey Afrika'da yetiştirilmektedir (Simon ve Chatwick, 1984). *M. officinalis*'in subsp. *officinalis*, subsp. *inodora* ve subsp. *altissima* olmak üzere üç alt türü bulunur. Bunlardan sadece subsp. *officinalis*'in ticari değeri ve karakteristik limon kokusu vardır. Bu bitkinin taze veya kurutulmuş yaprakları ilaç olarak kullanılır. Yapraklar, çiçek açmadan önce veya

dallanmadan önce hasat edilmektedir (Zeybek ve Haksel, 2010). *M. officinalis* bitki boyu, gövde ve yaprak boyutu gibi morfolojik özellikleri esas olarak genotip, çevre veya kültürel uygulamalara bağlı olarak değişim göstermektedir. Genel olarak 1.5 m yüksekliğe kadar büyüyebilir ve 0.5-1.0 m boyunca yayılabilir. Bitki kare sapsarı, limon kokulu ve sarmaşık kenar yaprakları, beyaz veya sarıdan soluk mora kadar olgunlaşan çiçeklerle karakterizedir. Bitkinin yeşil yaprakları yumurta veya kalp şeklinde 2-8 cm uzunluğundadır ve sapsar üzerinde karşıt çiftler halinde düzenlenmiştir. Üst yaprak genellikle alt yapraklardan daha büyüktür. Yapraklardaki damarlar kolayca görülebilir. Küçük çiçekler (0.5-1.5 cm boyutunda) bütün yaz boyu üretilmektedir. Sapsarın üzerinde yapraklarda aksillerden

küçük dallar seyrek halde büyümektedir (Sarı ve Ceylan, 2002).

*M. officinalis* bitkisinin uçucu yağı antiviral, antibakteriyel ve antispazmodik bir etkiye sahiptir (Farahani ark., 2009). Bitkinin uçucu yağı iyi bilinen bir antifungal ajandır ve hafif antidepresif ve antispazmolitik özellikleri de bildirilmiştir (Basta ark., 2005). *M. officinalis* üzerindeki fitokimyasal araştırmalarla, terpenler (monoterpenler, seskiterpenler ve triterpenler) ve fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler) de dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasal maddelerin varlığını ve miktarları belirlenmiştir (Allahverdiyev ark., 2004; Moradkhani ark., 2010). *M. officinalis*'in ana aktif bileşenleri uçucu bileşikler (örneğin geranial, neral, sitronelal ve geraniol), triterpenler (örneğin ursolik asit ve oleanolik asit) ve fenoliklerdir (örneğin cis ve trans-RA izomerleri, kafeik asit türevleri, luteolin, naringin ve hesperidin) (Argyropoulos ve Müller, 2014; Awad ark., 2009). Bu bitkideki uçucu yağ oranı, %0.02 - %0.30 arasında değişmekte olup bu oran Lamiaceae ailesinin diğer üyeleriyle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Bu sebeple, uçucu yağın üretim maliyeti ve fiyatı piyasada çok yüksektir. Uçucu yağın temel bileşenleri, yağ içeriğinin yaklaşık %96'sını sitral (geranial ve neral), sitronelal, linalool, geraniol,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -karyofilen ve  $\beta$ -karyofilen oksit oluşturmaktadır (Sarı ve Ceylan, 2002; Sağlam ark., 2004).

Çalışmamızın amacı *M. officinalis* bitkisinin farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle (BBD) yetiştirilen kallusların toplam fenolik ve toplam flavonoid kapasitesini belirlemektir.

## 2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada, eksplant kaynağı olarak *M. officinalis* bitkisinin saksıda yetiştirilen fideleri kullanılmıştır. Fidelerin kurumaması için kültüre alınacakları gün yıpratılmadan toplanmıştır. Çalışmada kullanılan *M. officinalis* fideleri musluk suyuyla yıkandıktan sonra, besiyerine ekilecek olan nod kısımları bisturiyle alınmış ve 30 saniye süreyle %70 lik etil alkolde yavaşça karıştırılarak bekletilmiştir. Etil alkolden çıkarılan eksplantlar 3 defa steril saf suda yıkandıktan sonra 5 dakika da %50 lik ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) bekletilmiştir. Sodyum hipoklorit olarak ticari çamaşır suyu (Ace) kullanılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu bittikten sonra çamaşır suyunun uzaklaştırılması için 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir.

### 2.1. Kallus Oluşumu

Bu çalışmada bitki doku kültürü için temel gereksinimleri karşılayan ve sıklıkla kullanılan MS ortamı kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). Besiyerleri hazırlanmasında 4.4 g/L MS, 30 g/L sakkaroz olacak şekilde tartılıp, çalkalayıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen besiyerleri pH değeri 5.7-5.8 şekilde ayarlanmış ve katılaşması için 8 g/L katılaştırıcı plant agar eklenmiştir. Tablo 2.1 'de görüldüğü gibi 12 farklı BBD kombinasyonu içeren besiyerleri her bir kombinasyonda 5 tekrarlı olacak şekilde (12×5= 60 petri besiyeri) hazırlanmıştır.

Çalışmada MS ortamında 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), Indol Asetik Asit (IAA), Kinetin (KIN) ve Picloram (PIC), 6-Benzylaminopürin (BAP) BBD' lerinin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılmıştır (Tablo 2.1.).

**Tablo 2.1:** Bitki büyüme düzenleyicilerin yoğunlukları.

| Besiyeri ortamı | 2,4-D (mg/L) | IAA (mg/L) | BAP (mg/L) | KIN (mg/L) | PIC (mg/L) |
|-----------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| 1               | 1            | 1          | 0.5        | -          | -          |
| 2               | 1.5          | 1          | 0.5        | -          | -          |
| 3               | 2            | 1          | 0.5        | -          | -          |
| 4               | 1            | -          | 0.5        | -          | -          |
| 5               | 1.5          | -          | 0.5        | -          | -          |
| 6               | 2            | -          | 0.5        | -          | -          |
| 7               | 1            | -          | -          | 1          | 0.5        |
| 8               | 1.5          | -          | -          | 1          | 0.5        |
| 9               | 2            | -          | -          | 1          | 0.5        |
| 10              | -            | -          | 0.5        | -          | 1          |
| 11              | -            | -          | 0.5        | -          | 1.5        |
| 12              | -            | -          | 0.5        | -          | 2          |

Ekimi gerçekleşen bitkiler  $\pm 22$  °C de, 2500 lux floresan ışık altında, 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık şartlarda iklim odalarında bekletilerek, günlük olarak kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu arada kontamine olan kültür kapları kültür ortamından uzaklaştırılıp, otoklavda steril edilmiştir.

### 2.2. Kallus Ekstraksiyonu

Besiyerinde yetiştirilen *M. officinalis* kallusları pens yardımıyla dikkatli bir şekilde petriden alınmıştır. Uygulanan bitki büyüme düzenleyicilere göre ayrılan kalluslar saf sudan geçirilerek 50 °C etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kalluslar hassas teraziyile 0.1 gram olacak şekilde tartılmış ve falkonlara aktarılmıştır. Kallusların üzerine 4 ml % 99.9 luk etanol pipetle eklenmiş ve falkonların etrafı parafimle sarılmıştır. Çözeltinin özdeşleşebilmesi için 72 saat buzdolabında saklanmıştır. Zamanı dolan çözeltiler blender yardımıyla 1-2 dk kadar parçalanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler huniye yerleştirilen Whatman filtre kağıtıyla süzülüş ve madde tayininde kullanılacak ekstraktlar elde edilmiştir.

### 2.3. Antioksidan Kapasite Analizi

Ekstrelerin antioksidan kapasitesi, ABTS+[2,2'-azonobis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonat)] radikal katyon yakalama kabiliyetine dayanılarak ölçülmüştür. Antioksidan kapasite analizi için, ABTS stok çözeltisi fosfat tampon çözelti ile absorban 734 nm de 0.7-0.8 olana kadar seyreltilmiştir. Seyreltilmiş çözelti her zaman deneyden önce hazırlanmış ve ışıktan korunmuştur. Daha sonra cam tüplere 1900  $\mu$ l seyreltilmiş ABTS çözeltisi ve 100  $\mu$ l *M. officinalis* kallus ektresi eklenerek karıştırılmıştır. Örneklerin absorbanları 6. dakikada 734 nm UV-VİS spektrofotometrede köre (fosfat tamponu) karşı okunmuştur.

Antioksidan kapasitenin belirlenmesi için kullanılan bu yöntem TEAC (Troloks eşdeğer antioksidan kapasite) olarak adlandırılmakta ve sonuçlar troloks standart olarak kabul edilerek verilmektedir. Troloks [6-hidroksi-2-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], E vitamininin suda çözünür eşdeğeridir. Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan kapasite tayin yönteminde standart olarak kullanılmaktadır (Re ark., 1999). Troloks antioksidan kullanılarak bir kalibrasyon grafiği hazırlanmış ve antioksidan kapasitesi, bu grafikten elde edilen sonuçlar ile TEAC olarak verilmiştir (Damar, 2010). Troloks kalibrasyon eğrisinden elde edilen  $y = 1,444x - 0,0004$  formülüne göre hesaplanmıştır.

### 3. Sonuçlar

Bu çalışmada *M. officinalis* bitkisinden elde edilen kallus ekstraktlarının antioksidan kapasite verileri hesaplanmıştır.

#### 3.1. Antioksidan Kapasite Analizi

*M. officinalis* kallus etanol ekstraktlarının farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre antioksidan kapasitesi Tablo 3.1 de verilmiştir.

**Tablo 3.1.3:** Kallus etanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

| Büyüme düzenleyici kombinasyonları         | Antioksidan kapasite (mM TEAC) |
|--|--------------------------------|
| 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP   | 0.363                          |
| 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP | 0.304                          |
| 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP   | 0.329                          |
| 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN   | 0.290                          |
| 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN | 0.365                          |
| 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN   | 0.216                          |
| 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP                | 0.297                          |
| 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP              | 0.191                          |
| 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP                | 0.232                          |
| 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP                  | 0.326                          |
| 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP                | 0.329                          |
| 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP                  | 0.223                          |

Bu sonuçlara göre kallus etanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesinde 0.191 – 0.365 mM TEAC arası değerler elde edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, en yüksek 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN hormon kombinasyonunda, en düşük 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP hormon konsantrasyonunda olan kallus etanol ekstraktları antioksidan kapasite göstermiştir.

### 4. Tartışma

Hormonların etkisiyle yetişen bitki kalluslarının kimyasal özellikleri farklı olduğundan, çalışmada yapılan antioksidan kapasitesi özellikleri elde edilen her bir kallus için de farklı olmuştur.

Doğal antioksidan kaynağı için daha fazla araştırılabilen in vivo materyallere göre, kallus ekstraktlarının önemli antioksidan potansiyeli sağladığı bazı çalışmalarda bildirilmiştir. *Salvia officinalis* (*S. officinalis*) ve *Rosmarinus officinalis*'in (*R. officinalis*) in vitro kültürlerinde, toprakta yetiştirilen bitki materyallerine göre daha yüksek antioksidan aktivite gözlenmiştir (Grzegorzcyk ark., 2007, Yesil-Celiktas ark., 2007). Yesil-Celiktas vd. *Rosmarinus officinalis* bitkisinin kalluslarını, MS ve odunsu bitki ortamında (WPM) 1 mg/L NAA (MS1 ve WPM1) ve 3 mg/L NAA (MS3 ve WPM3) ile destekleyerek yetiştirip, kalluslarda TEAC analizi yapmışlardır. Raporlarına göre *R. officinalis* kalluslarında TEAC değerini, WPM3' te 0.0018 mmol/g ve MS3' te 0.0016 mmol/g olarak belirlemişlerdir (Yesil-Celiktas ark., 2007). Giri ve ark., yukarıda belirtilen çalışmasında, *H. edgeworthii* kalluslarının metanolik ekstraktlarında ABTS testinde en yüksek antioksidan kapasite değeri 0,0671 askorbik asit eşdeğeri (AAE)/ g kuru ağırlık (DW) olarak, BA 3 µM konsantrasyonunda tespit etmişlerdir (Giri ark., 2012). Kousalya ve Bai tarafından yapılan bir çalışmada, *Canscora decussata* bitkisinin kallus kültürleri farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle desteklenen ortamlarda üretilmiştir. Çalışma verilerine göre antioksidan kapasitesi en yüksek 12.234 mmol/g TEAC olarak 1/2MS+0.5NAA ortamındaki kalluslarda, en düşük 1.191 mmol/g TEAC olarak 0.5BAP+2KIN+3 gibberellik asit (GA<sub>3</sub>) ortamındaki kalluslarda elde etmişlerdir (Kousalya ve Bai, 2016). Bahri-Sahloul ark., *Crataegus azarolus* var. *aronia* (kırmızı meyveli alıç) bitkisinin kallus kültürlerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde ABTS metotuna göre TEAC değerini 0.0674 mmol/g olarak belirlemişlerdir (Bahri-Sahloul ark., 2014).

### 5. Sonuç

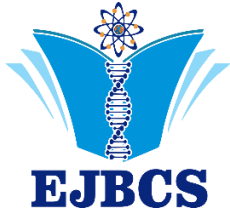
Yapılan bu çalışmada tıbbi ve aromatik bitki olan *M. officinalis* bitkisinin in vitro koşullarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileriyle kallus üretimi sağlanmış ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde antioksidan verilerinin normal bir bitkiye göre sınır değerlerin bir miktar altında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca BBD' lerin kombinasyon ve konsantrasyon değişimlerinin antioksidan miktarını etkilediği görülmüştür. Bitki çeşidi, bitkiden alınan miktar, ekstraksiyon seçimi, çözücü ve çözünen polaritesi gibi seçeneklerin farklılığı bu sonucun nedenleri olarak sayılabilir.

### Teşekkür

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'nin MF 15.39 nolu projesi ile desteklenmiştir.

**Kaynaklar**

- Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M and Koltas S 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine* 11(7-8) 657-661.
- Argyropoulos D, Müller J 2014. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Industrial Crops and Products* 52:118-224.
- Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VT, Arnason JT 2009. Bioassay- guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy Research* Volume 23 Issue 8 1075-1081.
- Bahri-Sahloul R, Ben Fredj R, Boughalleb N, Shriaa J, Saguem S, Hilbert JL and Harzallah-Skhiri F 2014. Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *aronia* (Willd.) Batt. ovaries calli. *Journal of Botany* 2014.
- Basta A, Tzakou O and Couladis M 2005. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* sl from Greece. *Flavour and fragrance journal* 20:(6) 642-644.
- Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian J and Khalvati MA 2009. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:(5) 329-333.
- Giri L, Dhyani P, Rawat S, Bhatt ID, Nandi SK, Rawal RS and Pande V 2012. In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: a rare Himalayan medicinal orchid. *Industrial Crops and Products* 39: 1-6.
- Grzegorzczak I, Matkowski A and Wysokinska H 2007. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry* 104:(2) 536-541.
- Kousalya L and Bai VN 2016. Effect of growth regulators on rapid micropropagation and antioxidant activity of *Canscora decussata* (Roxb.) Roem. & Schult.—A threatened medicinal plant. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 5:(2) 161-170.
- Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A and Meftahizade H 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol 4:(25) 2753-2759.
- Murashige T and Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:(3) 473-497.
- Saglam C, Atakisi I, Turhan H, Kaba S, Arslanoglu F. and Onemli F 2004. Effect of propagation method, plant density, and age on lemon balm (*Melissa officinalis*) herb and oil yield.
- Sarı AO and Ceylan A 2002. Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 26:(4) 217-224.
- Simon JE and Chadwick AF 1984. *Herbs an indexed bibliography 1971-1980: the scientific literature on selected herbs and aromatic and medicinal plants of the temperate zone*. Archon Books.
- Yesil-Celiktas O, Nartop P, Gurel A, Bedir E. and Vardar-Sukan F 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli. *Journal of plant physiology* 164:(11) 1536-1542.
- Zeybek U and Haksel M 2010. *Important medicinal plants and their use in Turkey and around the world*. Argefar and Helvacıade Medical Publications. Izmir.



# Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.gov.tr/ejbcs



## 3D composite scaffold production using Cu doped bioglass and Sr doped bioglass with Cu nanoparticles

Ayşe Özyuğuran<sup>1\*</sup>, Melek Erol Taygun<sup>1</sup>, Sadriye Küçükbayrak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istanbul Technical University, Chemical&Metallurgical Engineering Faculty, Chemical Engineering Department, Istanbul, Turkey

\*Corresponding author : [kmayse@itu.edu.tr](mailto:kmayse@itu.edu.tr)  
Orcid No: 0000-0002-9149-4004.

**Abstract:** In this study, it was aimed to produce BG/polymer 3D composite scaffolds with relevant ions in order to develop multifunctional scaffolds by using salt template-particulate leaching technique. The porous scaffolds were successfully synthesized and it was observed that there was a good pore interconnectivity maintained in the scaffold microstructure. In vitro bioactivity of the composite scaffolds was confirmed by Scanning Electron Microscopy, X-ray diffraction and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy measurements. Furthermore, the release of therapeutic ions were determined as a function of immersion time in SBF, while the Sr ion release is in the range of 1.27-4.81 ppm, the Cu ion releases are 0.67-1.42 ppm for Cu doped BG, 1.53-4.54 ppm for Sr doped BG- 1% Cu, and 3.08-7.59 ppm for Sr doped BG- 2% Cu, respectively. This result indicated that the scaffolds can deliver controlled doses of strontium and copper toward the SBF medium that is the determinant for bone tissue regeneration.

**Keywords:** Composite scaffold, bioactive glass, therapeutic ions, bone tissue engineering

### *Cu katkılı biyocam ve Cu nanoparçacıklı Sr katkılı biyocamdan 3D kompozit yapı iskelesi üretimi*

**Özet:** Bu çalışmada, çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi kullanılarak, çok işlevli yapı iskelelerinin geliştirilmesi için ilgili iyonlarla BG / polimer 3D kompozit yapı iskelelerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Gözenekli yapıya sahip yapı iskeleleri başarıyla sentezlenmiş ve yapı iskelelerinin mikroyapısında iyi bir gözenek bağlantısının bulunduğu gözlemlenmiştir. Kompozit yapı iskelelerinin in vitro biyoaktivitesi; Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), X-ışını kırınımı ve Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi ölçümleri ile teyit edilmiştir. Bunun dışında, terapötik iyonların salımının; SBF'de kalma sürelerinin bir fonksiyonu olarak, Sr iyon salımı 1.27-4.81 ppm aralığında iken, Cu iyon salımları sırasıyla, Cu katkılı BG için 0.67-1.42 ppm, Sr katkılı BG-%1 Cu için 1.53-4.54 ppm, Sr katkılı BG-%2 Cu için 3.08-7.59 ppm olarak saptanmıştır. Bu sonuç yapı iskelelerinin, kemik dokusu rejenerasyonunun belirleyicisi olan SBF ortamına, stronsiyum ve bakır dozlarını kontrollü olarak verebileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kompozit yapı iskelesi, biyoaktif cam, terapötik iyonlar, kemik doku mühendisliği

© EJBACS. All rights reserved.

### 1. Giriş

Yaşlanan nüfusun artmasıyla, insan yaşamının kalitesinde önemli rol oynayan ve kemik kusurlarına yol açan dejeneratif hastalıklara ve travmatik yaralanmalara daha sık rastlanmaktadır. Çözümlerden biri kemik naklidir, fakat uygun donörün bulunamaması en önemli problemlerden biridir. Biyo inert malzemelerin kullanımı ile gerçekleştirilen implantasyon işlemi, kemik yoğunluğunda azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca, kullanılan bu malzemelerin belli sürelerle değiştirilmesi gerekmektedir (Correlo ve ark., 2011). Kemik dokusu mühendisliği, yaralı kemik dokularını biyolojik olarak bozunabilir yapı iskelesi yardımıyla onarmak, değiştirmek ya da yenilemek amacıyla hızla gelişen bir disiplindir. Bu yaklaşımın avantajı,

hastanın iyileşmesi için yapılması gerekli operasyon sayısının azalması, dolayısıyla da hastanın iyileşme süresinin kısalmasıdır (Correlo ve ark. 2011, Wang ve Yeung, 2017).

Mükemmel bir yapı iskelesi üretmek, doku mühendisliğinin en zor aşamasıdır. Genel olarak, tek bir malzemenin özelliklerinin yetersiz olduğu durumlarda, iki veya daha fazla malzemenin özelliklerini birleştirerek, yeterli mekanik ve / veya kimyasal özelliklere sahip malzemeleri elde etmek yaygın şekilde uygulanan bir tekniktir (Chen ve ark., 2008a). Doğal kemik matrisi, biyolojik seramik ve biyolojik polimerin bir bileşimidir. Bu nedenle, kemik dokusu mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, biyoaktif camlar (BG) ve biyo-emilir polimerlerin kombinasyonu ile



istenen fiziksel, biyolojik ve mekanik özelliklere sahip bir yapı iskelesi üretmek oldukça mantıklıdır (Chen ve ark., 2008a, Kaur ve ark., 2014). Yapı iskelesi üretim malzemeleri arasında yer alan biyoaktif camlar, biyoyumlu, osteoconductive ve osteoproduktif oldukları için kemik dokusu rejenerasyonu için mükemmel performans sergilemektedir (Gerdhardt ve Boccacini, 2010). Biyoaktif camlar insan vücuduna implante edildiğinde veya biyolojik sıvılarla temas ettiğinde, içeriklerinde bulunan Si, Ca, P ve Na iyonları ara yüzeylerde çözünürler ve hücre içi ile hücre dışında uygun tepkilere girerek hızlı kemik oluşumuna neden olurlar (Öztopalan ve Durmuş, 2017). Böylece biyoaktif cam yüzeyinde bir karbonatlı hidroksiapatit (HCA) tabakası oluşturulurlar. Bu HCA tabakası, biyoaktif camın gerçek kemik yapısına kimyasal olarak bağlanmasını sağlar (Chen ve ark., 2008a; Kaur ve ark., 2014; Rezwan ve ark., 2006).

Son yıllarda, biyo-polimerlerin ve biyoaktif camların kombine edilmesi ile, geçici ortopedik implantlar, kemik dolgu malzemeleri veya doku mühendisliği alanında üç boyutlu (3D) biyoyumlu yapı iskeleleri gibi uygulamalar için yeni bir kompozit malzeme grubu ortaya çıkmıştır (Rezwan ve ark., 2006). Bu kompozit malzemelerin kemik üretim özelliklerini iyileştirmek için, kemik hücre uyarıcı iyonları (Sr, Cu, Ag, v.b) kompozit malzemenin kimyasal bileşimine dahil etmek çok uygulanan bir yöntemdir. Stronsiyumun kemik iyileştirme süreçlerini hızlandırdığı ve kemik dokusu onarımı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Chen ve ark., 2008b). In vitro ve in vivo çalışmalar, stronsiyumun kemik oluşumunu artırdığını ve osteoprozu azalttığını ve hayvanlar ile insanlarda kemiğin kütlelerinde ve kemiğin mekanik özelliklerinde bir artışa neden olduğunu göstermiştir (Seeman ve ark., 2008). Bakır iyonları, anjiyojenezin uyarılmasında aktif bir rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2014). Erol ve ark. (2012a), bor içeren biyoaktif cam kullanarak yeni yapı iskeleleri oluşturmuşlar ve bakır iyonlarıyla çapraz bağlanmış alginat ile kaplamışlardır. Bakır salınım çalışmaları, yeni yapı iskelelerinden bakır iyonlarının kontrollü bir şekilde serbest bırakıldığını ve dolayısıyla bu etkinin, kemik rejenerasyonu için anjiyojenik potansiyel olarak yararlı olabileceğini göstermiştir (Erol ve ark., 2012a).

Bu çalışmada, büyük kemik defektlerini onarmak için çoklu kullanıma uygun, biyoaktif cam kaynaklı, çok fonksiyonlu 3D kompozit yapı iskelelerinin elde edilmesi araştırılmıştır. Bu amaçla, 3D biyoaktif cam-polilaktid (PDLLA) kompozit gözenekli yapı iskeleleri, çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Üretilen yapı iskelelerinin mikroyapısal, fiziksel ve biyoaktivite özellikleri farklı karakterizasyon yöntemleri uygulanarak belirlenmiştir.

## 2. Materyal ve Metod

Yapı iskelesi üretiminde kullanılan rasemik poli (D, L-laktit) (PDLLA) granülleri (75,000-120,000 mol ağırlığı) Sigma-Aldrich Ltd. (ABD) 'den temin edilmiştir. Çözücü olarak, susuz dimetil karbonat (DMC, Merck) kullanılmıştır. Bu çalışmada yapı iskelelerinin üretiminde

kullanılan stronsiyum ve bakır içeren biyoaktif cam tozları başka bir çalışmamızda üretilmiştir (Erol ve ark., 2012b). Bu camların ağırlıkça yüzde bileşimi, %45 SiO<sub>2</sub>, %24.5 Na<sub>2</sub>O, %6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, %22.5 CaO ve %2 Sr ve %2 Cu'dan oluşmaktadır. Biyoaktif cam (BG), seramik bilyalı değirmende tanecik boyutu ≤45 µm olacak şekilde öğütülmüştür. Kullanılan diğer tüm kimyasalların analitik saflıkta olmasına dikkat edilmiştir.

Cu nanoparçacıkları, CuSO<sub>4</sub>'tan üretilmiştir. Deiyonize su ile seyreltilmiş CuSO<sub>4</sub> çözeltisinin pH'ı, amonyak eklenerek 10'a ayarlanmıştır. 100 mL aljinat çözeltisi üzerine, hazırlanan CuSO<sub>4</sub> çözeltisi yavaşça ilave edilmiştir. Çözeltiler birbirine tamamen karıştıktan sonra, Cu iyonlarını indirmek için, hidrazin ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti, mikrodalga fırında 2 dakika ısıtılmıştır. Bu işlemin ardından Cu partiküllerini elde etmek için, çözelti üç kez 22000 rpm'de 40 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemeden sonra Cu parçacıkları distile su ile yıkanmış ve tamamen kurumalarını sağlamak için vakum etüvünde gece boyunca bekletilmiştir.

Yapı iskeleleri, yemeklik tuz taneleri kullanılarak çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi (Misra ve ark., 2010) uygulanarak hazırlanmıştır. PDLLA pelletleri, çözelti konsantrasyonları %8 w/v ve %4 w/v olacak şekilde DMC'de çözülmüştür. Bakır nanoparçacıklarının kullanıldığı üretimde, nanoparçacıklar polimer ağırlığının %1'i ve %2'si olacak şekilde çözeltilere ilave edilmiştir. Bakır nanoparçacıkların ilavesinden sonra, parçacıkların tamamen dağılmasını sağlamak için, süspansiyonlar iyice karıştırılmıştır. Daha sonra, süspansiyonların bileşimlerinde %20 Sr olacak şekilde uygun miktarda BG eklenmiştir. Bakır katkılı biyocamın kullanıldığı üretimde ise, %8 w/v ve %4 w/v konsantrasyonlarında hazırlanmış olan PDLLA çözeltilerine bileşimlerinde %20 Cu olacak şekilde uygun miktarda bu kez bakır katkılı biyocam ilave edilmiştir. Parçacıkların dağılımının tamamlanması ve topaklanmanın önlenmesi için süspansiyonlar ultrasonik su banyosu kullanılarak karıştırılmıştır. Böylece, PDLLA-BG-Cu süspansiyonları elde edilmiştir. Tuz taneleri, tanecik boyutu 501-850 µm aralığında olacak şekilde öğütülmüştür. Yapı iskelesi üretimi için, tuz taneleri (1.5 g), 1 mL PDLLA-BG-Cu süspansiyonlarıyla (8 w/v) tamamen karıştırılarak viskoz macun kıvamına getirilmiştir. Daha sonra bu karışım silikon tüplere doldurulmuş ve bir cam pim yardımıyla elle sıkıştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen yapı iskelesi kalıpları (çap ≈ 9 mm, yükseklik ≈20 mm) bir inkübatör (37°C) içinde gece boyunca kurutulmuştur. Kalıplar, 2 gün süreyle 4 w/v PDLLA-BG-Cu süspansiyonları ile tekrar infiltre edilmiştir. Kurutulan kalıplar, 4-6 mm kalınlığında küçük silindirler halinde kesilmiş ve tuzun tam olarak çözülmesine izin vermek için 37° C'de 2.5-3 saat boyunca deiyonize su içinde bırakılmıştır. Sudan çıkarılan örnekler, yapı iskelelerinde kalan suyun tamamını uçurmak için bir inkübatör içine yerleştirilmiştir.

Gözenekli yapı iskelelerinin SBF içine batırılmadan önceki ve sonraki yüzey morfolojisi ve mikroyapılarını gözlemek için, 10 kV'de çalıştırılan bir taramalı elektron mikroskopu (SEM) (Quanta 250 FEG) kullanılmıştır. SEM

ölçümlerinden önce, tüm numuneler vakum altında platin ile kaplanmıştır.

3D yapı iskelelerinin X-ışını kırınımı (XRD) analizleri, numunelerin karakteristik fazlarını ve olası kristalliliğini araştırmak için, PANalytical X'Pert Pro difraktometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, 10-60° aralığındaki 2θ açılarında CuKα radyasyonu (35V ve 40 mA'de) kullanılarak elde edilmiştir.

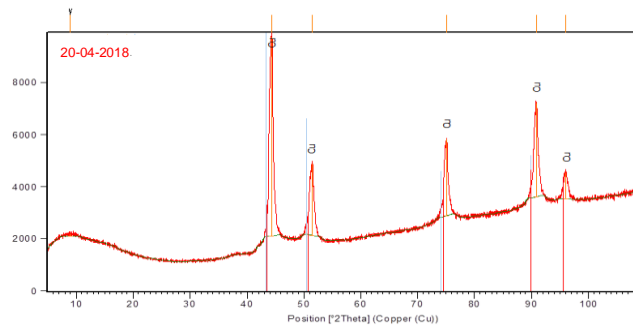
Fourier-dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) spektrumu bilgileri, 650-4000 bölgesindeki (cm<sup>-1</sup>) geçirgenlik modunda çalışan bir Perkin Elmer Spectrum 100 Model spektrometresi kullanılarak toplanmıştır.

Yapı iskelelerinin biyoaktif davranış testi, Kokubo ve ark. (1990) tarafından tarif edildiği gibi, numunelerin SBF içinde bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Yapı iskelesi örnekleri 200 mL SBF içine batırılmış ve 37° C sıcaklıkta tutulan bir inkübatörde bekletilmişlerdir. Örnekler SBF'den 14 gün sonra çıkarılmış ve 37°C'deki inkübatörde 4 h boyunca kurutulmuştur. Numuneler daha sonra SEM, XRD ve FTIR kullanılarak karakterize edilmişlerdir. Yapı iskelelerinin 1, 7 ve 14 gün boyunca SBF içinde bekletilmesinin bir sonucu olarak, SBF çözeltisinde stronsiyum ve bakır iyon konsantrasyonunda meydana gelen değişim, indüktif çift plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler için, 13.56 MHz'de çalıştırılan (Ar ve N<sub>2</sub> gazı kullanan) bir Perkin Elmer Model Optima 2100 ICP kullanılmıştır.

### 3. Sonuçlar

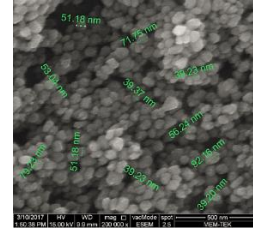
#### 3.1. Mikroyapısal karakterizasyon

Üretilen bakır nanoparçacıklarının karakterizasyonu XRD ve SEM analizleri kullanılarak yapılmıştır. Şekil 1 standart JCPDS kartlarına göre, üretilen yapı iskelelerinin içeriğindeki bakır nanoparçacıklarına ait pik listesini göstermektedir. (20-04-2018) kodlu JCPDS kartına göre 44.10°, 51.20°, 75.5°, 91.2° ve 96.5° 2θ'da görülen pikler bakır nanoparçacıklarını temsil etmektedir.



Şekil 1. Bakır nanoparçacıklarının XRD analizi sonuçları

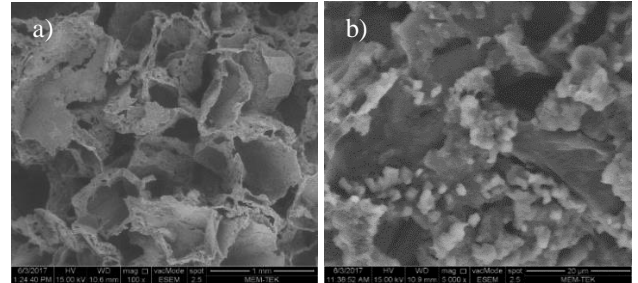
Şekil 2'de bakır nanoparçacıklarının SEM analizi verilmektedir. Yapılan ölçümler sonucunda, santrifüj yöntemi ile üretilen bakır nanoparçacıklarının tanecik boyutunun 39.7-85.0 nm arasında değiştiği saptanmıştır. 55 tanecik üzerinden yapılan ölçümler sonucunda da, ortalama tanecik boyutunun 60.0 ± 10.6 nm olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Bakır nanoparçacıklarının SEM görüntüleri

Üretilen yapı iskelelerinin makrogözenekli ağ yapısı Şekil 3'te gösterilmiştir. Şekil 3a'dan görülebileceği gibi birbirine bağlı gözenek yapısına sahip, oldukça gözenekli yapı iskeleleri üretilmiştir. Kompozit yapı iskelesi yüzeyinde polimer yapısının dışında görülen parlak beyaz parçacıklar, NaCl kristalinden farklı bir morfolojiye sahip oldukları için bunların biyoaktif cam parçacıkları oldukları düşünülmektedir (Şekil 3b). Bu sonuç, takip eden bölümdeki FTIR sonuçlarıyla da desteklenmektedir.

Kemik doku mühendisliğinde, hücrelerin büyümesi, bağlanması ve çoğalması, besinlerin ve metabolik atıkların taşınması için gözenekli bir yapıya ihtiyaç vardır. Ayrıca, hücrelerin istenen fiziksel forma dönüşmesini ve büyümüş dokunun vaskülarizasyonunu desteklemesi için de kontrol edilebilir ve birbirine bağlı bir gözenekliliğin olması zorunludur [Boccaccini ve ark., 2003, Hollister, 2005, 8, Rezwan ve ark., 2006]. SEM sonuçlarından, üretilen yapı iskelelerinin birbirine bağlı gözenekli bir yapıya sahip olmasının, yapı iskelelerinin hücre bağlanması, göçü ve vaskülarizasyonu için uygun olduğu sonuca varılmıştır.

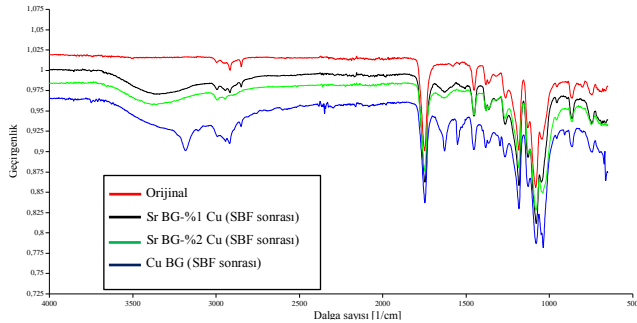


Şekil 3. Üretilen kompozit yapı iskelelerinin SEM görüntüleri

FTIR, XRD ve SEM analizleri, SBF ile temas halinde olan tüm yapı iskelesi yüzeyinde oluşan HA tabakasını saptamak için gerçekleştirilmiştir. SBF'de bekletme öncesi ve sonrasında, üretilen yapı iskelelerine ait FTIR spektrumları Şekil 4'te verilmiştir. SBF öncesi yapı iskelelerinin 3000 cm<sup>-1</sup> ve 2945 cm<sup>-1</sup>'de bulunan pikleri, PDLLA'nın metil ve metilen gruplarının gerilmesinden kaynaklanmaktadır (Pereira ve ark., 2014). PDLLA'nın karakteristik bantlarından biri olan ester karbonil gruplarının gerilme modu (C = O) 1747 cm<sup>-1</sup>'de gözükmemektedir (Leal ve ark., 2013). 1452 cm<sup>-1</sup> ve 1381 cm<sup>-1</sup>'deki pikler sırasıyla CH<sub>3</sub> asimetrik ve δs CH<sub>3</sub> simetrik deformasyon modlarını göstermektedir (Pereira ve ark., 2014; Leal ve ark., 2013). 1263 cm<sup>-1</sup>'de görünen pik, ester gruplarının -CO-O- gerilme bantlarına aittir (Pereira ve ark., 2014). Bu piklere ek olarak, 1183, 1135, 1082 ve 1043 cm<sup>-1</sup>'deki piklerin ise =C-O gerilme bantları olduğu belirlenmiştir. ~864 cm<sup>-1</sup> ve ~750 cm<sup>-1</sup>'deki iki pik, PDLLA'nın CH eğilme titreşim bantlarını

göstermektedir (Leal ve ark., 2013). Si-O-Si asimetrik gerilme titreşimine karşılık gelen bant, 1080  $\text{cm}^{-1}$ 'de (Catauno ve ark., 2015) saptanmıştır. 950  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pik, non-bridging oksijen içeren Si-O-Ca bağlarını göstermektedir (Catauno ve ark., 2015). SBF öncesi yapı iskelesi numunesinin FTIR spektrumu, kullanılan biyocam ağ yapısının tüm özelliklerinin üretilen yapı iskelesinde de görüldüğünü kanıtlamaktadır.

SBF'de bekletme sonrasındaki yapı iskelelerinin FTIR spektrumunda, HA'nin kristal yapısında bulunan, yapısal OH- grubunun gerilmesini karakterize eden geniş band 3000 ila 3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında görülmektedir (Akram ve ark., 2015). 3186  $\text{cm}^{-1}$  ve 2917  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler, sırasıyla  $\text{CO}_3$  grupları (Ryszkowska ve ark., 2010) ve HA'nın C-H bantlarını karakterize (Wan ve ark., 2015) etmektedir. 1630  $\text{cm}^{-1}$  ve 1550  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler ise, su absorpsiyon bandına ve  $\text{CO}_3$  ( $\nu_3$ ) titreşim piklerine aittir (Sofronia ve ark., 2014). Yapı iskelelerine ait FTIR spektrumları incelendiğinde, SBF öncesi ve sonrası spektrumlarında bir takım farklılıklar gözlenmiştir. 1043  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikin 1035  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaydığı ve bu pikin SBF öncesindeki yapı iskelesinin spektrumu ile kıyaslandığında daha büyük ve daha keskin bir bant haline geldiği saptanmıştır. Pikteki bu değişimin nedeninin, oluşan  $\text{PO}_4^{3-}$  gruplarının simetrik gerilme ve eğilme moduyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Akram ve ark., 2015; Sofronia ve ark., 2014). SBF'de bekletme sonrası tüm numunelerin FTIR spektrum sonuçları, yapı iskesinin her tarafında HA oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir.

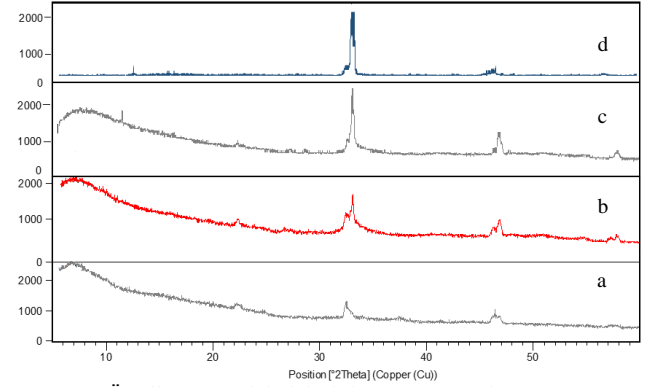


Şekil 4. Üretilen yapı iskelelerinin SBF öncesi ve sonrası FTIR spektrumları

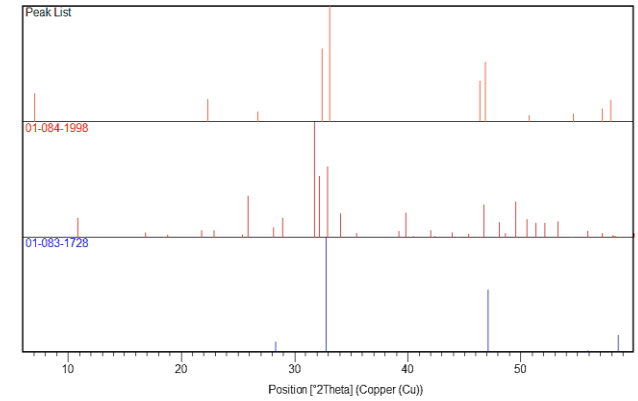
SBF'de bekletme öncesi ve sonrasında, üretilen tüm yapı iskeleleri için XRD analizleri Şekil 5'te verilmiştir. Şekil 6 ise, standart JCPDS kartlarına göre, üretilen yapı iskelelerinin içeriğindeki NaCl ve HA tabakası kristal yapısının pik listesini göstermektedir. (01-083-1728) kodlu JCPDS kartına göre 32.8°, 47.1° ve 58.5° 2θ'da görülen pikler NaCl'ü, (01-084-1998) kodlu JCPDS kartına göre 33° ve 48° 2θ'da görülen pikler HA'ı temsil etmektedir. NaCl'e ait çıkan pikler, yapı iskelesi içinde halen çözünmemiş halde NaCl kristallerinin kaldığını göstermektedir.

Şekil 5 incelendiğinde, yapı iskelesi orijinal örnekle kıyaslandığında, SBF içinde 14 gün bekletme süresi sonunda 33° 2θ'da görülen pikin şiddetinin ve bant genişliğinin arttığı saptanmıştır. Bu da kompozit yapı iskelesi yüzeyinde HA tabakasının oluştuğunu

göstermektedir. 33° 2θ'da ki bu pik, daha önce belirtildiği gibi (01-084-1998 kodlu JCPDS standart kartına göre), HA tabakasının oluşumunu temsil etmektedir. Ayrıca XRD analizi, yapı iskelesi yüzeyindeki HA oluşumunun FTIR sonuçlarını doğruladığını ortaya koymuştur.

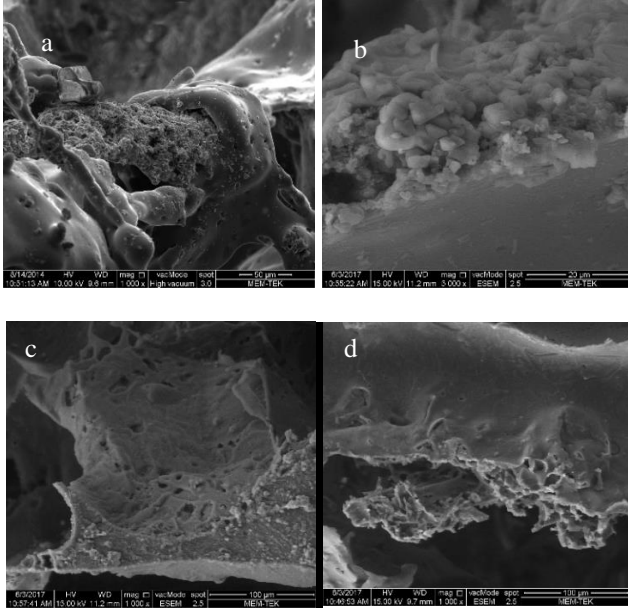


Şekil 5. Üretilen yapı iskelelerinin SBF öncesi (a) ve sonrası (b,c,d) XRD analizi sonuçları: (b) Sr katkılı BG +%2 wt Cu nanoparçacıkları (c) Sr katkılı BG +%1 wt Cu nanoparçacıkları (d) Cu katkılı BG



Şekil 6. Standart JCPDS kartlarına göre yapı iskelesinde saptanan HA tabakasının ve NaCl kristalinin pik listesi

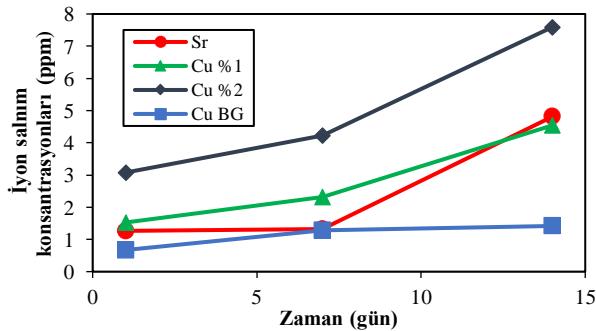
SEM, biyoaktif yapı iskeleleri yüzeyinde oluşan bir HA tabakası hakkında bilgi vermektedir. SBF'ye daldırıldıktan 14 gün sonra, üretilen tüm yapı iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 7'de verilmiştir. Şekil 7'den görüleceği üzere, yapı iskelesi yüzeyleri yeni oluşturulmuş bir HA tabakası ile kaplanmıştır. Yapı iskelesi yüzeylerinde bazı küçük parçacıklar oluşmuştur. Bu HA kristallerinin, BG parçacıklarının SBF ile temasının bir sonucu olarak oluştuğu açıktır. Hench tarafından önerilen ve genel olarak bilinen HA oluşum mekanizmasının, yapı iskelesi yüzeyi ile SBF çözeltisi arasındaki iyonik değişime dayandığı bilinmektedir (Hench ve ark., 1970). Şekil 7'den görülebileceği gibi, polimer tabakası üzerinde oluşan küçük boşluklar, polimer matrisinin kaybolmasına kanıt olarak gösterilebilir. Bu polimer matrisine gömülü olan BG parçacıklarının SBF ile temas etme şansı bularak, yapı iskelesi yüzeyinde HA tabakasının oluşumuna neden olduğu anlamına gelmektedir [Hench ve ark., 1970, Erol ve ark., 2012b, Erol ve ark., 2012c].



Şekil 7. Üretilen kompozit yapı iskelelerinin SBF sonrası (14 gün) SEM görüntüleri a) Cu katkılı BG, b/c) Sr katkılı BG-%2 Cu nanoparçacıklı, d) Sr katkılı BG-%1 Cu nanoparçacıklı

### 3.2. Cu ve Sr salımı

İyon değişimi sürecini cam çözünme hızı ile ilişkilendirmek için, yapı iskelelerinin bakır ve stronsiyum salım davranışları belirlenmiştir. Şekil 8, yapı iskelesi örneklerinin SBF çözeltisinde bekletilmeleri sonrasında çözültiyeye geçen Cu ve Sr iyonlarının konsantrasyonlarını göstermektedir. Şekil 8'den görülebileceği gibi, Cu ve Sr iyon miktarları SBF içinde bekletilme süresinin uzamasıyla artmıştır. Bu sonuç, camın yapısında bulunan Sr iyonu ile yapı iskelesi yapımında kullanılan Cu nanoparçacıklarının iyon değişim prosesi temeline dayalı gerçekleşen camın çözünmesi ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, Cu katkılı BG kullanılarak üretilen yapı iskelesinden olan Cu salımının, Cu nanoparçacıkların kullanıldığı yapı iskelelerinden olan Cu salımından oldukça düşük kaldığı açıkça görülmektedir. Bunun nedeni, camın yapısında bulunan Cu iyonlarının çözünmesinin, yapı iskelesine sonradan ilave edilen Cu nanoparçacıklarının serbest kalmasından daha zor olduğu gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, %1 Cu nanoparçacıkları içeren yapı iskelesinden olan Cu salımı ile Sr iyon salım konsantrasyonlarının hemen hemen aynı olduğu da açıkça görülmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Yapı iskelesinden Cu ve Sr iyon salım konsantrasyonlarının zamanla değişimi

## 4. Tartışma

Bu çalışmada, Cu katkılı BG ve Sr katkılı BG ile bakır nanoparçacıklarının varlığında 3D biyoaktif cam-PDLLA kompozit gözenekli yapı iskeleleri, modifiye edilmiş çözücü döküm ve tanecik uzaklaştırma yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Yapılan FTIR, XRD ve SEM analiz sonuçları, üretilen tüm yapı iskelesi yüzeylerinde SBF sonrasında HA oluşumunu ortaya koymuştur. Ayrıca, terapötik iyon salımları sonuçlarına bakıldığında, Sr iyon salımı 1.27-4.81 ppm aralığında iken, Cu iyon salımları sırasıyla, Cu katkılı BG için 0.67-1.42 ppm, Sr katkılı BG-%1 Cu için 1.53-4.54 ppm, Sr katkılı BG-%2 Cu için 3.08-7.59 ppm olarak bulunmuştur. Genel sonuçlar, bu çalışmada üretilen kompozit yapı iskelelerinin kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için osteojenik, anjiyojenik ve antibakteriyel potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir.

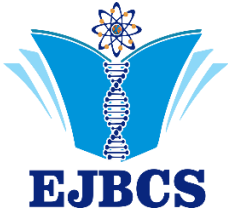
## Kaynaklar

- Akram M, Alshemary AZ, Goh YF, Ibrahim WAW, Lintang HO, Hussain R 2015. Continuous microwave flow synthesis of mesoporous hydroxyapatite. *Material Science of Engineering C*, 56: 356–362.
- Boccaccini AR, Maquet V 2003. Bioresorbable and bioactive polymer Bioglass®composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. *Composites Science and Technology*, 63(16): 2417–2429.
- Catauro M, Bollino F, Renella RA, Papale F 2015. Sol-gel synthesis of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses: Influence of the heat treatment on their bioactivity and biocompatibility. *Ceramics International*, 41: 12578–12588.
- Chen Q, Roether JA, Boccaccini AR 2008a. Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials. *Topics in Tissue Engineering*, Vol. 4 (Ch. 6), Biomaterials and Tissue Engineering Group.
- Chen YW, Shi GQ, Ding YL, Yu XX, Zhang XH, Zhao CS, et al. 2008b. In vitro study on the influence of strontium-doped calcium polyphosphate on the angiogenesis-related behaviors of HUVECs. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 19: 2655–2662.
- Correlo VM, Oliveira JM, Mano JF, Neves NM, Reis RL 2011. Natural origin materials for bone tissue engineering-properties, processing, and performance. *Principles of Regenerative Medicine*, 2nd ed., (Ch. 32, Part 3), London: Academic Press.
- Erol MM, Mouriño V, Newby P, Chatzistavrou X, Roether JA, Hupa L, Boccaccini AR 2012a. Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 8: 792–801.
- Erol M, Özyuğuran A, Özarpat Ö, Küçükbayrak S 2012b. 3D Composite scaffolds using Strontium containing bioactive glasses. *Journal of European Ceramic Society*, 32: 2747–2755.
- Erol M, Özyuğuran A, Özarpat Ö, Küçükbayrak S 2012c. Investigation of Strontium effect on the bioactive behavior glasses in the system SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-SrO. *Key Engineering Materials*, 493-494: 68-73.
- Gerhardt LC, Boccaccini AR 2010. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3: 3867-3910.
- Hench LL, Splinter RJ, Allen WC 1971. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 5(6): 117–141.



- Hollister S 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 4: 518-524.
- Kaur G, Pandey P, Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G 2014. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102A: 254–274.
- Kokubo T, Huang ZT, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T 1990. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic. *Journal of Biomedical. Material and Research*, 24(3): 331–343.
- Leal AI, Caridade SG, Ma J, Yu N, Gomes ME, Reis RL, Jansen JA, Walboomers XF, Mano JF 2013. Asymmetric PDLA membranes containing Bioglass® for guided tissue regeneration: Characterization and in vitro biological behavior. *Dental Materials*, 29: 427–436.
- Misra SK, Ansari TI, Valappil SP, Mohn D, Philip SE, Stark WJ, Roy I, Knowles JC, Salih V, Boccaccini AR 2010. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 31: 2806-2815.
- Öztopalan DF, Durmuş AS 2017. Kemik grefti yerine biyoaktif cam kullanımı. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 10(1): 56-61.
- Pereira RV, Salmoriab GV, Mouraa MOC, Aragonesc Á, Fredela MC 2014. Scaffolds of PDLA/Bioglass 58S Produced via Selective Laser Sintering. *Materials Research*, 17(1): 33-38.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18): 3413–3431.
- Ryszkowska JL, Auguścik M, Sheikh A, Boccaccini AR 2010. Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass for bone tissue engineering. *Composites Science and Technology*, 70: 1894–1908.
- Seeman E, Devogelaer JP, Lorenc R, Spector T, Brixen K, Balogh A, et al. 2008. Strontium ranelate reduces the risk of vertebral fractures in patients with osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23: 433-438.
- Sofronia AM, Baies R, Anghel EM, Marinescu CA, Tanasescu S 2014. Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite. *Material Science of Engineering C*, 43: 153–163.
- Wan Y, Wu C, Xiong G, Zuo G, Jin J, Ren K, Zhu Y, Wang Z, Luo H 2015. Mechanical properties and cytotoxicity of nanoplate-like hydroxyapatite/polylactide nanocomposites prepared by intercalation technique. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 47: 29–37.
- Wang H, Zhao S, Zhou J, Shen Y, Huang W, Zhang C, et al. 2014. Evaluation of borate BG scaffolds as a controlled delivery system for Cu ions in stimulating osteogenesis and angiogenesis in bone healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 2: 8547-8557.
- Wang W, Yeung KW 2017. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2: 224-247.





## Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.gov.tr/ejbcs



### Effects of conivaptan and mannitol on serum cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-15 and IL-35) following bilateral carotid artery occlusion

Betül Can<sup>1\*</sup>, Semih Öz<sup>2</sup>, Ahmet Musmul<sup>3</sup>, Tuğba Erkmen<sup>4</sup>, Ezgi Yaver<sup>1</sup>, Meltem Erdaş<sup>1</sup>, Özkan Alataş<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Eskisehir, Turkey

<sup>2</sup>Eskisehir Osmangazi University, Vocational School of Health Services, Health Services Department, Eskisehir, Turkey

<sup>3</sup>Eskisehir Osmangazi University, Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Eskisehir, Turkey

<sup>4</sup>Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Izmir, Turkey

\*Corresponding author: betul\_cn@yahoo.com

Orcid No: 0000-0001-8430-5298

**Abstract:** This study aimed to investigate the post-ischemic effects of aquaretic conivaptan and diuretic mannitol on serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-15 (IL-15) and interleukin-35 (IL-35) levels in an experimental cerebral ischemia-reperfusion (I/R) rat model. Healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: Control (Sham), I/R (I/R+Saline), MAN (I/R+mannitol), CON10 (I/R+conivaptan 10 mg/ml), and CON20 (I/R+conivaptan 20 mg/ml). Cerebral ischemia was conducted using bilateral common carotid artery occlusion technique. At the onset of reperfusion, saline, conivaptan or mannitol were administered intravenously. The blood samples were taken at 6th hours of reperfusion. Rat serum TNF- $\alpha$ , IL-15 and IL-35 levels were measured by using commercial ELISA Kits. The biochemical analyses showed that I/R method led to an increase in serum TNF- $\alpha$  and IL-15 levels when compared with the control. Conivaptan treatments decreased TNF- $\alpha$  and IL-15 levels significantly compared to the I/R group ( $p<0.001$ ). IL-35 levels were high in all ischemia groups, but 10 mg/ml conivaptan brought its levels close to the control ( $p<0.001$ ). The results of Spearman's correlation analyses showed that serum TNF- $\alpha$  levels were positively correlated with IL-15 levels ( $p<0.001$ ,  $r=0.596$ ) and IL-35 levels ( $p<0.05$ ,  $r=0.319$ ). According to our findings on pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels, conivaptan was more effective than mannitol in balancing inflammatory response in a dose-dependent manner. This study may provide useful information in the development of treatment/follow-up strategies for ischemia and inflammation related diseases such as stroke and brain edema.

**Keywords:** brain edema, conivaptan, interleukin, mannitol, serum cytokines, vasopressin

#### *Bilateral Karotis Arter Oklüzyonu Sonrasında Conivaptan ve Mannitol'ün Serum Sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-15 ve IL-35) Düzeyleri Üzerine Etkileri*

**Özet:** Bu çalışmada, deneysel bir serebral iskemi-reperfüzyon hayvan modelinde akuaretik Conivaptan ve diüretik Mannitol tedavilerinin serum tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-15 (IL-15) ve interlökin-35 (IL-35) düzeylerine post-iskemik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Sağlıklı erkek Sprague-Dawley sıçanlar rastgele 5 gruba ayrılmıştır: Kontrol (Sham), I/R (I/R+Salin), MAN (I/R+Mannitol), CON10 (I/R+Conivaptan 10 mg/ml), and CON20 (I/R+Conivaptan 20 mg/ml). Serebral iskemi, bilateral komon karotis arter oklüzyonu tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reperfüzyonun başlangıcında salin, conivaptan veya mannitol intravenöz yolla uygulanmıştır. Kan örnekleri reperfüzyonun 6. saatinde alınmıştır. Sıçan TNF- $\alpha$ , IL-15 ve IL-35 serum düzeyleri ticari ELISA kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Biyokimyasal analizler, I/R uygulaması TNF- $\alpha$  ve IL-15 düzeylerinde kontrole göre artışa neden olmuştur. Conivaptan tedavileri TNF- $\alpha$  ve IL-15 düzeylerini I/R grubuna göre anlamlı düzeyde azaltmıştır ( $p<0.001$ ). IL-35 düzeyleri tüm iskemi gruplarında yüksek bulunurken, 10 mg/ml Conivaptan tedavisi IL-35 düzeylerini kontrol grubuna yaklaştırmıştır ( $p<0.001$ ). Yapılan Spearman korelasyon analizleri, serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin IL-15 ( $p<0.001$ ,  $r=0.596$ ) ve IL-35 ( $p<0.05$ ,  $r=0.319$ ) düzeyleri ile pozitif yönde ilişkili olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar bu sitokin düzeylerine dair bulgularımız, Conivaptan'ın doza bağlı olarak inflammatuar yanıtın dengelenmesinde Mannitol'den daha etkili olabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, inme ve beyin ödemi gibi iskemi ve inflamasyon ile ilişkili hastalıkların tedavi ve takibine yönelik stratejilerin geliştirilmesinde yararlı bilgiler sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** beyin ödemi, conivaptan, interlökin, mannitol, serum sitokinleri, vazopressin

## 1. Introduction

Inflammation which is defined as an immunological reaction involving natural and adaptive immunity mechanisms, is a protective response in which exogenous and endogenous harmful agents that initiate cell damage are reduced, destroyed, or neutralized and attempted to be removed to maintain tissue homeostasis (Kumar et al., 2012; Chen and Xu, 2015). During this response, the process of repairing and cleaning of damaged cells and tissues is also initiated. It is generally considered that a controlled inflammatory response has beneficial effects, but it could be detrimental if triggered in excessive manner (Medzhitov, 2008).

The progressive inflammation process can be induced by ischemic conditions, and depends on the expression, release and activation of inflammatory mediators such as cytokines from cerebral and peripheral cells (Amantea et al., 2014). Cytokines are small signal molecules that can act on picomolar or nanomolar concentrations and defined as immunomodulators which are in form of polypeptide, protein and/or glycoprotein that regulate the activities of the target cells (Ramesh et al., 2013; Dembic, 2015). Various cytokines that are released following ischemic brain injury have been detected in blood, cerebrospinal fluid, and variety of brain regions both in humans and experimental animal models (Mizuma and Yenari, 2017). Tumor-necrosis factor (TNF, TNF- $\alpha$ ) is one of the most widely studied cytokine in experimental models with ischemia-related diseases (Lambertsen et al., 2012). It was suggested that the increase in levels of TNF- $\alpha$  released from active microglia in response to brain damage or neuroinflammation induced and promoted BBB destruction (Nishioku et al., 2010). Interleukin-15 (IL-15) is defined as a neuroprotective cytokine that has various effects on and outside the immunity system (Patidar et al., 2016), and is a new mediator that enhances and regulates TNF signaling (Pan et al., 2009; Pan et al., 2013). Interleukin-35 (IL-35) has been described as a new cytokine in 2007 that has anti-inflammatory and immunosuppressive properties (Banchereau et al., 2012). However, there is no sufficient information about the roles and molecular mechanisms of IL-15 and IL-35 in the post-ischemic inflammatory process.

It is suggested that ischemia-reperfusion (I/R) process which is continued with damage of the blood-brain barrier (BBB) and with cerebral edema, is becoming more complicated by the hypersecretion of arginine vasopressin (AVP). AVP is a neurohypophysial antidiuretic hormone and has many functions such as regulation of free water reabsorption, body fluid homeostasis, and acts upon its specific G protein-coupled receptors called  $V_{1A}$  ( $V_1$ , vascular),  $V_2$  (renal), and  $V_{1B}$  ( $V_3$ , pituitary) (Thibonnier et al., 2001; Palmer, 2015). In some brain injuries such as ischemic stroke (Barreca et al., 2001) and traumatic brain injury (Szmydynger-Chodobska et al., 2011), have been estimated that AVP levels increase in plasma and a variety of brain regions, and AVP hypersecretion stimulates platelet aggregation and coagulation factor release (Thibonnier et

al., 2001). AVP receptors might also prefer as an important therapeutic target (Zhao et al., 2015).

Vaptans, a new group of drugs produced in order to block AVP receptors, were recommended for the treatment of diseases accompanied by water retention (Peri 2013). Conivaptan ( $V_{1A}/V_2$  receptor antagonist), one of these AVP antagonist agents, is approved by the FDA in 2005 for the treatment of patients with clinical hyponatremia (Palmer et al., 2016). Conivaptan has aquaretic effects such as promoting renal free-water excretion without a significant change in electrolyte excretion (Wada et al., 2002; Murphy et al., 2004; Ali et al., 2007).

Mannitol which an alcohol derivative of mannose sugar, is a widely used diuretic agent (Grande and Romner, 2012) and has therapeutic effects such as neuroprotection by free radical scavenging, improving perfusion to the ischemic area and immunomodulation (Korenkov et al., 2000; Rabinstein, 2006). However, serious cerebral and systemic side effects of mannitol were reported in clinical studies (Wykes and Vindlacheruvu 2015; Rabinstein 2006). In recently presented meta-analyses, the need for an appropriate osmotherapeutic agent with low side effects has been overemphasized (Grande and Romner, 2012).

There is no sufficient and detailed information in the literature about changes and correlations of TNF- $\alpha$ , IL-15 and IL-35 levels during the post-ischemic treatment with conivaptan versus mannitol. This study was aimed to investigate the effects of treatment with aquaretic conivaptan and diuretic mannitol on serum TNF- $\alpha$  (pro-inflammatory), IL-15 (pro-inflammatory) and IL-35 (anti-inflammatory) cytokine levels following an experimental cerebral I/R rat model formed by bilateral carotid artery occlusion.

## 2. Materials and Method

All research protocols which used in this study were approved by the Animal Experiments Local Ethics Committee of Eskisehir Osmangazi University (Approval date: 14.03.2018; Protocol no: 560-1/2018).

### 2.1. Chemicals and Kits

The chemicals which was used in this study are as follows: Conivaptan hydrochloride (Cat. no. TRC-C384700) was purchased from Toronto Research Chemicals (Canada). D-mannitol (Cat. no. M4125) and Dimethyl sulfoxide (Cat. no. D5879) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Ketamine HCl (50 mg/mL) was from Pfizer (USA); Xylazine HCl was from Egevet (Turkey). Rat commercial ELISA Kits for Tumor Necrosis Factor Alpha (Cat. no. SEA133Ra) and Interleukin-15 (Cat. no. SEA061Ra) were purchased from Cloud-Clone Corp. (Houston, USA). Rat Interleukin-35 (Cat. no. CSB-E13652r) Kit were purchased from Cusabio Biotech Company (Wuhan, China).

### 2.2. Animals and Housing

Eight-week-old male Sprague-Dawley rats weighing 250-300 g, were purchased from KOBAY Laboratories (Ankara, Turkey), and housed in the temperature- ( $21 \pm 1$  °C), light- (12/12 h light/dark cycle) and humidity-controlled (45-50%)

environment with free access to standard rodent food pellets and tap water at the Medical and Surgical Experimental Research Center (TICAM) of the University.

### 2.3. Experimental Design

The animals were deprived of food for about 12 hours without any other kind of restriction, prior to the surgical operations. On the day of surgery, rats body weights were recorded, and anesthesia was ocured with Ketamine HCl (50 mg/kg) and Xylazine HCl (10 mg/kg) by intramuscular injection. At the sixth hours after the onset of reperfusion, blood samples were obtained immediately under anesthesia which is applied with the same chemicals and the doses, by intraperitoneal route.

In this study, rats were randomly divided into the five groups as follows: Control (Sham; n=10), I/R (I/R+saline; n=12), MAN (I/R+mannitol; n=12), CON10 (I/R+conivaptan 10 mg/mL; n=12) and CON20 (I/R+conivaptan 20 mg/mL; n=12). One animal in the I/R group eliminated from the study due to the respiratory arrest which occurred during the reperfusion process. The surgical protocols were based on two-vessel occlusion model with a slight modification (Smith et al., 1984). In this model, cerebral ischemia was induced by clamping arteria carotid communis bilaterally, without any added hypotension procedures. In all groups except the control group, the carotid arteries were clamped by a vascular clamp (Vascu Stop Bulldog Clamp, Istanbul, Turkey) for 30 minutes. Saline (0.9% NaCl), mannitol (20% wt/vol; dissolved in saline; MW=182.17) and conivaptan (10 or 20 mg/mL dissolved in 5% final DMSO vol/vol; MW=535.04) were applied to the related groups by the infusion into the jugular vein for 30 minutes (1 mL/h) with the onset of reperfusion (Taya et al., 2008). Immediately after skin-suturing, 1 mL of saline was injected intraperitoneally to the rats which were treated with mannitol and conivaptan to prevent of hypovolemia, and animals were maintained in separate cages. In the control group neck incision without clamping was performed and surface skin was sutured. The cardiac blood samples were taken at sixth hours of the reperfusion (at sixth hours after skin-suturing in control group) under anesthesia, and serum samples were analyzed as detailed below.

### 2.4. Preparation and Analyses of Serum Samples

The blood samples were centrifuged in 1000 x g for five minutes and obtained serum samples were maintained at -80 °C until the biochemical analysis. The serum TNF- $\alpha$ , IL-15, and

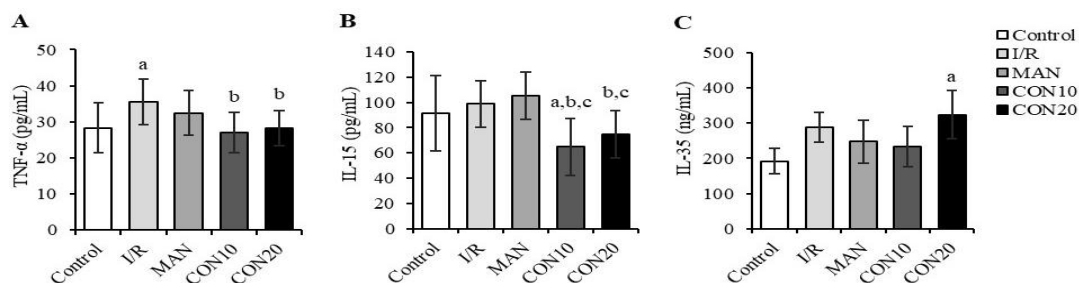
IL-35 levels were measured with the commercial ELISA Kits according to the manufacturer's instructions using a plate reader (VICTOR X3 Multilabel, PerkinElmer Inc., USA) at an optical density of 450 nm. The TNF- $\alpha$ , IL-15, and IL-35 ELISA Kits were based on a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. The detection range, the minimum detectable dose, the intra- and inter-assay precisions of TNF- $\alpha$ , IL-15 and IL-35 Kits were as follows, respectively: 15.6-1,000 pg/mL, 6.1pg/mL, CV<10% and CV<12%; 15.6-1,000 pg/mL, 5.8 pg/mL, CV<10% and CV<12%; and 15.6-1,000 pg/mL, 3.9 pg/mL, CV<8% and CV<10%.

### 2.5. Statistical Analysis

All data were assessed by the Shapiro–Wilk test for the normality. Comparisons for normally distributed variables were shown as n (sample size) and mean  $\pm$  standard deviation (SD) and were analyzed by the One-Way Analysis of Variance (Tukey's post-hoc analyses) test. The comparisons for non-normally distributed variables were analyzed by the Kruskal–Wallis test. The correlations among non-normally distributed variables were determined by using Spearman correlations analysis. The statistical significance level was accepted for P value less than 0.05 ( $p<0.05$ ). All statistical analysis was performed using SPSS Version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) by a blinded statistician.

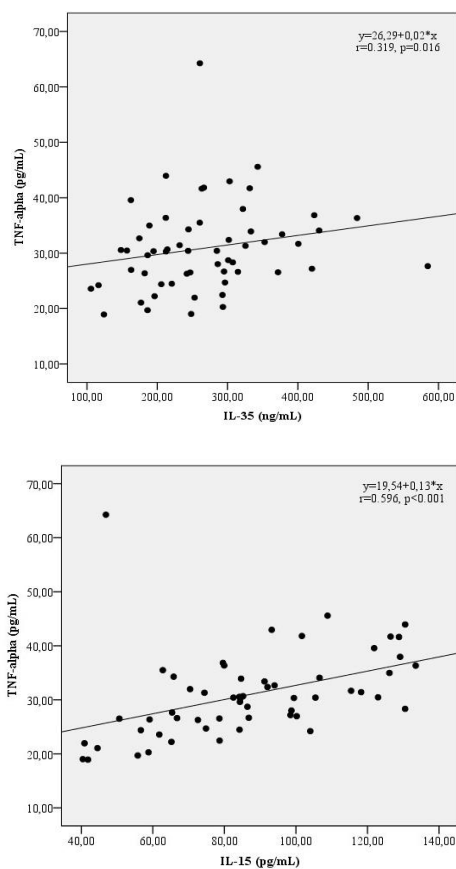
### 3. Results

To analyze whether conivaptan has a role in balancing pro- and anti-inflammatory cytokines following cerebral injury, TNF- $\alpha$ , IL-15 and IL-35 levels were measured in rat serum samples. Serum TNF- $\alpha$  levels were increased in the I/R group compared to the control group ( $p<0.001$ ), whereas there was a decrease in the CON10 and CON20 groups compared with the I/R group ( $p<0.001$ ) (Fig. 1A). Serum IL-15 levels in the CON10 group was lower than the control, I/R and MAN groups ( $p<0.001$ ). In the CON20 group, a decrease was detected in IL-15 levels compared to I/R and MAN groups ( $p<0.001$ ), but there was no significant difference between the I/R and control group (Fig. 1B). The statistical analysis showed that serum IL-35 levels were increased in all groups (I/R and treatment groups), however, this increase was significant only in the CON20 group compared to the control ( $p<0.001$ ) (Fig. 1C).



**Figure 1.** Comparison of the serum cytokine levels among the study groups. (A) Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels, (B) Interleukin-15 (IL-15) levels, and (C) Interleukin-35 (IL-35) levels. Control, Sham; I/R, I/R+saline; MAN, I/R+mannitol; CON10, I/R+conivaptan 10 mg/ml; CON20, I/R+conivaptan 20 mg/ml. I/R, ischemia-reperfusion; Data are shown as mean  $\pm$  standart deviation. <sup>a</sup> $p<0.001$  versus control group; <sup>b</sup> $p<0.001$  versus I/R group, and <sup>c</sup> $p<0.001$  versus MAN group.

Correlations between the serum cytokine levels were calculated by using the Spearman's correlation analyses, both in all and each group separately (Table 1). According to the findings, serum TNF- $\alpha$  levels were positively correlated with IL-15 levels ( $p<0.001$ ,  $r=0.596$ ) and IL-35 levels ( $p<0.05$ ,  $r=0.319$ ) in all groups. Scatter plot diagrams of all groups were represented in Figure 2. There was a statistically positive correlation between serum TNF- $\alpha$  and IL-15 levels in the control ( $p<0.05$ ,  $r=0.745$ ), the MAN ( $p<0.001$ ,  $r=0.727$ ) and the CON20 ( $p<0.005$ ,  $r=0.615$ ) groups (Figure 2A). Serum TNF- $\alpha$  and IL-35 levels were positively correlated only in the CON20 group ( $p<0.001$ ,  $r=0.748$ ) (Figure 2B).



**Figure 2.** Scatter-plot diagrams representing correlations between serum TNF- $\alpha$  levels (pg/mL) and serum IL-15 (pg/mL) (A) or IL-35 (ng/mL) levels (B), respectively. The  $r$  and  $p$  values showed in the figure represent the results of Spearman's correlation analysis. TNF- $\alpha$ , tumor necrosis alpha; IL-15, interleukin-15; IL-35, interleukin-35.

**Table 1.** Spearman's correlation coefficients of the study groups.

|       | TNF- $\alpha$ |                   |               |               |                 |                 |
|-------|---------------|-------------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
|       | All<br>(n=57) | Control<br>(n=10) | I/R<br>(n=11) | MAN<br>(n=12) | CON10<br>(n=12) | CON20<br>(n=12) |
| IL-15 | 0.596**       | 0.745*            | ns            | 0.727**       | ns              | 0.615*          |
| IL-35 | 0.319*        | ns                | ns            | ns            | ns              | 0.748**         |

\*\* $p<0.001$ , \* $p<0.05$ . Data are shown as n (sample size) and mean $\pm$ standard deviation. ns, not significant.

#### 4. Discussion

Brain tissue is characterized by high metabolic rate due to its functions such as preservation of membrane potentials, synthesis/storage of neurotransmitters and renewal of disrupted structural parts. Considering the central role and importance of the brain in the body, it is vital providing a continuous blood flow to the brain through the arterial circulation (Iadecola and Anrather, 2011). The sudden interruption of blood flow to the brain causes tissue hypoxia, induces an inflammatory cascade and can cause irreversible pathological changes due to ischemic death of the affected tissue (Sokoloff, 1997). Interestingly, reperfusion is often associated with an aggravation of tissue injury and a post-ischemic inflammatory response, which is called reperfusion injury (Bonaventura et al., 2016). Although the mechanisms associated with tissue injury such as BBB destruction are multi-factorial, it is suggested that inflammation usually has a pre-dominant role (Witt and Sandoval, 2014).

Tumor necrosis factor (TNF) is a pleiotropic pro-inflammatory cytokine that exhibits a variety of biological activities and is produced by a variety of immune system-related cells in response to several activating stimuli. It is stated that low levels of TNF inhibit neuronal deaths following metabolic exotoxic damage, induce the proliferation of astrocytes and neuronal progenitor cells, and have a critical prescription for repair and regeneration of damaged tissue in the central nervous system (Wang et al., 2003). Although TNF expression is tightly controlled, it is expressed at very high levels in various systemic inflammatory diseases. It is suggested that elevated TNF levels activate injury response and mediate hypotension, diffuse coagulation, and tissue damage (Wang et al., 2003). TNF- $\alpha$  levels in the brain are thought to increase after brain injury or ischemia, as well as in patients with neurodegenerative diseases, and this increase is largely due to activated microglia. In an *in vitro* study in which mouse brain microvascular endothelial cells were co-cultured with microglia, it was suggested that the increase in levels of TNF- $\alpha$  released from active microglia in response to brain damage or neuroinflammation induced and promoted BBB destruction (Nishioku et al., 2010). It is emphasized that TNF- $\alpha$  is a commonly found cytokine which is rapidly triggered in experimental and clinical traumas of CNS (Hallenbeck, 2002), can modulate neuroregeneration after stroke and enters the CNS through the BBB (Pan et al., 2006; Pan et al., 2013). For the first time in 1994 (Liu et al., 1994), induction of TNF- $\alpha$  mRNA in ischemic cortex was reported to occur in permanent MCAO-reconstructed rats. It is reported that induction was presented 1 hour after MCAO ischemic cortex, peaked at 12 hours, and significantly increased from day 3 to day 5. It has been suggested that pro-inflammatory and procoagulant effects of TNF on the endothelium may impair microcirculation perfusion in brain ischemia (Hallenbeck, 2002). In relation to this, it has been shown that inhibition of TNF- $\alpha$  activity in spontaneously hypertensive rats reduces ischemic damage following cerebral ischemia and improves

microvascular perfusion (Dawson et al., 1996), and that these results support the hypothesis that pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  are important in stroke pathophysiology. In our study, we observed a significant increase in TNF- $\alpha$  levels in the I/R group compared to the control. These findings suggested that neuroinflammation was triggered in the I/R process when pro-inflammatory effect of TNF- $\alpha$  was considered. CON10 and CON20 treatment groups showed a significant decrease in TNF- $\alpha$  levels according to the I/R group. It seems like that conivaptan effects the inflammatory response more efficiently than mannitol thanks to its aquaretic effect.

In the literature, it is pointed out that TNF accelerates the post-translational process of interleukin-15 (IL-15) which acts as a growth factor (Pan et al., 2009). Studies with TNF- $\alpha$  have identified the important functions of IL-15 in BBB (Pan vd., 2013). IL-15 is anti-apoptotic and neurotrophic (Budagian et al., 2006) and is a new mediator of TNF signaling at BBB level and acts to amplify and modulate TNF- $\alpha$  signal (Pan et al., 2009). Interleukin-15 is defined as a neuroprotective cytokine and it has indicated that IL-15 gene expression occurs in many tissue and cell types (Patidar et al., 2016). In many studies, it is stated that IL-15 is expressed in the brain especially from neurons, whereas glial cells are thought to express IL-15 when they undergo activation or transformation following inflammatory response (Gomez-Nicola et al., 2008). It is explained that IL-15 inhibits apoptosis of pro-apoptotic factors by down-regulation, and anti-apoptotic factors by up-regulation and is also required for homeostasis, development and function of various cells related to immun system (Patidar et al., 2016). IL-15 also plays an important role in processes such as neurogenesis, proliferation, differentiation and neuron self-renewal, and neutrophil activation. However, there is no sufficient information yet about its role in the central nervous system (Ransohoff and Benveniste, 2006). In our study, IL-15 levels were increased in the I/R and MAN group compared to the control, but decreased in the conivaptan groups as seen TNF- $\alpha$ . In addition, correlation analysis results showed that serum TNF- $\alpha$  levels were positively correlated with IL-15 levels in all groups together ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.596$ ), and in each of the control ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.745$ ), MAN ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.727$ ) and CON20 ( $p < 0.005$ ,  $r = 0.615$ ) groups.

Interleukin-35 (IL-35) is a new cytokine that described in 2007 and its encoding gene transcription has been reported to occur in pro-inflammatory cytokines-activated monocytes, vascular endothelial cells and smooth muscle cells (Banchereau et al., 2012). Initially, IL-35 had been thought to be produced only by regulatory T cells, but with the help of further studies was shown that inducing the development of a new T cell population, called iTr35, producing IL-35 (Sun et al., 2015). In recent studies, it has been reported that B cells also regulate IL-35, particularly in autoimmune and infectious diseases, and IL-35 has been acted as an immunomodulator in various diseases (Vignali and Kuchroo, 2014). In the literature, there was insufficient study or data on cerebral I/R model in which IL-35 levels

were investigated and associated with ADH antagonist treatments comparing mannitol. In our study, there was an increase in IL-35 levels in all groups when compared with control, but this increase was significant only between control and CON20 treatment group. Additionally, according to our findings, serum IL-35 levels were positively correlated with TNF- $\alpha$  levels ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.319$ ) both in all groups together and in the CON20 group ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.748$ ). However, there is a need for comprehensive and reliable studies of the possible role and utility of IL-15 and IL-35 in the pro-inflammatory, anti-inflammatory or immunomodulatory pathways associated with CNS pathologies.

## 5. Conclusions

The brain tissue is subject to a continuous support of oxygen and glucose through arterial blood flow. Although the failure of the cerebral blood supply causes to brain damage that can not be rectified, the restoration of blood flow can be lead to a more considerable damage. Thus, I/R damage results in a progressive cellular and molecular changes. Inflammatory signaling which is a progressive process triggered by I/R is contributory closely in all critical events of the ischemic cascade, from the early damage induced by arterial occlusion, to the late regenerative processes. Inflammatory changes can also be observed in the blood, so that, the analysis of cytokines that are included among inflammatory mediators in peripheral blood samples may reflect cerebral cytokine production. In cerebral I/R process, which is continued with damage of the blood-brain barrier and with cerebral edema, which is one of the destructive complications of neurology inpatients, the increased release of AVP can aggravate injury or edema. Mannitol is a widely used diuretic-agent, but its clinical utility is controversial. Instead of mannitol, it is very little known about the benefits of aquaretic conivaptan during these processes. This is the first study to investigate the comparison of the effects of conivaptan and mannitol treatments on serum TNF- $\alpha$ , IL-15 and IL-35 levels and the correlations of these cytokines in an ischemia-reperfusion injury induced by bilateral common carotid artery occlusion. According to our biochemical and statistical findings, conivaptan can be more effective than mannitol in balancing pro-inflammatory/anti-inflammatory response and get the progressive inflammation process induced by ischemia under control. Additionally and importantly, we are of the opinion that this study may provide crucial information to the new treatment strategies especially for ischemia/inflammation related cerebrovascular diseases. It is clear that there is a need for comprehensive experimental studies.

## Acknowledgements

This study was supported by Scientific Research Projects Commission of the Eskisehir Osmangazi University (Date: 02.06.2017, Project Number: 1524/2017). A part of this study was presented in oral abstract form at the International Biochemistry Congress-28th National Biochemistry Congress, Erzurum, Turkey, 19–23 September 2017.

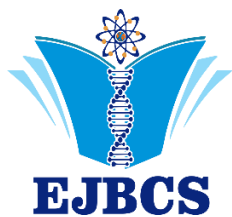


Authors give final approval of the version submitted. The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

- Ali F, Raufi MA, Washington B, Ghali JK 2007. Conivaptan: A Dual Receptor Vasopressin V1a/V2 Antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 25(3): 261-79.
- Amantea D, Tassorelli C, Petrelli F, Certo M, Bezzi P, Micieli G, Corasaniti MT, Bagetta G 2014. Understanding the multifaceted role of inflammatory mediators in ischemic stroke. *Curr Med Chem* 21(18): 2098-2117.
- Banchereau J, Pascual V, O'Garra A 2012. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol* 13(10): 925-931.
- Barreca T, Gandolfo C, Corsini G, Del Sette M, Cataldi A, Rolandi E, Franceschini R 2001. Evaluation of the secretory pattern of plasma arginine vasopressin in stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 11(2): 113-118.
- Bonaventura A, Liberale L, Vecchie A, Casula M, Carbone F, Dallegrì F, Montecucco F 2016. Update on Inflammatory Biomarkers and Treatments in Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* 25: 17(12).
- Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S 2006. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(4): 259-280.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC 2012. *Robbins Basic Pathology*. (8<sup>th</sup> Edition). Philadelphia: Saunders, pp 47-119.
- Lambertsen KL, Biber K, Finsen B 2012. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(9): 1677-1698.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ 1994. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke* 25(7): 1481-1488.
- Medzhitov R 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428-435.
- Mizuma A, Yenari MA 2017. Anti-Inflammatory Targets for the Treatment of Reperfusion Injury in Stroke. *Front Neurol* 8: 467.
- Murphy SJ, McCullough LD, Smith JM 2004. Stroke in the female: role of biological sex and estrogen. *Ilar J* 45(2): 147-159.
- Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y 2010. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 112(2): 251-254.
- Palmer BF 2015. Vasopressin Receptor Antagonists. *Curr Hypertens Rep* 17(1): 510.
- Palmer BF, Rock AD, Woodward EJ 2016. Dose comparison of conivaptan (Vaprisol®) in patients with euvolemic or hypervolemic hyponatremia-efficacy, safety, and pharmacokinetics. *Drug Des Devel and Ther* 10: 339-351.
- Pan W, Ding Y, Yu Y, Ohtaki H, Nakamachi T, Kastin AJ 2006. Stroke upregulates TNF $\alpha$  transport across the blood-brain barrier. *Exp Neurol* 198(1): 222-233.
- Pan W, Wu X, He Y, Hsueh H, Huang EYK, Mishra PK, Kastin AJ 2013. Brain interleukin-15 in neuroinflammation and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 37(2): 184-192.
- Chen M, Xu H 2015. Parainflammation, chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J Leukoc Biol* 98(5): 713-725.
- Dawson DA., Martin D, Hallenbeck JM 1996. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci Lett* 218(1): 41-44.
- Dembic Z 2015. *The Cytokines of the Immune System The Role Of Cytokines In Disease Related To Immune Response*. USA: Academic Press.
- Gomez-Nicola D, Valle-Argos B, Pita-Thomas DW, Nieto-Sampedro M 2008. Interleukin 15 Expression in the CNS: Blockade of Its Activity Prevents Glial Activation After an Inflammatory Injury. *GLIA* 56: 494-505.
- Grande PO, Romner B 2012. Osmotherapy in brain edema: a questionable therapy. *J Neurosurg Anesthesiol* 24(4): 407-412.
- Hallenbeck JM 2002. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 8(12): 1363-1368.
- Iadecola C, Anrather J 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17(7): 796-808.
- Korenkov AI, Pahnke J, Frei K, Warzok R, Schroeder HW, Frick R, Muljana L, Piek J, Yonekawa Y, Gaab MR 2000. Treatment with nimodipine or mannitol reduces programmed cell death and infarct size following focal cerebral ischemia. *Neurosurg Rev* 23(3): 145-150.
- Pan W, Yu C, Hsueh H, Khan RS, Kastin AJ 2009. Cerebral microvascular IL15 is a novel mediator of TNF action. *J Neurochem* 111(3): 819-827.
- Patidar M, Yadav N, Dalai SK 2016. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 31: 49-59.
- Peri A 2013. The Use of Vaptans in Clinical Endocrinology. *The J Clin Endocrinol Metab* 98: 1321-1332.
- Rabinstein AA 2006. Treatment of cerebral edema. *Neurologist* 12(2): 59-73.
- Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT 2013. Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuro-inflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators Inflamm* 2013: 480739.
- Ransohoff RM, Benveniste EN 2006. *CYTOKINES and the CNS* (2<sup>nd</sup> Edition). Boca Raton: CRC Press.
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjö BK 1984. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta neurologica Scandinavica* 69(6): 385-401.
- Sokoloff L 1997. *Anatomy of Cerebral Circulation*. In: K.M.A., Caplan L.R., Reis D.J., Siesjö B.K., Weir B. (Eds.). San Diego: Academic Press.
- Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE 2015. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine* 75(2): 249-255.
- Szmydynger-Chodobska J, Zink BJ, Chodobski A 2011. Multiple sites of vasopressin synthesis in the injured brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 31(1): 47-51.
- Taya K, Gulsen S, Okuno K, Prieto R, Marmarou CR, Marmarou A 2008. Modulation of AQP4 expression by the selective V1a receptor antagonist, SR49059, decreases trauma-induced brain edema. *Acta Neurochir Suppl* 102: 425-429.

- Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M 2001. The Basic And Clinical Pharmacology of Nonpeptide Vasopressin Receptor Antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 175-202.
- Vignali DAA, Kuchroo VK 2014. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat Immunol* 13(8): 722–728.
- Wada K, Tahara A, Arai Y, Aoki M, Tomura Y, Tsukada J, Yatsu T 2002. Effect of the vasopressin receptor antagonist conivaptan in rats with heart failure following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol* 450(2): 169-177.
- Wang H, Czura CJ, Tracey KJ 2003. *The Cytokine Handbook* (4<sup>th</sup> Edition). London: Elsevier Science Ltd.
- Witt KA, Sandoval KE 2014. Steroids and the blood-brain barrier: therapeutic implications. *Adv Pharmacol* 71: 361-390.
- Wykes V, Vindlacheruvu R 2015. Intracranial pressure, cerebral blood flow and brain oedema. *Surgery (Oxford)* 33(8): 355-362.
- Zhao XY, Wu CF, Yang J, Gao Y, Sun FJ, Wang DX, Wang CH, Lin BC 2015. Effect of arginine vasopressin on the cortex edema in the ischemic stroke of Mongolian gerbils. *Neuropeptides* 51: 55-62.



## Determination of Phytochemical Contents of Some Medicinal Aromatic Plants (*Echinacea pallida*, *Melissa officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Sideritis syriaca*) Belonging to Antalya Region

Serkan KÜÇÜK<sup>1\*</sup>, Ali Rıza TÜFEKÇİ<sup>1</sup>, Fatih GÜL<sup>1</sup>, İbrahim DEMİRTAŞ<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup>Cankiri Karatekin University, Science Faculty, Chemistry, Cankiri, TURKEY

\*Corresponding author: alpertunga05s@hotmail.com

**Abstract:** *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Melissa officinalis* L. (lemon balm), *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) and *Sideritis syriaca* L. are valuable for its pharmaceutical, medicinal and agricultural properties. These plants were extracted with methanol/chloroform (1:1) solvent, filtered, and solvents were removed by rotary evaporator to get four separate extracts. Quantifications of chemical constituents of extracts were determined by TOF-LC/MS and GC-MS. The main compounds of extracts for *E. pallida* were 4-hydroxybenzoic acid caffeic acid, for *M. officinalis* were eupatorin and diosmin, for *S. syriaca* chlorogenic acid and fumaric acid, for *H. perforatum* quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside and morin. The fatty acid contents of *E. pallida* is palmitic acid composition (30.07%), of *M. officinalis* is octadecatrienoic acid (43.39%), *H. perforatum* is octadecatrienoic acid (31.37%) and of *S. syriaca* is linoleic acid (34.89%).

**Keywords:** *Echinacea pallida*, *Melissa officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Sideritis syriaca*, HPLC-TOF/MS, GC-MS

### Antalya Bölgesine Ait Olan Bazı Tıbbi Aromatik Bitkilerin (*Echinacea pallida*, *Melissa officinalis*, *Hypericum perforatum* ve *Sideritis syriaca*) Fitokimyasal İçeriğinin Belirlenmesi

**Özet:** *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Melissa officinalis* L. (lemon balm), *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) ve *Sideritis syriaca* L. farmasötik, tıbbi ve tarımsal özelliklerinden dolayı değerlidir. Bu bitkiler metanol / kloroform (1: 1) çözücüsü ile ekstrakte edildi, süzülde ve dört ayrı ekstraktı elde etmek için çözücüler döner buharlaştırıcıyla uzaklaştırıldı. Ekstraktlar içerisindeki kimyasal bileşiklerin miktarları HPLC-TOF/MS ve GC-MS cihazları ile belirlendi. *E. pallida* ekstresi için 4-hydroxybenzoic acid ve caffeic acid, *M. officinalis* ekstresi için eupatorin ve diosmin, *S. syriaca* ekstresi için chlorogenic acid ve fumaric acid, *H. perforatum* ekstresi için quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside ve morin bileşikleri ana bileşen olarak belirlenmiştir. *E. pallida* ekstresi içerisinde yağ asidi bileşeni (30.07%) oranında Palmitic acid, *M. officinalis* ekstresinde (43.39%) oranında octadecatrienoic acid, *H. perforatum* ekstresinde (31.37%) oranında octadecatrienoic acid ve *S. syriaca* ekstresinde (34.89%) oranında linoleic acid bileşikleri ana bileşen olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Echinacea pallida*, *Melissa officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Sideritis syriaca*, HPLC-TOF/MS, GC-MS

© EJBCS. All rights reserved.

#### 1. Introduction

In our modern World, chemical preservatives/additives from unnatural sources and environmental pollution have a big contribution to the emerge of today's main illnesses. We can see the effects of these chemicals on the body and the different tissues and organs in the diseased individuals. It is seen that the incidence of illnesses of individuals exposed to environmental pollution is very high compared to those who are naturally fed and are away from environmental

pollution. Natural nutrition begins with natural consumption first. The dirty atmosphere created by drugs, consumed food and crowded city life causes very intense chemical exposures on living individuals and causes negative effects on the body over time.

Medicinal aromatic plants have very useful medical features due to the wide variety of components that they contain. It is known that the use of plants known as alternative medicine for this medical purpose is as old as human

history. Currently, preparations from many drug plants that use modern environment are used. The share allocated to the Ar-Ge work in the world is quite high. However, due to the relatively high cost of synthetic drugs and the adverse side effects, the popularity of alternative medicine is increasing day by day. Turkey has a very rich medicinal plant flora which is endemic due to its climate characteristics. Although we have this potential, our country still lacks enough scientific research on plants.

*H. perforatum* plant species, known as yellow kantaron, koyun kiran, kan otu, yaraotu and mayasil otu, belongs to the family Clusiaceae and covers about 400 species worldwide (Curtis and Lersten, 1990). In Turkey, 70 species were found (Baytop et al. 1999). In our country, this plant species is generally distributed in the Black Sea, Aegean, Marmara, Middle and Eastern Anatolia regions (Davis et al. 1988; Davis et al. 1965; Güner et al. 2000). These plant wounds are useful for the treatment of cancer, diabetes mellitus, chronic rheumatism, stomach ulcers, gastrointestinal diseases, diuretic sedative, liver-bile disorders, antidepressant (De Smet and Nolen, 1996; Linde et al. 1985), cold sores, worm-lowering, antiseptic wound healing (Baytop et al. 1999; Özyurt et al. 1992), throat infections, jaundice, bronchitis, diarrhea and dysentery.

*E. pallida* is spreading from North America to the whole world. These plant species are used as disinfectant for wound, burn healing, mumps, insect bite, mouth and pharynx, as a pain reliever in the abdomen and headache, as an antidote in snake bites and poisonings, as a blood cleanser, with coughs, colds, measles and gonorrhea (Prica et al. 1998). *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae, Labiatae) is a perennial herbaceous plant. Melissa plant has effects such as scorpion insertions, irritation of the teeth, menstruation by women, sputum diseases, mouth odor, skin itchiness, relieving shortness of breath, relieving shortness of breath, digestive ciliator (Sina et al. 2000; Kültür et al. 2007; Şaşkara et al. 2004; Baykan et al. 2011; Uzun et al. 2004). *S. syriaca* The plant is used to make an aromatic herbal tea. This plant is used for its anti-inflammatory and analgesic properties for treatment of gastric ulcers (Menghini et al. 2005). The aerial parts are used for their antioxidative properties (Armata et al. 2008). Common uses include treatment of stomach ache, stomach pain, painkiller, throat inflammation, neural appeaser, and colds (Fakir et al. 2009).

We have identified content analyzes of these medically specific plants that have been grown in their natural environment to help alleviate these negative and better understand the value of these plants. For this purpose, the chemical contents of *E. pallida*, *M. officinalis*, *H. perforatum* and *S. syriaca* plants were determined by GC-MS and HPLC-TOF / MS instruments collected from the highly consumed Antalya province.

## 2. Materials and Method

### 2.1. Plant materials

These plants were collected from Antalya, Karaman-Sariveliler, Uctas, 1905 m, in 2015 June, Turkey A voucher

specimen has been deposited at the Herbarium of Faculty of Science, Cankiri Karatekin University.

### 2.2. Preparation of Extracts Using Different Solvents

Plants were cut into small pieces with liquid nitrogen. These parts were extracted with methanol-chloroform (1:1 v/v) for five times at room temperature. Then extracts were filtered through Whatman No. 2 filter paper and concentrated to dryness under vacuum. The crude extracts were stored under adequate conditions until the time of analysis.

### 2.3. GC-MS Analysis

Fatty acid and volatile components analysis of plants extracts were carried by GC-MS performed on an Agilent Technologies model 7890 gas chromatograph equipped with a 5975 Triple Axis Detector Mass spectrometer. Analyzes were carried out using HP-5 ms capillary column (30 m x 250 µm x 0.25 µm film thickness, 5%-phenylmethylpolysiloxane). Ultra-pure helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 ml/min, splitless 2 µL injections were used. Electron impact (EI) ion source were analyzed at 70 eV. Injector, ion source and interface temperatures were 250, 250 and 270 °C. Oven temperature programme was arranged as follow: starting temperature was 100 °C. The temperature was kept at 100 °C for 10 min, then increased to 200 °C at a 10 °C/min rate, and held for 10 min, then 25 °C/min to 270 °C for 36 min, held for 20 min. total run time 84 min. Compounds in samples were identified comparing with those in the NIST and WILEYsearch database. Mass spectra were recorded in the m/z 50–550 mass range.

For GC-MS analysis, approximately 40 mg of extracts was weighed. The extracts were dissolved by the addition of 3 mL of KOH solution prepared in 2 M methanol. 3 ml of hexane was added to the solution and vortexed for 2 minutes. After a few minutes of waiting, two phases were observed. The esterified and hexane-phase supernatant was carefully separated from the lower phase. Hexane parts placed in vials.

### 2.4. HPLC-TOF/MS Analysis

Phenolic components analysis of extracts were determined by Agilent Technology of 1260 Infinity HPLC System was coupled with 6210 Time of Flight (TOF) LC/MS detector and ZORBAX SB-C18 (4.6 x100mm, 3.5µm) column. The mobile phases consisted of the A (ultra pure water with 0.1% formic acid) and B (acetonitrile-HPLC grade). Flow rate was 0.6 mL min<sup>-1</sup> and column temperature was 35°C. Injection volume was 10 µL. The solvent program was as follow: 0.min 10% B; 0-1.min 10% B; 1-20.min 50% B; 20-23.min 80% B; 23-25.min 10% B; 25-30. min 10% B. Ionization mode of HPLC-TOF/MS instrument was negative and operated with a nitrogen gas temperature of 325 °C, nitrogen gas flow of 10.0 L min<sup>-1</sup>, nebulizer of 40 psi, capillary voltage of 4000 V and finally, fragmentor voltage of 175 V. For sample analysis, dried crude extracts (250 ppm) were dissolved in methanol. Samples were filtered passing through a PTFE (0.22 µm) filter by an injector to remove particulates.

For HPLC-TOF/MS analysis, about 2 mg was weighed from each extracts. On the extracts were dissolved by adding 2 ml of methanol and 1000 ppm stock solutions were prepared. From the stock solutions, 200 ppm new solutions were prepared and transferred to the vials and analyzed by the device.

### 3. Results

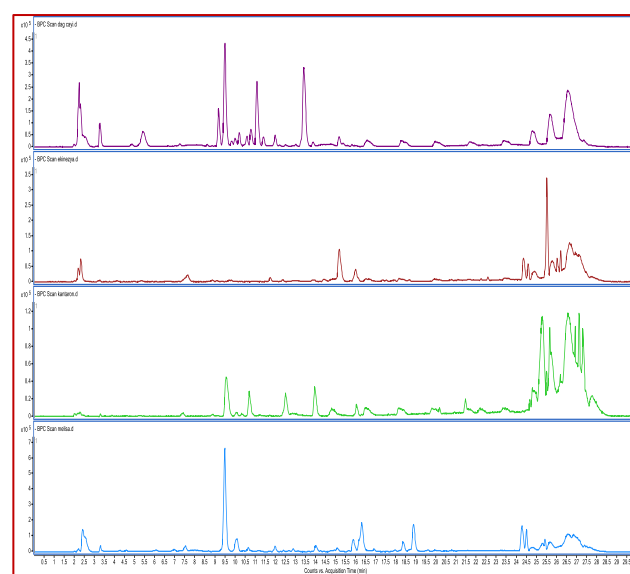
In this study, phytochemical contents of plants with some medicinal properties collected from Antalya province were carried out. For this the plants were extracted in the methanol/chloroform solvent system. The fatty acid components in the plants were determined by GC-MS instrument and are given in Table 1. According to the results obtained; more component analysis of *H. perforatum* plant extract was determined among these plants and Octadecatrienoic acid is the main component. It was also determined that essential oil components were present in the extract. Linoleic acid compound in *S. syriaca* plant extract, Palmitic acid compound in *E. pallida* extract and octadecatrienoic acid compound as main components in *M. officinalis* extract were determined as main components. Analysis of the phenolic components of extracts was quantitatively performed on HPLC-TOF/MS and results of analysis are given in Table 2. HPLC-TOF/MS chromatogram of these extracts is shown in Figure 2.

**Table 1.** GC-MS Analysis results of hexane extract of plants

| RT (min) | Compounds name        | S. syriaca | E. pallida | H. perforatum | M. officinalis |
|----------|-----------------------|------------|------------|---------------|----------------|
| 16.53    | Capric acid           |            | 6.39       |               |                |
| 18.54    | Caryophyllene         |            |            | 0.30          |                |
| 19.37    | $\gamma$ -Murolene    |            |            | 0.26          |                |
| 19.84    | Lauric acid           |            |            | 0.52          |                |
| 19.96    | $\gamma$ -Cadinene    |            |            | 0.15          |                |
| 20.04    | beta-Cadinene         |            |            | 0.30          |                |
| 21.06    | Caryophyllene oxide   |            |            | 0.36          |                |
| 22.90    | Myristic acid         | 0.32       | 2.73       | 1.70          | 1.14           |
| 24.92    | Pentadecylic acid     |            |            | 0.69          |                |
| 27.48    | Palmitoleic acid      | 0.23       |            | 0.27          |                |
| 27.61    | Palmitic acid         | 21.70      | 30.07      | 25.39         | 31.85          |
| 32.18    | Linoleic acid         | 34.89      | 15.16      | 29.71         | 13.99          |
| 32.27    | Octadecatrienoic acid |            | 20.65      | 31.37         | 43.39          |
| 32.43    | Trans Linoleic acid   |            |            | 1.58          |                |
| 32.44    | Oleic acid            |            | 1.52       |               | 2.23           |
| 32.56    | Stearic acid          |            | 20.65      | 4.13          | 6.32           |
| 34.50    | Heptacosane           |            |            | 0.23          |                |
| 34.57    | Eicosenoic acid       |            | 4.85       | 0.16          |                |
| 34.84    | Arachidic acid        |            | 6.13       | 1.09          | 1.08           |
| 37.30    | Behenic acid          |            | 2.03       | 0.45          |                |

**Table 2.** Quantitative phenolic component analysis of plants extracts by HPLC-TOF/MS

| RT (min) | Compounds name                    | M. officinalis | S. syriaca | E. pallida | H. perforatum |
|----------|-----------------------------------|----------------|------------|------------|---------------|
| 3.19     | Fumaric acid                      |                | 140.79     | 2.29       |               |
| 4.50     | Gentisic acid                     | 37.29          | 3.88       | 44.61      | 26.99         |
| 5.46     | Chlorogenic acid                  |                | 202.55     | 38.18      | 21.22         |
| 5.79     | Catechin                          |                |            |            | 19.03         |
| 6.96     | 4-hydroxybenzoic acid             | 93.08          | 13.10      | 166.47     | 4.43          |
| 7.08     | Protocatechuic acid               |                | 5.60       | 77.88      |               |
| 7.65     | Caffeic acid                      |                |            | 347.86     |               |
| 7.87     | Vanillic acid                     |                | 2.45       | 30.46      |               |
| 8.08     | Syringic acid                     | 89.03          | 6.58       |            | 39.30         |
| 9.23     | Rutin                             | 1.58           | 1.06       | 33.78      |               |
| 9.73     | Scutellarin                       | 6.30           |            |            |               |
| 9.76     | Quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside | 5.67           |            | 45.93      | 330.44        |
| 10.50    | Naringin                          | 7.93           | 2.19       |            |               |
| 10.61    | Diosmin                           | 263.95         | 22.79      |            |               |
| 10.76    | Hesperidin                        |                | 24.21      |            |               |
| 10.87    | Apigetrin                         |                | 33.31      |            |               |
| 11.08    | Neohesperidin                     |                | 14.58      |            |               |
| 13.01    | Morin                             | 61.99          | 3.96       | 86.72      | 119.80        |
| 13.12    | Salicylic acid                    |                | 6.52       |            |               |
| 14.02    | Quercetin                         |                |            |            | 56.51         |
| 15.16    | Sinamic acid                      |                | 18.40      |            | 18.02         |
| 15.64    | Apigenin                          |                | 1.49       |            |               |
| 18.91    | Eupatorin                         |                | 1403.91    |            |               |
| 20.26    | Galangin                          |                |            |            | 1.08          |
| 20.53    | Biochanin A                       |                |            | 0.45       |               |



**Figure 1.** HPLC-TOF/MS TIC chromatogram of plants extracts

Table 2 shows the results of the phenolic compounds contained in plants extracts. The quantitative analysis of a total of 25 compounds in the extracts was defined with HPLC-TOF/MS.

It has been determined that very high amounts of Eupatorin and Diosmin flavon compounds are found in the presence and high amount of phenolic acids in *M. officinalis* plant. It has been determined that very high amounts of chlorogenic acid and fumaric acid are present in the *S. syriaca* plant. It was determined that the composition of caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid in the *E. pallida* plant. It was determined that quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside and morin compounds are present in very high amounts in *H. perforatum* plant.

#### 4. Discussion

These plant species used in this study are among the plant species known and sold in medicinal where in transmitting the Turkey. These plant species are in the first place among exported plants. It is due to the phenolic and volatile components in these plants that they have medicinal properties. In particular, the results of HPLC-TOF analysis demonstrate that the amounts of the components are high and thus illuminate that the therapeutic effects are derived from phenolic compounds which are present in too much amounts. *M. officinalis* plant has activity against many cancer cells (Androustopoulos, 2008). Eupatorin found in *M. officinalis* has been shown to have anti-inflammatory effects in a mouse ear oedema, human gastric adenocarcinoma (MK-1), human uterus carcinoma (HeLa), murine melanoma (B16F10) cell lines (Nagao et al. 2002), highly metastatic murine colon carcinoma cells (26-L5) (Tezuka et al. 2000).

#### 5. Conclusions

*E. pallida*, *M. officinalis*, *H. perforatum* and *S. syriaca* have excellent biological activities and they contain medicinally valuable compounds. Therefore, these species could be used in food and pharmaceuticals industries.

#### Acknowledgements

The authors thank to State Planning Organization, Turkey (DPT 2003K120510) for the financial support, University of Çankırı Karatekin for grant (BAP, 2014L10).

#### References

- Androustopoulos V, Arroo R, Hall J, Surichan S, Potter G 2008. Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. *Breast Cancer Res*, 10(3): R394
- Baykan EŞ, 2011. "Melissa officinalis L." Tedavide Kullanılan Bitkiler FFD Monografı, Demirezer Ö, Ersöz T, Saraçoğlu D, Şener B (Eds.), 2. Baskı, MN Medical & Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 383- 90.
- Baytop T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmiste ve Bugün) İlaveli İkinci Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Curtis J, Lersten N 1990. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. *New Phytologist* 114(4): 571-580.

- Davis P, Mill R, Tan K 1988. *Astragalus* L. Flora of Turkey and the East Aegean islands. 114-124.
- Davis PH 1965. Flora of Turkey. Flora of Turkey.
- De Smet P, Nolen WA 1996. St John's wort as an antidepressant. *BMJ: British Medical Journal* 313(7052): 241.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer K 2000. Flora of Turkey and the east Aegean islands, Vol. 11. Second Supplement, Edinburgh.
- Kültür Ş 2007. Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of ethnopharmacology*, 111(2): 341-364.
- Linde K, Ramirez G, Mulrow CD, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D 1996. St John's wort for depression an overview and meta analysis of randomised clinical trials. *Bmj* 313(7052): 253-258.
- Nagao T, Abe F, Kinjo J, Okabe H 2002. Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25: 875-879.
- Özyurt MS 1992. Ekonomik botanik. Erciyes Üniversitesi Yayınları (47).
- Prica F, Rotar I, Sîma NF 1998. The influence of the phenological phase on the fodder quality of the *Festuca rubra* and *Agrostis capillaries* species. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 28(1): 21-26.
- Schinella GR, Giner RM, Recio MC, Mordujovich P, Rios JL, Manez S 1998. Anti-inflammatory effects of south American *Tanacetum vulgare*. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* 50: 1069-1074.
- Sina İ 2000. El Kanun Fi't Tıbb, ikinci kitap. *Türkçeye çeviren: Esin KAHYA Atatürk Kültür Merkezi Başkanlığı Yayınları* (234).
- Şaşkara C, Hürkul MM, Güvenç A 2010. Aktarlarda Satılan *Melissa Officinalis* L.(Oğulotu, Melisa) Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar. *Ankara Ecz. Fak. Dergisi* 39(2): 123-143.
- Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ, Saiki I, Kadota S 2000. Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 48: 1711-1719.
- Uzun E, Sarıyar G, Adersen A, Karakoç B, Ötük G, Oktayoğlu E, Pırıldar S 2004. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Journal of Ethnopharmacology* 95: 287-296.





**EJBCS**