



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜRKİYE FLORASINDA DOĞAL YAYILIŞ
GÖSTEREN MATRİCARİA CHAMOMİLLA L.
VE TRİPLEUROSPERMUM DECİPIENS
BORNM. TÜRLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İN VİTRO, İN SİLİKO
İNCELENMESİ VE BİYOAKTİF
FİTOKİMYASALLARININ ARAŞTIRILMASI**

NIHAL ZORLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Seda Damla HATİPOĞLU-ÇAKMAR

İSTANBUL, 2022



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜRKİYE FLORASINDA DOĞAL YAYILIŞ
GÖSTEREN MATRİCARİA CHAMOMİLLA L.
VE TRİPLEUROSPERMUM DECİPIENS
BORNM. TÜRLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İN VİTRO, İN SİLİKO
İNCELENMESİ VE BİYOAKTİF
FİTOKİMYASALLARININ ARAŞTIRILMASI**

NİHAL ZORLU

(520618001)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Seda Damla HATİPOĞLU-ÇAKMAR

İSTANBUL, 2022

*Hayatım boyunca bana büyük emekler veren ve daima arkamda durup
tüm kalpleri ile destekleyen gücümün kaynağı **canım aileme**,
Bugüne kadar bana emeği geçen **tüm hocalarıma**,
En kıymetli hazinemiz olan vatanımızı bizlere armağan eden
Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e ve silah arkadaşlarına
İthaf ediyorum.*

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasına imkân sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, motive eden, samimiyeti ve anlayışı ile hep yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe OGAN'a teşekkür ederim. Bitki kimyası alanını bana sevdiren, bilgisinden ve tecrübesinden daima yararlandığım, kendisini akademik ve kişisel hayatım boyunca örnek aldığım ve daima alacağım, bugünlere gelmemde çok büyük katkısı olan candan öte dostum ve eş danışman hocam Dr. Seda Damla HATİPOĞLU-ÇAKMAR'a teşekkür ederim. Yüksek lisans serüvenimin başlamasına vesile olan ve tüm süreç boyunca anlayışı ve desteği için Biyokimya Uzm. Erhan ÇAKMAR'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince çok değerli bilgiler paylaştan, Enzim İnhibisyon'u çalışmaları yapmamda bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Özkan DANIŞ'a teşekkür ederim. Tezin fitokimyasal içerik analizleri deneysel çalışmalarını yürütmeme olanak sağlayan TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'ne ve Mine BİLSEL'e teşekkür ederim. Tezin yağ asitleri içeriği deneylerini yürütmeme olanak sağlayan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezine, merkez müdürü Prof. Dr. Murat KARTAL'a ve analiz işlemleri sırasında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Kevser SALİHLER-ŞİMŞEK'e teşekkür ederim. Mikrobiyoloji çalışmalarına katkılarından dolayı Prof. Dr. Pelin YÜKSEL-MAYDA ve Arş. Gör. Dr. Harika Öykü DİNÇ'e teşekkür ederim. Tezin *in siliko* çalışmalarımın tamamlanmasında önemli katkısı olan dönem arkadaşım ve sevgili dostum Biyokimya Uzm. İlknur YILDIZ'a teşekkür ederim. Tez çalışmasında kullandığım bitkilerin toplanmasında emeği geçen Şehbal KURTAR'a ve teşhis edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ece SEVGİ'e teşekkür ederim. Manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ve motive eden çok kıymetli dostlarım Dr. Gamze ERGİN-KIZILÇAY, Mikrobiyoloji Uzm. Damla BİNGÖL, Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ, Dr. Tuba KUŞMAN-SAYGI, Uzm. Arkeolog Ülkü TÜRKOĞLU, Büşra İŞCAN-ŞAHİN ve Hilal GÜNAÇAR-ŞENGÜL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2022

Nihal ZORLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
SEMBOLLER.....	xi
KISALTMALAR.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
TABLO LİSTESİ.....	xx
EKLER LİSTESİ.....	xxii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. Genel Bilgiler	4
1.2.1. Botanik Bilgiler	4
1.2.1.1. Asteraceae (Compositae).....	4
1.2.1.2. <i>Matricaria chamomilla</i> L. (Tıbbi papatya)	5
1.2.1.3. <i>Tripleurospermum decipiens</i> Bornm. (Sarı papatya)	6
1.2.2. <i>Matricaria chamomilla</i> L. (Tıbbi Papatya)	8
1.2.2.1. Kimyasal Bölüm.....	8
1.2.2.1.1. Gaz kromatografisi ile yapılan yağ asiti kompozisyonu çalışmaları 9	
1.2.2.1.2. Sıvı kromatografisi ile yapılan aktif bileşen çalışmaları	9
1.2.2.2. Farmakolojik Bölüm.....	10
1.2.2.2.1. Antioksidan etki.....	10
1.2.2.2.2. Antibakteriyel ve antifungal etki	11
1.2.2.2.3. Alzheimer hastalığı üzerine etki	12
1.2.2.2.4. Antidepresif etki	12
1.2.2.2.5. Antienflamatuvar etki	13

1.2.2.2.6. Antikanser etki.....	14
1.2.2.2.7. Antiülser etki	14
1.2.2.2.8. Antidiyabetik etki	15
1.2.2.2.9. Antispazmodik etki.....	16
1.2.2.2.10. Pediatride kolik etki.....	16
1.2.2.2.11. Hepatit sistemi koruyucu etki	17
1.2.2.3. Geleneksel kullanım	17
1.2.3. <i>Tripleurospermum decipiens</i> Bornm. (Sarı Papatya)	19
1.2.4. Biyoaktif Fitokimyasallar	21
1.2.4.1. Flavonoidler.....	21
1.2.4.2. Kumarinler.....	22
1.2.4.3. Yağ Asitleri	23
1.2.5. Fitokimyasal Analiz.....	25
1.2.5.1. Gaz kromatografisi-alev iyonizasyon-kütle spektrometresi (GC-FID/MS)	25
1.2.5.2. Sıvı kromatografisi-kütle-kütle spektrometresi (LC-MS/MS)	25
1.2.5.3. Metot validasyonu	26
1.2.5.4. Metot performansı özellikleri	27
1.2.5.4.1. Seçicilik	27
1.2.5.4.2. Algılama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	27
1.2.5.4.3. Metot çalışma aralığı ve doğrusallık	28
1.2.5.4.4. Geri kazanım/ gerçeklik.....	28
1.2.5.4.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik).....	28
1.2.6. Antioksidan Etki	29
1.2.7. Antimikrobiyal Etki.....	31
1.2.7.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	31

1.2.7.2. <i>Escherichia coli</i>	31
1.2.7.3. <i>Candida albicans</i>	32
1.2.7.4. Antibiyotikler ve antibiyotik direnç	32
1.2.7.5. Antimikotikler ve antifungal direnç	33
1.2.7.6. Biyoaktif fitokimyasalların antibakteriyel etkinliği	34
1.2.8. Nörodejeneratif Hastalıklar	36
1.2.8.1. Alzheimer hastalığı (AD)	37
1.2.8.2. Parkinson hastalığı (PD)	38
1.2.8.3. Monoamin oksidaz (MAO)	38
1.2.8.4. Kolinesterazlar (ChE)	40
1.2.8.5. Biyoaktif fitokimyasalların nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkileri	42
1.2.9. Antiinflamatuar Etki	43
1.2.9.1. Lipooksijenaz (LOX)	43
1.2.10. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı	46
1.2.10.1 Moleküler doking	46
2. MATERYAL VE YÖNTEM	47
2.1. Bitkisel Materyal	47
2.2. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	48
2.3. Biyoaktif Fitokimyasalların Tayini	49
2.3.1. GC-FID/MS ile yağ asitlerinin tayini	49
2.3.2. LC-MS/MS ile flavonoid ve kumarin bileşiklerinin tayini	50
2.3.3. Metot validasyon performans parametreleri	58
2.4. Antioksidan Aktivite Yöntemleri	60
2.4.1. Toplam fenolik tayini	60
2.4.2. Toplam flavonoid tayini	61
2.4.3. DPPH serbest radikal giderim tayini	62

2.4.4. CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) tayini.....	64
2.4.5. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi tayini.....	66
2.5. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Yöntemleri.....	68
2.5.1. Disk difüzyon yöntemi	68
2.5.2. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) yöntemi.....	68
2.6. <i>in vitro</i> Enzim İnhibisyon Aktiviteleri Yöntemleri	69
2.6.1. MAO A ve B enzim inhibisyon tayini.....	69
2.6.2. AChE ve BChE enzim inhibisyon tayini.....	71
2.6.3. 15-LOX enzim inhibisyon tayini.....	74
2.7. Moleküler doking	76
2.7.1. Ligandların hazırlanması	76
2.7.2. Proteinlerin hazırlanması.....	76
2.7.3. Konfigürasyon dosyaları	77
2.7.4. Doking işlemi	78
2.7.5. Sonuçların görüntülenmesi	80
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	81
3.1. Biyoaktif Fitokimyasal İçerik Sonuçları	81
3.1.1. Yağ asiti kompozisyonları.....	81
3.1.2. Ekstrelerin biyoaktif fitokimyasal içerikleri.....	84
3.1.3. Metot validasyon	92
3.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları	93
3.2.1. Toplam fenolik	93
3.2.2. Toplam flavonoid	94
3.2.3. DPPH, CUPRAC ve ABTS antioksidan aktivite sonuçları.....	95
3.3. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Sonuçları.....	97
3.3.1. Disk difüzyon	97

3.3.2. MİK	99
3.4. <i>in vitro</i> Enzim İnhibisyon Aktivite Sonuçları	100
3.5. Moleküler Doking Sonuçları	102
3.5.1. MAO-A ve MAO-B doking sonuçları.....	103
3.5.2. AChE ve BChE doking sonuçları.....	106
3.5.3. 5-LOX ve 15-LOXB doking sonuçları.....	109
4. SONUÇLAR.....	112
KAYNAKLAR.....	115
EKLER	133

ÖZET

TÜRKİYE FLORASINDA DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN MATRICARIA CHAMOMILLA L. VE TRIPLEUROSPERMUM DECIPIENS BORNM. TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İN VİTRO, İN SİLİKO İNCELENMESİ VE BİYOAKTİF FİTOKİMYASALLARININ ARAŞTIRILMASI.

Matricaria chamomilla L. (MC) türünün fitokimyasal içeriği ve biyoaktivite çalışmalarına ait çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (TD) türü ile ilgili çalışmalara daha az rastlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, 2019 yılında Gaziantep’den (MC) ve Mersin’den toplanan (TD) türlerinin çiçeklerinden farklı çözücülerle elde edilen özütlerinin biyoaktif fitokimyasal içerikleri; flavon, flavon glikozit, flavanol, flavanol glikozit ve kumarin türevi bileşikler LC-MS/MS ile kantitatif olarak belirlenmiştir. MC türünde apigenin (217,72-1465,83 µg/g), apigetrin (20,42-5141,85 µg/g) ve herniarin (728,85-3135,93 µg/g), TD türünde ise luteolin (248,78-13094,21 µg/g), sinarozit (719,80-3259,38 µg/g) ve kersetin (200,46-3679,27 µg/g) bileşikleri tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite Trolox eşdeğeri olarak DPPH, CUPRAC ve ABTS yöntemleri ile belirlenmiştir. MC ve TD türlerinin bütanol özütlerinin antioksidan değerleri diğer özütlerden öne çıkmışlardır. Antibakteriyel etkinlikleri *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde disk difüzyon ve MİK testleri ile incelenmiştir. MC’nin etanol ve TD’nin hekzan özütleri *S. aureus* üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. *İn vitro* yöntemler kullanılarak, antienflamatuar aktivitesi; 15-LOX inhibisyonu, antidepresan aktivitesi; MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin inhibisyonu ile belirlenmiştir. Antikolinesteraz aktivitesi ise AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyonları ile incelenmiştir. Araştırılan tüm özütler içerisinde MC’nin su özütü antienflamatuar (%72,63), antidepresan (%52,38, MAO-A seçici) ve antikolinesteraz (%49,90, AChE) etkinliği ile öne çıkmıştır. Türlerin tespit edilen biyoaktif fitokimyasallarının enzimlere bağlanma afiniteleri moleküler doking yöntemi ile hesaplanmıştır. Doking sonuçlarımıza göre, Apigenin MAO-A enzime seçici ve çok güçlü afinite ile bağlanırken eskuletin ve umbelliferon ise MAO-B izoenzime çok güçlü afinite ile bağlanmıştır. Apigetrin AChE enzime çok güçlü afinite ile yüksek

seçicilikte bağlanırken astragalin molekülü BChE enzimine seçici ve çok güçlü afinite ile bağlanmıştır.

Bulgularımıza göre 5-LOX ve 15-LOXB enzimleri için önerilebilecek en iyi iki inhibitör adayı apigenin ve apigetrin olmuştur. Doking sonuçlarımız da deneysel verilerimizi desteklemektedir.

Tez alışması kapsamında TD türünün biyoaktif fitokimyasal içeriği, antimikrobiyal etkinliği, AChE, BChE, MAO-A/B ve LOX enzimlerini inhibe etme özellikleri ilk kez literatre kazandırılmıştır.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF IN VITRO, IN SILICO BIOLOGICAL ACTIVITIES AND BIOACTIVE PHYTOCHEMICALS OF THE SPECIES OF *MATRİCARİA CHAMOMİLLA* L. AND *TRİPLEUROSİPERMUM DECİPIENS* BORNİ. WHICH ARE NATURALLY SPREAD IN THE FLORA OF TURKEY.

Although *Matricaria chamomilla* L. (MC)'s phytochemicals and biological activities have been well defined, there are very few studies on *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (TD).

In this thesis, the bioactive phytochemical contents of the extracts obtained from the flowers of the (TD) species collected from Gaziantep (MC) and Mersin in 2019 with different solvents; flavone, flavone glycoside, flavanol, flavanol glycoside and coumarin derivative compounds were determined quantitatively by LC-MS/MS. Apigenin (217.72-1465.83 $\mu\text{g/g}$), apigenin (20.42-5141.85 $\mu\text{g/g}$) and herniarin (728.85-3135.93 $\mu\text{g/g}$) in MC strains; In the TD strain, luteolin (248.78-13094.21 $\mu\text{g/g}$), synarosite (719.80-3259.38 $\mu\text{g/g}$) and quercetin (200.46-3679.27 $\mu\text{g/g}$) compounds were detected. Antioxidant activity was determined as Trolox equivalent by DPPH, CUPRAC and ABTS methods. The antioxidant values of butanol extracts of MC and TD species were significantly high when compared to other extracts. Their antibacterial activities were investigated on *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* by disc diffusion and MIC tests. It was determined that MC's ethanol and TD's hexane extracts were effective on *S. aureus*. *In vitro* anti-inflammatory, antidepressant activities of the extracts were determined by the inhibition of 15-LOX, MAO-A, MAO-B isoenzymes respectively and inhibitory anticholinesterase activities were evaluated by the inhibition of AChE and BChE enzymes. Among all the investigated extracts, water extract of MC was striking with its anti-inflammatory (72.63%), antidepressant (52.38%, MAO-A selective) and anticholinesterase (49.90%, AChE) activities. The binding affinities of the identified bioactive phytochemicals of the species to enzymes were calculated by molecular docking method. According to our docking results, Apigenin binds to MAO-A enzyme with selective and very strong affinity, while esculetin and umbelliferone bind to MAO-B isoenzyme with very strong affinity. While apigenin binds to AChE enzyme with very strong affinity and high selectivity, astragalin molecule binds to BChE enzyme

selectively and with very strong affinity. According to our findings, the two best inhibitor candidates for 5-LOX and 15-LOXB enzymes were apigenin and apigetrin. Our docking results support our experimental data.

Within the scope of the thesis study, the bioactive phytochemical content, antimicrobial activity and inhibition properties of AChE, BChE, MAO-A/B and LOX enzymes of the TD species were brought to the literature for the first time.



SEMBOLLER

cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
g	: Gram
L	: Litre
m	: Metre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
M	: Molar
nm	: Nanometre
ppm (δ)	: Milyonda bir birim
%	: Yüzde
Å	: Angstrom
dk	: Dakika
kDa	: Kilo Dalton
mmol	: Milimol
ΔG	: Rreaksiyon serbest enerji değışimi
β	: Beta
ω	: Omega
α	: Alfa
δ	: Delta
π	: Pi
λ	: Lambda
pH	: Hidrojen Gücü
J (Hz)	: Etkileşim sabiti (hertz)
U	: Ünite

mTorr	: Militorr
m/z	: Kütle/yük
psi	: Pound-kuvvet bölü inçkare
IC₅₀	: %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
R²	: Korelasyon Katsayısı
M^{+/-}	: Moleküler İyon
MHz	: Mega Hertz
ε	: Molar soğurum
V	: Volt
eV	: Elektronvolt
Kcal	: Kilokalori

KISALTMALAR

MC	: <i>Matricaria chamomilla</i> L.
TD	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> Bornm.
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü (WHO)
LD	: Öldürücü Doz
IL	: İnterlökin
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
LPS	: Lipopolisakkarit
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Azot Türleri
NDD	: Nörodejeneratif hastalıklar
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi
GC-FID/MS	: Gaz kromatografisi Alev iyonizasyon tespiti (FID, flame ionization detection), kütle spektrometrisi
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ABTS	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
TEAC	: Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasitesi
TR	: Troloks
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
C	: Karbon
C	: Derişim
FA	: Fatty acid; yağ asiti
FFA	: Free fatty acids; Serbest yağ asitleri
OS	: Oksidatif stres
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
ATP	: Adenozin trifosfat

AH	: Alzheimer hastalığı
PD	: Parkinson hastalığı
βA	: Beta amiloid
ER	: Endoplazmik retikulum
MAO	: Monoamin oksidaz
FAD	: Flavin-adenozin dinükleotit
MAO A	: Monoamin oksidaz A
MAO B	: Monoamin oksidaz B
ChE	: Kolinesterazlar
AChE	: Asetilkolinesteraz
BChE	: Bütilkolinesteraz
AChI	: Asetilkolin iyodür
BChI	: Butilkolin iyodür
DTNB	: 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
ACh	: Asetilkolin
LOX	: Lipoksijenaz
HPETE	: Hidroperoksi-eikosatetraenoik asit
HETE	: Hidroksiyeikosatetraenoik asit
NDGA	: Nordihidroguaretik asit
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Kurumu
IEC	: Uluslararası Elektroteknik Komisyonu
LOD	: Algılama sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
SRM	: Sertifikalı referans malzeme
IS	: İç standart
MCD	: <i>Matricaria chamomilla</i> dekoksiyon
TDD	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> dekoksiyon
MCA	: <i>Matricaria chamomilla</i> alkol özütü
TDA	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> alkol özütü
MCHA	: <i>Matricaria chamomilla</i> hidroalkolik özüt
TDHA	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> hidroalkolik özüt
MCFH	: <i>Matricaria chamomilla</i> hekzan fraksiyonu

TDFH	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> hekzan fraksiyonu
MCFK	: <i>Matricaria chamomilla</i> kloroform fraksiyonu
TDFK	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> kloroform fraksiyonu
MCFE	: <i>Matricaria chamomilla</i> etilasetat fraksiyonu
TDFE	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> etilasetat fraksiyonu
MCFB	: <i>Matricaria chamomilla</i> bütanol fraksiyonu
TDFB	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> bütanol fraksiyonu
MCFS	: <i>Matricaria chamomilla</i> su fraksiyonu
TDFS	: <i>Tripleurospermum decipiens</i> su fraksiyonu
GAE	: Gallik Asit
FCR	: Folin-Ciocalteu ayracı
QER	: Kersetin
McFarland	: Bakteri süspansiyonlarının bulanıklık derecesi
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
CID	: Çarpışma kaynaklı ayrışma
MA	: Molekül ağırlığı
RT	: Alıkonma zamanı
RSD	: Bağlı standart sapma
SD	: Standart sapma
RMSD	: Kök-ortalama-kare sapma
SAFA	: Doymamış yağ asidi
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
MUFA	: Tekli doymamış yağ asidi
SI	: Seçicilik
SER	: Serin
LYS	: Lizin
THR	: Treonin
TYR	: Tirozin
LEU	: Lösin
GLU	: Glutamik Asit

ARG	: Arjinin
VAL	: Valin
ALA	: Alanin
ILE	: İzolösün
PHE	: Fenilalenin
GLY	: Glisin
HIS	: Histidin
GLN	: Glutamin
CYS	: Alanin
PRO	: Prolin
MET	: Metiyonin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
CADD	: Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
YAI	: Yapı Aktivite İlişkisi
PDB	: Protein Data Bank
AA	: Araşidonik Asit
ALA	: Alfa linolenik asit
LA	: Linoleik asit
OA	: Oleik asit
HEM	: Protoporfirin IX Fe ³⁺
i.d	: İç çap
A	: Absorbans
Abs	: Absorbans
a	: Ağırlık
h	: Hacim
Poz	: Pozitif
Neg	: Negatif
Ort	: Ortalama
RRI	: Relative retention indices (bağıl tutma endeksleri)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>Matricaria chamomilla</i> L. (Tıbbi papatya, 2019 Mayıs-Gaziantep)	6
Şekil 2. <i>Tripleurospermum decipiens</i> Bornm. (Sarı papatya)	7
Şekil 3. MC'nin biyoaktif fitokimyasalları	8
Şekil 4. Başlıca flavonoid iskeletleri.....	22
Şekil 5. Kumarin biyosentezi (76).....	22
Şekil 6. Yağ asitlerinin sınıflandırılması.....	23
Şekil 7. Üçlü kuadropol sistemi	26
Şekil 8. Flavonoidlerin antioksidan mekanizması.....	30
Şekil 9. Flavonoidlerin etki mekanizmalarına genel bir bakış	34
Şekil 10. MAO reaksiyon kataliz mekanizması	39
Şekil 11. (a) MAO-A Enzimi (PDB kodu: 2Z5X) ve (b) MAO-B Enzimi (PDB kodu: 2XFN) Kristal Yapıları	39
Şekil 12. Asetilkolinin sentez ve hidroliz reaksiyonu (171).	40
Şekil 13. (a) AChE Enzimi (PDB kodu: 4M0E) ve (b) BChE Enzimi (PDB kodu: 4BDS) Kristal Yapıları	41
Şekil 14. Lipoksijenaz reaksiyonu.....	44
Şekil 15. (a) 5-LOX (PDB kodu: 3O8Y), (b) 15-LOX-B (PDB kodu: 4NRE)	45
Şekil 16. (a) MC ve (b) TD'nin herbaryum örnekleri	47
Şekil 17. Flavon bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.....	53
Şekil 18. Flavon bileşiklerin molekül formülleri	53
Şekil 19. Flavon glikozit bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.....	54
Şekil 20. Flavon glikozit bileşiklerinin molekül formülleri	54
Şekil 21. Flavonol bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.....	55
Şekil 22. Flavonol bileşiklerinin molekül formülleri	55
Şekil 23. Flavonol-glikozit bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.	56

Şekil 24. Flavonol glikozit bileşiklerinin molekül formülleri.....	56
Şekil 25. Kumarin bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.....	57
Şekil 26. Kumarin bileşiklerinin molekül formülleri	57
Şekil 27. Standart gallik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi grafiği.....	60
Şekil 28. Standart kersetin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi grafiği.....	61
Şekil 29. DPPH antioksidan mekanizması tepkimesi	62
Şekil 30. TEAC DPPH Kalibrasyon eğrisi grafiği.....	62
Şekil 31. CUPRAC antioksidan mekanizması tepkimesi.....	64
Şekil 32. TEAC CUPRAC Kalibrasyon eğrisi grafiği	65
Şekil 33. ABTS antioksidan mekanizması tepkimesi	66
Şekil 34. TEAC ABTS Kalibrasyon eğrisi grafiği.....	67
Şekil 35. Amplex® Red Monoamine Oxidase Assay Kitinin çalışma prensibi.....	69
Şekil 36. Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması	72
Şekil 37. Ligandların dok pozisyonları	79
Şekil 38. Moleküler doking işlemi akış şeması.....	80
Şekil 39. MC ve TD'nin yağ asiti kompozisyonları grafiği.....	82
Şekil 40. MC'nin GC-FID/MS kromatogramı.....	83
Şekil 41. TD'nin GC-FID/MS kromatogramı.....	83
Şekil 42. MC'nin ikincil metabolit içerik sınıflandırması.....	84
Şekil 43. TD'nin ikincil metabolit içerik sınıflandırması.....	84
Şekil 44. MC'nin majör biyoaktif fitokimyasalları.....	85
Şekil 45. TD'nin majör biyoaktif fitokimyasalları	86
Şekil 46. MC ve TD'nin Dekoksiyonun'un majör bileşenleri	87
Şekil 47. MC ve TD'nin Etanol özütünün majör bileşenleri	87
Şekil 48. MC ve TD'nin Tentür formunun majör bileşenleri	88
Şekil 49. Toplam Fenolik (mg gallik asit eşdeğer/g özüt)	93

Şekil 50. Toplam Flavonoit (mg kersetin eşdeğer/g özüt)	94
Şekil 51. Antioksidan sonuçlarına ait grafik (mol TR/g özüt)	96
Şekil 52. <i>C. albicans</i> ve <i>S. aureus</i> disk difüzyon deneyi petri görüntüleri	98
Şekil 53. MC'nin antibakteriyel-antifungal disk difüzyon zon (mm).....	98
Şekil 54. TD'nin antibakteriyel-antifungal disk difüzyon zon (mm)	98
Şekil 55. <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> minimum inhibisyon deneyi mikropate görüntüleri	100
Şekil 56. Apigenin bileşiğinin MAO-A aktif bölgesine yerleşme pozu	104
Şekil 57. Apigenin bileşiğinin MAO-B aktif bölgesine yerleşme pozu.....	104
Şekil 58. Apigetrin bileşiğinin AChE aktif bölgesine yerleşme pozu.....	107
Şekil 59. Apigetrin bileşiğinin BChE aktif bölgesine yerleşme pozu	107
Şekil 60. Apigenin bileşiğinin 5-LOX aktif bölgesine yerleşme pozu	110
Şekil 61. Apigenin bileşiğinin 15-LOX aktif bölgesine yerleşme pozu.....	110

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. <i>Matricaria chamomilla</i> L. (Tıbbi Papatya) taksonomik hiyerarşisi	5
Tablo 2. <i>Tripleurospermum decipiens</i> Bornm. (Sarı Papatya) taksonomik hiyerarşisi...	7
Tablo 3. MC'nin geleneksel kullanımı	18
Tablo 4. Yağ asitlerinin antibakteriyel etkileri	24
Tablo 5. Biyoaktif fitokimyasalların bakteri/fungus etkinlikleri	35
Tablo 6. MAO ve ChE inhibitör aktivitesine sahip biyoaktif fitokimyasallar.....	42
Tablo 7. Çalışılan papatya bitki türleri.	47
Tablo 8. Fenolik bileşiklere ait iyonların m/z değerleri.....	52
Tablo 9. Metot geçerli kılma kabul kriterleri.....	58
Tablo 10. Toplam fenolik deney prosedürü.....	60
Tablo 11. Toplam flavonoit deney prosedürü.....	61
Tablo 12. DPPH deney prosedürü	63
Tablo 13. CUPRAC deney prosedürü.....	65
Tablo 14. ABTS deney prosedürü	67
Tablo 15. 15-LOX test prosedürü	75
Tablo 16. Enzimlerin aktif bölgesinde esnek olarak seçilen aminoasitler.....	77
Tablo 17. Her izozim için oluşturulan küpün boyutlarını tanımlayan parametreler	78
Tablo 18. Enzimlerin RMSD değerleri.....	79
Tablo 19. MC ve TD'nin yağ asiti kompozisyonları	81
Tablo 20. MC'nin Kütle Spektroskopisi ile yapılan nicel ve nitel analizlerinin literatür değerlendirmesi	89
Tablo 21. MC (Tıbbi Papatya) özütlerinin biyoaktif fitokimyasal içerikleri, ($\mu\text{g/g}$ özüt)	90
Tablo 22. TD (Sarı Papatya) özütlerinin biyoaktif fitokimyasal içerikleri, ($\mu\text{g/g}$ özüt)	91
Tablo 23. MC ve TD'nin toplam fenolik içerik sonuçları.....	93

Tablo 24. MC ve TD'nin toplam flavonoit içerik sonuçları.....	94
Tablo 25. TEAC antioksidan aktivite sonuçları.....	95
Tablo 26. MC ve TD'nin antibakteriyel-antifungal disk difüzyon zon (mm) sonuçları	97
Tablo 27. MC ve TD'nin antibakteriyel-antifungal MİK sonuçları (µg/ml).....	99
Tablo 28. <i>in vitro</i> Enzim inhibisyonu sonuçları, %	101
Tablo 29. Enzim ligand bağlanma enerjilerinin incelenmesi.....	102
Tablo 30. MAO-A ve MAO-B izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (µM) ve SI değerleri	103
Tablo 31. Apigenin bileşiğinin MAO-A ve MAO-B enzimleri ile yaptığı etkileşimler	105
Tablo 32. AChE ve BChE enzimlerinin ΔG (kcal/mol) K_i (µM) ve SI değerleri	106
Tablo 33. Apigetrin bileşiğinin AChE ve BChE Enzimleri ile yaptığı etkileşimler....	108
Tablo 34. 5-LOX ve 15-LOXB izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (µM) ve SI değerleri	109
Tablo 35. Apigenin bileşiğinin 5-LOX ve 15-LOXB Enzimleri ile yaptığı etkileşimler	111

EKLER LİSTESİ

EK 1. LC-MS/MS örneklerinin derişimleri	133
EK 2. LOD, LOQ değerleri.....	134
EK 3. Tekrarlanabilirlik parametreleri.....	135
EK 4. Doğruluk parametreleri.....	139
EK 5. Geri kazanım parametreleri	143
EK 6. Metot çalışma aralığı	147
EK 7. Kalibrasyon eğrisi analit derişimi	149
EK 8. Her bileşik için MAO-B ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri	150
EK 9. Her bileşik için MAO-A ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri	151
EK 10. Her bileşik için 5-LOX ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri	152
EK 11. Her bileşik için 15-LOX ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri	153
EK 12. Her bileşik için ACHE ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri	154
EK 13. Her bileşik için BChE ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri	155

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Tıbbi ve aromatik bitkiler hastalıkların önlenmesi, sağlığın sürdürülmesi ve hastalıkların iyileştirilmesi için ilaç olarak geleneksel ve modern tıpta kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), insanların %80'inin temel sağlık ihtiyaçları için geleneksel tıbbi kullandığını açıklamıştır. Tıbbi bitkilerin biyoaktif özütleri ve bunların tanımlanmış/izole edilmiş aktif bileşenleri, birçok akut ve kronik hastalıklara/bozukluklara karşı çeşitli tıbbi farmakolojik özellikler göstermektedir. DSÖ verilerine göre, dünya üzerinde tıbbi amaçlarla ortalama 70.000 bitkinin 21.000 kadarı ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır (1).

Türkiye, iklim çeşitliliği ve farklı ekolojik koşullara sahip olması, floranın çok sayıda çeşitli bitki türü içermesi bakımından, doğadan toplanan tıbbi ve aromatik bitkiler açısından büyük bir ekonomik potansiyele ve değere sahiptir (2). Ülkemizde birçok doğal yetişen bitki türlerinin yalnızca 1.000 kadarı tıbbi amaçla kullanılmaktadır (1).

Sentetik kimyasalların sağlık yönünden etkileri düşünüldüğünde, günümüzde kullanılan ilaçların birçoğunun etken maddesi konumundaki tıbbi ve aromatik bitkilerin önemi açıkça görülmektedir. Doğadan toplanan bitkilerde belirli bir standardizasyon bulunmadığı için toplanan tüm bitkiler aynı kalitede olmayıp, etkin maddesi de farklı oranlarda olmaktadır (3). Ancak, gelişen kimya bilimi ve teknolojilerle bitkilerde insan sağlığına faydalı fitokimyasallar tespit edilip drog haline getirilerek insanların hizmetine sunulmasını amaçlamaktadır (4).

Bitkiler, genetik yapıları nedeniyle, normal fizyolojik işlevlerini yerine getirmelerine ve/veya kendilerini mikrobiyal patojenlerden ve hayvan otçullarından korumalarına yardımcı olan birincil (primer) veya ikincil (sekonder) metabolitler olarak sınıflandırılan pek çok fitokimyasal sentezlerler. Bitkilerin sekonder metabolitleri alkaloidler, terpenoidler, fenolikler, flavonoidler, kumarinler ve triterpenler olarak tanımlanmıştır. Bu sekonder metabolitler diğer bir deyimle fitokimyasallar; antimikrobiyal, antifungal, antialerjik, antidiyabetik, kardiyovasküler sistemi koruyucu, antioksidan, antikanser, antitiroid, antihistaminik, antienflamatuvar, antihipertansif, spazm çözücü ve ağrı kesici gibi pek çok değişik aktivite gösterirler. Artan oksidatif stres, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ve yara enfeksiyonu dahil olmak üzere yaşamı tehdit eden

çeşitli hastalıkların gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir nedensel faktör olarak tanımlanmaktadır. Bitkiler potansiyel bir antioksidan kaynağı olmalarından dolayı büyük ilgi görmektedir (5, 6). Antioksidan içeren doğal bitki bileşiklerinin günlük beslenmeye dahil edilerek tüketilmesi sağlık sorunlarının çözümüne yardımcı olabilir (7).

Papatya, papatyagiller (Asteraceae) familyasında sınıflandırılan *Anthemis*, *Matricaria*, *Bellis*, *Leucanthemum* ve *Tripleurospermum* gibi farklı cinslerden bitki türlerine verilen ortak addır. Asteraceae (Compositae) familyası, 1.600 cins ve 24.000 tür ile çiçekli bitkilerin en büyüklerinden biridir ve dünya çapında yayılışa ve kullanıma sahiptir. Biyoaktif bileşikler, antioksidan ve fitokimyasallar bakımından zengindir. Tıbbi kullanımlara kanıt sağlamak için önemli çalışmalar yapılmıştır. *Matricaria recutita* L. Alman papatyası veya Tıbbi papatya olarak bilinen Asteraceae (Compositae) ailesinin ünlü bir bitkisidir. Yaprakları ve çiçekleri başta antideprean etki olmak üzere antioksidan, analjezik, antimikrobiyal antienflamatuar, antiseptik, antidiyabetik, antibakteriyel ve sedatif aktiviteler göstermesinden dolayı birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (8, 9).

Tripleurospermum türleri, çiçek mimarisi ve yaprak şekli gibi morfolojik özellikleri bakımından *Matricaria*'ya çok benzerdir. Bu nedenle hem taksonomik hem de terminolojik özellikleri birbirleriyle karıştırılmaktadır. Bazı *Tripleurospermum* türleri daha önce *Matricaria*'ya atanmış, daha sonra meyve (aken/cypsela) özelliklerine göre farklı bir cins olarak kabul edilmiştir (10). *Tripleurospermum* türleri ile ilgili olarak günümüze kadar yapılan az sayıdaki çalışmalarda, biyoaktif bileşenleri ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmamızda Türkiye florasında yaygın bir tür olan Gaziantep yöresinden toplanan *Matricaria chamomilla* L. ve şimdiye kadar biyoaktif fitokimyasalları çalışılmamış Mersin'den toplanan *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (*Matricaria decipiens* K. Koch) türlerinin çiçeklerinden polaritesi artan çözücülerle bir dizi özüt elde edilmiştir. Bu özütlerin fitokimyasal içerikleri ve LC-MS/MS ve GC-FID/MS yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Özütlerdeki fitokimyasallarının antioksidan, antibakteriyel, aktivitelerinin belirlenmesinin yanı sıra enflamasyonda etkili olan lipooksijenaz, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda önemli olan

AChE ve MAO-B, depresyonda öne çıkan MAO-A üzerindeki inhibisyon aktiviteleri *in vitro* olarak saptanmış ve aralarındaki ilişki irdelenmiştir. Biyoaktif içerikleri aydınlatılan bileşiklerin LOX, MAO-A, MAO-B, AChE ve BChE enzimlerine bağlanma afinitelerini moleküler doking ile hesaplanmıştır. Hesapsal çalışmalar ile elde ettiğimiz veriler *in vitro* deneysel verileri desteklemekte ve etkin ikincil metabolitlerin hangileri olduğunu bulma şansı kazandırmaktadır. Bu bileşiklerin hastalıklarla doğrudan ilişkisi olan enzimler üzerine etkilerinin incelenmesi, incelediğimiz papatya türlerinin fitokimyasallarından yeni öncü bileşikler önerilmesinin yolunu açacaktır.



1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Botanik Bilgiler

1.2.1. Asteraceae (Compositae)

Asterales takımı, en büyüklerinden biri olan Asteraceae dahil olmak üzere 11 aile içermektedir. Asteraceae, dünya çapında yayılış gösteren 1.500'den fazla önemli cins ve yaklaşık 25.000 türden oluşur. Latince adı “Asteraceae”, “yıldız” anlamına gelen Yunanca bir terim olan Aster türünden türetilmiştir (11). Ülkemizde Papatyagiller olarak bilinen Asteraceae diğer bir adıyla Compositae familyası, çiçekli bitkilerin çok büyük ve yaygın bir ailesidir. Papatyagiller (Asteraceae) familyasında sınıflandırılan Matricaria, Anthemis, Bellis, Leucanthemum, Tripleurospermum gibi farklı cinslerden bitki türlerine verilen ortak addır (12).

Asteraceae familyası tek yıllık, iki yıllık ve çok yıllık bitkilerden oluşur. Bu bitkilerin yaprakları çoğunlukla basit veya birleşik, alternat, eksik, tam, dişli, loblu veya çeşitli parçalı olabilir. Tek tek çiçekler sayısızdır, sapsızdır ve nadiren kaynaşmış bir veya çok dizi filaryanın koruyucu bir bileşimi ile kaplanmış bir kapitulumda toplanır. Ayrıca kapitula, ikincil kapitulum benzeri bir kafada toplanabilir. Çiçek tablası çoğunlukla çıplaktır, uzun tüylü veya kıllı soluk tüylere sahiptir. Çiçekler epiginözdür ya hepsi hermafrodit ve protandözdür ya da dişi, erkek veya nötrdür. Kaliks, yumurtalığın tepesinde, kıllar, pullar veya kılçıklardan oluşan bir pappus veya sürekli bir taç yapıdan oluşabilir ya da pappus bulunmayabilir. Taç yaprakları gamopetal, tübüler, filiform, ligulat veya bazen bilabiat, özellikle 3 veya 5 dişlidir. Genel olarak, çiçekler epipetal olan 4 veya 5 organa sahiptir ve filamentleri genellikle serbesttir ve anterler, nadiren serbest veya ayrılma iç kısmında bir silindir şeklinde yanal olarak kaynaşmıştır. Yumurtalık alttadır ve 1 hücreli ve 1 bazal anatropöz ovül vardır. Boyun yukarıda 2 dala ayrılmıştır. Ek olarak, disk çiçek stilleri genellikle anter silindirinden poleni tutan toplayıcı tüyler taşır. Ayrıca, ailenin karakteristik meyve türü, genellikle kalıcı veya yaprak döken bir pappusa (tüylü çanak) sahip olan akendir (13).

Bu familya Türkiye florası'nda 133 cins, 430'u endemik olan yaklaşık 1156 tür ile temsil edilmektedir. Asteraceae familyası Türkiye'nin birinci büyük familyası olmakla birlikte Türkiye florası'ndaki endemiklik oranı %38'dir (14).

1.2.2. *Matricaria chamomilla* L. (Tıbbi papatya)

Tıbbi papatya (Mayıs papatyası) diğer bir adlandırması *Matricaria chamomilla* L. (MC) ülkemizde doğal olarak yetişen önemli bir tıbbi ve ıtri bitkidir. Mayıs papatyası, İngilizce’de alman papatyası (German chamomile) veya *Marticaria recutita* L. adıyla bilinir. Bu bitkinin kurutulmuş çiçekleri Avrupa Farmakopesi’nde Matricariae flos olarak tanımlanmıştır. Bir yıllık otsu bitkilerdir. 10–45 cm boyundadır ve tüysüzdür. Kapitulum genellikle tek, bazen subkorimbus şeklindedir. İnvolukrum 5-6 mm genişliğinde olup daha sonra 8 mm genişliğe ulaşır. Brakteler 2,5-3,5 mm uzunluğunda, oblanseolat, obtus veya akuttur. Tüpsü çiçekler 1,25-1,5 mm uzunluğunda; dilsî çiçekler 12-15 adet, petalleri 4-8 mm, önce yatık sonra geriye kıvrıktır. Akenler kahverengi, arka yüzeyinde 5 beyazımsı çıkıntılı, 0,75 mm uzunluğundadır (15). Reseptakulumun koni biçiminde, üzeri çıplak ve içi boştur (16). *Matricaria chamomilla* L. (Tıbbi Papatya) taksonomik hiyerarşisi Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. *Matricaria chamomilla* L. (Tıbbi Papatya) taksonomik hiyerarşisi

Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Asteridae
Sıra	Asterales
Aile	Asteraceae
Cins	Matricaria
Tür	<i>Matricaria chamomilla</i> L.
Sinonim	<i>Matricaria recutita</i> L.
Yaygın isim	Tıbbi papatya, Mayıs papatyası, Alman papatyası



Şekil 1. *Matricaria chamomilla* L. (Tıbbi papatya, 2019 Mayıs-Gaziantep)

1.2.3. *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (Sarı papatya)

Sarı papatya (17), *Tripleurospermum decipiens* Bornm (TD) diğer bir adlandırması *Matricaria decipiens* K. Koch. literatürde ilk olarak *Matricaria* cinsine atanmış ancak daha sonra akenlerinin farklı yapıları ve tetrasporik embriyo kesesinin oluşumu temelinde ayrı bir cins olarak tanınmış ve *Tripleurospermum* cinsine atanmıştır (18-20).

İki yıllık, 10-90 cm boyunda, Gövdesi bir veya daha çok sayıda, bazen yatık, genellikle dik veya yükselen, yukarıda dallanmış korimboz çiçek durumu olan bir yapıya sahiptir. Yapraklar tek saplı, sert tüylü ve mızrak şeklindedir. Kapitula çok sayıda, genellikle diskiform (bastırılmış ligüllere sahip dış dişi), nadiren diskoid, 4-9 mm genişliğinde, gevşek korimboz, uzun, eşit olmayan pedinküller üzerinde taşınır. Fillerlerin yapısı mızraksı veya oblanseolat, kenarları beyaz ve zarsıdır. Reseptalar ovaldir. Korolla lobları genellikle uçlarda glandüler, nadiren eglandülerdir. Akenler obpiramidal, 1-1.5 x 0.3-0.7 mm, müsilaşsız, her iki yüzeyi buruşuk, arkada 3 çıkıntılı, yaprak damarları ince, sivri, beyaz; taç kısmı çok kısa ve lobüllerden oluşmaktadır. Bozkır, kayalık yamaçlar, ekili ve nadas tarlaları vb. gibi alanlarda ve 700-2350 m yüksekliklerde yetişir. Avrupa, Orta Asya, Kuzey Amerika ve Kuzey Afrika'da yaygın olarak yetişmektedir (21). *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (sarı papatya) taksonomik hiyerarşisi Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (Sarı papatya) taksonomik hiyerarşisi

Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Asteridae
Sıra	Asterales
Aile	Asteraceae
Cins	<i>Tripleurospermum</i>
Tür	<i>Tripleurospermum decipiens</i> (Fisch. & C. A. Mey.) Bornm.
Sinonim	<i>Matricaria decipiens</i> K. Koch.
Yaygın isim	Sarı papatya



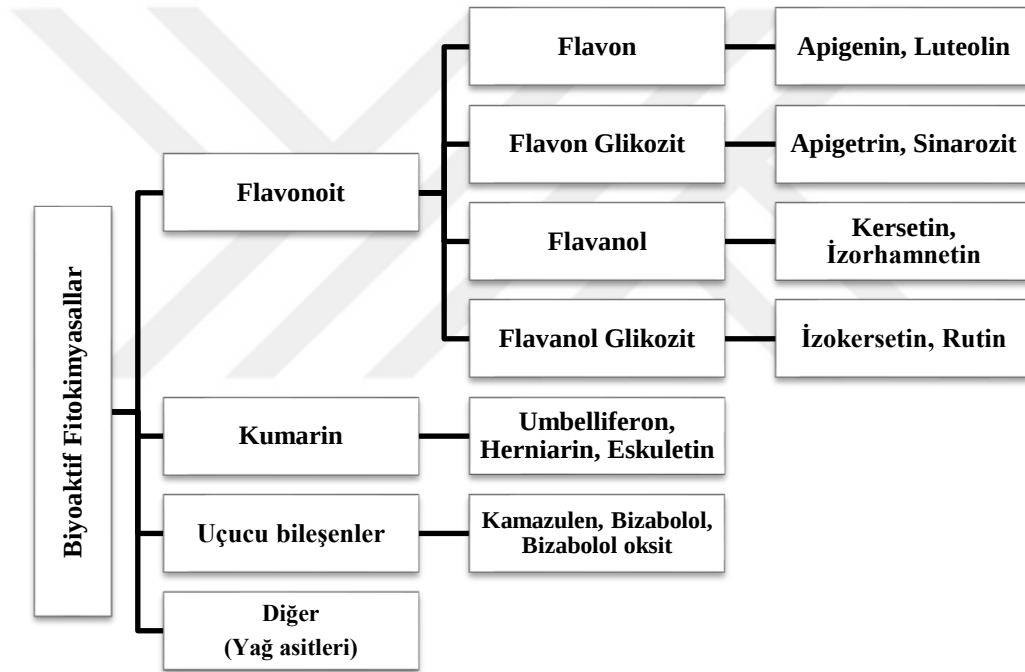
Şekil 2. *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (Sarı papatya)

1.2.2. *Matricaria chamomilla* L. (Tıbbi Papatya)

1.2.2.1. Kimyasal Bölüm

Papatyanın bileşiminde başlıca kumarinler, flavonoidler, fenolik asitler, uçucu yağlar ve diğer maddeler (müsilaj, polisakkaritler, aminoasitler, yağ asitleri, antemik asit, triterpen hidrokarbonlar, tannin ve kolin) bulunmaktadır. Bu bileşiklerin üzerinde birçok kimyasal ve biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

Özellikle MC çiçeklerinde bulunan uçucu olmayan biyoaktif fitokimyasal majör bileşenler; flavonoidler ve bunların glikozitleri, kumarinler (8, 22-24) Şekil 3'teki gibidir:



Şekil 3. MC'nin biyoaktif fitokimyasalları

MC'den elde edilen drog'un ana kumarin bileşiği umbelliferon ve onun metil esteri olan herniarin (3-metoksi kumarin)'dir (25, 26).

1.2.2.1.1. Gaz kromatografisi ile yapılan yağ asiti kompozisyonu çalışmaları

Helal M.H. ve ark., Boron Tri-Florür-AOAC-IUPAC metodu ile yağ asitleri kompozisyonları incelemiş; Tıbbi papatyanın yağ asiti içeriğini majör bileşenler olarak Linoleik asit (%17,78), palmitik asit (%15,91) ve oleik asit (%9,64) olarak tespit etmişlerdir (27).

1.2.2.1.2. Sıvı kromatografisi ile yapılan aktif bileşen çalışmaları

Apigetrin, apigenin, kersetin, luteolin, luteolin-7-glikozit (sinarozit) ve izorhamnetin gibi çeşitli fenolik bileşenlerinin sulu, alkollü veya hidroalkolik MC özütlerinde analiz etmek için çeşitli kalitatif ve kantitatif yöntemler geliştirilmiştir.

MC su ekstraksiyonu ile yapılan bir çalışmada ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizisi dedektörü (UHPLC-DAD) ve tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) yöntemleri ile analizi neticesinde apigenin, apigetrin, luteolin, sinarozit kersetin-3-O-galaktozit, rutin (kersetin-3-O-rutinozit) ve kateşin tespit edilmiştir. Ayrıca apigeninin majör bileşik olduğu bildirilmiştir (28).

Başka bir çalışmada, iki çeşit Alman papatyasından izole edilen sulu ve metanolik fraksiyonun HPLC-MS analizi neticesinde MC'nin ana bileşeni olarak apigetrin olduğunu tespit edilmiştir (29).

Bir başka çalışmada etanolik MC özütü, HPLC/MS ve HPLC/NMR ile analiz edilmiş ve MC'den elde edilen özütteki ana bileşenlerin güvenilir ve kapsamlı bir karakterizasyonu sağlanmıştır. 2-(glukosiloksi)-4-metoksi-sinamik asidin ve ayrıca herniarin ve apigenin cis- ve trans-izomerlerine ek olarak, apigetrinin kendisi ve diğer türevleri ana bileşenler olarak tanımlanmıştır (30).

Bir başka çalışmada MC özütleri ve MC çayı UHPLC-MS/MS analizine tabi tutulmuştur. Hem papatya çiçeği hem de papatya çayı özütlerinde en çok bulunan fenolik bileşikler klorojenik asit, umbelliferon, apigenin ve apigetrin olduğu bildirilmiştir. MC çayı özütlerinde rutin veya kersitrin gibi flavonoidler glikozitlerin bolluğu bulunurken, aglikon apigenin ve glikoziti daha düşük miktarda mevcut olduğu tespit edilmiştir (31).

Farklı ülkelerde gıda pazarlarından veya perakende eczanelerden satın alınan MC çayının ticari örnekleri, çay infüzyonları, LC-DAD–MS/MS ile spektrofotometrik ve kromatografik olarak polifenoller için analiz edilmiştir. Papatya infüzyonlarındaki başlıca fenolik bileşikler, klorojenik asitler, ferulik asit, glikozitler ve apigenin glikozitlerden oluşmaktadır (32).

1.2.2.2. Farmakolojik Bölüm

Papatya antik Roma'dan beri sedatif, antispazmodik ve antiromatizmal etkilerinden dolayı kullanılmıştır (33). Bu bitkinin, Anglo-Saksonlar tarafından, Tanrının insanlara verdiği dokuz kutsal bitkiden biri olduğuna inanılmaktadır (34). MC, terapötik ve kozmetikte sayısız kullanımı ve yüksek besin değeri ile öne çıkmaktadır. Bu nedenle, MC iyileştirici etkileri nedeniyle geleneksel ve alternatif tıpta (unani, homeopati vs.) yaygın olarak kullanılmaktadır (35).

1.2.2.2.1. Antioksidan etki

MC özütünün antioksidan aktivitesini göstermek amacıyla makrofaj RAW 264,7 hücreleri, MC özütünün sitoprotektif etkilerini göstermek için Bhaskaran ve ark. tarafından uygulanmıştır. Hücresel hasarı indüklemek için hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. Özüt ile ön işleme tabi tutulmuş hücreler doza bağlı olarak H_2O_2 kaynaklı hücre canlılığı kaybını azalttığı görülmüştür. Oksidatif strese karşı koruma mekanizması, NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) dahil olmak üzere çeşitli antioksidan enzimlerin indüklenmesi ve ayrıca transkripsiyon faktörü Nrf2' nin nükleer birikimini ve bunun antioksidana bağlanmasını artırması yanıt ajanları yoluyla olmuştur. Ayrıca MC, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre içi seviyelerindeki H_2O_2 aracılı artışı doza bağlı olarak azaltmıştır. Sonuç olarak, ekstraktaki antioksidan aktivite ile ilişkili olabilecek iki ana bileşen, sırasıyla Apigenin-7-glikozit (%63,3) ve apigenin-7-O-neohesperidoside (%27,7) analiz edilmiştir (36).

Başka bir çalışmada MC bitkisinin metanol, etanol, dietil eter ve hekzan çözücülerıyla maserasyon yoluyla hazırlanan ekstralarının antioksidan aktiviteleri DPPH kullanılarak ölçülmüştür. Sonuç olarak ekstrede polar konsantrasyonunun artması serbest radikal temizleme kapasitesini arttırmıştır. Metanol en yüksek serbest radikal temizleme kapasitesine sahiptir. Bunun sebebinin, HPLC analizleri sonucunda metanol özütlerinde tespit edilen klorojenik asit, p-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit gibi yüksek oranda fenolik bileşikler olduğu düşünülmektedir. Bu bileşikler lipid peroksidasyonunun ana nedeni olan serbest radikalleri temizleyerek bitkinin antioksidan kapasitesinin temel kaynağını oluşturmaktadır (37).

1.2.2.2.2. Antibakteriyel ve antifungal etki

MC'nin sulu ve alkol özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçlar hem sulu hem de alkol özütlerinin tüm mikrobiyal izolatlar üzerinde belirgin bir inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir. MC'nin sulu özütü papatya, mikrobiyal büyüme (1,64 mm) üzerinde inhibitör etkiye sahip görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan özütlerin tüm konsantrasyonları (%5, 10, 20, 40) mikrobiyal büyüme üzerinde inhibitör etki göstermiştir ve bu etki konsantrasyon arttıkça artmıştır. *S. aureus* özellikle alkol özütü daha fazla inhibisyon gösterirken (inhibisyon bölgesi 3,4 mm), sulu özütler kullanıldığında etkilenen en düşük mikroorganizma *C. albicans* olmuştur (inhibisyon bölgesi 2.25 mm) (38).

Disk difüzyon yöntemi Roby ve ark. *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus* ve *Candida albicans* kullanılarak MC esansiyel yağının ve çeşitli çözücü özütlerinin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmişlerdir. Hem uçucu yağ hem de özütlerinin doza bağlı olarak antimikrobiyal aktiviteler (7,5- 20 µg) sergilediği sonucuna varmışlardır. Metanolik özütün hem en düşük hem de en yüksek konsantrasyonları *A. flavus*'a karşı güçlü aktivite gösterirken, etanolik ve n-heksan özütleri *S. aureus*'a karşı en yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca dietil eter özütü en düşük ve en yüksek konsantrasyonlarda *C. albicans*'a karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonlar (MİK), analiz edilen en hassas mikroorganizmaların *B. cereus* ve *A. flavus* olduğunu göstermiştir. Öte yandan, test materyallerinin *E. coli*'ye karşı yalnızca zayıf bir aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (37).

1.2.2.2.3. Alzheimer hastalığı üzerine etki

Ionita R., ve ark. MC hidroalkolik özütü üzerinde yaptığı çalışmada (25 ve 75 mg/kg) sıçanlara 7 gün boyunca günde bir kez periton içine uygulamış ve hafıza bozukluğunu indüklemek için davranış testinden 30 dakika önce skopolamin (0,7 mg/kg) enjekte etmiştir. Özütün fitokimyasal bileşimi, HPLC/DAD analizi ile incelenmiştir. Bellek değerlendirmesi için Y-labirent ve radyal labirent testleri kullanılmıştır. Asetilkolinesteraz aktivitesi sıçan hipokampusunda ölçülmüştür. Sıçan hipokampusunda, indirgenmiş glutatyon ve protein karbonil ve malondialdehit seviyelerinin toplam içeriği ile süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz spesifik aktiviteler de ölçülmüştür. qRT-PCR, sıçan hipokampusunda BDNF mRNA ve IL1 β mRNA ekspresyonunu ölçmek için kullanılmıştır. Klorojenik asit, apigenin-7-glukozit, rutin, sinarozit, luteolin ve apigenin türevlerini özütün ana bileşenleri olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, ekstraktın, Y-labirent testinde skopolamin kaynaklı spontan değişimin azalmasını ve radyal labirent testinde skopolamin kaynaklı çalışma ve referans hafıza hatalarını tersine çevirdiğini gösterilmiştir. Sıçan hipokampusundaki asetilkolinesteraz aktivitesinin ve oksidan-antioksidan dengesinin skopolamin ile indüklenen değişikliği, özüt ile tedavi edilerek geri kazanılmıştır. Son olarak, özütün sıçan hipokampusunda skopolamin-azalmış BDNF ekspresyonunu ve artan IL1 β ekspresyonunu restore ettiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak bu bulgular, özütlerin sıçan hipokampusunda kolinerjik aktiviteyi, nöroinflamasyonu modüle ederek ve antioksidan etkiyi artırarak amneziye karşı güçlü bir nörofarmakolojik ajan olabileceğini düşündürmektedir (39).

1.2.2.2.4. Antidepresif etki

R. Awad ve ark., MC'nin sulu ve etanolik özütlerinin γ -aminobütirik asit (GABA) metabolizmasından sorumlu birincil beyin enzimlerini doğrudan etkileyip etkilemediğini belirlemeyi amaçlamışlardır. Anksiyolitik bitkilerin, glutamik asit dekarboksilaz (GAD) veya GABA transaminaz (GABA-T) ile etkileşime girebilir ve nihayetinde beyin GABA seviyelerini ve sinir iletimini etkileyebileceği düşünülmektedir. Sulu ve etanolik bitki özlerinin inhibitör konsantrasyonlarını (IC₅₀) belirlemek için iki *in vitro* sıçan beyin homojenat tahlili geliştirilmiştir. MC (Alman papatyası) GAD aktivitesini önemli ölçüde-inhibe ettiği gösterilmiştir (40).

Bir insan çalışmasında, papatya çayının kadınlarda doğum sonrası depresyon, uykusuzluk üzerindeki etkinliği değerlendirilmiş ve Papatya çayının doğum sonrası kadınlarda depresyonu azaltmak ve uyku problemlerini iyileştirmek için kullanılabileceği gösterilmiştir (41).

1.2.2.2.5. Antienflamatuvar etki

İnterlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi lipopolisakarit (LPS) ile indüklenen proinflamatuvar sitken üretiminin bir fare modeli, apigenin' in antienflamatuvar etkisini araştırmak için Smolinski ve Pestka tarafından kullanılmıştır. Murin makrofaj hücre hattı, RAW 264.7, apigenin antienflamatuvar aktivitesinin moleküler temelini belirlemek için de uygulanmıştır. Test hayvanları apigenin (50 mg/kg) ile ön işleme tabi tutularak ve 1 saat sonra LPS (1 mg/kg) uygulamasıyla iltihaplanma tetiklenmiştir. Uygulamadan 90 dakika sonra kan alınmış sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Apigenin'in LPS ile indüklenen IL-6 ve TNF- α üretiminde neden olduğu azalmanın yüzdesi sırasıyla %35 ve %33 olarak belirlendi. Diğer analizlerde, RAW hücreleri, 12 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda LPS ve apigenin ile uygulanmıştır. En yüksek iki doz olan 1 ve 10 mg/mL apigenin ile uygulama doza bağlı olarak LPS ile indüklenen IL-6 üretimini bozmuştur. Bununla birlikte, TNF- α üretimi önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Sonuç olarak apigenin, LPS ile indüklenen proinflamatuvar sitokin üretimini azaltarak antienflamatuvar aktivite göstermiştir (42).

Nitrik oksit (NO), çeşitli enflamatuvar hastalıkların patogenezinde ve indüklenebilir NO sentaz (iNOS) ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bhaskaran ve ark. RAW 264,7 makrofajları kullanarak apigenin-7-glikozit' nin molar konsantrasyonuna eşdeğer dozlarla standartlaştırılmış sulu MC özütünün NO sentezi üzerindeki engelleyici etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, makrofajlarda NO sentezi ve iNOS ekspresyonu, ekstrakt (10-40 μ g/mL) ile bloke edilmiştir. Ek olarak, nükleer faktör- κ B (NF- κ B) p65 alt ünitesinin (RelA/p65) LPS ile uyarılan DNA bağlanma aktivitesini, NF- κ B/RelA aktivitesini düzenleyen yukarı akış kinazını ve inhibitör faktör- κ B'nin bozulmasını belirgin şekilde inhibe etmiştir. Bu sonuçlar, MC özütünün, RelA/p65 aktivasyonunu inhibe ederek NO sentezini ve iNOS gen ekspresyonunu baskıladığını ve özütün etkili bir antienflamatuvar ajan olarak kullanımını desteklediğini göstermiştir (43).

Dondurularak kurutulmuş papatya özütlerinin (*Matricaria chamomilla* L.) hem enflamatuar etkiyi hem de lökosit sızıntısını baskıladığı bulunmuştur. *Matricaria chamomilla*, %80 etanol özü için intraperitoneal LD₅₀ dozunun 1/10'u tarafından üretilen pati ödeminin baskılanması ölçülerek, bozulmamış sıçanlar üzerindeki antienflamatuar aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar, 6 bitkinin iyi bir antienflamatuar aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (44, 45).

1.2.2.2.6. Antikanser etki

Zheng ve ark. apoptotik yol yoluyla insan servikal karsinom hücrelerinin (HeLa) büyümesi üzerindeki apigenin inhibitör aktivitesini incelenmiştir. Apigenin 37-74 µM konsantrasyonlarda HeLa hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı ve IC₅₀ değerinin 35,89 µM olduğu sonucuna varmışlardır (46).

Lefort ve Blay, apigenin'in gastrointestinal kanserler üzerindeki önleyici rolünü incelenmiştir. Apigenin'in kemokin sinyal yollarını bloke ederek, hücre adezyon moleküllerini inhibe ederek ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesini sağlayarak metastatik hastalıkların ortaya çıkışını yavaşlatmada mevcut kemoterapötiklerin ötesinde katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (47).

1.2.2.2.7. Antiülser etki

Balb/c fareleri, MC özütünün antiülser aktivitesini araştırmak için Karbalay-Doust ve Noorafshan tarafından kullanılmıştır. Test hayvanları gruplanarak ve intragastrik yoldan sırasıyla 400 mg/kg sukralfat, bir sitoprotektif ajan veya 400 mg/kg özü almışlardır. 30 dakika sonra, mide ülseri, tüm hayvanlarda %60 etanol içinde 1,0 mL 0,3 M hidroklorik asit çözeltisinin oral yoldan uygulanmasıyla uyarılmıştır. 1 saat sonra gastrik lezyonların ve kanamanın alanını belirlemek için stereolojik yöntem kullanılmıştır. Yazarlar ayrıca 5000 mg/kg ekstraktlık tek bir dozda uygulandığında olası toksisiteyi de incelemiştir. Uygulamadan 14 gün sonra karaciğer, böbrek, akciğer ve kalp dokularının histopatolojik değerlendirmesi, ekstrenin 5000 mg/kg'a kadar güvenli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Daha sonra 400 mg/kg'daki *M. recutita* özütlerinin farelerde mide ülserasyonunu önlemede etkili olabileceği ve 5000 mg/kg'a kadar dozlarda toksik etki oluşturmadığı sonucuna varmışlardır (48).

1.2.2.2.8. Antidiyabetik etki

Matricaria chamomilla L. etanolik özüt tedavisi, kontrol grubuna göre pankreas adacık hücrelerinin çoğunluğunu korumuştur. Sonuç olarak, *Matricaria chamomilla* L. etanolik özütünün, STZ-diyabetik sıçanlarda doza bağlı bir şekilde önemli antihiperglisemik etki gösterdiği, beta hücrelerini korudu ve hiperglisemi ile ilişkili oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir (49).

Kato ve ark. sulu MC özütünün ve umbelliferon, esculetin, luteolin ve kersetin gibi bileşenlerinin antihiperglisemik aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçları, esculetin ($IC_{50} = 0,9$ mg/mL) ve kersetin ($IC_{50} = 72$ ve 71 µg/mL) sukraz enzimini orta düzeyde inhibe ettiğini göstermiştir. Bir sakaroz yükleme deneyinde, 15 ve 30 dakika sonra esculetin (50 mg/kg vücut ağırlığı) hiperglisemiye baskılarken, özüt (500 mg/kg vücut ağırlığı) ve kersetin (50 mg/kg vücut ağırlığı) daha az etkili bulunmuştur. Öte yandan, özüt ve kersetin'in uzun süreli uygulanması, kan şekeri düzeylerinin önemli ölçüde inhibisyonunu sağlamıştır. Ayrıca bu örneklerin karaciğer glikojen seviyelerini arttırdığı da tespit edilmiştir. Ayrıca özüt ($IC_{50} = 16,9$ µg/mL), aldoz redüktaza karşı güçlü baskılama göstermiştir. Ek olarak, umbelliferon, eskuletin, luteolin ve kersetin, insan eritrositlerinde sorbitol agregasyonunu belirgin şekilde inhibe etmiştir. Buna göre sulu MC özütlerinin hiperglisemi ve diyabetik engellerin ilerlemesinin önlenmesine katkıda bulunduğu sonucuna varmışlardır (50).

STZ (streptozotosin) ile indüklenen (70 mg/kg) diyabetik sıçanlar üzerine, Çemek ve ark. etanolik MC özütlerinin olası antihiperglisemik ve antioksidatif aktiviteleri araştırılmıştır. Hayvanlar dörde ayrılmıştır: (I) kontrol, (II) STZ ve damıtılmış su ile tedavi edilen grup, (III) STZ ve 5 mg/kg glibenklamid verilen grup ve STZ ile 20, 50, 100 mg/kg özüt ile tedavi edilen (IV) grup. Veriler özütlerin tokluk hiperglisemi ve oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığını ve tüm dozlarda antioksidan durumunu artırdığını ortaya koymuştur. Histolojik değerlendirme ayrıca özütün kontrol grubuna kıyasla pankreas adacık hücrelerinin çoğunu koruduğunu kanıtlamıştır. Sonuç olarak, MC özütü, STZ tarafından uyarılan korumalı β -hücre hasarı, doza bağlı olarak ve hiperglisemi ile ilişkili oksidatif stresin restorasyonu yoluyla önemli antihiperglisemik etki sergilemiştir (49).

1.2.2.2.9. Antispazmodik etki

Alman papatyasının alkollü özütleri, asetilkolin ve histamin kaynaklı spazmı inhibe ettiği bildirilmiştir. Apigenin bileşiğinin, kobay incebağırsağı üzerinde doza bağlı spazmolitik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (51).

Maschi ve ark. *in vitro* testler ile sulu MC özütünün siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat fosfodiesterazlar (cGMP-PDE) üzerindeki spazmolitik aktivitesini incelenmişlerdir. İnsan trombosit cAMP-PDE ve rekombinant PDE-5A1, çalışma sırasında analiz edilmiştir. Sonuç olarak, özütün cAMP-PDE aktivitesini bloke ettiği (IC₅₀= 17,9-40,5 µg/mL), cGMP-PDE5'in ise daha az etkilendiği bulunmuştur (50 µg/mL' de %15). Bu veriler, MC özütünün neden olduğu düz kas gevşemesinin, cGMP'den ziyade cAMP bozulmasının azalmasına aracılık ettiğini desteklemektedir (52).

1.2.2.2.10. Pediatride kolik etki

Yapılan iki klinik çalışmada, çocuklarda kolik (gaz sancısı) tedavisi için papatyanın etkinliğini değerlendirmiştir ve her ikisi de papatyayı diğer bitkilerle birleştirmiştir. Prospektif, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, koliki olan (2 ila 8 haftalık) 68 sağlıklı bebeğe ya bitki çayı (Alman papatyası, mine çiçeği, meyan kökü, rezene, melisa nane) ya da plasebo çayı (glikoz, tatlandırıcı) verilmiştir. Her bebeğe, günde üç defadan fazla olmamak üzere, 150 mL/doza kadar tedavi verilmiştir. 7 günlük tedaviden sonra ebeveynler çayın bebeklerin %57'sinde koliki ortadan kaldırdığını, plasebo 'nun sadece %26'sında yardımcı olduğunu bildirmişlerdir (P<0.01). Her iki grupta da herhangi bir yan etki gözlenmediği kaydedilmiştir (53).

Anne sütüyle beslenen 93 kolikli bebek üzerinde yapılan randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, standart bir papatya özütü (*Matricaria chamomilla*), rezene (*Foeniculum vulgare*) ve melisa (*Melissa officinalis*) günde iki kez plasebo ile karşılaştırılmıştır. Papatya/rezene/melisa balsamı grubunun %85,4' ünde ve plasebo grubunun %48,9'unda ağlama süresini azalttığı (P<0.005) ve herhangi bir yan etkinin gözlenmediği bildirilmiştir (54).

1.2.2.2.11. Hepatit sistemi koruyucu etki

Karaciğer hasarı olan albino sıçanlar, hidroalkolik MC özütlerinin kan ve karaciğer GSH, karaciğer $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$ aktivitesi, serum marker enzimleri, serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat gibi farklı biyokimyasal parametreler üzerindeki hepatoprotektif aktivitesini değerlendirmek için Gupta ve Misra tarafından incelenmiştir. Sıçanlar ekstrakt (400 mg/kg vücut ağırlığı) ile beslenmiş ve 5 gün sonra parasetamol (200 mg/kg vücut ağırlığı) tarafından karaciğer hasarı oluşturulmuştur. Sonuç olarak, özüt uygulanan grupta karaciğer ve kandaki GSH konsantrasyonu ve karaciğer $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$ aktivitesi artarken, karaciğer tiobarbitürik asit reaktif maddelerin seviyesi ile serum ALT, AST, ALP ve bilirubin seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca parasetamolün neden olduğu karaciğer hasarına karşı özütün olası mekanizmasını, parasetamol metabolizmasında yer alan serbest radikallerin mikrozomal enzimler tarafından durdurulması ve kandaki GSH (Aktif Glutasyon) seviyesinin yükselmesinin karaciğer dokusu için antioksidatif strese karşı etkili bir koruma sağladığını öne sürmüşlerdir (55).

1.2.2.3. Geleneksel kullanım

MC çiçeklerinden hazırlanan infüzyon, yüzyıllardır gerek hoş ve sakinleştirici tadı için gerekse ağrılı mide-bağırsak şikayetlerini (ishal, gaz, spazmlar, hafif uyku bozuklukları, gastrit ve enterit gibi iltihabi durumlarda) gidermek için kullanılmıştır. Ayrıca infüzyon bronşit ve nezle şikayetlerini hafifletmek için inhale edilir veya yara, apse ve hemoroidleri iyileştirmek için dışarıdan sıcak kompres olarak uygulanır. MC'nin geleneksel kullanımı Tablo 3'te detaylandırılmıştır.

Tablo 3. MC'nin geleneksel kullanımı

Kısım	Uygulama	Kullanım
Kapitulum (Çiçek)	Dahili olarak; infüzyon; 3-7 gün boyunca günde iki kez bir çay bardağı içilir (56).	Astım, böbrek taşı (56), öksürük (56, 57) , grip (57) soğuk algınlığı (56, 58) spazmolitik (56, 59), bronşit (56, 57, 60), gaz giderici (56, 61), iştah açıcı (61), sindirim (60, 62), adet sancılarına karşı (62, 63), karın ağrısı (56, 58, 59, 63, 64), yatıştırıcı (61, 62, 64) iltihap önleyici (56, 59, 64)
	Harici olarak; infüzyon; iyileşene kadar gargara olarak (56); bir bezle tamponlanarak (56, 59): buhar inhalasyonu (59, 64)	Sivilce, bronşit (59), boğaz ağrısı, ağız kokusunu gidermek (56), iltihaplı yaralar (56, 59), yüz ve gözleri temizlemek (60), sinüzit (64), yaralar (56, 59, 64).
	Dahili olarak; kaynatma (62, 63)	Karın ağrıları (62), yatıştırıcı (63), öksürük (62, 63)
	Harici olarak; kaynatma; İyileşene kadar günde bir kez uygulanır (56).	Antiseptik (56), hemoroid (61), yaralar (56, 61).
Toprak Üstü	Dahili olarak; infüzyon; 2-3 gün boyunca günde 2-3 kez bir çay bardağı içilir (65).	Gastrointestinal hastalıklar, baş ağrısı, solunum yolu hastalıkları ve grip (65).

1.2.3. *Tripleurospermum decipiens* Bornm. (Sarı Papatya)

Mojap, F. ve ark. 2002 yılında İran bitkilerinin bazı türleri üzerine yapmış olduğu çalışmada *Tripleurospermum decipiens* Bornm'un ikincil metabolitleri üzerine fitokimyasal araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada toprak üstü kısımların batı İran'daki farklı bölgelerden çiçeklenme döneminde toplanmış, gölgede kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Bitkisel materyal örnekleri, soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak sulu ve metanol özütleri hazırlanmıştır. *Tripleurospermum decipiens* (Fisch. & C. A. Mey) Bornm'un yoğun olarak flavonoit tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca alkaloidler ve steroidal sapogeninler (saponinler) ve tanenleri içerdiği rapor edilmiştir (66).

Nesrin C. ve ark. 2017 yılında Türkiye Eskişehir'den toplanan *Tripleurospermum decipiens* Bornm 'un toplam fenolik ve antioksidan kapasitelerini incelemişlerdir. Yaklaşık 1 g toz haline getirilmiş kuru kapitulum örneği, yağı ve diğer polar olmayan bileşikleri uzaklaştırmak için ilk önce petrol eteri ile iki kez (her biri için 10 mL) ekstrakte edilmiştir. Yağı alınmış numune daha sonra sulu metanol (her biri için %80, h/h, 10mL) kullanılarak özüt elde edilmiştir. Ortalama toplam fenolik (TF) içeriği 28,77 mg GAE/g kuru drog ve ortalama TF içeriği 15,72 mg olarak tespit edilmiştir. Antioksidan kapasitesi ORAC için 25,87 µmol TE/g kuru drog DPPH için 115.65 µmol TE/g kuru drog, FRAP için 311,13 µmol TE/g kuru drog ve CUPRAC için 105,83 µmol TE/g kuru drog içerdiği tespit edilmiştir (67).

Ayaz FA., ve ark. 2016 yılında Türkiye İzmir'den toplanan TD akenlerinin yağ asidi bileşimi incelemiştir. 0,5 g aken numunesi, 20 mL kloroform/metanol (2:1, h/h) ile 4°C' de 18 saat boyunca ekstrakte edildi. Yağlı asit metil esterleri, heksan ile ekstre edilerek bir alev iyonizasyon detektörü ve bir kaynaşmış silika kapiler kolonu (SP-2330, 30 m 0,25mm, i.d, film kalınlığı) ile donatılmış bir Perkin Elmer Auto System XL gaz kromatografisi kullanılarak analiz edilmiş ve miktarları belirlenmiştir. TD'nin %17,37 oranında stearik asit tespit edilmiştir (68).

Göger, G. ve ark. 2021 yılında Türkiye Eskişehir'den toplanan, *Tripleurospermum decipiens* Bornm'un toprak üstü kısımlarından mikrobuhar damıtma -katı faz mikroekstraksiyon (MSD-SMPE) tekniği ile uçucu maddeler elde etmiştir. Uçucuların ve yağ asidi metil esterlerinin kimyasal bileşimleri Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GC/MS) teknikleri ile analiz edilmiştir. *T. decipiens*'in n-Heksan (TDH) ve metanol (TDM) özütlerinin asetilkolinesteraz (AChE), α -amilaz enzim inhibisyonları ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı. AChE'nin *in vitro* inhibisyonu Ellman'ın kromojenik ajanı kullanılarak izlendi ve özütlerin antidiyabetik etkileri domuz pankreas α -amilaz enziminin inhibisyonu ile spektrofometrik olarak değerlendirildi. Özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Bacillus subtilis subsp spizizeni* ATCC 6633, *B. subtilis* ATCC 19654, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *Candida parapsilosis* ATCC 22019'a karşı mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. 10 mg/mL'de metanol özütü (%55,6) için *in vitro* α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi gözlenmiştir. En yüksek AChE inhibisyonu, konsantrasyonda (10 mg/mL) n-heksan özütü (%58,8) için kaydedilmiştir. Özütlerin *B. subtilis* ATCC 19654, *B. subtilis subsp spizizeni* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019'a karşı etkili olduğu bulunmuştur (69).

1.2.4. Biyoaktif Fitokimyasallar

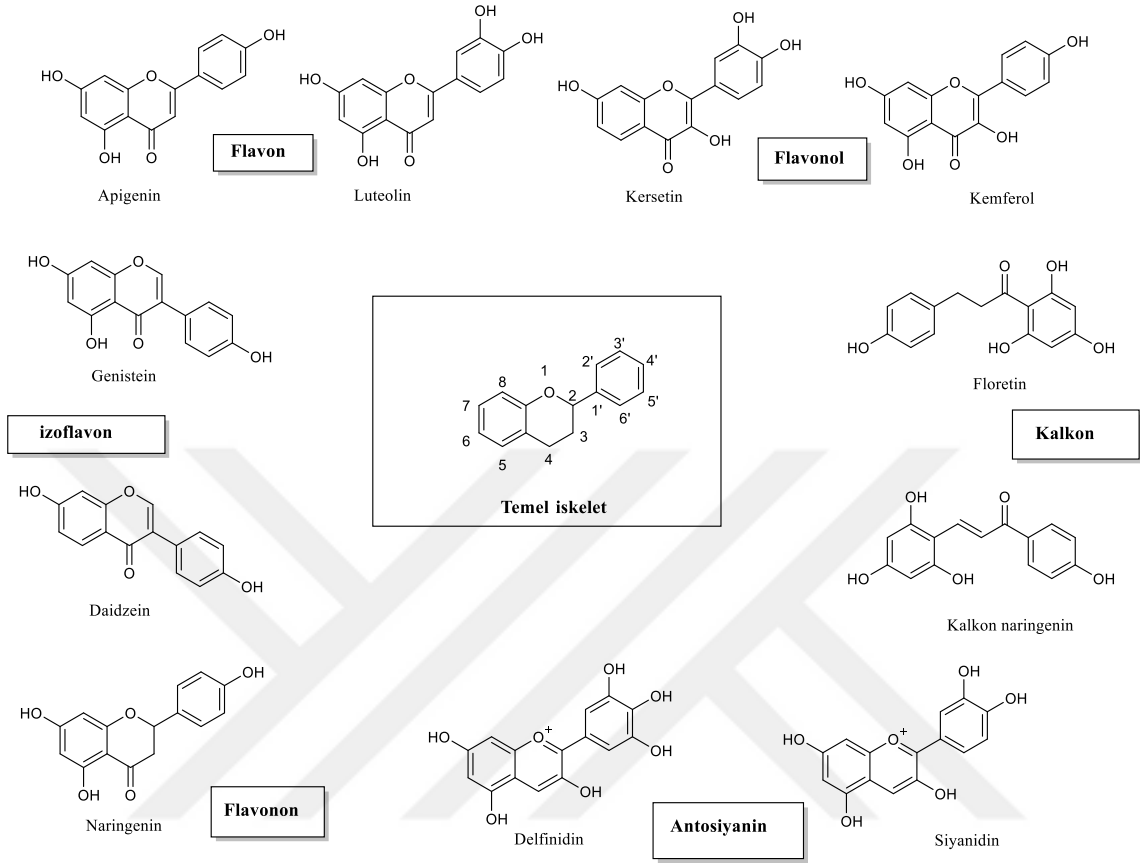
Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkilerin ikincil metabolizma (sekonder metabolit) ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Günümüze kadar bitkilerden 8.000'in üzerinde fenolik bileşik elde edilmiştir (70). Bitkisel metabolitlerin bu sınıfı fenollerin kendisi gibi basit fenollerden, taninler gibi karmaşık yapıli bileşiklere kadar geniş bir dağılım göstermektedirler (71).

Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdeleri gibi tüm kısımlarında bulunabilen sekonder metabolitlerdir. Bitkiler büyüme, lignifikasyon, pigmentasyon, tozlaşma gibi çeşitli süreçlerde ve patojenlere, predatörlere ve çevresel strese karşı direnç sağlamak için ikincil metabolitler olarak fenolik bileşikleri üretirler (72, 73).

1.2.4.1. Flavonoitler

Flavonoitler, bitkilerin fotosentezle sentezleyerek, yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları karbonhidrat, amino asitler vb. birincil metabolitlerden türerler ve bitkilerin ikincil metabolitlerinin önemli bir sınıfını oluştururlar. Flavonoitlerin biyosentezleri fenilalanin ve malonil-koenzim A ile hücrede sitozol içerisinde gerçekleşmektedir (74). Flavonoitlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆ – C₃ – C₆) yapısı oluşturur. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması sonucu flavonoitler alt sınıflara ayrılırlar. Altı üyeli hetero halkanın oluşması ile meydana gelen trisiklik sistem ise hetero halkanın yükseltgenme derecesine bağlı olarak, iki farklı yapıda bulunabilir. Bunlardan birisi 2-fenilkroman veya fenilbenzopiran iskeletine sahip flavan, diğeri ise 2-phenyl-1-benzopyran-4-one iskeleti içeren flavondur (75). Genellikle flavon türevlerine flavonoitler, flavan türevlerine ise flavanoitler denir. Flavonoitlerdeki yapı çeşitliliği, sadece difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenmesiyle sınırlı kalmamaktadır. Ayrıca, her sınıf içinde, molekülün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan süstitüentlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoitlerde gözlenen yapı çeşitliliğine neden olmaktadır. Flavonoit yapılarında gözlenen en yaygın süstitüentler hidroksil gruplarıdır. Flavonoitlerin yapısındaki hidroksil gurupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla

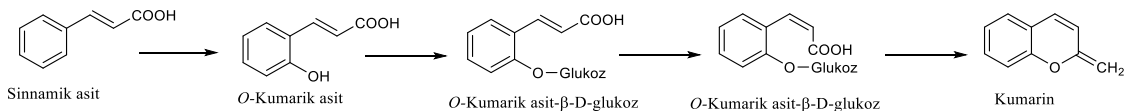
alkillenmekte ya da glikozillenmektedirler. Bu nedenle, flavonoitlerin metoksi ve glikozil türevlerine bitkilerde sık rastlanır.



Şekil 4. Başlıca flavonoit iskeletleri

1.2.4.2. Kumarinler

Kumarinler, doğada yaygın olarak bulunan bir benzopiren ailesidir (1,2-benzopiron veya 2H-1-benzopir-an-2-on). Tipik bir benzopiren çerçevesi taşıyan, doğal olarak oluşan ve/veya sentetik oksijen içeren heterosikllerin önemli bir ailesini temsil ederler. Kumarin yapısı, Şekil 5'te gösterildiği gibi orto-hidroksilasyon, yan zincir çift bağının trans-cis izomerizasyonu ve laktonizasyon yoluyla sinnamik asitten türetilir.



Şekil 5. Kumarin biyosentezi (76)

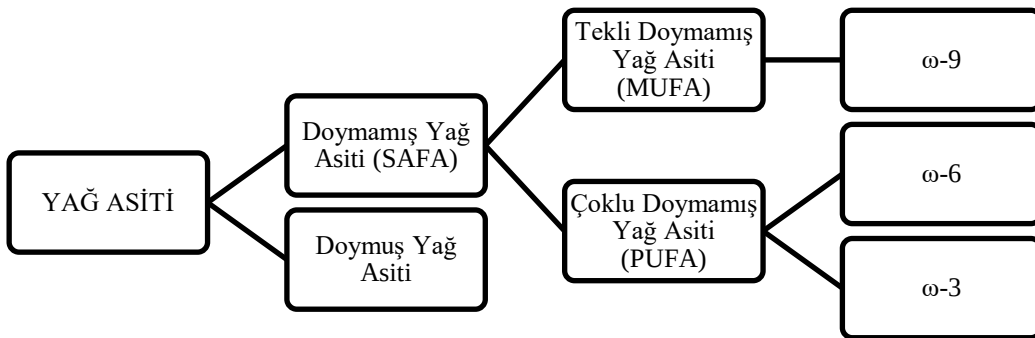
Doğada en yaygın olarak bulunan kumarinler umbelliferon, esculetin ve scopoletin'dir. Kumarinlerin biyosentez yolu, tüm kumarin türevlerinin yedinci pozisyonda oksijenlenmiştir (77).

Kumarin ve heterosiklik türevleri, antitümör, antibakteriyel, antienflamasyon, insan karbonik anhidrazın inhibisyonu ve antikanser aktivitesi dahil olmak üzere faydalı ve çeşitli biyolojik aktiviteler sergiler. Kumarinler ayrıca orta düzeyde trigliserit düşürücü aktivite ile lipid düşürücü aktivitesi ile bilinirler. Ayrıca, hidroksil kumarinler güçlü antioksidanlar olarak kabul edilir ve reaktif oksijen türlerini temizler, böylece insan vücudunda serbest radikal hasarını önleyebilir. Kumarinler ayrıca osteoporoz, artmış kardiyovasküler kalp hastalığı riski ve bilişsel eksiklikler gibi menopozla ilgili hastalıkların ortaya çıkmasını önlemede faydalı olabilecek aromatazı da inhibe edebilir (78).

1.2.4.3. Yağ Asitleri

Bitkiler, çevre dostu bir şekilde çok büyük çeşitlilikte yağ asiti diğer bir ifade ile FA (Fatty acid; yağ asiti) üretebilen mükemmel kimyasal fabrikalar olarak görülebilir.

Lipitler, kimyasal yapıda geniş çeşitlilik gösteren bir organik bileşik sınıfıdır. Bu nedenle lipitleri fiziksel özelliklerine göre “suda çözünmeyen ve hücrelerden polar olmayan organik çözücüler (kloroform gibi) ile ekstrakte edilebilen bileşikler” olarak tanımlamak daha kolaydır (79).



Şekil 6. Yağ asitlerinin sınıflandırılması.

Antimikrobiyal ajanlar olarak yağ asitleri:

Yağ asitleri bitkilerin önemli bileşenleridir ve yaygın olarak antimikrobiyal aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Yağ asitlerinin antimikrobiyal ajanlar olarak terapötik kullanım olasılığı kayda değerdir (80). Serbest yağ asitlerinin (FFA'lar) çeşitli ve güçlü biyolojik aktiviteleri arasında bakterileri öldürme veya büyümesini engelleme yeteneği vardır. FFA'ların antibakteriyel özellikleri, birçok organizma tarafından parazitik veya patojenik bakterilere karşı savunmak için kullanılır. Antibakteriyel etki biçimleri hala tam olarak anlaşılmamış olsa da FFA etkisinin ana hedefi hücre zarıdır. Burada, FFA'lar elektron taşıma zincirini ve oksidatif fosforilasyonu bozar. Hücresel enerji üretimine müdahale etmenin yanı sıra, FFA eylemi ayrıca enzim aktivitesinin inhibisyonundan, besin alımının bozulmasından, toksik peroksidasyon ve oto-oksidasyon bozunma ürünlerinin oluşumundan veya bakteri hücrelerinin doğrudan parçalanmasından da kaynaklanabilir. Geniş aktivite spektrumları, spesifik olmayan etki biçimleri ve güvenlikleri, özellikle geleneksel antibiyotik kullanımının istenmediği veya yasaklandığı tıp, tarım ve gıda koruma alanlarındaki çeşitli uygulamalar için antibakteriyel ajanlar olarak onları çekici kılmaktadır (81, 82). Yağ asitlerinin antibakteriyel etkinleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Yağ asitlerinin antibakteriyel etkinleri

Yağ asiti	<i>Candida</i>	<i>S. aureus</i>
Kaproik	NI	NI
Kaprilik	NI	NI
Kaprik	+	+
Laurik	+	+
Miristik	+	+
Miristoleik	+	+
Palmitik	NI	NI
Palmitoleik	+	+
Stearik	NI	NI
Oleik	NI	NI
Elaidik	NI	NI
Linoleik	+	NI
Linolenik	NI	+
Araşidonik	NI	NI

+, Duyarlı.

1.2.5. Fitokimyasal Analiz

1.2.5.1. Gaz kromatografisi-alev iyonizasyon-kütle spektrometresi (GC-FID/MS)

Bitkilerde uçucu ve uçucu olmayan (yağ asitleri gibi) organik bileşiklerin nitel ve nicel tayinleri için kullanılan gaz kromatografisine dayandırılan GC-MS, GC-FID metotlarıdır. GC-FID yüksek hassasiyetteki inorganik ve organik bileşiklerin tespitinde kullanılan alev iyonizasyon dedektörüdür. GC cihazı toplamda 6 ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar, taşıyıcı gazın basınç ayarını yapacak bir regülatör ve valf ünitesi, enjeksiyon sistemi, ayırma kolonu, dedektör, dedektörün içine konduğu ve sabit sıcaklığı sağlayan bölge ve bir kaydediciden oluşmaktadır. Numune buharlaştırılarak gaz fazına dönüştürülür ve taşıyıcı gaz ile kolon içinde sürüklenir. Kolon boyunca kolon içinde ilk olarak adsorbe edilen madde sonradan gelen gaz ile tekrar desorbe edilir. Çıkışlar kaydedicide pik şeklinde grafiğe dökülür.

1.2.5.2. Sıvı kromatografisi-kütle-kütle spektrometresi (LC-MS/MS)

LC (sıvı kromatografi) ayırma ile birleştirilmiş kütle spektrometrisi, bitki biyokimyasında hedefli ve hedefsiz fitokimyasalların analizi için rutin olarak uygulanan bir tekniktir. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS), Kütle Spektrometrisinin (MS) algılama gücü ile HPLC'nin ayırma gücü ve kullanılan Sıvı Kromatografi ve Kütle Spektrometresi kombinasyonudur. HPLC (LC), kromatografik kolondan geçerek karışımların bileşenlerini ayırır. Genel olarak, ayrılmış bileşenler tek başına tanımlanamaz. Kütle Spektrometresi, bilinen ve bilinmeyen bileşiklerin tanımlanması ve yapının aydınlatılması için kullanılır. Kütle Spektrometresi, araştırılan analitle ilgili iyonik türlerin kütle/yük (m/z) oranının ölçülmesine dayanan analitik bir tekniktir. MS, bir analitin moleküler kütlelerini ve temel bileşimini ve ayrıca yapısal derinliği belirlemek için kullanılır.

Tandem Kütle Spektrometresi: Genellikle MS/MS olarak adlandırılan Tandem Kütle Spektrometresi, 2 veya daha fazla kütle analiz cihazının kullanılmasını içerir. Genellikle bir karışımdaki tek tek bileşenleri analiz etmek için kullanılır. Bu teknik, belirli bir analize özgüllük katar. MS/MS'nin temel fikri, iyon kaynağında oluşan belirli bir iyonun m/z'sinin bir seçimidir ve bu iyonu, genellikle inert gazla (örneğin; Argon) çarpışarak parçalanmaya maruz bırakır. Ürün iyonları daha sonra tespit edilir. Bu, belirli bileşiklerin kimliğini doğrulamanın ve bilinmeyen türlerin yapısını belirlemenin güçlü bir yoludur (83).



Şekil 7. Üçlü kuadrupol sistemi

1.2.5.3. Metot validasyonu

Metot validasyonu (geçerli kılınması), kimyasal analizlerin uygulanmasında önemli bir gerekliliktir. Metodun geçerli kılınması temel olarak, analitik gerekliliğin tanımlandığı ve ele alınan metodun ihtiyaç duyulan gereksinimi karşılayacak yeteneğe sahip olduğunun onaylanması sürecidir. Bunun doğasında da metodun performansının değerlendirilmesi ihtiyacı vardır. Geçerli kılma, kavramı ISO/IEC 17025 standardında “özel amaçlı bir kullanım için gerekli şartların yerine getirildiğinin inceleme sonucunda teyit edilmesi ve objektif bir delil elde edilmesi” olarak tanımlanmıştır (84-87).

1.2.5.4. Metot performansı özellikleri

1.2.5.4.1. Seçicilik

Analitik seçicilik, bir metodun karışımlar veya matrisler içindeki belirli analitleri tanımlamak üzere, benzer özellik gösteren diğer bileşenlerin girişimleri olmaksızın kullanılabilme derecesini ifade etmektedir (88).

1.2.5.4.2. Algılama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Ölçümler düşük seviyelerde yapıldığında dikkate alınması gereken üç genel kavram vardır. Birincisi, belirgin bir şekilde sıfırdan farklı bir analit seviyesi gösteren bir sonuç elde edilmesi gerekebilir. Bu seviye “kritik değer”, “karar sınırı” olarak bilinmektedir (89).

İkincisi, metotla belirli bir güvenilirlik seviyesinde tespit edilebilecek en düşük analit derişiminin bilinmesi önemlidir. Bu kavram için “algılama sınırı” (LOD), “en düşük tespit edilebilir değer” terimleri kullanılır (89).

Üçüncüsü, belirli bir uygulama için performansın kabul edilebilir olduğu en düşük derişim seviyesinin belirlenmesi önemlidir. Bu üçüncü kavram genellikle tayin sınırına karşılık gelir (LOQ).

Algılama ve Tayin sınırı tespiti farklı şekillerde yapılabilir.

Gözlem: Analit derişimi, çalışılan örneklerin analizi ile ölçülebilen en düşük miktarın belirlenmesi ile elde edilir. Algılama sınırında analit içeren örnekler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilir ve bu eğrinin y eksenini kestiği nokta algılama sınırı olarak kaydedilir.

Sinyal/gürültü oranı: Kromatografi gibi, zamana bağlı sinyal alınan analizlerde sinyal/gürültü oranının üç katı alınarak algılama sınırı, on katı alınarak tayin sınırı tespit edilir.

Standart sapma: Herbir analit için LOQ ve LOD değerleri kalibrasyon doğrusunun eğimi (m) ve y eksenini kestiği nokta üzerinden aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{m} \qquad LOD = \frac{3 \sigma}{m}$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

1.2.5.4.3. Metot çalışma aralığı ve doğrusalılık

Çalışma aralığı; metodun kabul edilebilir bir belirsizlikle sonuç sağladığı aralıktır. Çalışma aralığının alt sınırı LOQ (Tayin sınırı) dır. Çalışma aralığının en üst sınırı analitik duyarlılıkta belirgin bir bozulmanın gözlemlendiği derişimdir.

1.2.5.4.4. Geri kazanım/ gerçeklik

Numunede tespit edilen konsantrasyonun numunede var olan veya eklenen analit konsantrasyonuna oranıdır; çoğu zaman % olarak verilir. Geri kazanım/Geçerlilik çalışmasında kullanılan 3 yaklaşım şu şekildedir:

- Örnek matriksine uygun SRM/RM kullanımı
- Örneğe analit ekleme (spike etme)
- İki farklı analitik ölçüm metodu kullanımı

Analit eklenerek yapılan gerçeklik/geri kazanım çalışmasında hesaplama aşağıdaki formül kullanılarak da hesaplanabilir.

$$\% \text{ Geri kazanım (verim)} = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100$$

1.2.5.4.5. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Ölçüm kesinliği sonuçların birbirine ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür (90). Genellikle, sonuçların dağılımını tanımlayan istatistiksel parametreler, belirtilen koşullarda uygun bir malzeme ile gerçekleştirilen tekrar ölçümlerinden hesaplanan standart sapma ile ifade edilir. Tekrarlanabilirlik, sonuçlar arasındaki en küçük varyasyon vermesi beklenen, aynı cihazla kısa bir zaman aralığında gerçekleştirdiği ölçümlerin dağılımının ölçüsüdür.

1.2.6. Antioksidan Etki

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddeler antioksidanlar olarak bilinirler (91, 92) Fenolik bileşikler en aktif doğal antioksidanlar olup, antioksidan etkileri serbest radikalleri bağlamaları, metallerle kelat oluşturmaları ve lipoksijenaz enzimini inaktive etmeleri ile gerçekleşmektedir.

Bütülleniş hidroksi toluen (BHT) ve bütülleniş hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına ciddi sınırlamalar ve yasaklar getirilmiştir (93). Bu sebepten doğal antioksidan kaynağı olan meyve ve sebzeler, baharatlar ve bitkisel çaylara olan ilgi artmıştır (94). Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri özellikle flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır (95).

Antioksidanları kaynaklarda üç kategoriye ayrılmıştır: birincil, ikincil ve üçüncül antioksidanlar. Birincil antioksidanlar, oksidan oluşumunun önlenmesinde rol oynar; ikincil antioksidanların ROS temizleyicileri olduğu bilinmektedir ve üçüncül antioksidanlar, diyet veya ardışık antioksidanlar gibi kaynaklar aracılığıyla oksitlenmiş molekülleri onarır. Antioksidanlar ayrıca enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlar olarak da sınıflandırılabilir.

Enzimatik antioksidanlar; ROS'a karşı savunmaya doğrudan/dolaylı olarak katkıda bulunur. Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz vb. enzimatik antioksidanlardır.

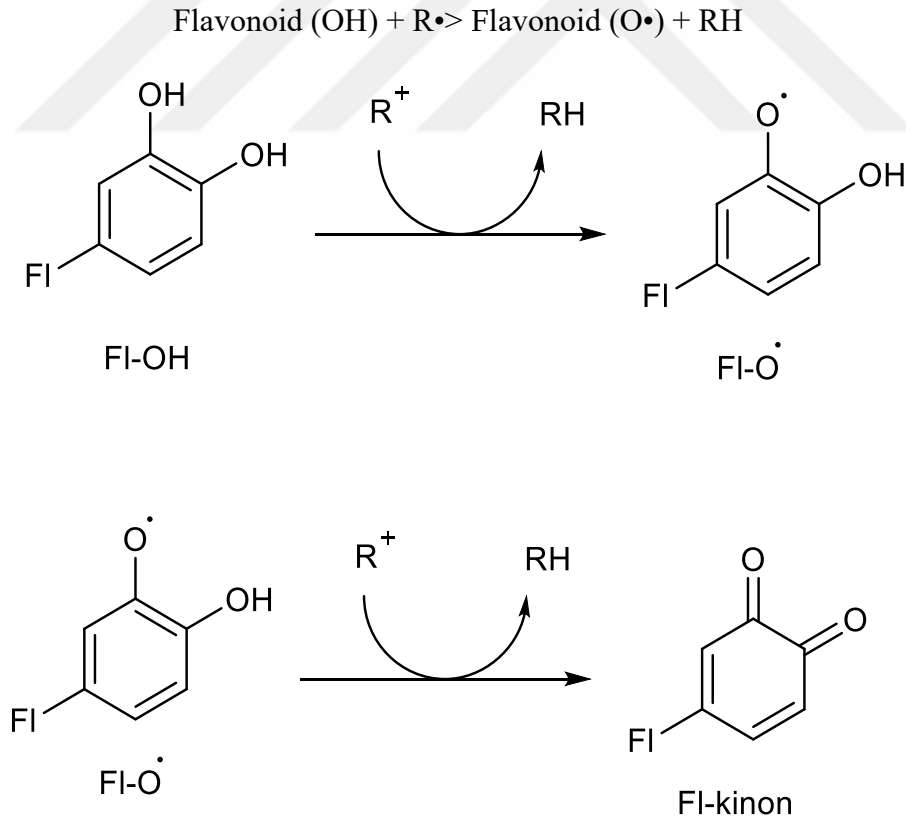
Enzimatik olmayan antioksidanlar; bu antioksidanlar, vitaminler (A, C, E ve K), enzim kofaktörleri (Q10), mineraller (Zn, Se vb.), organosülfür bileşikleri (allium ve allium kükürt), nitrojen bileşikleri (ürik asit) peptitler (glutatyon) ve polifenoller (flavonoidler ve fenolik asit) gibi oldukça az sayıdadır (96).

Serbet radikaller normalde insan vücudunda temel metabolik süreçlerde üretilir, ancak X ışınlarına maruz kalma, ozon, sigara, hava kirleticiler ve endüstriyel kimyasallar gibi dış kaynaklardan da oluşabilirler (97). Sürekli olarak *in vivo* olarak üretilirler. İnsan organizması, bu türleri yok etmek için doğal sistemlere sahiptir, ancak vücudun bunları düzenleme yeteneği aşıldığında, oksidatif stres olarak bilinen bir durum ortaya çıkar. En

önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir. Serbest radikaller önemli makromoleküllere (protein, DNA vs.) saldırarak hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açar (98, 99).

Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Bozulan denge sonucu ortaya çıkan oksidatif stres inflamatuvar hastalık, kardiyovasküler hastalık, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı, katarakt, otizm ve yaşlanma patojenezine önemli ölçüde katkıda bulunur (100).

Biyoaktif fitokimyasalların antioksidan aktivitesi reaktif oksijen türlerini (ROS) ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) temizleyerek ve bazı durumlarda yapıya bağlı bir şekilde geçiş metal iyonlarını şelatlayarak antioksidan ajanlar olarak işlev gördüğü bildirilmektedir (101-103). Reaktif oksijen türlerinin ($R\bullet$) flavonoid tarafından temizlenmesi; serbest radikal $Fl-O\bullet$ ikinci bir radikal ile reaksiyona girerek stabil bir kinon yapısı elde edebilir (104).



Şekil 8. Flavonoitlerin antioksidan mekanizması

1.2.7. Antimikrobiyal Etki

Mikroplar, yararlı ve öldürücü etkileri nedeniyle insan uygarlığı tarafından bilinmektedir. Mikroorganizmaların simbiyotik ilişkisi sınırları aştığında patojenik enfeksiyon ve hastalıklara neden olarak vücuda zarar vererek ölümle sonuçlanabilir.

1.2.7.1. *Staphylococcus aureus*

“Altın staf” olarak da bilinen *Staphylococcus aureus*, Bacilli sınıfı, Bacillales takımı, Staphylococcaceae familyası ve *Staphylococcus* cinsine ait gram pozitif bir koktur. Bakteri hareketsiz, spor yapmayan ve mikroskobik olarak üzüm salkımı gibi görünen bir bakteridir. Kanlı agarda genellikle hemolizli büyük, yuvarlak, altın sarısı koloniler gösterir (105).

Staphylococcus türleri dünya çapında mevcuttur. *S. aureus*, insanların yaklaşık %20 ila %30'unun üst solunum yolu, mide-bağırsak ve ürogenital yollarına yerleşen ve uzun süreli taşıyıcı görevi gören her yerde bulunan bir organizmadır (106). *Staphylococcus aureus*, çok çeşitli klinik enfeksiyonlara neden olan önemli bir insan patojenidir. Bakteriemi ve enfektif endokarditin yanı sıra osteoartiküler, deri ve yumuşak doku, plöropulmoner ve cihazlar ile ilgili enfeksiyonların önde gelen nedenidir (107-111).

1.2.7.2. *Escherichia coli*

E. coli, 1885 yılında Dr. Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarındaki bakteriler üzerine yaptığı çalışmayla keşfedilmesinden bu yana önemli bir insan patojeni olarak kabul edilmiştir. *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae familyasında çubuk şeklinde, Gram negatif bir bakteri olarak sınıflandırılır. Bakteri esas olarak insanlar da dahil olmak üzere sıcak kanlı hayvanların alt bağırsak yollarında yaşar ve genellikle dışkı veya atık su yoluyla çevreye boşaltılır (112). *E. coli* türlerinin çoğu zararsızdır. Ancak Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) gibi bazı suşlar gıda kaynaklı ciddi hastalıklara neden olabilir. İnsanlara öncelikle çiğ veya az pişmiş kıyma ürünleri, çiğ süt ve kontamine çiğ sebze ve filizler gibi kontamine gıdaların tüketimi yoluyla bulaşır (113).

1.2.7.3. *Candida albicans*

Candidaceae familyasından *Candida albicans*, sıcaklığa, pH'a ve besinlere bağılı olarak maya veya psödohipal formlarda oluşabileceğinden kapsüllü polimorfik mantardır. *Candida* türleri, ökaryot fırsatçı patojenler olup hastane enfeksiyonu etkenleri içinde dünyada ön sıralarda yer almaktadır (114). *Candida*'ların 200'den fazla türü bulunur, bunlar arasında dissemine kandidoz ile invazif olmayan deri ve mukoza kandidozlarının en sık nedeni *Candida albicans*'tır. Klinik tablolar, deri ve mukoza kandidozları ile derin yerleşimli enfeksiyonlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Deri ve mukoza enfeksiyonları içerisinde pamukçuk, *Candida* özefajiti, özefagus-dışı gastrointestinal kandidoz, *Candida* vaginiti ve deri kandidozu yer alır. Derin yerleşimli enfeksiyonlar; kronik dissemine kandidoz (hepatosplenik kandidoz), kandidemi ve çeşitli organların kandidozunu içerir. Kandidoza karşı konak savunmasının önemli bir özelliği, bütünlüğü bozulmamış deri bariyeridir. Dış dünyaya karşı korunmayı sağlayan bu bariyer zarar gördüğünde veya tıbbi aletler ya da cerrahi işlemler sonucu kırıldığında, *C. albicans* gibi patojenler için giriş kapısı oluşturur (115).

1.2.7.4. Antibiyotikler ve antibiyotik direnç

Antibiyotikler genellikle bakteri hücrelerini öldüren bakterisidal (Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler, Monobaktamlar, Aminoglikozidler, Florokinolanlar, Vankomisin, Rifampin, Nitroimidazoller) ve bakteri üremesini engelleyen ve bakterileri öldürebilen bakteriyostatik (Tetrasiklinler, Sülfonamidler, Amfenikoller, Makrolidler ve Azolidler, Linkozamidler) olmak üzere iki tiptir. Antibiyotik kullanımına ilişkin ilke, hedef bakterinin duyarlı olduğu, etkili olabilecek ancak yan etkilere neden olmayacak kadar yüksek konsantrasyonda ve enfeksiyonun geçmesini sağlayacak yeterli süre boyunca hastanın antibiyotik kullanmasını sağlamaktır (116-119).

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek için kullanılan ilaçlardır. Antibiyotik direnci, bakterilerin bu ilaçların kullanımına tepki olarak değişmesiyle oluşur. İnsanlar veya hayvanlar değil, bakteriler antibiyotiğe dirençli hale gelmektedir. Antibiyotik direnci kazanan bakteriler insanları ve hayvanları enfekte edebilir ve neden oldukları enfeksiyonların tedavisi, dirençli olmayan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara göre daha zor olmaktadır.

2017 yılında, Dünya Sağlık Örgütü, insan sağlığına en büyük tehdidi oluşturan 12 antibiyotiğe dirençli "öncelikli patojen" ailesinin bir listesini yayınlamıştır. Dünya sağlık örgütü listesi, yeni antibiyotik ihtiyacının aciliyetine göre kritik, yüksek ve orta öncelikli olmak üzere üç kategoriye ayrılmıştır. *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, vankomisin orta düzey dirençli olarak yüksek risk oluşturmaktadır.

1.2.7.5. Antimikotikler ve antifungal direnç

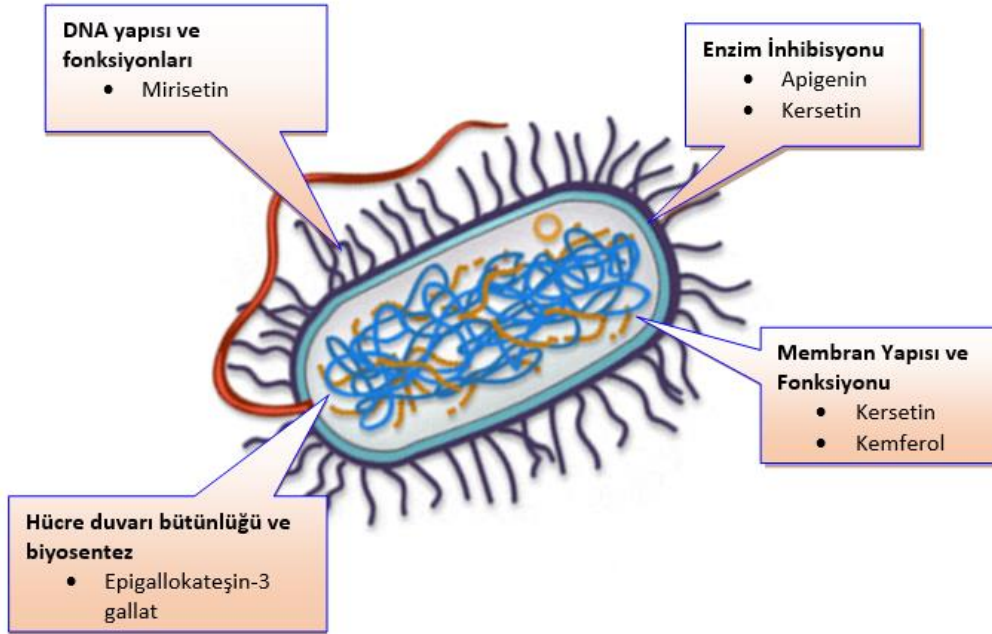
Mantar hücreleri ökaryotiktir ve DNA, sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı içeren çekirdeklere sahip olmaları bakımından memeli hücrelerine benzerler. Bununla birlikte, mantar hücre zarı, esas olarak kolesterol içeren memeli hücresinden farklı olan ergosterolden oluşur. Ergosterol: mantar ve protozoanın hücre zarlarında bulunan ve kolesterolün hayvan hücrelerinde hizmet ettiği işlevlerin çoğuna hizmet eden bir steroldür. Birçok mantar ve protozoa ergosterol olmadan hayatta kalamayacağından, onu sentezleyen enzimler ilaç keşfi için önemli hedefler haline gelmiştir. Ergosterol oluşumu, antifungal ilaçların araştırılmasında ilgi duyulan ana ilaç hedefi olarak kaydedilmiştir (120). Mantar enfeksiyonlarını iyileştirmek için, genellikle dört kategoride mantar önleyici ilaç sunulur; Polienler (amfoterisin B, nistatin, kandisidin, pimarisin, metil partrisin, trikomisin), Azoller (flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, mikonazol, klotrimazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol), Ekinokandinler ve Flusitozin (5-florositozin). Bununla birlikte, bu mantar önleyici maddeler sadece kısmen etkilidir ve bunların çoğu dokuları üzerinde çeşitli komplikasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (121).

Edinilmiş direnç mekanizmaları; Antifungal ajanların sık ve profilaktik kullanımı sonucu, tıbbi açıdan önemli mantarlarda güçlü bir direnç gelişmesine yol açmıştır. İlaç hedef değişikliği veya aşırı ekspresyonu, çoklu ilaç taşıyıcılarının artan regülasyonu ve stres tepkilerinin aktivasyonu dahil olmak üzere, antifungal ilaç direncinin çok sayıda adaptif mekanizması tanımlanmıştır. Polienlere karşı direnç son derece nadir olmasına rağmen azollere ve ekinokandinlere karşı direnç kolaylıkla belgelenmiştir (122).

1.2.7.6. Biyoaktif fitokimyasalların antibakteriyel etkinliği

Antibiyotik direncinin ve özellikle çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması, dünya çapında insan sağlığı için büyük tehdit oluşturmaktadır. Geleneksel antibiyotiklere alternatif olarak yeni antibakteriyel ajanlar aramak için devam eden çalışmaların ortasında, araştırmacılar bitki kaynağından elde edilen çeşitli antibakteriyel bileşiklerin gücünü yoğun bir şekilde araştırmışlardır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar bitkisel kaynaklı antibakteriyel bileşiklerin, antibiyotiğe dirençli suşlar da dahil olmak üzere çeşitli bakteriyel patojenlerle mücadelede etkinliklerini göstermiştir. Bu doğal ürünler, çevreyi algılama sistemi ve biyofilm oluşumuna müdahale etmenin yanı sıra, bakteri membran bütünlüğünün bozulması, hücre içi metabolizmanın inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla inhibitör etkilerini göstermektedir. (116, 123).

Flavonoitlerin antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı potansiyel etki mekanizmaları şunları kapsar: sitoplazmik membran yapısının bozulması, kimyasal modifiye edici enzimlerin inhibisyonu, besin ve metabolit taşınmasının engellenmesi, nükleik asit sentezinin inhibisyonu, sinerjik/güçlendirici etkidir.



Şekil 9. Flavonoitlerin etki mekanizmalarına genel bir bakış

Çoklu ilaca dirençli bakterilerin ve mantarların ortaya çıkması, mevcut antibiyotiklerin ve antimikotikler etkinliğini giderek daha fazla sınırlandırarak tedavi başarısızlığına yol açmıştır. Kazanılan direnç nedeniyle, solunum yolu enfeksiyonları, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve idrar yolu enfeksiyonları dahil olmak üzere giderek daha yaygın hastalıklar tedavi edilemez hale gelmiştir. Örneğin kolistin, karbapenemlere dirençli Enterobacteriaceae'nin neden olduğu hayatı tehdit eden enfeksiyonlar için son rapor edilen tedavisidir. Öte yandan, *Escherichia coli*'nin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan florokinolon antibiyotiklere direnci uzun süredir bilinmektedir.

Bitkisel ürünler geleneksel olarak halk hekimliğinde çeşitli patojenik hastalıkları tedavi etmek için terapötik bir ajan olarak kullanılmıştır. Birçok bilim adamı, bitki ürünlerini, çoklu ilaca dirençli bakterilere ve mantarlara karşı yeni ve yenilikçi antibakteriyel ve antimikotik ilaçların önemli alternatif kaynakları olarak görmektedir. Bugüne kadar bitkiden 30.000'den fazla antimikrobiyal ve antifungal etki gösteren bileşik tanımlanmıştır. Ayrıca, bitkisel doğal ürünler-antibiyotik bitkisel doğal ürün- fungal aktivite gösteren kombinasyonlar, antibiyotik ve antifungal direnç sorunuyla mücadelede umut verici bir strateji olarak giderek daha fazla kabul görmektedir (116, 123, 124).

Tablo 5. Biyoaktif fitokimyasalların bakteri/fungus etkinlikleri

Biyoaktif Fitokimyasal	Bakteri / Fungus	MİK (µg/mL)	Kaynak
Apigenin	<i>S. aureus</i>	500-1000	(125)
	<i>E. coli</i>	500	(126)
	<i>C. albicans</i>	5	
Luteolin	<i>S. aureus</i>	15,625	(127)
	<i>E. coli</i>	500	(125)
	<i>C. albicans</i>	> 83	(126)
Kersetin	<i>S. aureus</i>	20	(128)
	<i>E. coli</i>	33	(129)
	<i>C. albicans</i>	128	(126)
Umbelliferon	<i>S. aureus</i>	500	(130)
	<i>E. coli</i>	1000	(131)
	<i>C. albicans</i>	50	
Vankomisin	<i>S. aureus</i>	1000	(132)
Ampisilin	<i>E. coli</i>	4	(132)
Flukanozol	<i>C. albicans</i>	3,906	(132)

1.2.8. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörolojik bozukluklar (NDD'ler), merkezi ve periferik sinir sistemlerini etkileyen hastalıklardır. NDD'ler, sinir sistemi hasarı, iskemi, oksidatif ve ER (endoplazmik retikulum) hücresel stres, nöral dokuda inflamasyon anormal protein birikimi, otoimmün aracılı nöronal kayıp ve viral veya prion enfeksiyonları gibi çeşitli faktörler nedeniyle ortaya çıkabilmektedir. Etkilenen bölgeye bağlı olarak, nöronal kayıp, gliozis (merkezi sinir sistemi' nin beyin veya omurilik yaralanmasına verdiği tepki) veya demiyelinizasyon (sinir hücrelerinin etrafını çevreleyen miyelin kılıflarının hasar görmesi) motor kusurlara, davranış bozukluklarına ve bilişsel gerilemeye neden olabilmektedir (133).

Beynin NDD'leri şu şekilde karakterize edilebilir: hafıza kaybı veya kişilik değişiklikleri—Alzheimer hastalığı (AH), bozulmuş hareket kapasitesi ve dikkat eksikliği—Parkinson hastalığı (PD), zayıflık ve bilişsel gerileme—Amyotrofik lateral skleroz (ALS). Periferik sinir bozuklukları, diyabetik nöropatiyi, diğer metabolik nöropatileri, endokrin nöropatileri ve miyelin kaybı bozukluklarını, duyu kusurları ve otonomik işlev bozukluğunu içerir—Multipl skleroz (MS) (133, 134).

NDD'ler için şu anda mevcut olan tedaviler, öncelikle geçici semptomatik rahatlamaya odaklanmaktadır. Bu nedenle, NDD'lerin ilerlemesini önlemek ve geciktirmek için yeni tedavilerin ve nöroprotektif ajanların keşfine yüksek bir talep vardır. Geleneksel tıpta kullanılan bazı farmakolojik bileşiklerle ilişkili istenmeyen yan etkiler, daha yüksek etkinlik ve biyoyararlanım ve daha az yan etki ile alternatif tedaviler yaratmanın uygunluğunu desteklemektedir. Bu bağlamda bitkiler, NDD'ler için terapötik değeri olan yeni bileşiklerin gerçek bir kaynağı olabilmektedir (134, 135).

Bir dizi ikincil metabolit, amyloid beta plakları'nın birikmesini önleme ve AD'nin deneysel modellerinde amyloid beta yükünü azaltma yeteneği ile önemlidir: bunlardan başlıca flavonoidler apigenin (136), baicalein (137), hesperidin, izokersetin, morin (138) ve kersetin (139) dir.

Beyin, yüksek metabolik aktivitesi, yüksek oksijen gereksinimi ve yüksek seviyelerde redoks-aktif metaller ve oksitlenebilir lipidlerin varlığı nedeniyle oksidatif strese (OS) karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir (140). OS, birçok NDD'nin patogenezinde ve ilerlemesinde rol oynayan önemli bir mekanizmadır (141). Örneğin, serebral iskemi ve

reperfüzyon sırasında mitokondriyal hasar ve bozulmuş enerji metabolizması, beyni akut bir OS hasarına maruz bırakarak nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretir (142). Amiloid beta ve hücre hasarı, AD hastalarının beyinlerinde kronik ROS üretimini indükler. PD'de dopamin metabolizması, mitokondriyal disfonksiyon (143) ve anormal alfa-sinüklein birikiminin nörotoksik etkileri, tümü ROS oluşumunu teşvik etmektedir. (144). Ayrıca kanıtlar, PD hastalarında endojen antioksidan sistemlerin aktivitesinin azaldığını göstermektedir (145). Bu nedenle, antioksidasyon, fitokimyasalların nörolojik sağlık için hayati bir savunma mekanizması olan nöroprotektif etkilerini göstermelerinin önemli bir yoludur. Antioksidan aktivite apigenin, berberin, crosin, kurkumin, ginsenosid, kersetin, resveratrol ve rutin bileşikleriyle geniş bir fitokimyasallar yelpazesinde daha önce rapor edilen en etkili olanlardan bazılarıdır (146, 147).

1.2.8.1. Alzheimer hastalığı (AD)

Alzheimer hastalığı (AD), β -amiloid ($A\beta$) peptit agregasyonu, tau protein hiperfosforilasyonu ve güçlendirilmiş oksidatif stres ile karakterize edilen bilişsel işlevlerin, hafızanın ve öğrenmenin ilerleyici zayıflamasıdır. $A\beta$ peptitleri öncelikle etkilenen beyin bölgelerindeki senil (reaktif glia hücreleri ve peptidlerden meydana gelen komplike lezyonlar) plakları oluşturur ve bu alanlar daha az sayıda sinaps sergiler. Bu plaklar genellikle, beta amiloid tarafından nörit ve sinaps hasarını gösteren çizik nöronlar içerir. Beyindeki hiperfosforile tau ve $A\beta$ birikiminin, nöronal hasarı aktive ederek AD'nin nörodejeneratif sürecinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Ayrıca, oksidatif stres, tau'nun hiperfosforilasyonu ve beta amiloid birikimi ile AD'nin bir başka özelliğidir. AD'nin patogeneğinde oksidatif stres meydana gelebilecek en erken değişiklik olabilir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak hiperkolesterolemiden (kanda yüksek kolesterol) kaynaklanabilir. Endoplazmik retikulum (ER) stresi ayrıca oksidatif stres tarafından tetiklenebilir ve sürekli ER stresi ek oksidatif hasara yol açabilir (148). Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk adımlarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynama durumuna sahip olduğu bildirilmiştir (149). Günümüzde, küresel bunama prevalansı 36 milyon kadar ve hastaların yaklaşık üçte ikisi gelişmiş ülkelerden olmak üzere 2030'da 66 milyona ve 2050'de 115 milyona ulaşması beklenmektedir (134).

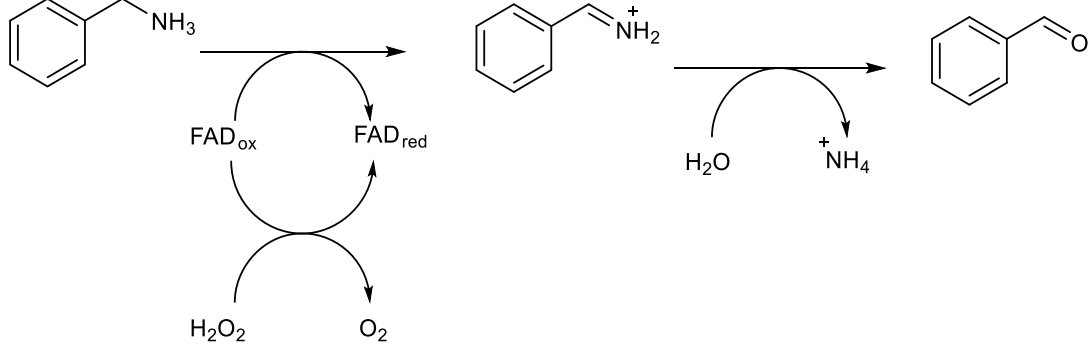
1.2.8.2. Parkinson hastalığı (PD)

Parkinson hastalığı (PD), substantia nigra'daki (kara madde) (SN) dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize edilmiştir (150). Hastalığın ilk belirtileri arasında harekette yavaşlama, titreme, katılık, yürüme güçlüğü ve davranış sorunları yer almıştır (151). 60 yaşın üzerindeki %1-2'lik kişilerde görülen geç başlangıçlı bir hastalıktır (152). Beyindeki ayırt edici nöropatolojik değişiklikler, Lewy cisimciklerinin anormal oluşumunu içerir. Lewy cisimcikleri ile dejenere olmuş dopaminerjik nigrostriatal nöronlar, PD'deki motor hasarın başlıca nöropatolojik korelasyonudur, ancak noradrenerjik, adrenerjik, glutamaterjik, kolinerjik ve GABAerjik sinir hücreleri de hücre iskeletinde aynı hasarı göstermiştir (153). SN'nin dopaminerjik nöronları ilerleyici ve seçici olarak dejenere olmuştur (154). Nöroinflamasyon ve özellikle mikrogliyal aktivasyon, PD patogenezi ile ilişkilidir. Mikrogliyal aktivasyon, interleukin-1 β (IL-1 β), nitrik oksit (NO), ROS ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) dahil olmak üzere çok çeşitli sitotoksik faktörlerin oluşumunu tetikleyerek nörodejenerasyona neden olmuştur (155).

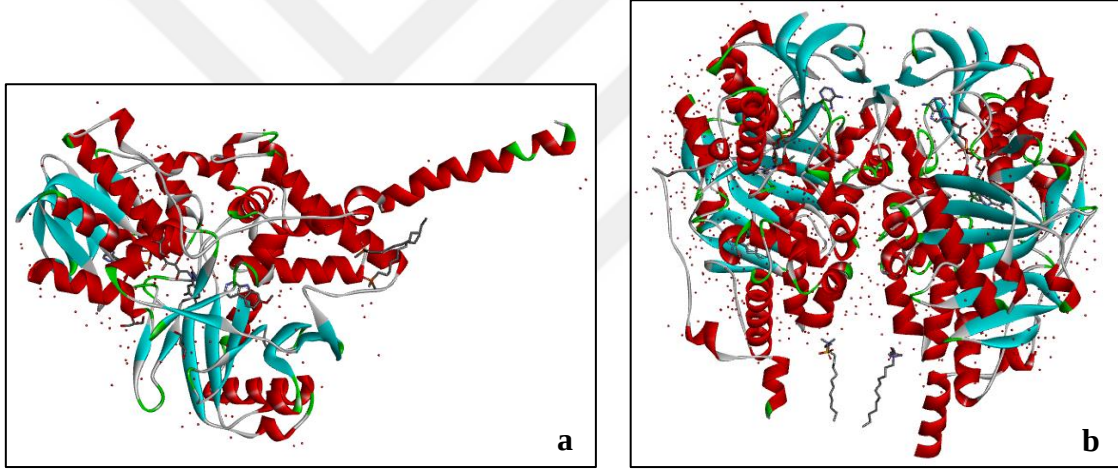
1.2.8.3. Monoamin oksidaz (MAO)

Monoamin oksidazlar (MAO; EC 1.4.3.4), amin nörotransmitterlerinin oksidatif deaminasyonunda yer alan mitokondriyal enzimlerdir (156). Monoamin oksidaz (MAO), enzime bağlı bir flavin-adenozin dinükleotit (FAD) içerir ve esas olarak memeli beyninin ve periferik dokuların dış mitokondriyal membranında lokalizedir. MAO'nun birincil rolü, nörotransmitter seviyesinin düzenlenmesi ve diyet aminlerinin bozulması ile bağlantılıdır (157). MAO'nun inhibisyonu, merkezi sinir sistemindeki nörotransmitterlerin seviyesini artırır. Dopamin ve serotonin gibi aminlerin oksidasyonuna ek olarak, bu enzimler aynı zamanda fenetilamin ve tiramin gibi sindirilmiş aminleri oksitleyerek yanlış nörotransmitterler olarak işlev görmelerini önleme işlevi görür (157). MAO A ve MAO B olmak üzere %70 oranında birbirine benzeyen farklı genlerden sentezlenen iki izoenzim bulunmaktadır (158). Parkinson hastalığı esnasında metabolizmada var olan dopamin miktarında azalma olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Parkinson hastalığının tedavisi için dopamin parçalanmasından sorumlu MAO B enzimini inhibe eden bileşikler ilaç olarak kullanılmaktadır. Depresyon esnasında ise beyindeki serotonin miktarının azaldığı bulunmuştur. Bu azalmanın engellenmesi için metabolizmadaki görevi serotoninin

parçalanması olan MAO A enziminin inhibe edilmesi hedeflenmektedir. MAO A ve MAO B'nin inhibisyonu, bu aminlerin yıkımını engelleyerek antidepresan (159-161) ve anti-Parkinson etkisi sağladığı bildirilmektedir (162, 163).



Şekil 10. MAO reaksiyon kataliz mekanizması



Şekil 11. (a) MAO-A Enzimi (PDB kodu: 2Z5X) ve (b) MAO-B Enzimi (PDB kodu: 2XFN) Kristal Yapıları

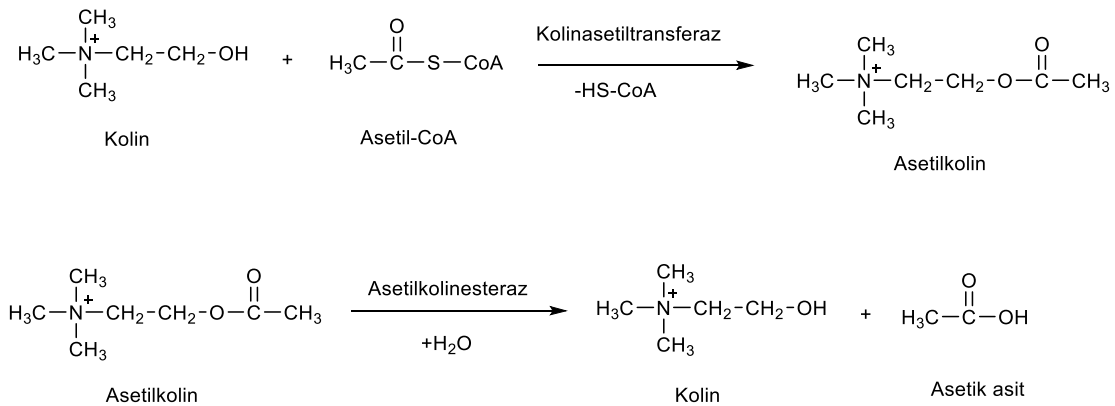
MAO-A tercihen serotonin, epinefrin ve norepinefrini deamine eder ve seçici olarak klorgilin ile inhibe edilir. MAO-B ise tercihen benzilamin ve β -fenetilamini (PEA) metabolize eder ve seçici olarak selegilin ve rasagilin tarafından inhibe edilir (164). İki izoformun farklı hücre ve dokularda ekspresyonu nedeniyle MAO-A inhibitörlerinde daha büyük bir tiramin etkisi görülür. Seçici olmayan MAO inhibisyonun tiramin kuvvetlenmesine neden olduğu düşünüldüğünden MAO inhibitörlerinde seçicilik aranması gerekli hale gelmiştir (164, 165).

Antidepresan ve antianksiyetik etkiye sahip klorgilin geliştirilen ilk seçici ve geri dönüşümsüz MAO-A inhibitörüdür. Rasajilin ve selejilin ise anti-Parkinson etkiye sahip seçici ve geri dönüşümsüz MAO-B inhibitörleridir. MAO enzimini seçici olarak inhibe etme yeteneğine sahip olmalarına rağmen bu ilaçların serotonin sendromu, baş dönmesi, bulanık görme, sersemlik gibi santral sinir sistemi yan etkilerinin olması, enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanarak geri dönüşümsüz inhibisyon yapması, yüksek dozlarda ve tekrar eden uygulamalarda selektivite kayıpları gibi nedenler tedavideki kullanımlarında önemli kısıtlamalara neden olmuştur (166) (167).

1.2.8.4. Kolinesterazlar (ChE)

Vücutta asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8) olmak üzere iki tane kolinesteraz enzimi bulunmaktadır. Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, bütirilkolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır (168).

Beyinde nöronlar arasında veya bir nöron ile başka bir (tür) hücre arasında iletişimi sağlayan kimyasallara “nörotransmitter” denir. Alzheimer beyindeki nörotransmitterlerin azalması ile karakterize edilmiş bir hastalıktır. Bu hastalıkta en fazla azalma gösteren nörotransmitter asetilkolin olduğu tespit edilmiştir (169). Bir alkaloid olan asetilkolin (ACh), tanımlanan ilk ve en çok bilinen nörotransmitterdir. Dokulardaki bilgiyi veya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolinesteraz isimli enzim tarafından parçalanır (170).



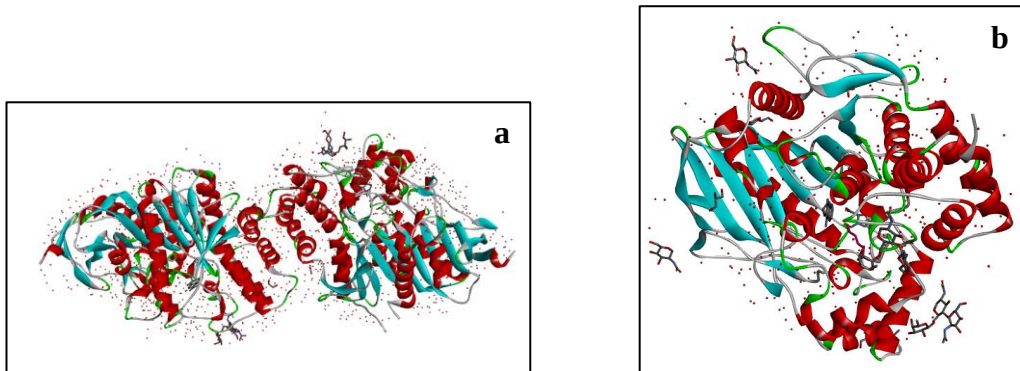
Şekil 12. Asetilkolinin sentez ve hidroliz reaksiyonu (171).

Asetilkolinesteraz (AChE)'in temel biyolojik rolü; Şekil 12'de görüldüğü gibi nörotransmitter asetilkolin (ACh)'in hızlı hidrolizi ile kolinerjik sinapslarda uyarıların iletimini sonlandırmaktır (172, 173).

ACh'in, asetik asit ve koline hidrolizinden sorumlu iki tip kolinesteraz enzimi vardır. Bunlar asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimleridir (174). Sağlıklı bir beyinde AChE, ACh hidrolizinin yaklaşık %80'inden, BChE ise %20'sinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (175).

Bazal ön beyin kolinerjik hücrelerinin kaybı sonucunda ACh seviyesinde meydana gelen belirgin azalma, AH ile ilişkili bilişsel bozukluklarda önemli rol oynamaktadır (176). Bu nedenle AH'nın semptomatik tedavisinde en umut verici girişim, ACh'in hidrolizinden başlıca sorumlu enzim olan asetilkolinesterazın (AChE) inhibisyonuyla ACh'in beyindeki sinaptik düzeyini arttırmak olduğu bildirilmiştir (177).

Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri, erken evre demansları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir ilaç sınıfıdır (178). AChE inhibitörleri ile ilgili çalışmaların çoğu, galantamin gibi asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesine sahip alkaloidler üzerine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar 35'ten fazla alkaloidin AChE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu aktiviteye sahip olduğu belirlenen diğer bileşenler ise terpenoidler, glikozidler ve kumarinler olarak bildirilmiştir (179).



Şekil 13. (a) AChE Enzimi (PDB kodu: 4M0E) ve (b) BChE Enzimi (PDB kodu: 4BDS) Kristal Yapıları

1.2.8.5. Biyoaktif fitokimyasalların nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkileri

Bitki özleri ve bunların aktif fito-bileşenleri, çeşitli nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların tedavisinde uzun süredir kullanıldığı bilinmektedir. Tıbbi bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerin yapısındaki çeşitli farklılıklar, onları çeşitli terapötik hedeflere bitişik yeni bileşikleri için alternatif bir kaynak haline getirmiştir. Bu fito-bileşenler, farklı nörotransmitterler için reseptör işlevselliğinin değiştirilmesi yoluyla kimyasal dengeyi koruyarak daha yüksek beyin fonksiyonunun düzenlenmesinde kilit bir rol oynar (180).

Tablo 6. MAO ve ChE inhibitör aktivitesine sahip biyoaktif fitokimyasallar

Fitokimyasal	MAO-A IC₅₀ (μM)	MAO-B IC₅₀ (μM)	SI MAO-A/B	Kaynak
Apigenin	1,7	12,8	0,1328	(181)
Luteolin	4,9	59,7	0,0820	(181)
Kersetin	2,8	90	0,0311	(181)
Umbelliferon	18,08	12,98	1,3929	(182)
Moklobemid*	0,033	4,19	0,0078	(183)
Selegilin*	8,22	0,12	68,5	(183)

Fitokimyasal	AChE IC₅₀ (μM)	BChE IC₅₀ (μM)	Kaynak
Apigenin	81,5	-	(184)
Luteolin	17,3	-	(184)
Kersetin	15,7	-	(184)
Umbelliferon	145,19	105,28	(185)
Galantamin*	1,1	73,6	(186)
Rivastigmin*	87,9	11,6	(186)

*; Referans inhibitör

1.2.9. Antienflamatuar Etki

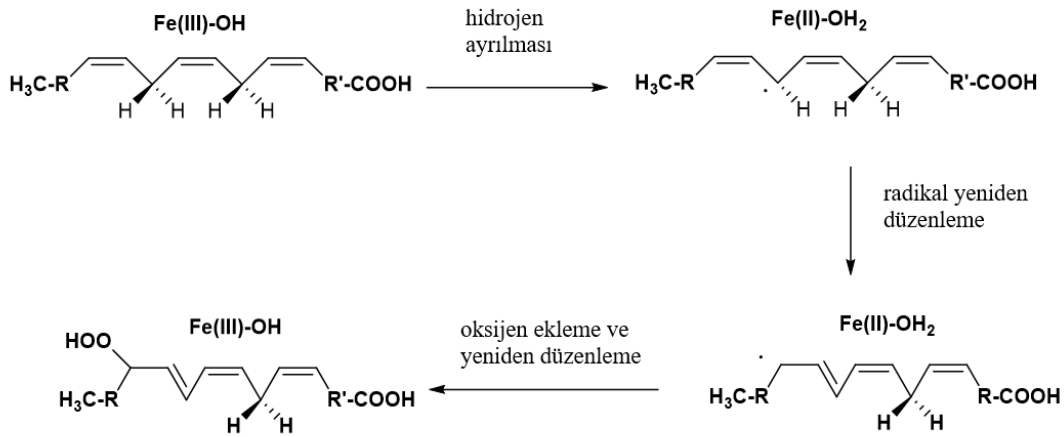
Enflamasyon, canlı vaskülarize dokuların endojen ve eksojen uyaranlara lokal bir tepkisi (reaksiyonu) olarak tanımlanmaktadır. Enflamasyon, temel olarak, neden olan ajanı lokalize etmek ve ortadan kaldırmak ve doku hasarını sınırlamak içindir. Dolayısıyla enflamasyon, yaralanmaya karşı fizyolojik (koruyucu) bir yanıttır. Enflamasyonun kendisi bir hastalık olarak değil ya bir şiddetle ya da bazı hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkan sıhhatli bir operasyon olarak düşünölmelidir. Fiziksel (mekanik yaralanmalar, sıcaklık ve basınçta değışiklik), kimyasal (artan ilaç ve toksinler), biyolojik (bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitler), immünolojik bozukluklar (aşırı duyarlılık reaksiyonları, otoimmünite, immün yetmezlik durumları vb.), genetik/metabolik bozukluklar (gut, diabetes mellitus vb.) enflamasyonun nedenleri olarak bildirilmektedir. Enflamasyonun altında yatan neden devam ettiğinde, bağışıklık sistemi kronik enflamasyon geliştirir ve sonuçta çoğu hastalığın destekleyicisi ve temel nedeni olduğu bir kısır döngü yaratır. Bu hastalıklar arasında kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalık yer alır.

Lipoksijenaz (LOX), birçok hayati hastalıkta rol oynayan bir dizi aktif metabolik ürün üretmek için yağ asidini katalize edebilir. Özellikle LOX, araşidonik asit (AA) metabolizmasının lökotriene (LT) dönüşme sürecinde, iltihaplanma oluşumuna aracılık eden bir tür hız sınırlayıcı enzimdir. LOX'un inhibisyonu ile LT üretiminin bloke edilmesi, enflamasyonun olumsuz etkilerini iyileştirmenin yanı sıra, indüklenen ve toplanan pro-inflamatuar hücre popölasyonlarının azaltılmasıyla sonuçlanabilir böylece anti-inflamatuar etki üretebilir (187). Bitki özleri, zengin bir LOX inhibitörleri kaynağıdır ve belirli bir sınıf olan fenolikler, flavonoidler nispeten toksik değildir ve LOX'a karşı güçlüdür.

1.2.9.1. Lipooksijenaz (LOX)

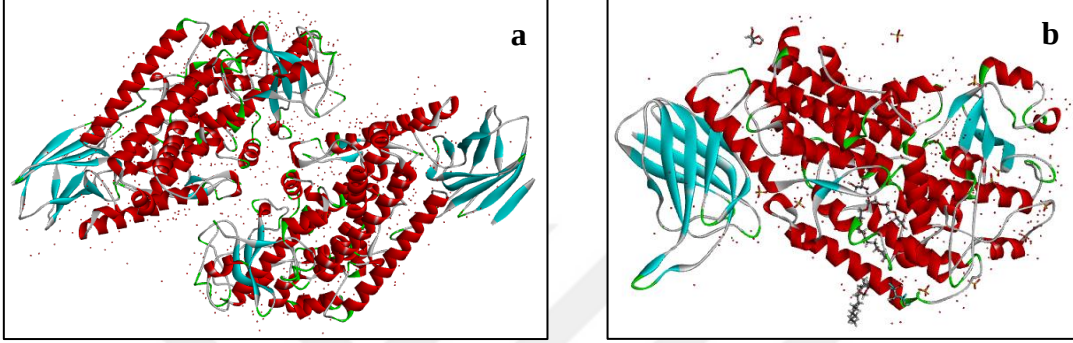
Lipoksijenazlar (LO'lar), hem-olmayan katalitik demir içeren enzimlerdir. LO'lar, 1,4-cis, cis-pentadien içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin (örn., linoleik asit (LA) ve araşidonik asit (AA)) dioksijenasyonunu katalize ederek hidroperoksi-yag asitleri oluşturur (188). Araşidonik asit, hücre membranı fosfolipitlerinin hidrolizi sonucu serbest hale geçen doymamış yağ asitidir. Araşidonik asit üç önemli yolakla metabolize

olur. Bunlar; siklooksijenaz (COX), lipooksijenaz (LOX) ve sitokrom P450 (CYP450) epoksijenaz yolaklarıdır ve Şekil 14’de memelilerde LOX yolağı, kritik biyolojik sinyal molekülleri olan lökotrienler, hidroksieikosatetraenoik asitler (HPETEs) ve lipoksinlerin biyosentezindeki ilk adımdır (188, 189). LOX'ların temel isimlendirmesi bir substrattaki oksijenin yerleştirilmesinin konumuna dayanır. Örneğin, 5-LOX, stereo konfigürasyonlu alifatik zincirin AA ile karbon 5'ine moleküler oksijen ekler. Üç ana insan LO'su (hLO'su), 5-, 12- ve 15-hLO'su vardır; bunların ana farkı, dioksijen katılımının araşidonik asit (AA) (C-5, C-12 veya C-15) içindeki konumudur (190, 191). LOX enzimi, substrat yağ asidi ve moleküler oksijen arasında bir serbest radikal reaksiyonu başlatır, kontrol eder ve sonlandırır. AA'nın C-5, -12 ve -15 konumlarındaki 5-, 12- ve 15-LOX O₂ eklenmesiyle, sırasıyla ve 5-, 12- ve 15-HPETE (hidroperoksi-eikosatetraenoik asit) üretilir (192). LOX enzim ailesi; epitelyal, endotelyal ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipinde eksprese edilir ve cilt bariyeri oluşumu, hücre farklılaşması ve bağışıklık dahil romatoid artrit, iltihaplı bağırsak hastalığı, ülseratif kolit, astım, sedef hastalığı ve alerjik rinit gibi birçok enflamatuvar hastalık ve alerjik rahatsızlığın önemli araçları olarak kabul edilmiştir (193-195). Bu tür hastalıklara dahil olmaları nedeniyle, spesifik LO izozimlerine karşı gelecekteki rasyonel ilaç tasarımına yardımcı olmak için küçük moleküllerin inhibisyon modunun daha iyi anlaşılması gerekli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 14. Lipoksijenaz reaksiyonu

İnsanda işlevsel lipoksijenazlar arasından en önemlisi araşidonat-5-lipoksijenazdır. 5-LOX, araşidonik asidin C5'ine saldırarak 5-hidroperoksiyeikosatetraenoik asit'e (HPETE) dönüştür ve lökotrienlerin biyosentezinden sorumludur. İnsanda 5-LOX'a en yakın homolog 15-LOXB'dir (196). 15-LOX-B enzimi, araşidonik asiti 15-hidroperoksiyeikosatetraenoik aside (15-HPETE) dönüştürür ve 15-HETE ya da lipoksinlerin biyosentezinden sorumludur (197, 198).



Şekil 15. (a) 5-LOX (PDB kodu: 3O8Y), (b) 15-LOX-B (PDB kodu: 4NRE)

Terapötik uygulamalar için 15-LOX inhibitörlerinin geliştirilmesine büyük ilgi vardır. Çok sayıda 15-LOX inhibitörü hazırlanmış ve biyolojik olarak çalışılmış olmasına rağmen, yan etkileri genellikle tüketiminin yasaklanmasına veya sınırlandırılmasına neden olmaktadır. 15-LOX inhibitörleri, inhibitör etki tarzlarına göre gruplandırılabilir. Bunlar: (i) aktif bölge demirini azaltan veya radikal ara maddeleri yakalayan redoks inhibitörleri; (ii) demir şelatlama inhibitörleri; (iii) 15-LOX aktif bölgelerine bağlanmak için yağlı asit substratları ile rekabet eden redoks olmayan inhibitörler. Çeşitli LOX aktiviteye sahip bazı molekül grupları: Heterosiklik bileşikler; purinler, indolizinler, indoller, piranlar, imidazol, pirazoller, oksadiazoller, triazoller, izotiazolonlar. Fenolik bileşikler; katekoller, flavonoidler, alil benzenler ve aliloksi benzenler; eugenol, metil isoeugenol, silybin, kumarinlerdir. Diğerleri; kannabidiol, NDGA (Nordihidroguaretik asit) inhibitör etkisi olan moleküller olarak literatürde belirtilmiştir (199).

1.2.10. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

Hesaplamalı kimya, teorik kimyacılar tarafından geliştirilmiş matematiksel yöntemleri uygulayan ve elde edilen sonuçları yorumlayan, böylece deneysel kimya ile teorik kimya arasında köprü kuran bir daldır. Hesaplamalı kimya ile sadece kararlı molekülleri değil, aynı zamanda kısa-ömürlü, kararsız ara ürünler ve geçiş hallerini de çalışmak mümkün olur. Bu şekilde, gözlem yolu ile elde edilmesi mümkün olmayan moleküller ve tepkimeler hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu hesaplamalar ile elde edilen nitel veya nicel sonuçlar, kimyacıların çok faydalı öngörülerde bulunmasını sağlar (200). Yapı temelli (structure-based) CADD, yeni ilaç benzeri moleküller için etkileşim enerjilerini makro moleküler hedefin protein yapısının bilgisiyle hesaplar, ligand temelli (ligand-based) CADD, benzer ve etken olmayan moleküllerin bilgisini kimyasal benzerlik tahminine dayalı olarak kantitatif yapı-aktivite ilişkisinin oluşturulmasıyla hesaplar. Yapı temelli yöntemlerin en bilineni olan ligand yerleştirme (Moleküler Doking) yönteminde hem hedef hem de ligand yapılarının bilinmesi zorunlu olduğundan yüksek verimli tarama gerçekleştirilir.

1.2.10.1 Moleküler doking

Doking, bir molekülün hedef makromoleküle (reseptör) nonkovalent bağlanarak kararlı bir kompleks oluşturmasını, buna bağlı moleküllerin uzayda tercih ettikleri pozisyonu, aktif bölgede bağlanmaya etki eden amino asitleri ve bağlanma ilgilerini (afinitelerini) tahmin ederek, ilgili terapötik yanıtta altta yatan etki mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunan reseptör-ligand bağlanma doğasını incelemek için kullanılan bir moleküler modelleme yöntemidir (201-203). Moleküler doking ligand türüne göre; protein-ligand, protein-nükleik asit, protein-protein olmak üzere üç temel sınıfa ayrılır: Protein-ligand doking, ligand-protein komplekslerinin serbest bağlanma enerjisine klasik moleküler mekanik fonksiyonlarını kullanarak elektrostatik ve van der Waals etkileşimi ile yaklaşan, proteinleri potansiyel olarak inhibe edebilecek molekülleri öngörmede basit ve iyi bir kaynaktır. Buna karşın proteinlerin esnek olmaları ve konformasyonel alanlarının oldukça geniş olması sebebiyle protein-protein doking daha karmaşıktır (203).

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

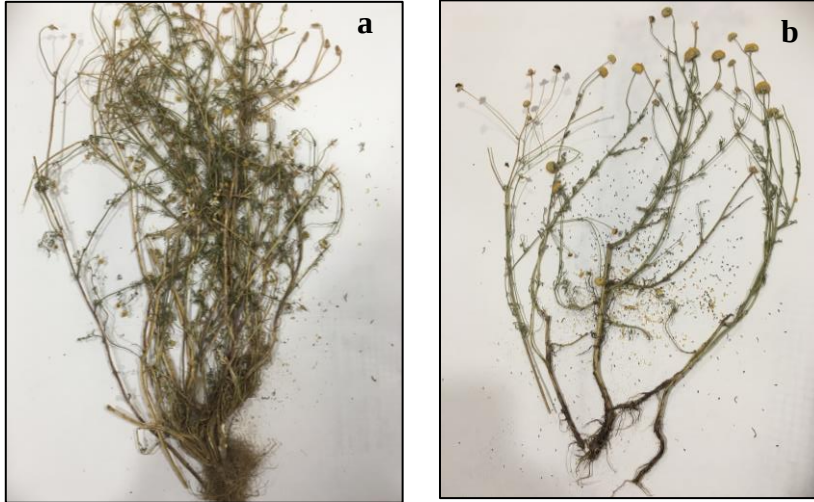
2.1. Bitkisel Materyal

Tez kapsamında çalışılan papatya bitki türleri ve bu türlere ait bilgiler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Çalışılan papatya bitki türleri.

Herbaryum No	Papatya türleri	Toplanma Yeri	Yükseklik (m)	Toplanma Tarihi
ISTE117001	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (Tıbbi papatya)	Nizip- Birecik arası yol kenarı/Gaziantep	350	11.05.2019
ISTE117002	<i>Tripleurospermum decipiens</i> Bornm. (Sarı papatya)	Aliye Pınarı kenarı- köy içi, Kavak köy- Silifke /Mersin	1300	28.06.2019

Bitki türlerinin taksonomik tanımlamaları, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Ece SEVGİ tarafından yapılmıştır. Bitki örnekleri İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu’nda Tablo 7’de belirtilen her bir bitkiye ait herbaryum kodu ile saklanmaktadır.



Şekil 16. (a) MC ve (b) TD'nin herbaryum örnekleri

2.2. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Matricaria chamomilla L. (MC) ve *Tripleurospermum decipiens* BORNM. (TD)'nin çiçekleri (kapitulum) gölgede havadar bir ortamda demetler halinde kurutulmuştur. Kurutulan bitkisel materyaller toz edilmiştir. 10 g toz halindeki bitki materyaline 500 mL çözücü ilave edilerek (1:50; a/h) maserasyon yöntemi ile özüt elde edilmiştir. Özütlemeye için fraksiyonlama yöntemi (apolardan polara artan çözücü polaritesi) kullanılmıştır. Sırasıyla kuru bitki üzerine eklenen ilgili çözücü ile maserasyon işlemine tabi tutulmuş ve işlem sonrası bitki kurutularak sırasıyla Hekzan, Kloroform, Etilasetat, Bütanol ve Su ile maserasyon yapılarak elde edilmiştir.

MCFH-TDFH: MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri 24 saat oda sıcaklığında hekzan çözücüsü kullanılarak maserasyon işlemi ile hekzan fraksiyonu elde edilmiştir.

MCFK-TDFK: MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri 24 saat oda sıcaklığında kloroform çözücüsü kullanılarak maserasyon işlemi ile kloroform fraksiyonu elde edilmiştir.

MCFE-TDFE: MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri 24 saat oda sıcaklığında etil asetat çözücüsü kullanılarak maserasyon işlemi ile etil asetat fraksiyonu elde edilmiştir.

MCFB-TDFB: MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri 24 saat oda sıcaklığında bütanol çözücüsü kullanılarak maserasyon işlemi ile bütanol fraksiyonu elde edilmiştir.

MCFS-TDFS: MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri 24 saat oda sıcaklığında su çözücüsü kullanılarak maserasyon işlemi ile su fraksiyonu elde edilmiştir.

MCHA-TDHA: Tentür, MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri 24 saat oda sıcaklığında (1:1) %50 Etanol - %50 Su maserasyonu ile elde edilmiştir.

MCA-TDA: Etanol özütü, MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri 24 saat oda sıcaklığında etanol (%96) maserasyonu ile elde edilmiştir.

MCD-TDD: Dekoksiyon; MC ve TD'nin kurutulmuş çiçekleri (1:100 drog:çözücü oranı) 1 g çiçek 100 mL(~100g) içme suyu ile hafif ateş üzerinde 10 dakika kaynatılıp süzülerek hazırlanmıştır.

Elde edilen tüm özütler vakum altında yoğunlaştırılarak denemeler boyunca buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

2.3. Biyoaktif Fitokimyasalların Tayini

2.3.1. GC-FID/MS ile yağ asitlerinin tayini

Bitkiden yağın ekstraksiyonu: İçerisinde 10 g toz edilmiş bitki bulunan kartuş soxhelet aparatına koyulur. Balon içine yaklaşık 500 mL hekzan koyularak 4-6 saat reflux edilir. Daha sonra çözücü uzaklaştırılarak, yağ asidi elde edilmiş olur.

Hidroliz: Elde edilen bu yağ yağ asitlerinin bir kısmını serbest bir kısmını da bağlı olarak içermektedir. Hidroliz işlemi ile bağlı yağ asitleri serbest hale getirilir.

100 mg yağ 2 mL 0,1 M KOH (NaOH) Etanol'deki çözeltisi ile 1 saat reflux edilir. Çözelti soğuduktan sonra üzerine 5 mL su ilave edilir, 0,5 M HCl ile nötralize edilir. Hekzan: dietileter (1:1) ile ekstrakte edilir. Organik faz alınır. Na₂SO₄ ile kurutulur. Serbest yağ asitleri çözücü uçurulduktan sonra elde edilir.

Esterleşme: 50 mg yağ örneği/özüt alınır, 1 mL tolueen içinde çözülür. 2 mL %1 H₂SO₄ (Metanol'de) ilave edilir. 50°C'de bir gece bekletilir. Üzerine %5'lik NaCl çözeltisinden 5 mL eklenir. Hekzan ile ekstrakte edilir. Organik faz ayrılır ve %2'lik 4 mL NaHCO₃ ile yıkanır. Organik faz ayrılır. Na₂SO₄ ile kurutulur. Elde edilen ürün yağ asidi metil esteridir.

Kromatografik koşullar: Sistem: Agilent 7890B GC, Taşıyıcı Gaz: Helyum, Taşıyıcı Gazın Akış Hızı: 2 mL/dak, Enjektör Sıcaklığı: 220 °C, Enjeksiyon Hacmi: 5 µL, Split Oranı: 50:1, Kolon: Agilent DB-Wax (60m x 0,25mm x 0,25 µm), Fırın Sıcaklık Programı: 50°C (1 dak), 25°C/dak → 200°C, 3°C/dak → 230°C (38 dk.), Dedektör: FID (Alev İyonlaşma Dedektörü), Dedektör Sıcaklığı: 220°C, FID Hidrojen: 30 mL/dak, FID Hava: 400 mL/dak, Dedektör: MS (Kütle Spektrometresi), Sistem: 5977E, İyon Kaynağı Sıcaklığı: 230°C, İyonizasyon Modu: Electron Impact Ionization (EI), Elektron Enerjisi: 70 eV, Arayüz Sıcaklığı: 250°C, Kuadripol Sıcaklığı: 150°C, Kütle Tarama Aralığı: 35-450 m/z, Tanımlamalar: Wiley 9-NIST 11 Mass Spectral Database.

2.3.2. LC-MS/MS ile flavonoit ve kumarin bileşiklerinin tayini

Kullanılan Kimyasallar: SIGMA ALDRICH; 7-hidroksikumarin %99, kumarin % ≥ 99 , 6,7-dihidroksikumarin %98, mirisetin % ≥ 96 , kemferol % ≥ 97 , izokersetin % ≥ 90 , kersetin % ≥ 95 , rutin hidrat % ≥ 94 , apigenin % ≥ 95 , apigenin-7-glikozit analitik standart, luteolin % ≥ 98 , mirisitrin %90, luteolin-7-glikozit analitik standart, izorhamnetin %90, 7-metoksi kumarin %98, genkvanin %95, homoplantaginin %95, astragalin %95, kurkumin %99.

MERCK; Metanol LC MS Saflık, Formik asit % ≥ 98 .

Kalibrasyon Standart Çözeltilerin Hazırlanması: apigenin (1293,37 $\mu\text{g/g}$), luteolin (2985,36 $\mu\text{g/g}$), genkvanin (1135,03 $\mu\text{g/g}$), apigenin-7-glikozit; apigetrin (1586,45 $\mu\text{g/g}$), luteolin-7- glikozit; sinarozit (1046,31 $\mu\text{g/g}$), homoplantaginin (2287,21 $\mu\text{g/g}$) kersetin (1361,83 $\mu\text{g/g}$) kemferol (1375,96 $\mu\text{g/g}$), izorhamnetin (1278,64 $\mu\text{g/g}$), mirisetin (2625,34 $\mu\text{g/g}$), izokersetin (4158,59 $\mu\text{g/g}$), rutin hidrat (1319,36 $\mu\text{g/g}$), mirisitrin (2607,41 $\mu\text{g/g}$) astragalin (6827,09 $\mu\text{g/g}$), kumarin (6530,06 $\mu\text{g/g}$), umbelliferon (2662,53 $\mu\text{g/g}$), herniarin (12548,34 $\mu\text{g/g}$), eskuletin (8999,45 $\mu\text{g/g}$), bileşiklerinin metanol, etanol veya su çözücüsü içerisinde belirtilen derişimlerde ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce standart saf bileşiklerin karışımından oluşan 50 $\mu\text{g/g}$ ara stok karışım çözeltisi oluşturulmuştur. Bu çözeltiden 0,05 - 5 $\mu\text{g/g}$ olacak şekilde metanol içerisine spike edilerek farklı derişimlerde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. İç standart olarak kullanılan kurkumin metanol çözücüsü içerisinde 641,29 $\mu\text{g/g}$ derişiminde ana stok çözeltisi hazırlanmış, çalışmaya başlamadan önce 131,33 $\mu\text{g/g}$ derişimine seyreltilerek IS ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm bu çözeltiler gravimetrik tartım alınarak hazırlanmıştır.

Bitki numunelerinin hazırlanması: Özütlerin metanol çözücüsü içerisinde stok çözeltiler hazırlanmış, LC-MS/MS cihazında analiz edilmek üzere yaklaşık 6000 ppm'e metanol ile seyreltilmiş ve yaklaşık 3 ppm derişiminde iç standart eklenmiştir (EK-1).

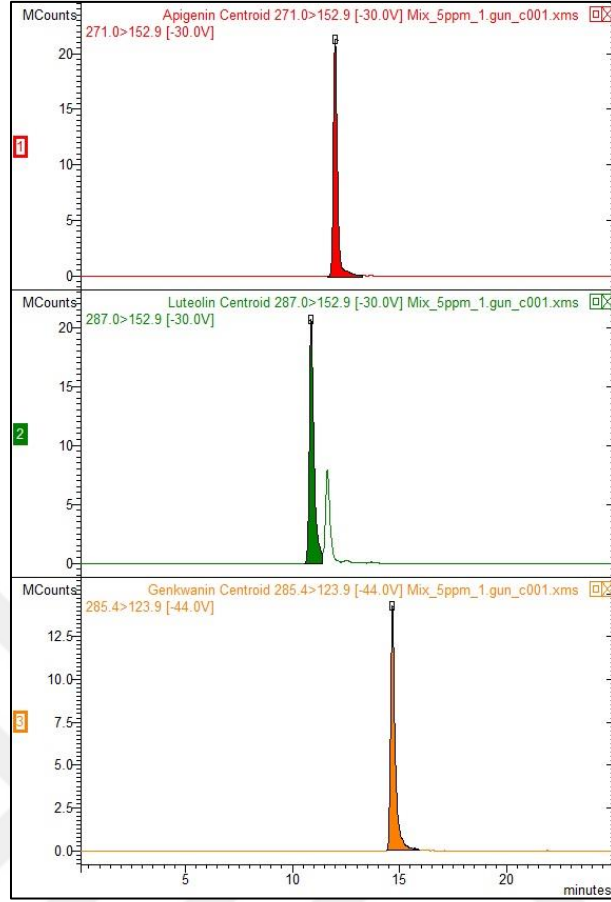
Enstrümental Analiz ve Kromatografik Koşullar: Analizlerde Zivak Tandem Gold Triple Quadrupole kütle spektrometre cihazı kullanılmıştır. Kromatografi kolonu olarak, Synergy Max C18 kolon (250 x 2 mm, i.d, 5 µm partikül büyüklüğü), hareketli faz olarak da içerisinde %0,05 formik asit bulunan distile su (A) ve MeOH (B) kullanılmıştır. Pompa programı dakikada 0,25 mL akış hızında olup, akış gradienti 0.00-1.00 dakikalarda %55 A ve %45 B, 1.00-20.00 dakikalarda %100 B, 20.01-25.00 dakikalarda %55 A ve %40 B olacak şekilde programlanmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir.

MS/MS koşulları: CID gaz basıncı 2.0 mTorr, 4000 V ESI iğne voltajı, 600 V sprey koruma voltajı, 300 °C kurutma gaz sıcaklığı, 55 psi nebulizer gaz basıncı ve 35 psi kurutma gaz basıncı olmak üzere optimum ESI parametreleri kullanılmıştır. Standart bileşiklerin optimum LC-MS/MS karakteristikleri belirlenerek ölçüm metodu oluşturulmuştur. Tablo 8’de biyoaktif fitokimyasal bileşiklere ait iyonların m/z değerleri verilmiştir. Bileşenlerin LC-MS/MS kromatogramı ve açık yapıları Şekil 17-26’de görülmektedir.

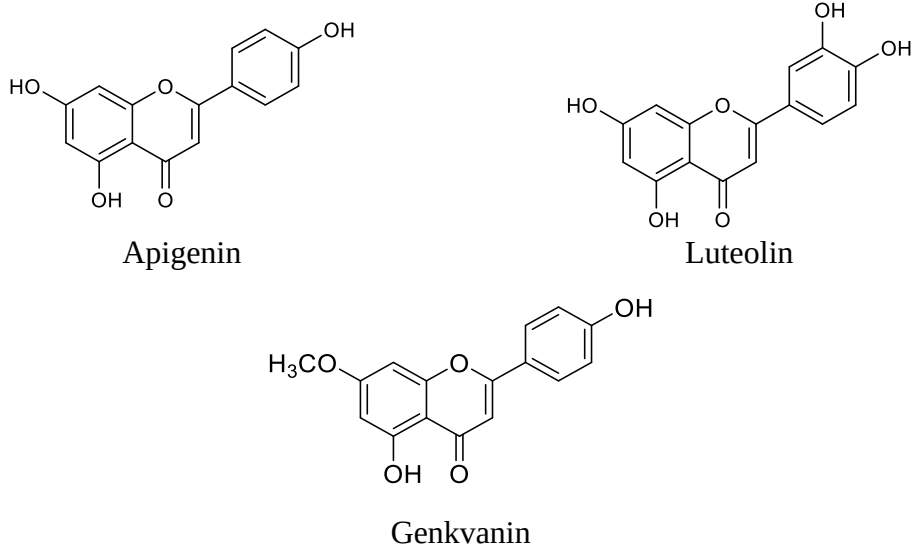
Optimum ESI parametreleri kullanılmıştır. Standart bileşiklerin LC-MS karakteristikleri belirlenerek ölçüm metodu oluşturulmuştur. Buna göre standart bileşiklere ait moleküler iyonların m/z değerleri ve alıkonma zamanları aşağıdaki Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Fenolik bileşiklere ait iyonların m/z değerleri

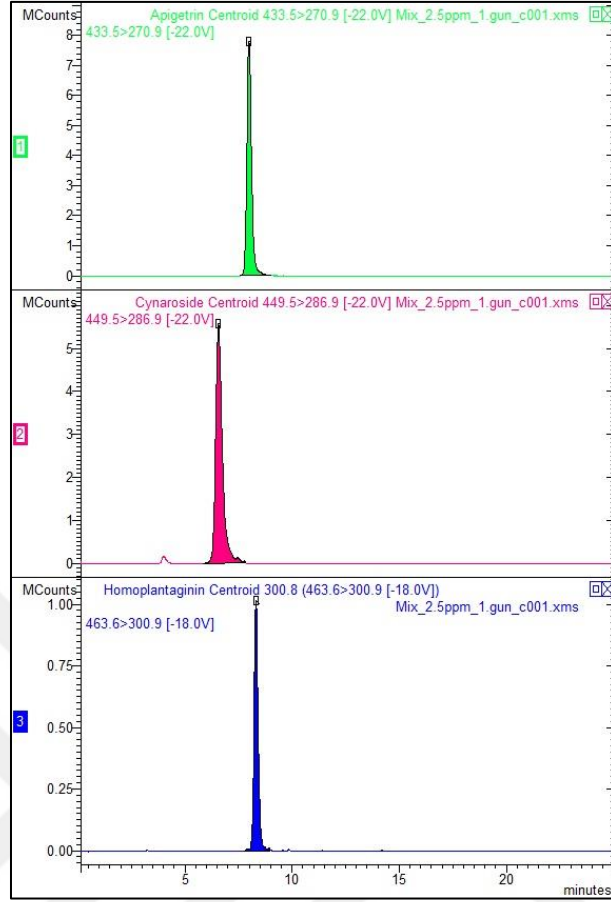
	Bileşen	MA	ESI	M⁺	MS/ MS	Capiler	Collision energy (V)	RT (dk.)
1	Apigenin	270,24	Poz.	271,0	152,9	120	30	11,53
2	Luteolin	286,24	Poz.	287,0	152,9	140	30	10,45
3	Genkvanin	284,26	Poz.	285,4	123,9	120	44	13,78
4	Apigetrin	432,38	Poz.	433,5	270,9	70	22	8,38
5	Sinarozit	448,38	Poz.	449,5	286,9	80	22	5,89
6	Homoplantaginin	463,40	Poz.	463,6	300,9	60	18	7,72
7	Kersetin	302,24	Poz.	303,3	152,9	100	34	9,85
8	Kemferol	286,24	Poz.	287,4	152,9	120	34	12,25
9	İzorhamnetin	316,26	Poz.	317,4	152,9	110	35	11,61
10	Mirisetin	318,24	Poz.	319,4	152,9	130	35	8,49
11	İzokersetin	464,38	Poz.	465,5	302,9	50	30	7,32
12	Rutin hidrat	610,52	Poz.	611,5	302,9	60	20	6,56
13	Mirisitrin	464,40	Poz.	465,5	318,9	40	25	5,84
14	Astragalin	448,40	Poz.	449,5	286,9	30	20	8,00
15	Kumarin	146,14	Poz.	147,2	90,9	90	22	6,57
16	Umbelliferon	162,14	Poz.	163,2	106,8	80	20	5,09
17	Herniarin	176,17	Poz.	177,3	77,9	100	36	7,96
18	Eskuletin	178,14	Poz.	179,2	76,9	100	32	4,12
IS	Kurkumin	368,38	Poz.	369,5	144,9	80	30	13,48



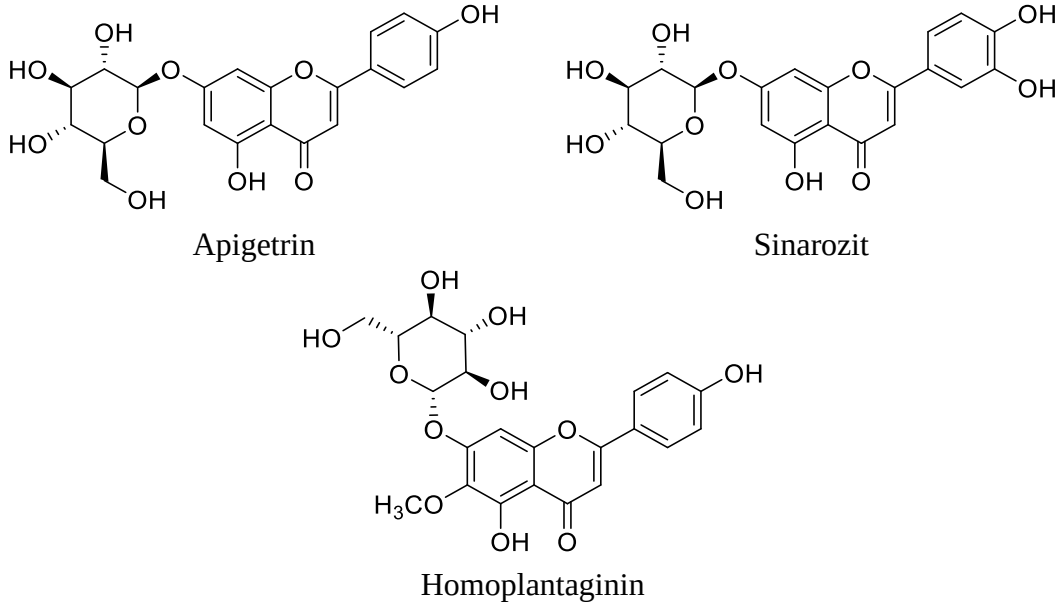
Şekil 17. Flavon bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.



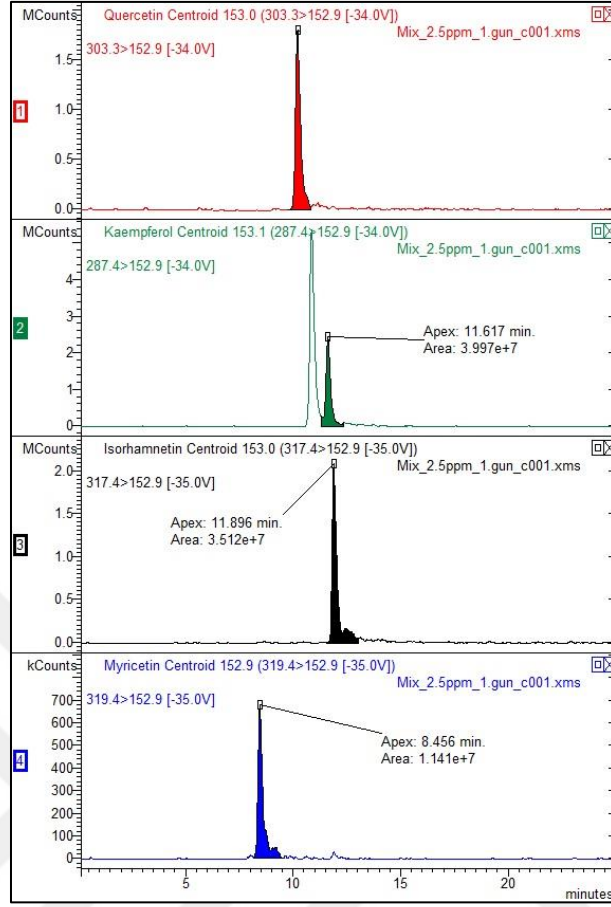
Şekil 18. Flavon bileşiklerin molekül formülleri



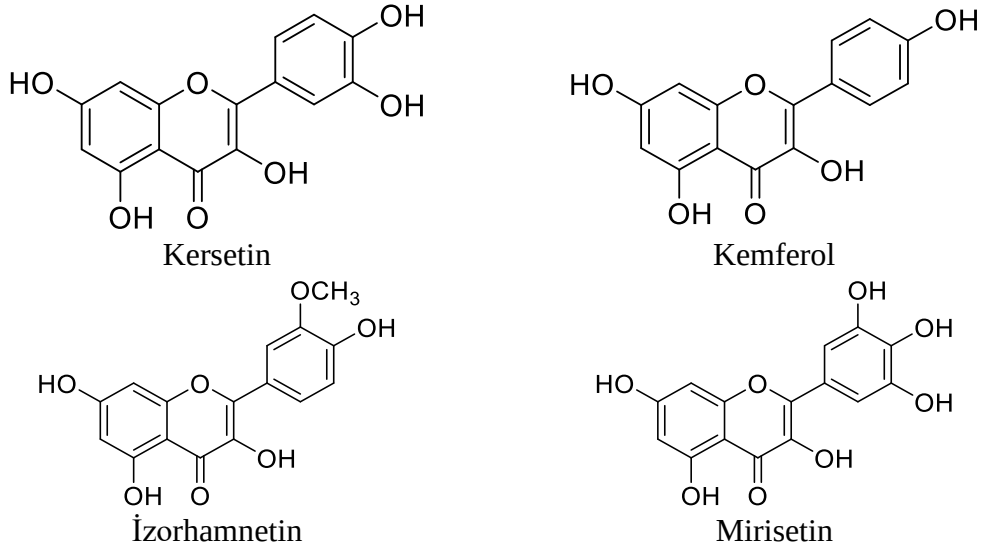
Şekil 19. Flavon glikozit bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.



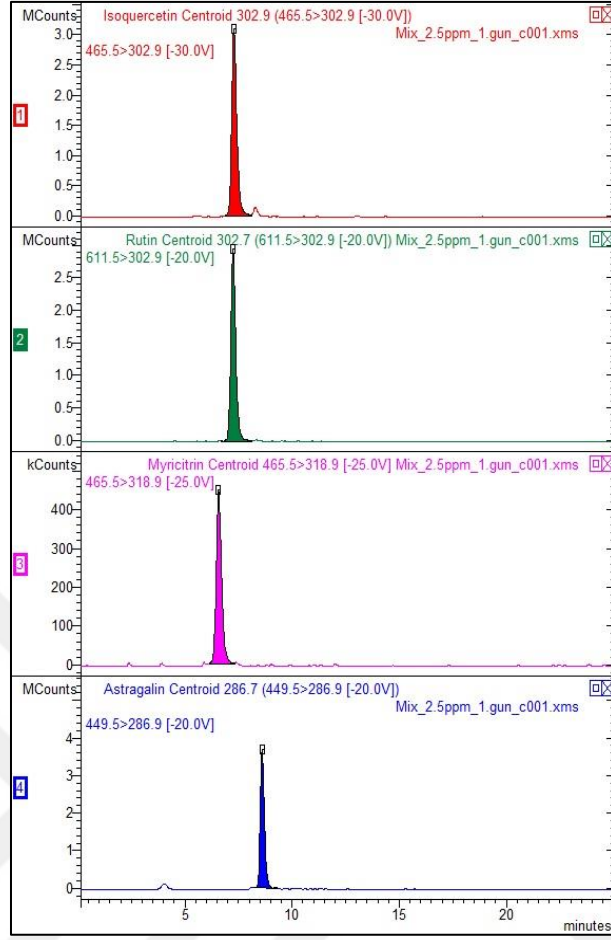
Şekil 20. Flavon glikozit bileşiklerinin molekül formülleri



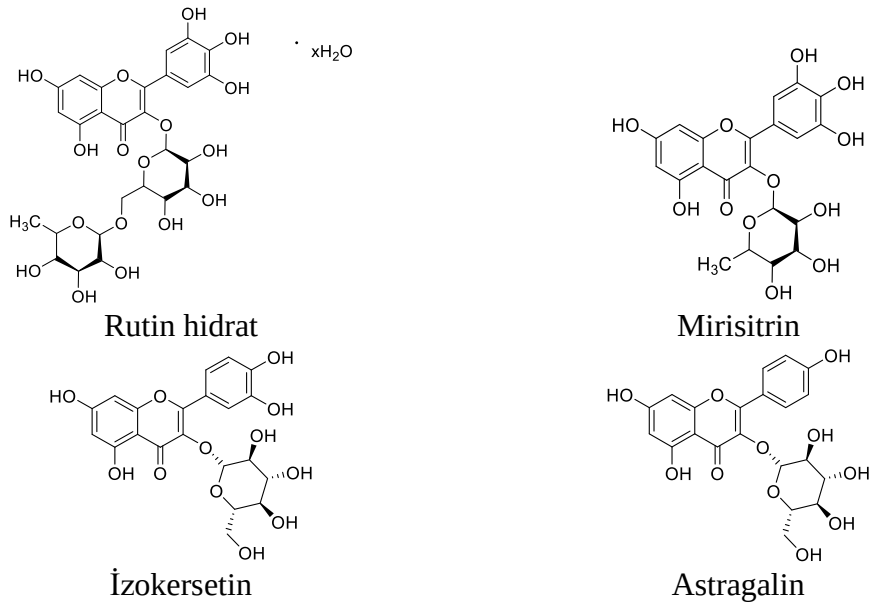
Şekil 21. Flavonol bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.



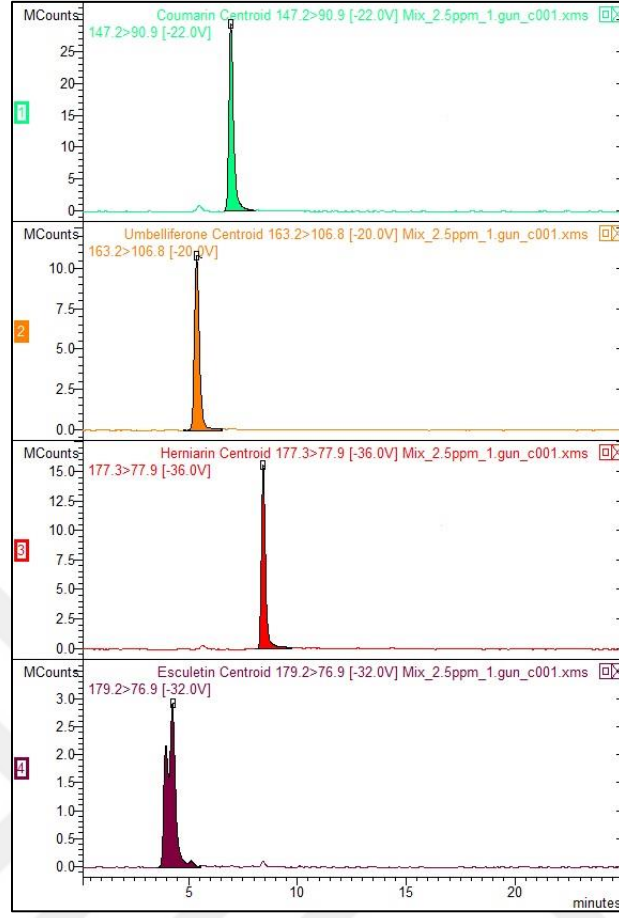
Şekil 22. Flavonol bileşiklerinin molekül formülleri



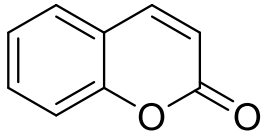
Şekil 23. Flavonol-glikozit bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.



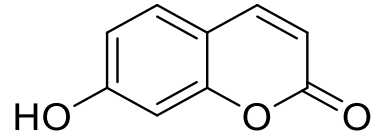
Şekil 24. Flavonol glikozit bileşiklerinin molekül formülleri



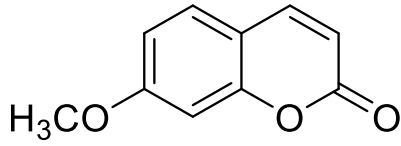
Şekil 25. Kumarin bileşiklerin LC-MS/MS kromatogramı.



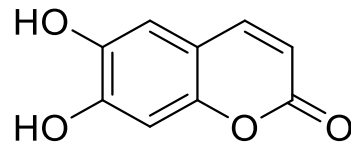
Kumarin



Umbelliferon



Herniarin



Eskuletin

Şekil 26. Kumarin bileşiklerinin molekül formülleri

2.3.3. Metot validasyon performans parametreleri

Metodun performans kriterleri başka bir deyişle metot geçerli kılma kabul kriterleri aşağıdaki Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Metot geçerli kılma kabul kriterleri

Değişken	Kabul Kriteri
LOD & LOQ	Kalibrasyon doğrusunun eğimi (m) ve y eksenini kestiği nokta üzerinden hesaplanır.
Tekrarlanabilirlik	RSD <%2 olmalıdır.
Doğruluk	RSD <%2 olmalıdır.
Geri Kazanım	%80-110 olmalıdır.
Doğrusal Aralık	$R^2 \geq 0,98$ olmalıdır.

LOQ ve LOD değerleri: Kalibrasyon doğrusunun eğimi (m) ve y eksenini kestiği nokta üzerinden aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{m} \quad LOD = \frac{3 \sigma}{m}$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik: Bağlı standart sapma değerleri aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$RSD_{tekrarlanabilirlik} = \frac{SD}{W_{ortalama}} \times 100$$

Bu eşitlikte,

SD: Gün içi ölçüm sonuçlarının standart sapması;

W_{ortalama}: Günler içi ölçüm sonuçlarının kütle kesri ortalaması;

Geri kazanım: 6 cihaz tekrarı ile analiz edilmiştir. Bu koşullarda geri kazanım hesaplaması aşağıdaki eşitlik kullanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{W_{\text{ölçülen}}}{W_{\text{eklenen}}} \times 100$$

Bu eşitlikte,

$W_{\text{ölçülen}}$: Ekleme yapılan örnek (spiked) ile ekleme yapılmayan örnek (blank) ölçüm sonuçları arasındaki fark, ($\mu\text{g/g}$)

W_{eklenen} : Eklenen analit miktarı, ($\mu\text{g/g}$)

Ölçüm modeli : Bitki ekstratlarında, içerisindeki analitlerin miktarları aşağıdaki ölçüm modeli kullanılarak belirlenmiştir.

$$C (\mu\text{g/g}) = \frac{((A_{\text{Analit}}/A_{\text{IS}}) - b) \times C_{\text{IS}}}{a}$$

A_{Analit} : Analitin alanı

A_{IS} : İç standardın alanı

C_{IS} : İç standardın derişimi

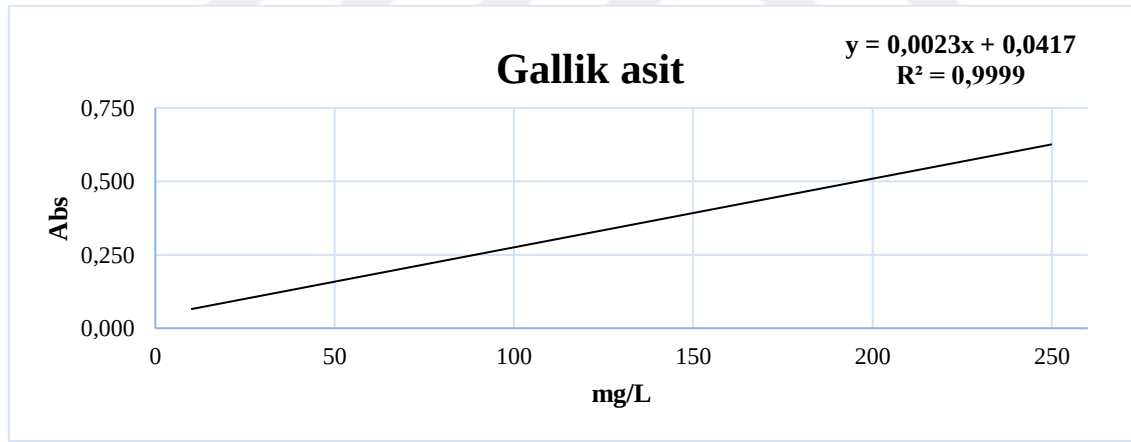
a : Kalibrasyon grafiğinin eğimi

b : Kalibrasyon grafiğinin kesim noktası

2.4. Antioksidan Aktivite Yöntemleri

2.4.1. Toplam fenolik tayini

Numunelerin toplam fenolik miktarları, folin-ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik asit'e eşdeğer olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde tayininin esası fenolik bileşiklerin bazik ortamda folin-ciocalteu ayıracını indirgeyip kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin-ciocalteu ayıracı burada oksitleyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayıracın oluşturduğu mavi rengin absorbansının ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarlarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Gallik asidin metanol ile farklı konsantrasyonlarda (10-250 mg/mL) hazırlanıp, absorbansları 725 nm'de okunmuş, konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilmiştir. Grafik Şekil 27'de verilmiştir. Özütlerin metanol çözücüsünde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlanarak absorbansları ölçülmüştür. Özütlerin 1 gramındaki mg gallik asit eşdeğeri [mg GAE (gallik asit) / g özüt] fenolik madde miktarı olarak hesap yapılmıştır (204, 205).



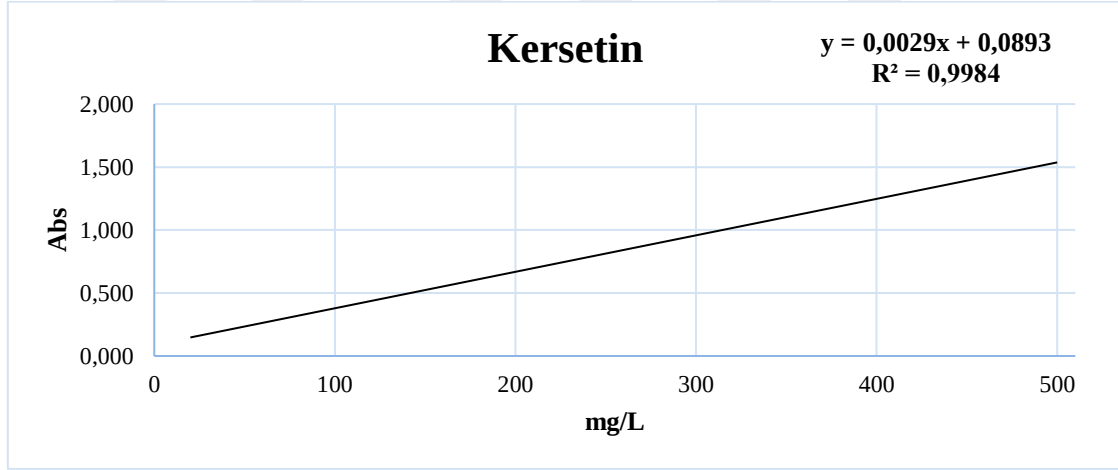
Şekil 27. Standart gallik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi grafiği

Tablo 10. Toplam fenolik deney prosedürü

Uygulama (10 mL)
0,4 mL Örnek / Standart / Kontrol
5,2 mL Su
0,4 FCR
5 dk. sonra
4 mL %7 lik Na ₂ CO ₃
90 dk. sonra 725 nm ölçüm

2.4.2. Toplam flavonoit tayini

Bu yöntemde numunelerin toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum klorit yöntemi ile belirlenir. Metodun prensibi, $AlCl_3$ 'ün flavonlar ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanır. Ek olarak $AlCl_3$ flavonoitlerin A- veya B-halkalarının orto-dihidroksi grupları ile kompleks oluşturur. Kersetin metanol ile farklı konsantrasyonlarda (10-500 mg/mL) hazırlanmış ve absorbansları 425 nm'de okunmuştur. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilmiştir. Özütlarin metanol çözücüsünde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlanarak absorbansları ölçülür. Özütlarin 1 gramındaki mg kersetin eşdeğeri $[mg \text{ KER (kersetin) / g özütl}]$ flavonoit madde miktarı olarak hesap yapılmıştır. Grafik Şekil 28'de verilmiştir.



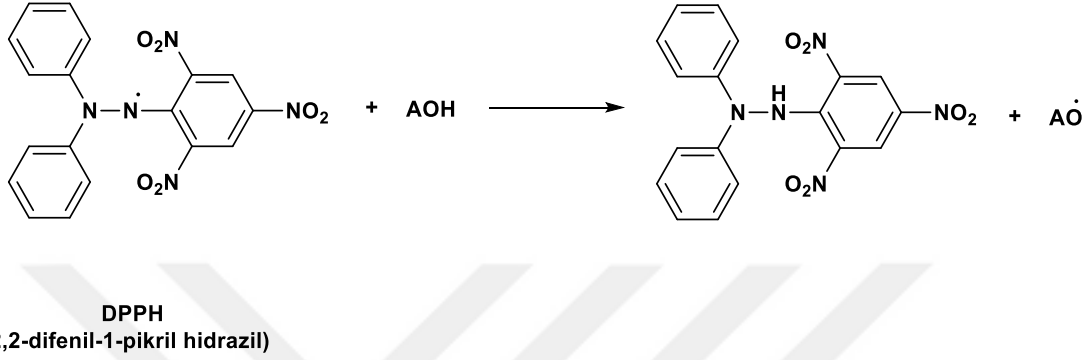
Şekil 28. Standart kersetin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi grafiği

Tablo 11. Toplam flavonoit deney prosedürü

Uygulama (10 mL)
1 mL Örnek / Standart / Kontrol
6,7 mL Su
0,3 $AlCl_3$
2 mL 1M CH_3COONH_4
10 dk. sonra 425 nm ölçüm

2.4.3. DPPH serbest radikal giderim tayini

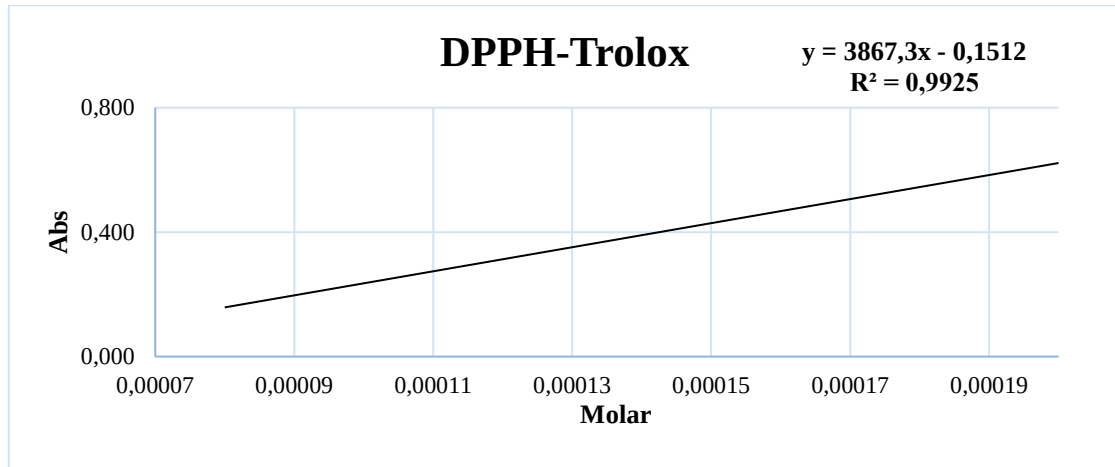
DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 517 nm’de karakteristik absorpsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldır. DPPH’nın 517 nm’deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenmektedir (206).



Şekil 29. DPPH antioksidan mekanizması tepkimesi

Ekstrelerin metanol ile 1000 ppm (mg/L)’lik çözeltileri hazırlanmıştır. Trolox standardının ana stok çözeltisi 1000 µM etanol içerisinde, kalibrasyon çalışma standartları 80, 100, 120, 140, 160, 180 ve 200 µM derişimlerinde hazırlanmıştır. Troloks eşdeğeri antioksidan aktivite değerleri, troloks ile hazırlanan standart ölçü eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar gram örnek başına troloksa eşdeğer antioksidan kapasite cinsinden ifade edilmiştir (mol TR/g). Grafik Şekil 30’da verilmiştir.

40 µL örnek üzerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 160 µL ilave edilir.



Şekil 30. TEAC DPPH Kalibrasyon eğrisi grafiği

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etil alkolde çözölmüştür.

Tablo 12. DPPH deney prosedürü

KONTROL (Etanol)	ÖZÜT 1000 mg/L	STANDART 1000 µM	TROLOX 1000 µM
-	20 µL örnek	x µL standart	x µL trolox
40 µL etanol	20 µL etanol	40-x µL etanol	40-x µL etanol
160 µL DPPH	160 µL DPPH	160 µL DPPH	160 µL DPPH
30 dk. karanlıkta inkübasyon			
517 nm de ölçüm			

Standart hesap $TEAC_{DPPH}$;

$$\epsilon_{Standart} / \epsilon_{Trolox}$$

ϵ : molar soğurma

Ekstre hesap (**mol TR/g**);

$$Antioksidan\ kapasite\ (mol\ TR/g) = \frac{A_f}{\epsilon_{TR}} \times \frac{V_f}{V_s} \times r \times \frac{V_{cup}}{m}$$

A_f: Absorbans

ϵ_{TR} : Trolox'un molar soğurumu

V_f: Son hacim (hücre)

V_s: Örnek hacmi (hücre)

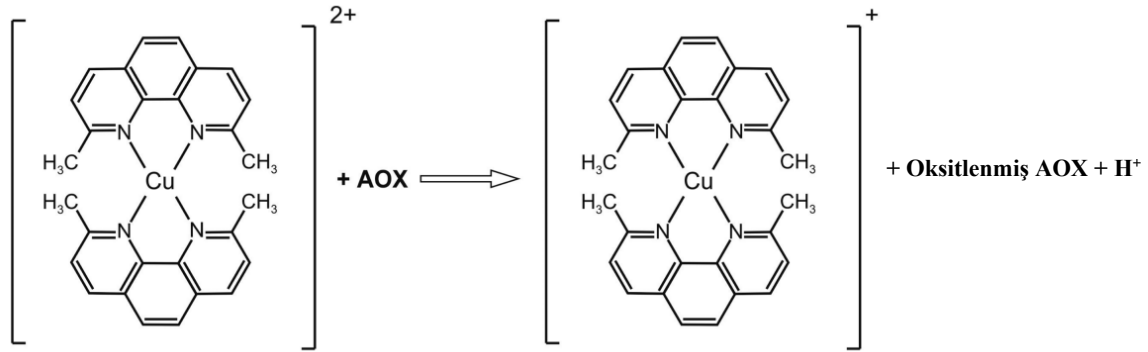
r: Seyreltme faktörü

V_{cup}: ilk hacim (mL)

m: g (özüt)

2.4.4. CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) tayini

Bu yöntemle göre, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin) ve Cu (II) aynı ortama konur. Antioksidan maddenin Cu (II)'yi indirgemesi sonucu oluşan Cu (I)'in neokuproin ile yaptığı kompleks 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesi ilkesinden yararlanılarak analiz gerçekleştirilmektedir (207).



Şekil 31. CUPRAC antioksidan mekanizması tepkimesi

Trolox standardının ana stok çözeltisi 1000 µM derişiminde, kalibrasyon çalışma standartları 2,44-24,4 µM derişimler arasında hazırlanmıştır. Troloks eşdeğeri antioksidan aktivite değerleri, troloks ile hazırlanan standart ölçü eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar gram örnek başına troloks eşdeğer antioksidan kapasite cinsinden ifade edilmiştir (mol TR/g). Grafik Şekil 32’de verilmiştir.

Çoklu okuyucu tabakasındaki her bir hücreye sırasıyla 50 µL 10 mM CuCl₂ ve 50 µL 7,5 mM neokuproin ve 50 µL 1 M NH₄CH₃COO pH 7 tamponu ilave edilmiştir. 1000 mg/L derişiminde metanol çözücüsü içerisinde hazırlanan bitki eskre örneklerinden 20,5 µL ve 34,5 µL distile su ilave edilmiştir.

10 mM Bakır (II) klorür dihidrat çözeltisinin hazırlanması: 42,62 mg CuCl₂.2H₂O tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür.

1 M Amonyum asetat tampon çözeltisinin hazırlanması: 1,93 g NH₄OAc tartılarak 25 mL distile suda çözülmüş, pH’ı 7’ye ayarlanmıştır.

7,5 mM Neokuproin çözeltisinin hazırlanması: 76,6 mg neokuproin tartılarak 50 mL %96’lık alkolde çözülmüştür.

Tablo 13. CUPRAC deney prosedürü

KONTROL (Etanol)	ÖZÜT 1000 mg/L	STANDART 1000 µM	TROLOX 1000 µM
50 µL CuCl ₂	50 µL CuCl ₂	50 µL CuCl ₂	50 µL CuCl ₂
50 µL Neokuproin	50 µL Neokuproin	50 µL Neokuproin	50 µL Neokuproin
50 µL NH ₄ CH ₃ COO	50 µL NH ₄ CH ₃ COO	50 µL NH ₄ CH ₃ COO	50 µL NH ₄ CH ₃ COO
20,5 µL etanol	20,5 µL örnek	x µL standart	x µL trolox
34,5 µL su	34,5 µL su	55- x µL su	55- x µL su
30 dk. karanlıkta inkübasyon			
450 nm de ölçüm			

Standart hesap **TEAC_{CUPRAC}**;

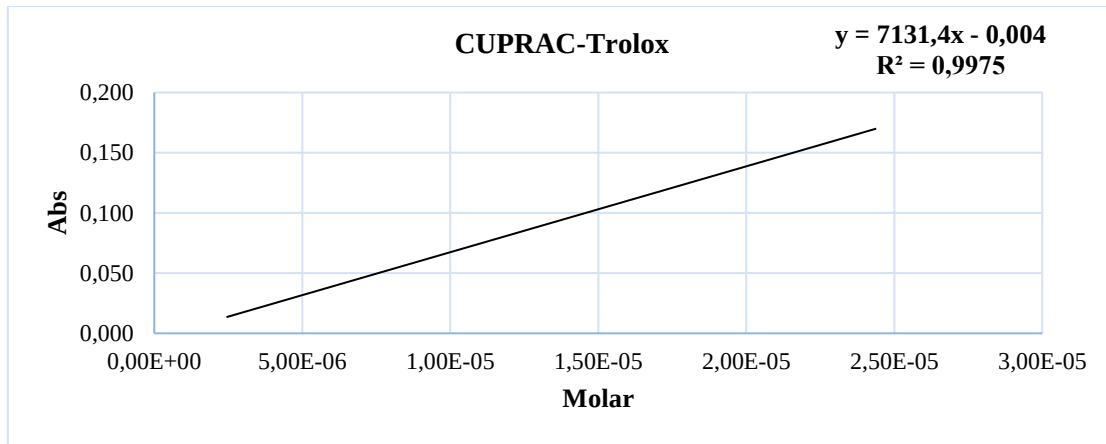
$$\frac{\epsilon_{Standart}}{\epsilon_{Trolox}}$$

ε: molar soğurma

Ekstre hesap (**mol TR/g**);

$$Antioksidan\ kapasite\ (mol\ TR/g) = \frac{A_f}{\epsilon_{TR}} \times \frac{V_f}{V_s} \times r \times \frac{V_{cup}}{m}$$

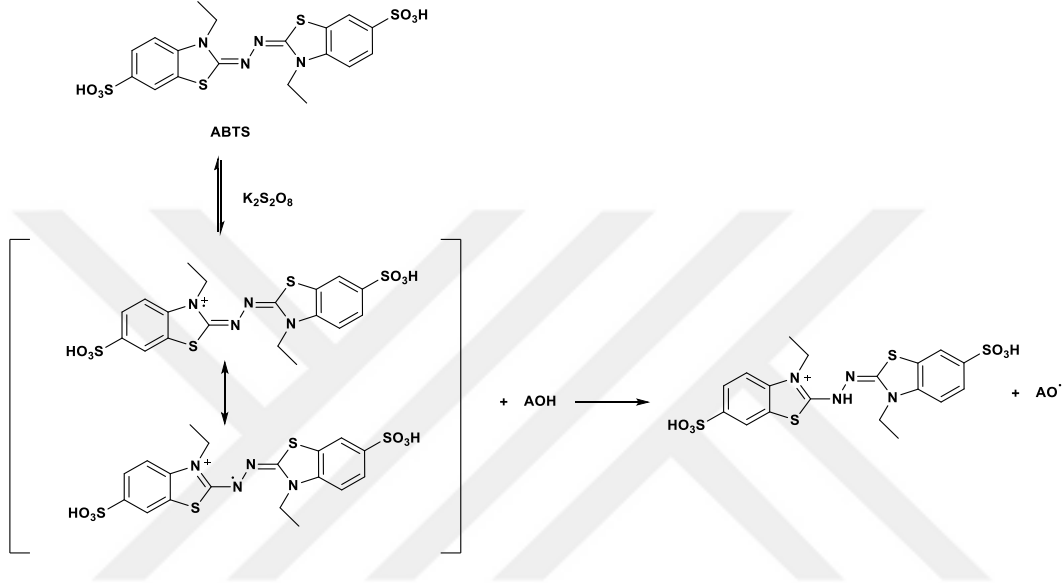
A_f: Absorbans; **ε_{TR}**: Trolox'un molar soğurumu; **V_f**: Son hacim (hücre); **V_s**: Örnek hacmi (hücre); **r**: Seyreltme faktörü; **V_{cup}**: ilk hacim (mL); **m**: g (özüt)



Şekil 32. TEAC CUPRAC Kalibrasyon eğrisi grafiği

2.4.5. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi tayini

Bu yöntemde ABTS'nin (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) persülfatla oskidasyonundan mavi/yeşil renkli ABTS•+ radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS radikalini indirgenmesi ile rengini 734 nm dalga boyunda kaybetmesi temeline dayanmaktadır.



Şekil 33. ABTS antioksidan mekanizması tepkimesi

7 mM amonyum ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) tuzu distile suda çözündürülerek 2,45 mM potasyum persülfatla muamele edilmiş oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletilmiştir. Hazırlanan koyu mavi renkli ABTS katyon radikali çözeltisi, pH 4,5 amonyum asetat tamponu ile absorbansı 734 nm'de 0,7 olacak şekilde seyreltilmiştir. Özütlerin metanol ile 1000 ppm (mg/L)'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Trolox standardının ana stok çözeltisi 100 μ M etanol içerisinde, kalibrasyon çalışma standartları 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14 μ M derişimlerinde hazırlanmıştır. Troloks eşdeğeri antioksidan aktivite değerleri, troloks ile hazırlanan standart ölçü eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar gram örnek başına troloksa eşdeğer antioksidan kapasite cinsinden ifade edilmiştir (mol TR/g) (207, 208). Grafik Şekil 34'te verilmiştir.

7 mM ABTS katyon radikalinin hazırlanması: 19,2 mg ABTS katyon radikali tartılarak 5 mL distile suda çözülmüştür. Üzerine 3,3 mg $K_2S_2O_8$ (potasyum persülfat)

eklenerek karıştırılır, karışım oda sıcaklığında karanlıkta 12-16 saat bekletilmiştir. Analize başlarken ABTS katyon radikali çözeltisinin 734 nm dalga boyundaki absorbanansı yaklaşık 0,70 olacak şekilde seyreltilmiştir.

Tablo 14. ABTS deney prosedürü

KONTROL (Etanol)	ÖZÜT 1000 mg/L	STANDART 100 µM	TROLOX 100 µM
20 µL etanol	20 µL örnek	x µL standart	x µL trolox
20 µL su	20 µL su	40-x µL su	40-x µL su
160 µL ABTS	160 µL ABTS	160 µL ABTS	160 µL ABTS
6 dk. karanlıkta inkübasyon			
734 nm de ölçüm			

Standart hesap $TEAC_{ABTS}$;

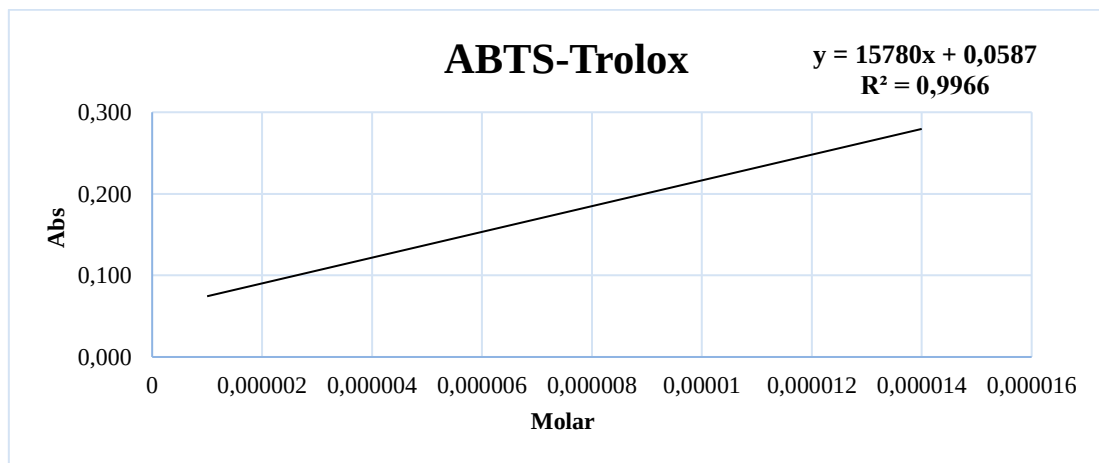
$$\epsilon_{Standart} / \epsilon_{Trolox}$$

ϵ : molar soğurma

Ekstre hesap (mol TR/g);

$$Antioksidan\ kapasite\ (mol\ TR/g) = \frac{A_f}{\epsilon_{TR}} \times \frac{V_f}{V_s} \times r \times \frac{V_{cup}}{m}$$

A_f: Absorbans; **ε_{TR}**: Trolox'un molar soğurumu; **V_f**: Son hacim (hücre); **V_s**: Örnek hacmi (hücre); **r**: Seyreltme faktörü; **V_{cup}**: ilk hacim (mL); **m**: g (özüt)



Şekil 34. TEAC ABTS Kalibrasyon eğrisi grafiği

2.5. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Yöntemleri

2.5.1. Disk difüzyon yöntemi

Bu yöntemde belli dozlarda bitki özütü /antibiyotik emdirilmiş diskler kullanılmaktadır. İnkübasyon sonrası disk etrafında oluşan zon değerine bakılarak antibiyotiğe duyarlılık ya da direnç durumu belirlenir.

Antibiyotik duyarlılığı incelenecek mikroorganizma için uygun katı besiyeri (Mueller Hinton Agar-MHA) hazırlanarak petrilere dökülür. 18-24 saatlik sıvı mikroorganizma kültürünün bulanıklığı 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlanır. Sıvı kültüre eküyon çubuk daldırılıp iyice eminceye kadar bekletilir ve eküvyon çubuktaki kültür petri yüzeyine 120 derecelik açıyla sürülerek mikroorganizma ekimi gerçekleştirilir. Mikroorganizmaların tüm petriye yayılması için işlem en az 6 kez tekrar edilir. Etkisi belirlenecek bitki özütleri, ekim yapılmış petri yüzeyine, petri boyutuna göre yerleştirilen boş disklere emdirilir. Bitki özütleri emdirilmiş diskleri içeren petri, mikroorganizmanın gelişeceği sıcaklık ve sürede (37 °C, 18-24 saat) inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında, petri yüzeyinde, disk etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları, milimetre cinsinde ölçülür ve ölçülen değer CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü; Clinical and Laboratory Standards Institute)'ın bildirmiş olduğu standart değerlere göre karşılaştırılarak mikroorganizmanın o bitki özütüne karşı duyarlı ya da dirençli olduğu belirlenir (209).

2.5.2. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) yöntemi

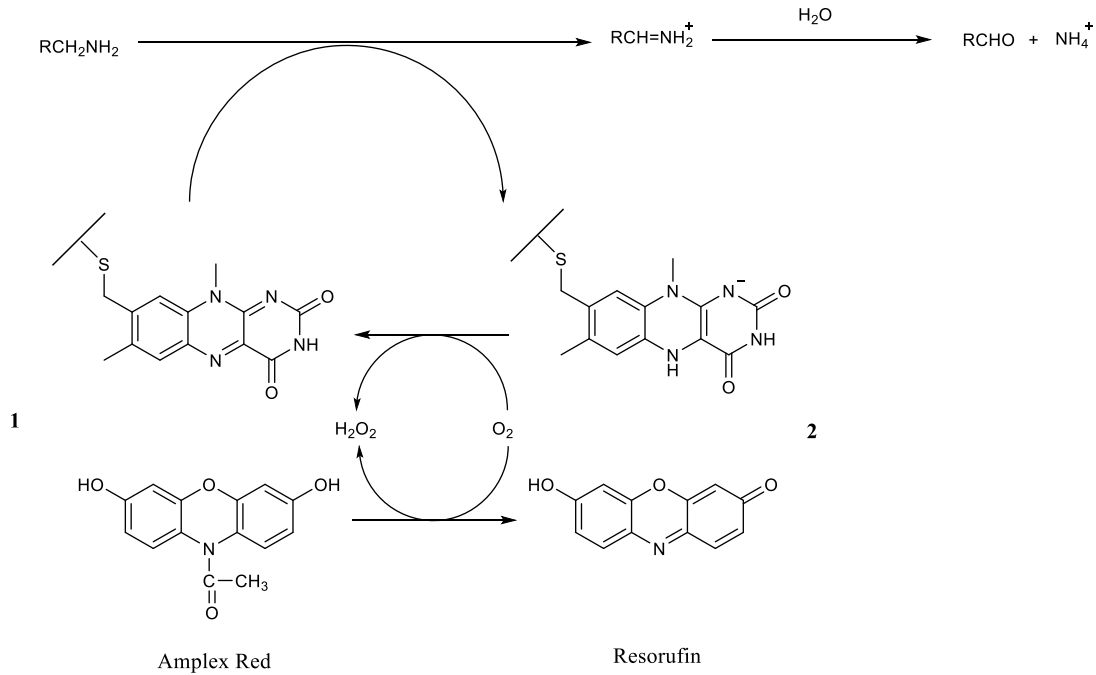
Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 8739 standart kökenlerine karşı antibakteriyel *Candida albicans* ATCC 90028 standart kökenine karşı antifungal aktivitelerinin ve minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesinde resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) mikropalak yöntemi kullanılmıştır. Aktivite tayini iki tekrar olacak şekilde belirlenmiştir. Standart ilaçlar olarak *S. aureus* için vankomisin, *E. coli* için seftazidim ve *C. albicans* için flukanazol kullanılmıştır. Özütlerin 2000 µg/mL konsantrasyonundaki stok solüsyonları DMSO (Dimetil sülfooksit) ile hazırlandı ve 0,22 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. İlk olarak her bir kuyucuğa 50 µL Müller Hinton Broth besiyeri eklendi. Hazırlanan solüsyonların seri dilüsyonları 96 kuyulu mikropalakların ilk kuyucuğuna 1000 µg/mL ilave edilerek yapıldı. Standart ilaçların (vankomisin, ampisillin

ve flukanazol) final konsantrasyonları 30 µg/mL olacak şekilde ilk kuyucuğa 50 µL ilave edilerek seri dilüsyonları yapılmıştır. Plağın bir kolonuna negatif kontrol olarak sadece DMSO bir kolonuna da pozitif kontrol olarak sadece standart bakteriler 50'şer µL konulup seri dilüsyonları yapılmıştır. Bakterilerin 1-2 günlük kolonilerinden McFarland 0,5 bulanıklık değerinde süspansiyonu hazırlanmış ve daha sonra 1:100 oranında sulandırılmıştır. Bu hazırlanan son süspansiyonlardan 10 µL plak kuyularına ilave edilmiştir. Plaklar parafilm ile kapatılarak 37 °C'de normal atmosferde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bütün kuyulara 5 ml distile suda çözöürölen 33,75 mg resazurin' den ve %20'lik Tween 80'den 10'ar µL ilave edilerek plaklar 2-4 saat inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar görsel olarak değöerlendirilmiştir. MİK değöeri, maviden pembeye renk değöişimini engelleyen en düşük konsantrasyon değöeri olarak belirlenmiştir (210).

2.6. *in vitro* Enzim İnhibisyon Aktiviteleri Yöntemleri

2.6.1. MAO A ve B enzim inhibisyon tayini

MAO-A ve MAO-B enzim aktivitesi tayini Amplex® Red Monoamin Oksidaz deney kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak belirlenmiştir. Kitin genel çalışma prensibi Şekil 35'te verilmiştir.



Şekil 35. Amplex® Red Monoamine Oxidase Assay Kitinin çalışma prensibi

20mM Amplex® Red stok çözeltisi: 1mg Amplex® Red reaktifi 200 µL DMSO içinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti -20 °C sıcaklıkta, ışıktan korunarak muhafaza edilmiştir.

1X tampon Çözelti (0.25 M, pH:7.4 Sodyum fosfat tamponu): 5 mL 5X stok tampon çözeltisi destile su ile 25 mL'ye seyreltilmiştir. Hazırlanan çözeltiler günlük olarak kullanılmıştır.

200 U/mL'lik horseradish peroksidaz (HRP) stok çözeltisi: Kit kullanım kılavuzuna uygun olarak 1X tampon çözelti kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 200 µL'lik hacimlere ayrılarak -20 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

100 mM substrat (p-tiramin) çözeltisi: Kit kullanım kılavuzuna uygun olarak 1,2 mL destile su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 200 µL'lik hacimlerde -20 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

hMAO-A: Enzimli reaksiyonda floresans şiddeti 10000 birim olacak şekilde ana stoktan (0,5 mL: 100 mM pH 7,4 potasyum fosfat tamponu, 0,25 M Sukroz, 0,1 M EDTA, %5 Gliserol. 5 mg protein/mL; 140 ünite/mg protein) 1:20 seyreltme ile hazırlanmıştır (son konsantrasyon: 1,1 µg protein/200 µL).

hMAO-B: Enzimli reaksiyonda floresans şiddeti 10000 birim olacak şekilde ana stoktan

(0,5 mL: 100 mM pH 7,4 potasyum fosfat tamponu, 0,25 M Sukroz, 0,1 M EDTA, %5 Gliserol, 5 mg protein/mL; 47 ünite/mg protein) 1:3 seyreltme ile hazırlanmıştır (son konsantrasyon: 7,5 µg protein/200 µL).

Substrat çalışma çözeltisi: Yukarıda hazırlanışı verilmiş olan stok çözeltiler kullanılarak

her çalışma günü taze olarak hazırlanmıştır (200 µL Amplex Red stok çözeltisi, 100 µL horseradish peroksidaz stok çözeltisi, 200 µL substrat (p-tiramin) çözeltisi ve 9,5 mL 1X reaksiyon tamponu).

Stok inhibitör çözeltileri: Özütler 10000 µg/mL konsantrasyonunda DMSO içinde hazırlanmıştır.

Enzim Aktivitesinin Tayini: 2 µL destile su, 4,5µL hMAO-A veya hMAO-B ve 93,5 µL 1X reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu plakalara

konulmuştur. 15 dakika 37°C’de karıştırılarak inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda 100 mikrolitre substrat çözeltisi eklenerek reaksiyona başlanmıştır. 37 °C’de çoklu ölçümlü mikropalak floresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545 nm uyarma ve 590 nm emisyon) 15 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüm alınarak enzimatik reaksiyonun ilerlemesi takip edilmiştir. Enzim aktivitesi 15 dakika sonundaki gözlenen floresans şiddetinden başlangıç anındaki floresans şiddeti çıkarılarak hesaplanmıştır. hMAO-A ve hMAO-B izoenzimleri ile gerçekleştirilen reaksiyonların aynı anda paralel yürümesi sağlanmıştır. Özütlerin çözücüsü olan DMSO’nun etkisini gözlemlemek amacıyla aynı deneme 2 µL destile su yerine 2 µL DMSO kullanılarak tekrarlanmıştır.

Sonuçların hesaplanması:

Yüzde inhibisyon değerleri aşağıda verilen denklemle hesaplanmıştır.

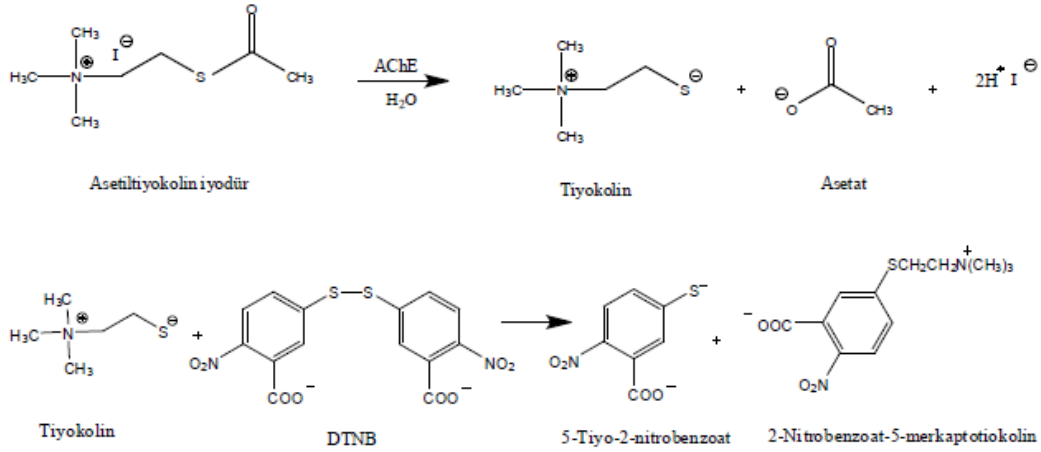
$$\% inhibisyon = \frac{F_{enz} - F_{inh}}{F_{enz}} \times 100$$

F_{enz}: İnhibitörsüz enzim aktivitesi

F_{inh}: İnhibitör varlığında enzim aktivitesi

2.6.2. AChE ve BChE enzim inhibisyon tayini

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçülmüştür (211). Enzim olarak elektrik balığından elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetilkolin iyodür ve bütirilkolin iyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5"-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakaların her bir kuyucuğuna 0,1 M pH=8 fosfat tamponundan 130 µL, 10 µL numune, AChE veya BChE çözeltisinden ise 20 µL ilave edildi. 25 °C de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 20 µL DTNB çözeltisi ve 20 µL asetilkoliniyodür veya bütirilkolin iyodür ilave edilmiştir. Sırasıyla asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlenmiştir.



Şekil 36. Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması

0,1 M H₂PO₄⁻ Çözeltisinin Hazırlanması: 1,56 g H₂PO₄⁻ tartılıp, 100 mL distile suda çözülür.

0,1 M HPO₄²⁻ Çözeltisinin Hazırlanması: 3,556 g HPO₄²⁻ tartılıp, 200 mL distile suda çözülür.

0,1 M pH=8 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 94,7 mL HPO₄²⁻ ve 5,3 mL H₂PO₄⁻ çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlanır.

0,1 M pH=7 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 3,9 mL H₂PO₄⁻ ve 6,1 mL HPO₄²⁻ çözeltilerinden alındıktan sonra 10 mL distile su eklenerek hazırlanır.

DTNB Çözeltisinin Hazırlanması: 16 mg DTNB 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde ve 7,5 mg NaHCO₃ 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırılır. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlanır. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edilir.

AChI: 32,8 mg asetilkolin iyodür alınarak, 8 mL deiyonize su eklenir. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlanır.

BChI: 4 mg Bütirilkolin iyodür alınarak, 8 mL deiyonize su eklenir. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlanır.

AChE Enzimi: 1,17 mg AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülür ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrılır. Her biri için 0,235 mg/mL'lik konsantrasyon sağlanmış olur. 8 mL distile su eklenmesi sonucu 125 µL'lik enzim çözeltileri elde

edilir. Her bir 125 µL'lik örnekte 0,02925 mg enzim bulunur. 125 µL'lik enzim çözeltisine 460 µL pH=8 tampon çözeltisi eklenir. 585 µL çözelti 25 µL'lik 23 küçük şişelere doldurulur ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletilir. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 3000 µL' ye tamamlanır.

BChE Enzimi: 1 mg BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülür. Bu çözeltiden 300 µL'lik stoklar oluşturularak küçük şişelere doldurulur ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletilir. Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1850 µL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.

Sonuçların hesaplanması:

Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\% inhibisyon = \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \times 100$$

A: Absorbans

2.6.3. 15-LOX enzim inhibisyon tayini

LOX enzimi üzerine etkileri Abnova firmasından temin edilen Lipoksijenaz İnhibitör tarama kiti kullanılarak (Katalog no: KA1329), üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. (http://www.abnova.com/protocol_pdf/DS_KA1329.pdf).

Test prensibi: Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit saflaştırılmış bir LO kullanarak lipoksijenasyon reaksiyonunda üretilen hidroperoksitleri saptar ve ölçer. Tespit reaksiyonu, yağ asidi içindeki çeşitli pozisyonlardaki hidroperoksitlere eşit derecede duyarlıdır ve herhangi bir karbon uzunluğundaki yağ asitleri ile çalışmaktadır. Bu nedenle, LO için genel bir saptama yöntemidir.

Reaktif Hazırlama: Lipoksijenaz İnhibitör Tarama Test Tamponu (10X)- 3 mL Test Tamponu konsantresini 27 mL ultra saf su ile seyreltilmiştir. Bu son 1X Test Tamponu (0,1 M Tris-HCl, pH 7,4), analiz işleminden önce numunelerin seyreltilmesi ve 15-LO standardı için kullanılmıştır. 4°C'de saklandığında, bu 1x test tamponu en az iki ay stabildir.

Kromojen; Kullanmadan önce kromojeni eşit hacimlerde geliştirme reaktifi 1 ve geliştirme reaktifi 2'yi bir test tüpünde karıştırarak ve vorteksleyerek hazırlanmıştır. Hazırlanacak kromojen hacmi, analiz edilecek mikrolak hücresi sayısı başına hesaplanır. Her hücre için 100 µL hesaplanır ve bir saat içinde kullanılmalıdır.

15-Lipoxygenase (Standard): Bir pozitif kontrol olarak 15-LO (soya fasulyesi) enziminin 10 µL'sini başka bir şişeye aktarılıp kullanımdan önce 990 µL 1x test tamponu ile seyreltilerek, buz üzerinde korunarak bir saat içinde kullanılmıştır.

Araşidonik Asit (Substrat): Etanol içinde bir arşidonik asit çözeltisi içerir ve kullanılmadığı zaman -20°C'de saklanmalıdır. Substrattan 25 µL'si başka bir şişeye aktararak, 25 µL 0,1 M Potasyum Hidroksit ile vorteks yapılmış 1 mM'lik bir çalışma konsantrasyonu elde etmek için 950 µL ultra saf su ile seyreltilmiştir. Hazırlanan arşidonik asit solüsyonunu 30 dakika içerisinde kullanılmıştır.

NDGA (Pozitif Kontrol İnhibitörü): 550 nmol seçici olmayan lipoksijenaz inhibitörü nordihidroguaiaretik asit (NDGA) çözeltisinden 1,1 mM stok yapmak için 500 µL 1x Test tamponu ile süspanse edilir. Analiz sırasında mikrolak hücrelerine 10 µL eklenerek 100 µM inhibitör nihai konsantrasyonu elde edilir.

Tablo 15. 15-LOX test prosedürü

Kuyu	Test tamponu (1x)	15-LO	Çözücü	İnhibitör
Negatif kontrol	100 µL	-	-	-
Pozitif kontrol	10 µL	90 µL	-	-
%100 ilk aktivite	-	90 µL	10 µL	-
İnhibitör	-	90 µL	-	10 µL

5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir.

Tüm kuyulara 10 µL substrat (Araşidonik veya Linoleik Asit) ekleyerek 10 dk. boyunca çalkalanarak reaksiyonu başlatılır.

Enzim katalizini durdurmak ve reaksiyonu geliştirmek için her kuyuya 100 µL Kromojen eklenir. Bir plaka kapağı ile örtülür ve 96 kuyulu plakayı beş dakika boyunca bir çalkalayıcıda karıştırılır.

490 nm de ölçüm alınır.

Sonuçların hesaplanması:

Negatif kontrol, %100 ilk aktivitesi (IA) ve inhibitör kuyularının ortalama absorbansını belirleyin.

%100 IA ve inhibitör kuyularının ortalama absorbansından negatif kontrol'ün ortalama absorbansını çıkarın.

$$\% inhibisyon = \frac{IA - \text{İnhibitör}}{IA} \times 100$$

2.7. Moleküler doking

Bu çalışmada Scripps Araştırma Enstitüsü'ndeki Olson'ın laboratuvarı tarafından geliştirilen küçük esnek ligandları sabit bir 3 boyutlu hedef yapıya yerleştirmeyi sağlayan AutoDock Vina yazılımı kullanılmıştır (212).

2.7.1. Ligandların hazırlanması

Bileşik yapıları SPARTAN'16 programıyla çizilmiştir. Moleküler mekanik yöntemiyle konformer taraması yapılmış. en iyi 50 konformer ile yarı-deneysel PM6 yöntemi kullanılarak bileşiklerin en kararlı konformasyonları seçilmiştir. Enerji değerleri birbirine yakın olan yapılar için M06-2X yöntemiyle DFT (Density Functional) yapılmıştır. Hazırlanan bileşikler pdb formatında kaydedilip. AutoDock Vina programında doking işlemine hazırlanarak pdbqt formatında kaydedilmiştir.

2.7.2. Proteinlerin hazırlanması

MAO-A için 2.2 Å çözünürlükteki 2Z5X kristal yapısı. MAO-B için 1.6 Å çözünürlükteki 2XFN kristal yapısı. AChE için 2.2 Å çözünürlükteki 4M0E kristal yapısı. BChE için 2.1 Å çözünürlükteki 4BDS kristal yapısı. 5-LOX için 2.4 Å çözünürlükteki 3O8Y kristal yapısı. 15-LOX-B için 2.63 Å çözünürlükteki 4NRE kristal yapısı protein veri bankasından pdb formatında indirilmiştir. Dimer yapılarıdaki (2XFN 4M0E ve 4NRE) chainlerden biri silinip monomer hale getirilen yapılar su, deterjan, inhibitör gibi moleküllerden temizlenmiştir. Elde edilen pdb formatındaki enzim dosyaları rijid doking işlemi için AutodockTools 1.5.6 programında (213) açılarak pdbqt formatına dönüştürülerek doking işlemine hazır hale getirilmiştir. Ayrıca pdb formatında kaydedilen aktif bölgesi boş olan enzim dosyaları esnek (flex) doking işlemi için AutodockTools 1.5.6 programında açılıp aktif bölge amino asitleri doking işleminde esnek olarak seçilmiş. dönebilen bağ sayıları tanımlanmış ve pdbqt formatında kaydedilmiştir.

Tablo 16. Enzimlerin aktif bölgesinde esnek olarak seçilen aminoasitler

MAO-A	MAO-B	AChE	BChE	5-LOX	15-LOXB
Tyr69	Tyr60	Tyr72	Asp70	Trp147	Glu369
Asn181	Cys172	Asp74	Trp82	Phe177	His373
Ile207	Ile198	Trp286	Gly115	Tyr181	His378
Phe208	Gln206	Ser293	Gly116	Thr364	Leu415
Gln215	Lys296	Val294	Glu197	Asn407	Leu419
Lys335	Tyr326	Phe295	Ser198	Leu420	Val426
Phe352	Phe343	Phe297	Ala328	Phe421	Thr431
Cys406	Cys397	Tyr337	Trp430	His432	Leu605
Tyr407	Tyr398	Phe338	Met437	Trp599	Ala606
Tyr444	Tyr435	Tyr341	His438	His600	Leu609

2.7.3. Konfigürasyon dosyaları

Doking işlemini yaparken komut istemini çalıştırmak için konfigürasyon dosyaları gereklidir. Konfigürasyon dosyasında doking işlemine hazırlanan ligand ve protein moleküllerinin adı proteinin aktif bölgesinde bağlanmanın gerçekleştiği atom merkez alınarak oluşturulan küpün boyutlarını ve merkez koordinatlarını tanımlayan parametreleri bulunur. Esnek doking işleminde ek olarak esnek seçilen aminoasitlerin bulunduğu flexible ve esnek seçilen aminoasitlerin dışındaki aminoasitleri içeren rijid dosyası pdbqt formatında oluşturulmuştur.

Tablo 17. Her izozim için oluşturulan küpün boyutlarını tanımlayan parametreler

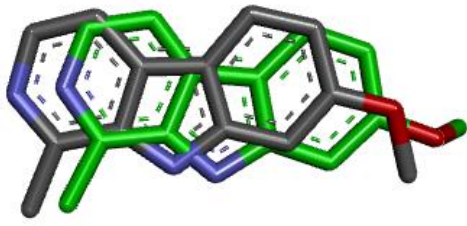
İzozim	x. y. z boyutu (Å)	x. y. z koordinatları
MAO-A	40x40x40	x:34.176 y:31.342 z:-14.785
MAO-B	40x40x40	x:55.199 y:150.457 z:21.281
AChE	60x60x60	x:-14.694 y:-42.429 z:26.174
BChE	60x60x60	x:131.493 y:115.592 z:42.71
5-LOX	40x40x40	x:-4.583 y:25.920 z:-0.113
15-LOXB	40x40x40	x:11.484 y:-55.195 z:-23.606

2.7.4. Doking işlemi

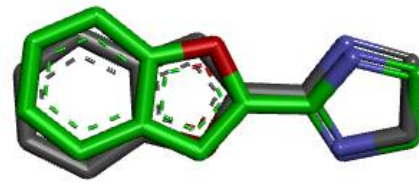
AutoDock Vina programı ile protein ve ligand dosyaları pdbqt formatında açılarak çalıştırılmış ve doking işlemi yapılmıştır. Her bileşik için bu hesaplama 10 kez tekrarlanmıştır. Ligandların enzimlere bağlanabileceği farklı konformasyon ve bağlanma enerjileri hesaplama sonucunda elde edilmiştir. Doking işleminin validasyonu enzimlerin kristal yapısında var olan inhibitörlerin doclanması ile elde edilen konformasyonların X-ray yapısından sapması incelenerek yapılmış RMSD değerleri incelenmiştir. Kristal yapı pozisyonları ile dok pozisyonları BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5- 2016 programı (Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio Modeling Environment. Release 2016. San Diego: Dassault Systèmes. 2016) kullanılıp üst üste karşılaştırılarak hata payının RMSD <2 kriterini sağlayıp sağlamadığı kontrol edilmiştir.

Tablo 18. Enzimlerin RMSD değerleri

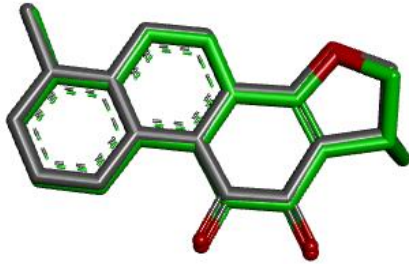
MAO-A	Harmin (RMSD değeri 1.194)
MAO-B	2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin (RMSD 1.594)
AChE	Dihydrotanshinone I (RMSD 0.150)
BChE	Tacrine (RMSD 0.457)
5-LOX	inhibitör bulunmadığından validasyon atlandı.
15-LOXB	(Hidroksietiloksi)-tri-(metiloksi) oktan (RMSD 1.726)



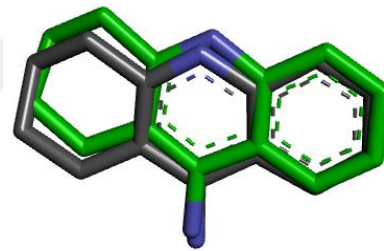
Harmin (RMSD 1.194)



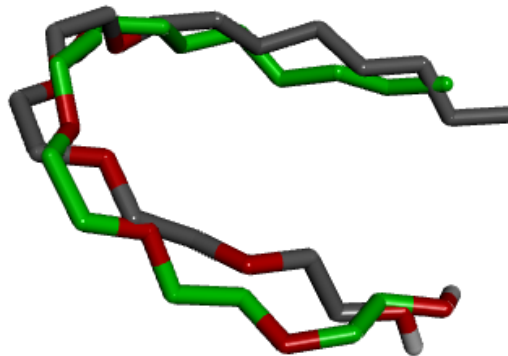
2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin
(RMSD 1.594)



Dihydrotanshinone I (RMSD 0.150)



Tacrine (RMSD 0.457)



(Hidroksietiloksi)-tri-(metiloksi) oktan (RMSD 1.726)

Şekil 37. Ligandların dok pozisyonları

Ligandların dok pozisyonları (C atomları yeşil) ile kristal yapı pozisyonlarının (C atomları gri) üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntüler.

2.7.5. Sonuçların görüntülenmesi

Docking işleminin ardından program tarafından yapılan hesaplamalar sonucunda rijid dokingde ligandın enzime bağlanabileceği konformasyonlar ile her birine ait bağlanma enerjilerinin olduğu pdbqt formatında out dosyası bağlanma enerjilerini ve bu enerjilerin karşılaştırmalarını içeren txt formatında log dosyası elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar AutoDockTools ile görüntülendikten sonra her bir ligand için en iyi bağlanan konformasyonlar seçilmiştir ve Discovery Studio görüntüleme programı ile enzim-ligand etkileşimleri (etkileşim mesafeleri, etkileşim çeşidi vs.) incelenmiştir. Moleküler doking işlemi akış şeması Şekil 38’de verilmiştir.



Şekil 38. Moleküler doking işlemi akış şeması

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Biyoaktif Fitokimyasal İçerik Sonuçları

Doğadan toplanan bitkilerde belirli bir standardizasyon bulunmadığı için toplanan tüm bitkiler aynı kalitede olmayıp, etkin maddesi de farklı oranlarda olmaktadır. Bitkilerin kimyasal yapısı içinde bulunan etkili bileşiklerin tayini tıbbi ve aromatik bitkilerin ilaç değerini ve tedavide kullanım potansiyellerini ortaya koymaktadır.

3.1.1. Yağ asiti kompozisyonları

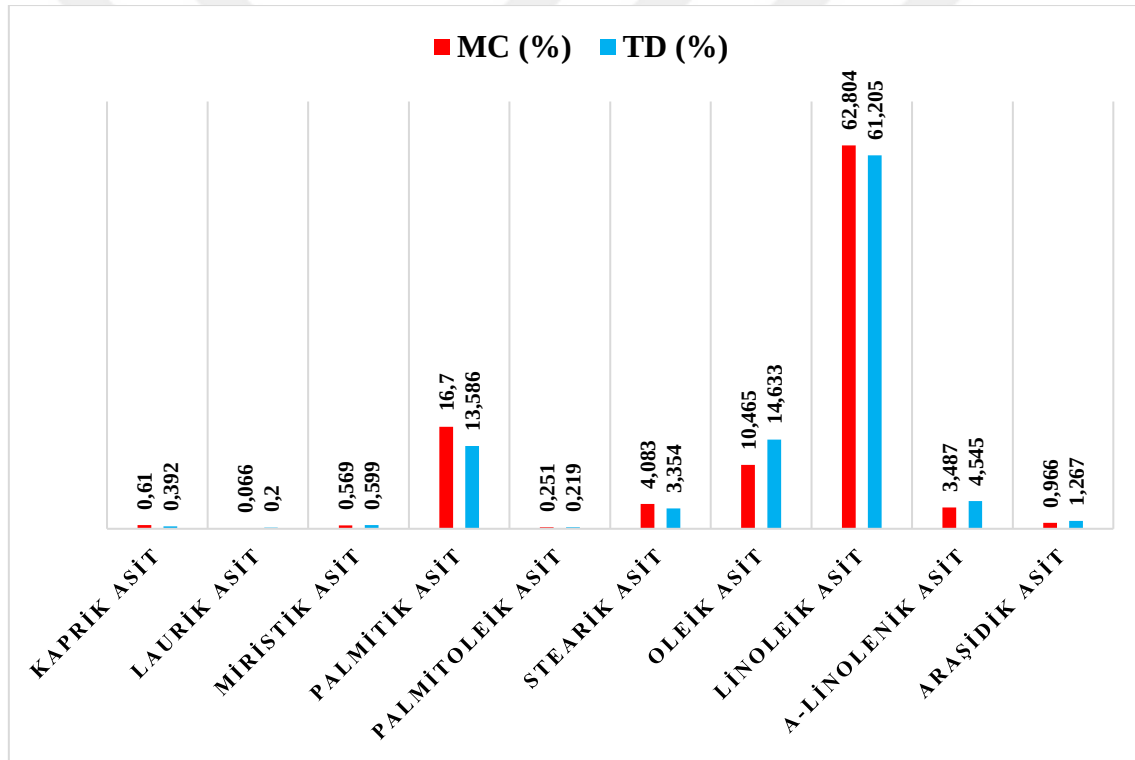
Papatya türlerinin yağ asitleri analizleri GC-FID/MS tekniği ile yapılmış, birbirinden farklı 10 adet bileşik (kaprik asit, laurik asit, miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, α -Linolenik asit ve araşidik asit) Tablo 19’da tanımlanmıştır. MC ve TD'nin yağ asiti kompozisyonları grafiği Şekil 39’da verilmiştir.

Tablo 19. MC ve TD’nin yağ asiti kompozisyonları

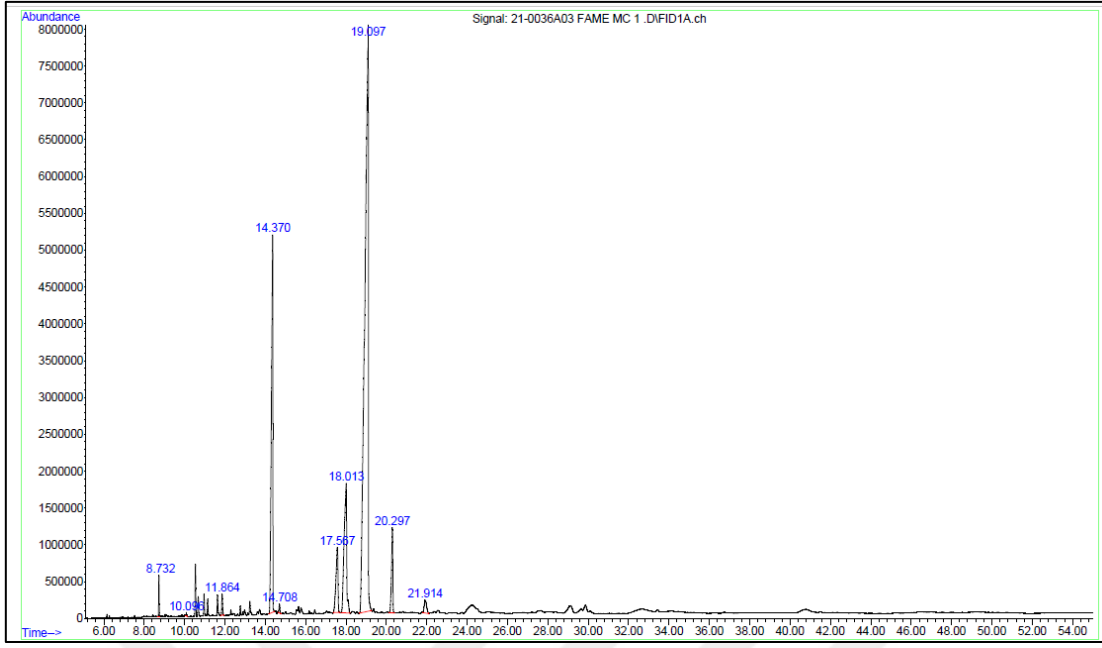
RT (dk.)	RRI	Yağ asiti	MC (%)	TD (%)
8.732	1604	C (10:0) Kaprik asit	0,610	0,392
10.096	1807	C (12:0) Laurik asit	0,066	0,200
11.864	2014	C (14:0) Miristik asit	0,569	0,599
14.370	2223	C (16:0) Palmitik asit	16,700	13,586
14.708	2229	C (16:1) Palmitoleik asit	0,251	0,219
17.567	2445	C (18:0) Stearik asit	4,083	3,354
18.013	2472	C (18:1) Oleik asit	10,465	14,633
19.097	2502	C (18:2) Linoleik asit	62,804	61,205
20.297	2536	C (18:3) α -Linolenik asit	3,487	4,545
21.914	2615	C (20:0) Araşidik asit	0,966	1,267
<i>Doymuş yağ asidi toplamı</i>			22,384	18,131
<i>Doymamış yağ asidi toplamı (SAFA)</i>			77,616	81,869
<i>Çoklu doymamış yağ asidi ω-3 (PUFA)</i>			3,487	4,545
<i>Çoklu doymamış yağ asidi ω-6 (PUFA)</i>			62,804	61,205
<i>Tekli doymamış yağ asidi ω-9 (MUFA)</i>			10,716	14,852
Toplam			99,391	98,733
Yağ verimi %			5,2	2,4

Tanımlanan bileşenler, bitkilerin içeriğine göre %0,2 – 62,8 oranında değişmektedir. İki türde de baskın olarak linoleik asit ve palmitik asit tespit edilmiştir. Ayrıca %3-5 arasında değişen oranlara değerli bir FA olan omega-3 yağ asiti α -Linolenik asiti içerdiği tespit edilmiştir. Yağ asitlerinin kompozisyonları bitki türlerine özgü ekolojik ve diğer birçok faktörün dışında genotipe bağlı olarak karakteristik farklılıklar göstermektedir.

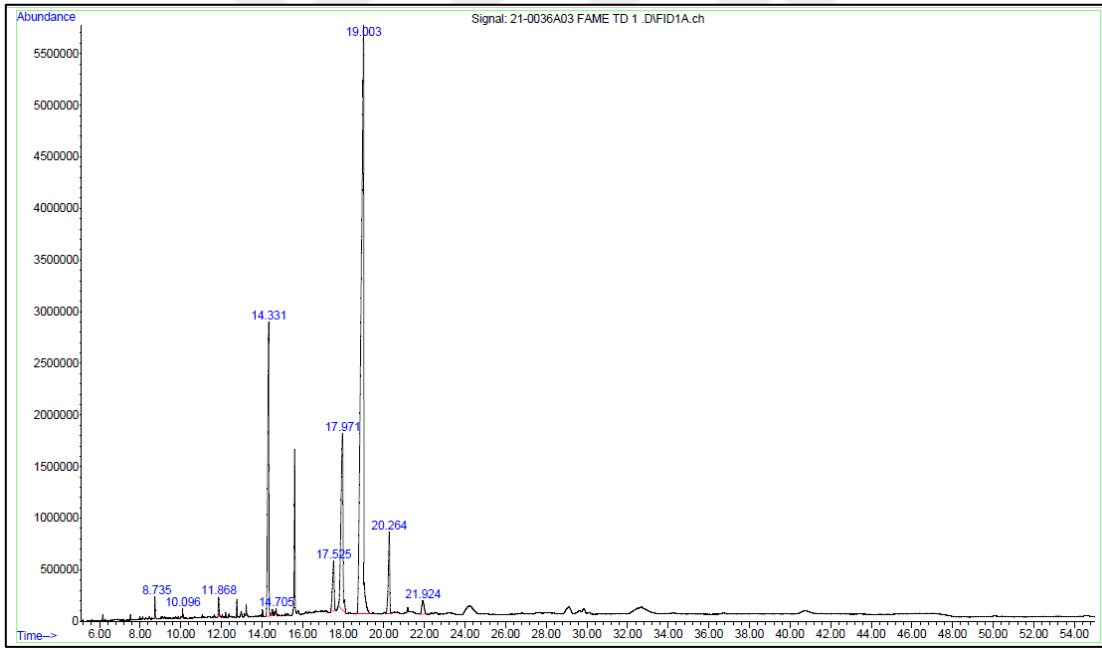
Yapılan literatür taramaları neticesinde elde edilen bulgular iki türün yağ asiti kompozisyonu araştırmaları için kloroform/metanol kombinasyonu içeren çözgen sistemleri kullanmış olmaları nedeni ile içerik değerlendirmesi ve yüzde oranları bakımından farklılık göstermektedir (27, 68).



Şekil 39. MC ve TD'nin yağ asiti kompozisyonları grafiği



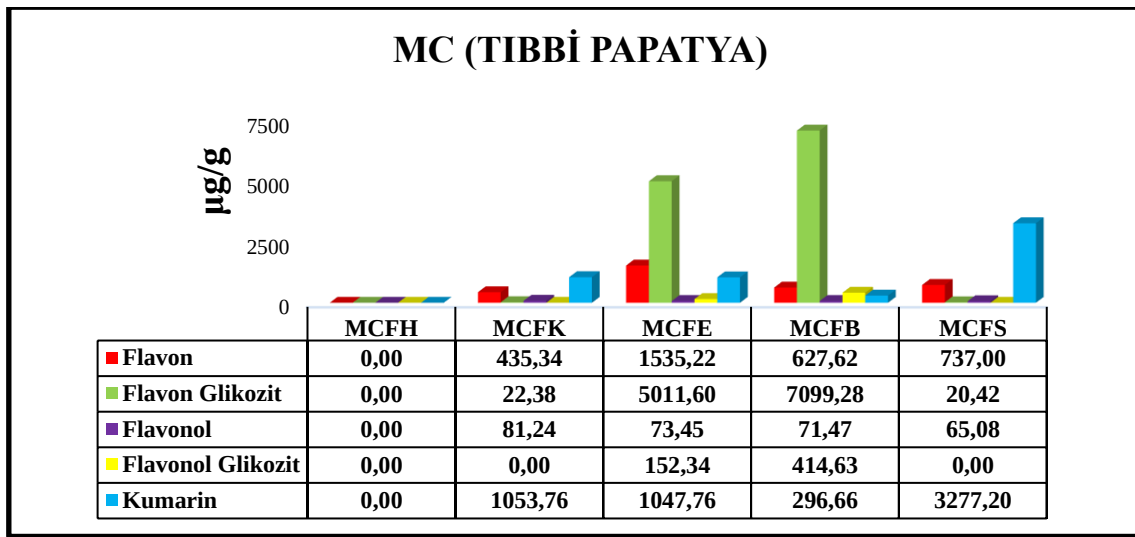
Şekil 40. MC'nin GC-FID kromatogramı



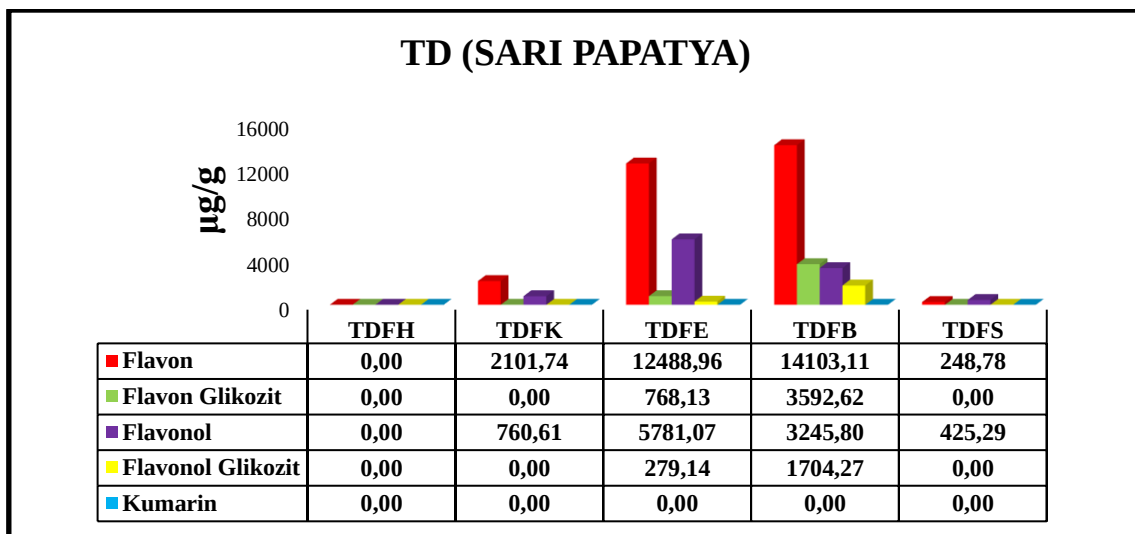
Şekil 41. TD'nin GC-FID kromatogramı

3.1.2. Ekstrelerin biyoaktif fitokimyasal içerikleri

Papatya bitki türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan MCFH, MCFK, MCFE, MCFB, MCFS, MCD, MCA, MCHA, TDFH, TDFK, TDFE, TDFB, TDFS, TDD, TDA, TDHA özütlerin on sekiz farklı biyoaktif sekonder metabolit bileşik içeriği bakımından LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu bileşenler 3 adet flavon (apigenin, luteolin, genkvanin), 3 adet flavon-glikozit (apigetrin, sinarozit, homoplantagin), 4 adet flavonol (kersetin, kemferol, izorhamnetin, mirisetin), 4 adet flavonol-glikozit (izokersetin, rutin hidrat, mirisitrin, astragalin) ve 4 adet kumarinler (kumarin, umbelliferon, herniarin, eskuletin)’den oluşmaktadır.

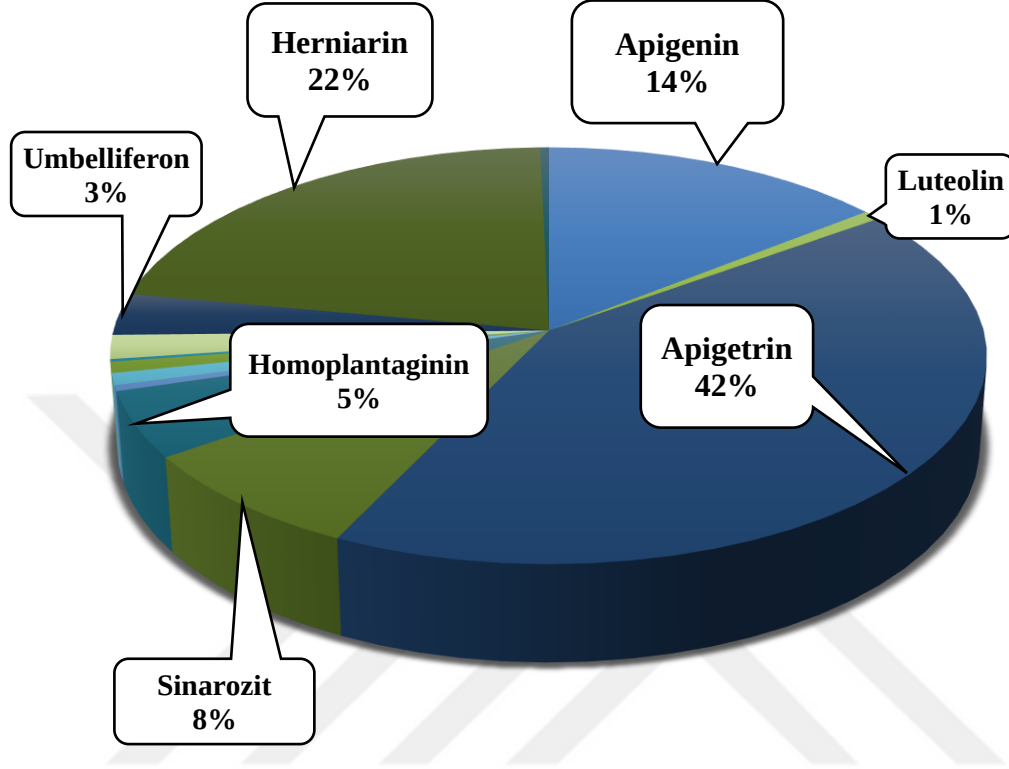


Şekil 42. MC’nin ikincil metabolit içerik sınıflandırması



Şekil 43. TD’nin ikincil metabolit içerik sınıflandırması

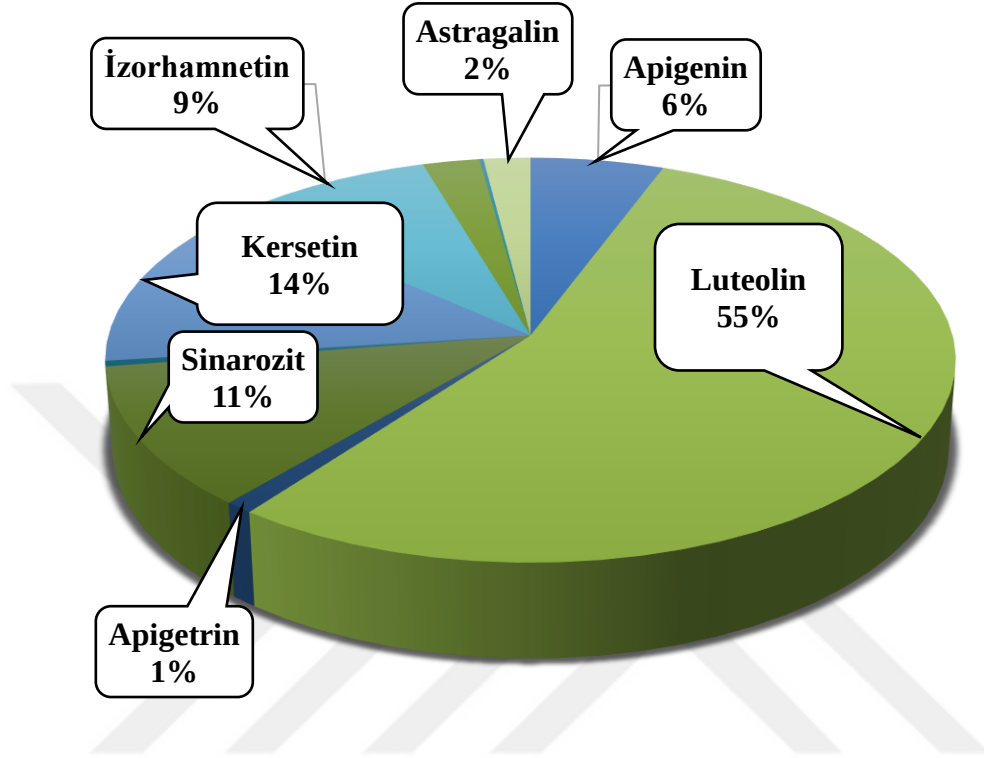
MC (TIBBİ PAPATYA)



■ Apigenin	■ Luteolin	■ Genkvanin
■ Apigetrin	■ Sinarozit	■ Homoplantaginin
■ Kersetin	■ Kemferol	■ İzorhamnetin
■ Mirisetin	■ İzokersetin	■ Rutin
■ Mirisitrin	■ Astragalin	■ Kumarin
■ Umbelliferon	■ Herniarin	■ Eskuletin

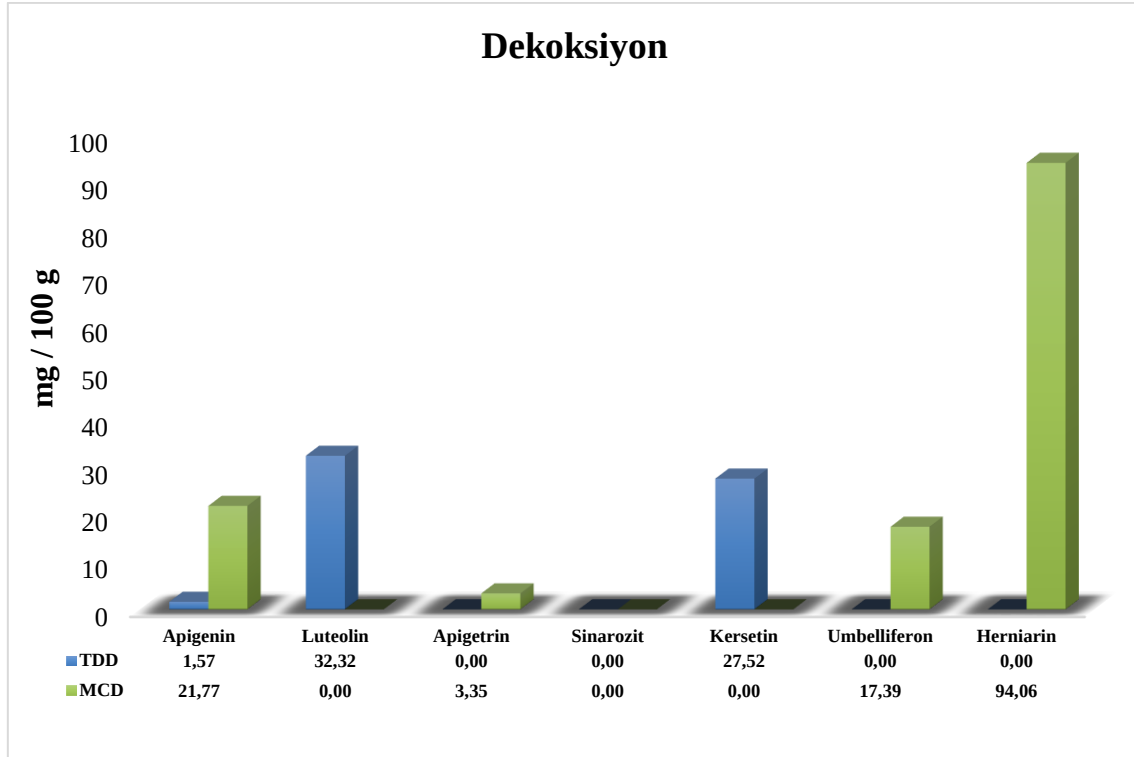
Şekil 44. MC'nin majör biyoaktif fitokimyasalları

TD (SARI PAPATYA)

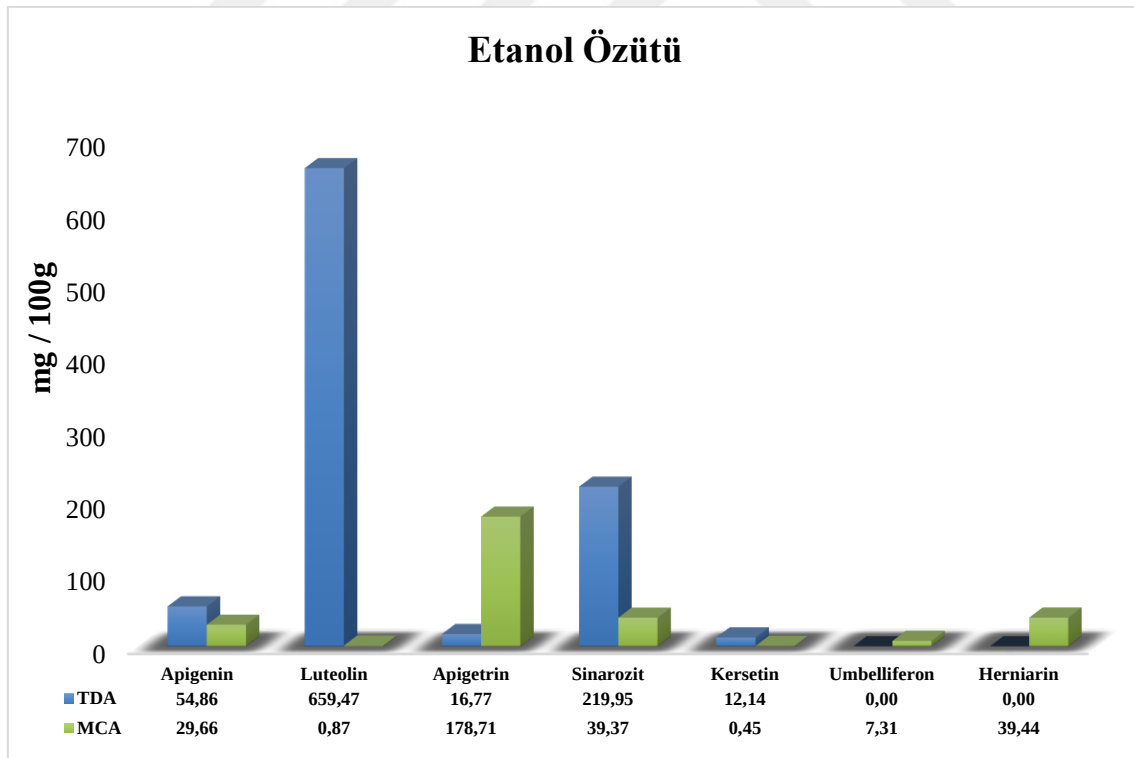


■ Apigenin	■ Luteolin	■ Genkvanin
■ Apigetrin	■ Sinarozit	■ Homoplantaginin
■ Kersetin	■ Kemferol	■ İzorhamnetin
■ Mirisetin	■ İzokerketin	■ Rutin
■ Mirisitrin	■ Astragalin	■ Kumarin
■ Umbelliferon	■ Herniarin	■ Eskuletin

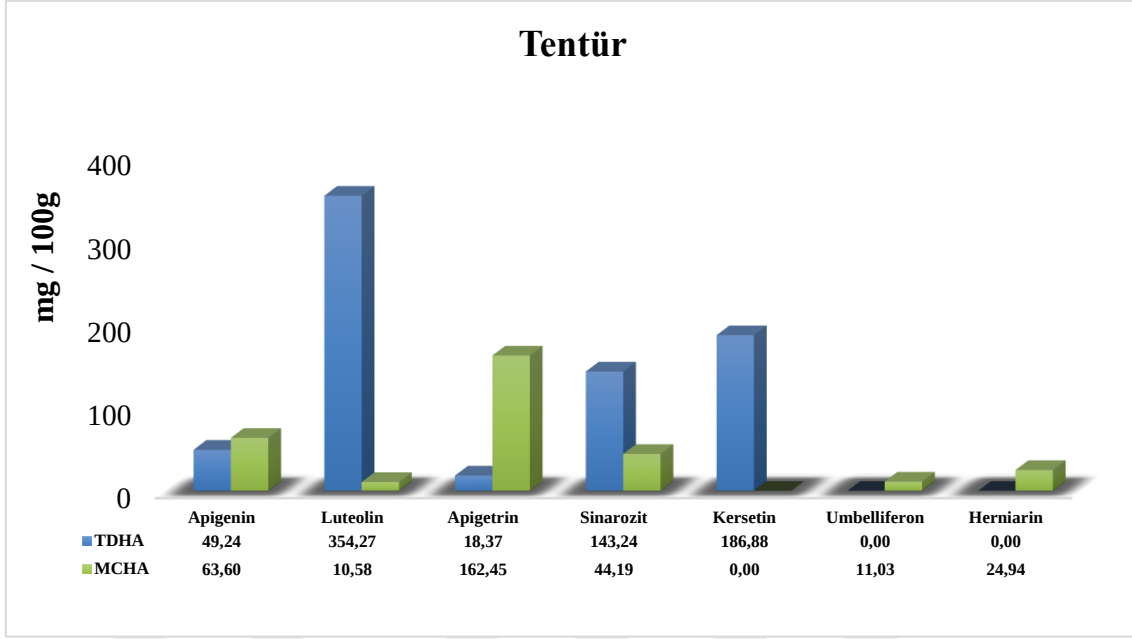
Şekil 45. TD'nin majör biyoaktif fitokimyasalları



Şekil 46. MC ve TD'nin Dekoksiyonun'un majör bileşenleri



Şekil 47. MC ve TD'nin Etanol özütünün majör bileşenleri



Şekil 48. MC ve TD'nin Tentür formunun majör bileşenleri

Yapılan kromatografik çalışmalarda MC özütlerinde yoğun olarak flavon, flavon glikozit ve kumarin bileşikleri baskın iken, TD özütlerinde flavon, flavon glikozit ve flavonol bileşikleri baskın gelmiş ve tarama yapılan kumarin bileşiklerine rastlanmamıştır. MC özütleri en yüksek oranda flavon glikozitler içermekteyken TD özütlerinin fraksiyonları değerlendirildiğinde flavon sınıfı ikincil metabolitler daha yüksek oran oluşturmaktadır.

Bitkilerin dekoksasyon özütleri kıyaslandığında MCD özütü apigenin, apigetrin, herniarin ve umbelliferon bileşenleri ön plana çıkarken TDD özütü, luteolin ve kersetin içeriğiyle ön plana çıkmaktadır.

Bitkilerin etanol özütleri kıyaslandığında alkol çözünürlüklerinin suya oranla daha iyi olmasından kaynaklanan etki ile biyoaktif fitokimyasal içeriklerinde diğer özütlere göre içerdikleri majör fitokimyasalların çoğunda 10 kattan fazla artış gösterdiği gözlenmiştir. TDA özütü MCA dan yüksek oranda fitokimyasal içerdiği tespit edilmiştir.

Literatür taramalarında TD (sarı papatya) için herhangi bir biyoaktif fitokimyasal içerik çalışmasına rastlanmamış olup, MC (tıbbi papatya) için bulunan literatürlerin değerlendirilmeleri sonucunda apigenin ve apigetrin türevleri ana bileşen olup fenolik asit ve kumarin türevleri de içerdiği literatürde bildirilmiştir. İçerik Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. MC'nin Kütle Spektroskopisi ile yapılan nicel ve nitel analizlerinin literatür değerlendirmesi

Özüt	Cihaz	Metot	Analiz edilen bileşen	Kaynak
Metanol	HPLC-ESI-MS $\lambda = 335$ nm	A: su (pH 2.5) B: asetonitril Gradyan sistemi: 50 dakika içinde %92 A (0 dakika), %30 A Akış hızı: 0.4 mL/dak; Intersil C3 kolon (3 μ m, 150 mm x 3.0 mm, i.d)	Nitel ve nicel analiz 3-O-kafeoilkuinik asit, 4-O-kafeoilkuinik asit, 5-O-kafeoilkuinik asit, kuinik asit ve türevleri, ferulik asit-l-O-glikozit, ferulik asit 7-O-glikozit, kersetin 3-O-galaktozit, kersetin 7-O-glukozit, patuletin 7-O-glukozit, 1,3-O-dikaffeoilkuinik asit, apigetrin, kersetin türevi, luteolin 4'-O-glukozit, apigenin 7-O-glukosil-2"-asetat, apigenin 7- O-glukosil-6"-asetat, apigenin 7-O-glukosil-diasetat, apigenin, luteolin 7-O-rutinoz Ana bileşen(ler): çiçeklerinde apigenin glikozit türevleri (%68,6).	(214)
	HPLC-ESI-MS $\lambda = 335$ nm	A: su B: asetonitril İzokratik sistem: A-B, (70:30,v/v);Akış hızı: 1 mL/dak ; C18 Kolon	Nitel ve nicel analiz Apigetrin ve apigenin türevleri Ana bileşen(ler): Apigetrin (sulu özde %58,61).	(29)
Ticari çay ürünleri	HPLC-UV/Vis $\lambda = 306-370$ nm HPLC-ESI-MS-MS	A: su (%0,1 formik asit) B: asetonitril Gradyan sistemi: %1 B (0-2 dk), B'den %31'e doğrusal bir gradyan (2-80 dakika), B'den %95'e (80-83 dakika), %95 B'ye (83-90 dakika) doğrusal bir gradyan Akış hızı: 0,3 mL/dak Agilent Zorbax 300 SB-C18 kolon (5 μ m, 150 mm x 2.1 mm, i.d)	Nitel ve nicel analiz neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asit, ferulik asit glikozitler, kersetin galaktozit, kersetin glikozit, luteolin glikozit, 3,4-O-dikaffeoil kuinik asit 3,5-O-dikaffeoil kuinik asit, 4,5-O-dikaffeoil kuinik asit, apigenin asetilglukozit, apigenin glukozit Ana bileşen(ler): dikaffeoilkuinik asitler (1,7-30,4 mg/200 mL); ferulik asit glikozitler (1,0-18,0 mg/200 mL); apigenin glukozitleri (0,6-10,2 mg/200 mL).	(32)

Tablo 21. MC (Tıbbi Papatya) özütlerinin biyoaktif fitokimyasal içerikleri, (µg/g özüt)

BİYOAKTİF FİTOKİMYASAL	MCFH	MCFK	MCFE	MCFB	MCFS	MCD	MCA	MCHA
Flavon								
Apigenin	<LOQ	435,34±4,76	1465,83±53,64	617,38±20,81	703,78±14,66	217,72±8,11	296,55±19,81	635,98±24,58
Luteolin	<LOQ	<LOQ	69,39±1,53	10,24±0,89	33,22±3,02	<LOQ	8,67±0,55	105,84±3,04
Genkvanin	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavon Glikozit								
Apigetrin	-	22,38±1,29	4194,69±24,63	5141,85±30,54	20,42±1,09	33,48±1,88	1787,07±34,71	1624,51±46,41
Sinarozit	-	-	404,22±13,17	1243,42±21,38	-	-	393,72±18,51	441,94±13,35
Homoplantagin	-	-	412,69±26,26	714,01±27,83	-	4,58±0,46	198,63±7,34	235,41±19,75
Flavonol								
Kersetin	-	-	32,58±1,54	24,47±1,50	34,36±0,94	-	45,36±2,40	-
Kemferol	-	-	-	-	-	-	-	-
İzorhamnetin	-	81,24±2,99	40,87±3,52	47,00±1,71	30,72±1,49	-	79,21±3,21	-
Mirisetin	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonol Glikozit								
İzokersetin	-	-	32,90±2,96	129,74±3,36	-	-	55,58±2,79	43,22±2,33
Rutin	-	-	-	40,63±3,16	-	-	18,21±1,08	-
Mirisitrin	-	-	-	-	-	-	-	-
Astragalin	-	-	119,44±3,11	244,26±4,16	-	<LOQ	92,17±3,19	110,07±4,93
Kumarin								
Kumarin	-	-	-	-	-	-	-	-
Umbelliferon	-	324,91±5,93	151,54±2,65	11,54±0,93	141,27±2,35	173,85±2,28	73,14±2,49	110,32±2,55
Herniarin	<LOQ	728,85±7,63	896,22±7,29	285,12±4,67	3135,93±32,90	940,62±4,98	394,35±5,76	249,35±4,06
Eskuletin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	110,09±5,95	<LOQ	<LOQ
Toplam (µg/g)	0	1592,72	7872,3	9277,47	4099,7	1481,62	4455,25	4869,94

LOQ: Tespit limiti.

Tablo 22. TD (Sarı Papatya) özütlerinin biyoaktif fitokimyasal içerikleri, (µg/g özüt)

BİYOAKTİF FİTOKİMYASAL	TDFH	TDFK	TDFE	TDFB	TDFS	TDD	TDA	TDHA
Flavon								
Apigenin	-	479,12±16,30	1282,79±48,54	1008,90±28,28	<LOQ	15,74±2,72	548,57±30,70	492,36±27,28
Luteolin	<LOQ	1622,62±7,94	11206,17±7,94	13094,21±84,64	248,78±9,44	323,23±11,26	6594,74±18,29	3542,70±51,54
Genkvanin	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavon Glikozit								
Apigetrin	-	-	48,33±1,66	247,81±4,03	-	-	167,73±6,69	183,68±9,58
Sinarozit	-	-	719,80±43,93	3259,38±28,52	<LOQ	<LOQ	2199,54±56,10	1432,43±34,74
Homoplantaginin	-	-	-	85,43±5,29	-	-	104,60±8,35	103,55±4,19
Flavonol								
Kersetin	-	200,46±4,28	3679,27±37,82	1604,90±40,66	227,04±4,71	275,17±4,05	1214,09±8,82	1868,78±53,86
Kemferol	-	-	-	-	-	-	-	-
İzorhamnetin	-	560,15±27,10	2101,80±29,90	1640,90±18,45	198,25±8,80	202,79±4,33	730,27±11,95	535,30±13,57
Mirisetin	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonol Glikozit								
İzokersetin	-	-	66,48±3,62	1124,13±23,58	-	-	206,31±10,77	234,79±5,14
Rutin	-	-	-	30,26±1,45	-	-	29,71±2,07	53,94±2,89
Mirisitrin	-	-	-	-	-	-	-	-
Astragalin	-	-	212,66±4,21	549,88±6,24	-	-	344,29±1,83	235,94±5,58
Kumarin								
Kumarin	-	-	-	-	-	-	-	-
Umbelliferon	-	-	-	-	-	-	-	-
Herniarin	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskuletin	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam (µg/g)	0	2862,35	19317,3	23073,69	674,07	816,93	13051,4	8931,19

LOQ: Tespit limiti.

3.1.3. Metot validasyon

LOD ve LOQ değerleri: Tablo EK-2 incelendiğinde LOQ değerleri En düşük seviye kalibrasyon çözeltisinin kütle kesri olduğu görülmektedir. Bu durumda metot performans kabul kriterinin sağlandığı gözlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik ve Doğruluk : Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik parametreleri 3 farklı konsantrasyon noktasında analizler 6 kez tekrar edilerek elde edilen bulguların %RSD değerleri değerlendirilmiştir. Doğruluk için 3 farklı konsantrasyonda kalibrasyon noktasının %RSD değerleri değerlendirilmiştir. EK-3'deki tablo incelendiğinde $RSD_{\text{tekrarlanabilirlik}}$ ve $RSD_{\text{arakesinlik}}$ değerleri metot performans kabul kriteri olarak belirlenen %2'den küçük olduğundan kriterin sağlandığı gözlenmiştir. EK-4'deki tablo incelendiğinde $RSD_{\text{doğruluk}}$ metot performans kabul kriteri olarak belirlenen %2'den küçük olduğundan kriterin sağlandığı gözlenmiştir.

Geri kazanım: Her bir bitkiye 3 farklı konsantrasyonda kalibrasyon noktası spike edilmiş. Elde edilen dataların %80-110 arasında olması değerlendirilmiştir. EK-5'deki tablo incelendiğinde Metot performans kabul kriteri olarak belirlenen geri kazanım değerleri metot performans kabul kriteri olarak belirlenen % 80-110 aralığında olduğundan kriterin sağlandığı gözlenmiştir.

Doğrusallık ve metot çalışma aralığı: Yapılan çalışmada kullanılan analit karışımı için aşağıdaki tabloda verilen derişim aralıklarında 7 noktalı farklı seviye kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. Numunelere EK-7 'daki tabloda derişimi belirtilen iç standart çözeltisi ilave edilmiştir. Eğrinin şeklinin ve eğimlerinin kıyaslanması için 2 gün kalibrasyon grafiğı hazırlanmıştır. EK-6'deki tablodan da görüleceğı üzere her bir analit için farklı günlerde çizilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları (R^2 değerleri) metot performans kabul kriteri olarak belirlenen $R^2 \geq 0,98$ kriterini sağlamıştır.

3.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları

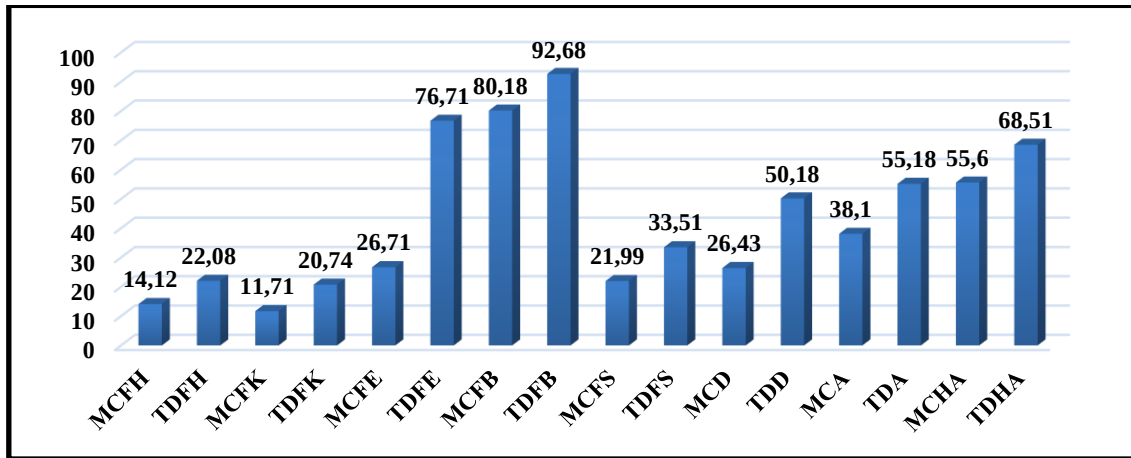
Tüm özütlerin toplam fenolik ve toplam flavonoit içerikleri sırasıyla gallik asit ve kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. DPPH CUPRAC ve ABTS antioksidan kapasiteleri gram ekstre başına mol trolox'a eşdeğer olarak belirlenmiştir.

3.2.1. Toplam fenolik

Ekstraktların toplam fenolik madde içeriği folin yöntemi göre gallik asit'e eşdeğer olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 23'te verilmiştir. Absorbans = 0,0042[gallik asit (mg)]- 0,0051 (r^2 : 0,9991). Özütlerin toplam fenolik miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak; 11,71±0,05-92,68±0,28 mg/g bulunduğu tespit edilmiştir.

Tablo 23. MC ve TD'nin toplam fenolik içerik sonuçları

Toplam Fenolik (mg gallik asit eşdeğer/g özüt)			
Özüt	mg /g	Özüt	mg /g
MCFH	14,12 ± 0,03	TDFH	22,08 ± 0,09
MCFK	11,71 ± 0,05	TDFK	20,74 ± 0,08
MCFE	26,71 ± 0,11	TDFE	76,71 ± 0,21
MCFB	80,18 ± 0,23	TDFB	92,68 ± 0,28
MCFS	21,99 ± 0,09	TDFS	33,51 ± 0,12
MCD	26,43 ± 0,09	TDD	50,18 ± 0,11
MCA	38,10 ± 0,11	TDA	55,18 ± 0,11
MCHA	55,60 ± 0,11	TDHA	68,51 ± 0,23



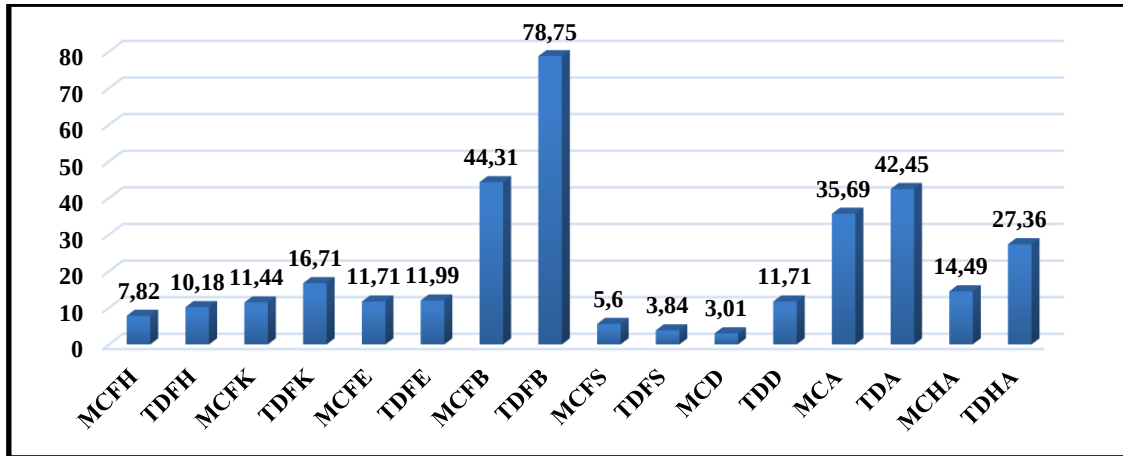
Şekil 49. Toplam Fenolik (mg gallik asit eşdeğer/g özüt)

3.2.2. Toplam flavonoit

Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları alüminyum klorit yöntemine göre kersetin'e eşdeğer olarak yapılmıştır. Elde edilen bulgular Tablo 24'te verilmiştir. Absorbans = 0,0077[kersetin (mg)] + 0,0012 (r^2 : 0,9998). Özütlerin toplam flavonoit içeriklerinin kersetin eşdeğeri olarak; $3,01 \pm 0,16$ - $78,75 \pm 0,53$ mg/g aralığında bulunduğu tespit edilmiştir.

Tablo 24. MC ve TD'nin toplam flavonoit içerik sonuçları

Toplam Flavonoit (mg kersetin eşdeğer/g özüt)			
Özüt	mg /g	Özüt	mg /g
MCFH	$7,82 \pm 0,05$	TDFH	$10,18 \pm 0,23$
MCFK	$11,44 \pm 0,04$	TDFK	$16,71 \pm 0,09$
MCFE	$11,71 \pm 0,11$	TDFE	$11,99 \pm 0,31$
MCFB	$44,31 \pm 0,24$	TDFB	$78,75 \pm 0,53$
MCFS	$5,60 \pm 0,13$	TDFS	$3,84 \pm 0,21$
MCD	$3,01 \pm 0,16$	TDD	$11,71 \pm 0,21$
MCA	$35,69 \pm 0,35$	TDA	$42,45 \pm 0,45$
MCHA	$14,49 \pm 0,28$	TDHA	$27,36 \pm 0,11$



Şekil 50. Toplam Flavonoit (mg kersetin eşdeğer/g özüt)

3.2.3. DPPH, CUPRAC ve ABTS antioksidan aktivite sonuçları

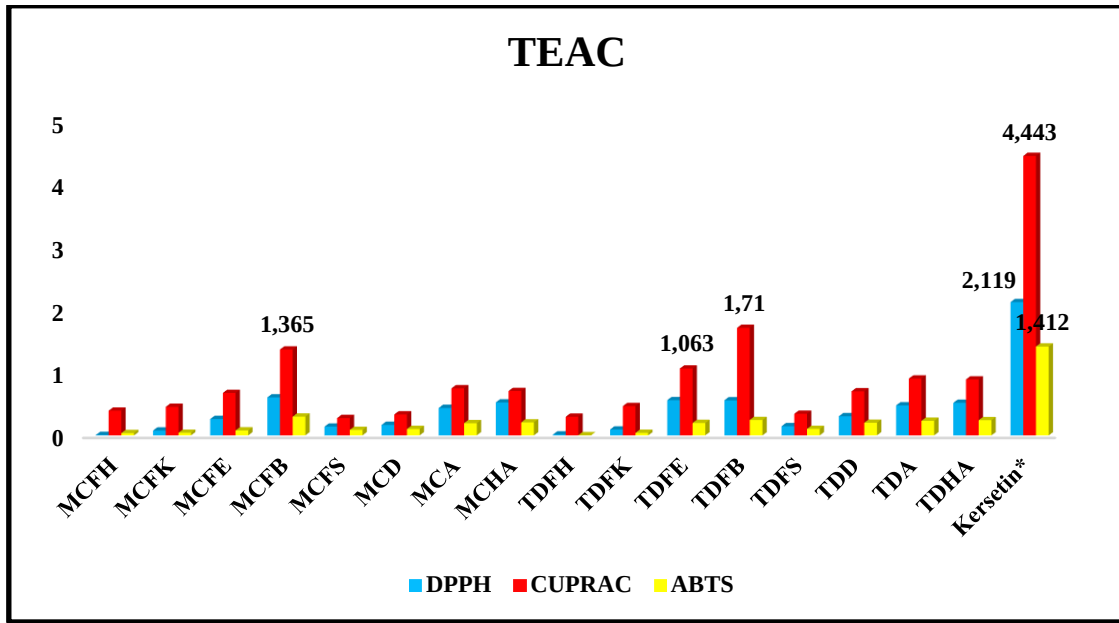
En çok kullanılan radikal süpürücü aktivitelerden olan DPPH, CUPRAC ve ABTS yöntemleri troloks'a eşdeğer olarak yapılmıştır. Elde edilen bulgular Tablo 25'te verilmiştir.

Tablo 25. TEAC antioksidan aktivite sonuçları

	TEAC_{DPPH} (mol TR/g özüt)	TEAC_{CUPRAC} (mol TR/g özüt)	TEAC_{ABTS} (mol TR/g özüt)
MCFH	0,007 ± 0,002	0,393 ± 0,011	0,036 ± 0,003
MCFK	0,076 ± 0,004	0,453 ± 0,026	0,041 ± 0,009
MCFE	0,260 ± 0,002	0,674 ± 0,030	0,078 ± 0,004
MCFB	0,603 ± 0,006	1,365 ± 0,065	0,298 ± 0,013
MCFS	0,138 ± 0,004	0,275 ± 0,018	0,087 ± 0,004
MCD	0,166 ± 0,004	0,333 ± 0,021	0,101 ± 0,006
MCA	0,436 ± 0,007	0,748 ± 0,054	0,193 ± 0,001
MCHA	0,523 ± 0,008	0,705 ± 0,075	0,206 ± 0,006
TDFH	0,014 ± 0,003	0,296 ± 0,018	0,002 ± 0,001
TDFK	0,093 ± 0,006	0,466 ± 0,024	0,040 ± 0,004
TDFE	0,559 ± 0,004	1,063 ± 0,068	0,197 ± 0,008
TDFB	0,557 ± 0,007	1,710 ± 0,097	0,244 ± 0,024
TDFS	0,145 ± 0,007	0,343 ± 0,026	0,102 ± 0,002
TDD	0,304 ± 0,004	0,700 ± 0,032	0,200 ± 0,007
TDA	0,476 ± 0,006	0,903 ± 0,060	0,231 ± 0,027
TDHA	0,517 ± 0,006	0,889 ± 0,077	0,242 ± 0,001
Kersetin*	2,119 ± 0,006	4,443 ± 0,032	1,412 ± 0,015

*: Standart

Tüm bitki özütlerinin elektron transferine dayanan reaksiyon mekanizmasına göre çalışan DPPH, ABTS ve CUPRAC antioksidan kapasiteleri gram ekstre başına mol trolox'a eşdeğer olarak belirlenmiştir. Özütlerin DPPH aktivite kapasitesi $0,007 \pm 0,002$ - $0,603 \pm 0,006$ mol TR/g aralığında, CUPRAC aktivite kapasitesi $0,275 \pm 0,018$ - $1,710 \pm 0,097$ mol TR/g aralığında ABTS radikali giderme aktivitesi $0,002 \pm 0,001$ - $0,298 \pm 0,013$ mol TR/g aralığında, tespit edilmiştir. Bitkilerin aktivite sonuçları standart olarak kullanılan kersetin'e göre mukayese edilmiştir.



Şekil 51. Antioksidan sonuçlarına ait grafik (mol TR/g özüt)

3.3. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Sonuçları

Antibakteriyel etkinlikleri *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde disk difüzyon ve MİK testleri ile incelenmiş elde edilen bulgular Şekil 53 ve 54'te verilmiştir.

3.3.1. Disk difüzyon

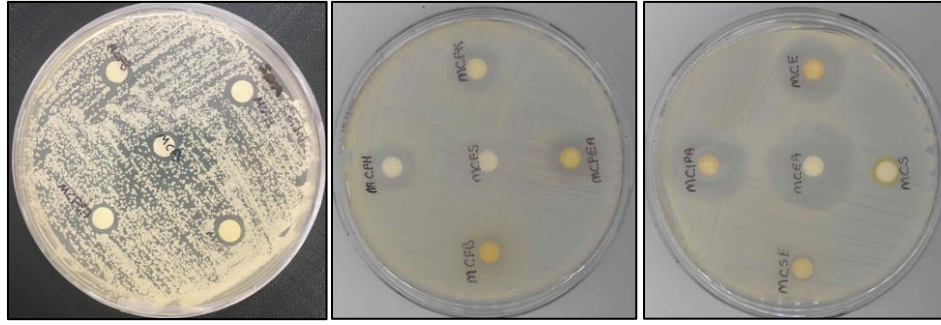
Disk Difüzyon Testi (EUCAST) Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi prosedürüne göre yapılmıştır. Bulgular Tablo 26'te verilmiştir.

Tablo 26. MC ve TD'nin antibakteriyel-antifungal disk difüzyon zon (mm) sonuçları

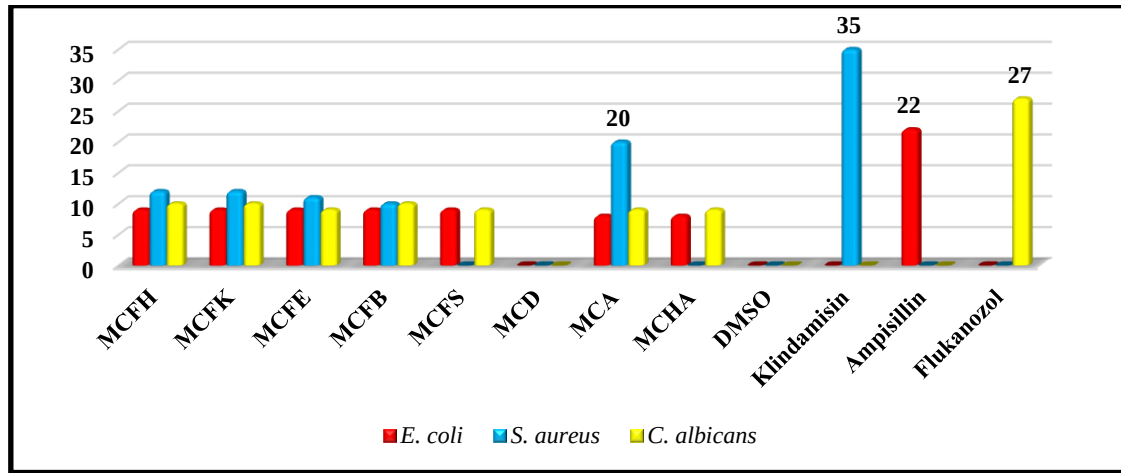
µg/disk	Özüt	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
200	MCFH	D	D	D
200	MCFK	D	D	D
200	MCFE	D	D	D
200	MCFB	D	D	D
200	MCFS	D	-	D
200	MCD	-	-	-
200	MCA	D	20	D
200	MCHA	D	-	D
200	TDFH	D	15	D
200	TDFK	D	D	D
200	TDFE	D	D	D
200	TDFB	D	D	D
200	TDFS	D	-	-
200	TDD	-	-	-
200	TDA	D	D	D
200	TDHA	-	-	-
200	DMSO*	-	-	-
2	Klindamisin**	NT	35	NT
10	Ampisillin**	22	NT	NT
50	Flukanozol**	NT	NT	27

*: Negatif kontrol; **: Pozitif kontrol; NT: Test edilmedi; (-): Zon gözlenmedi.

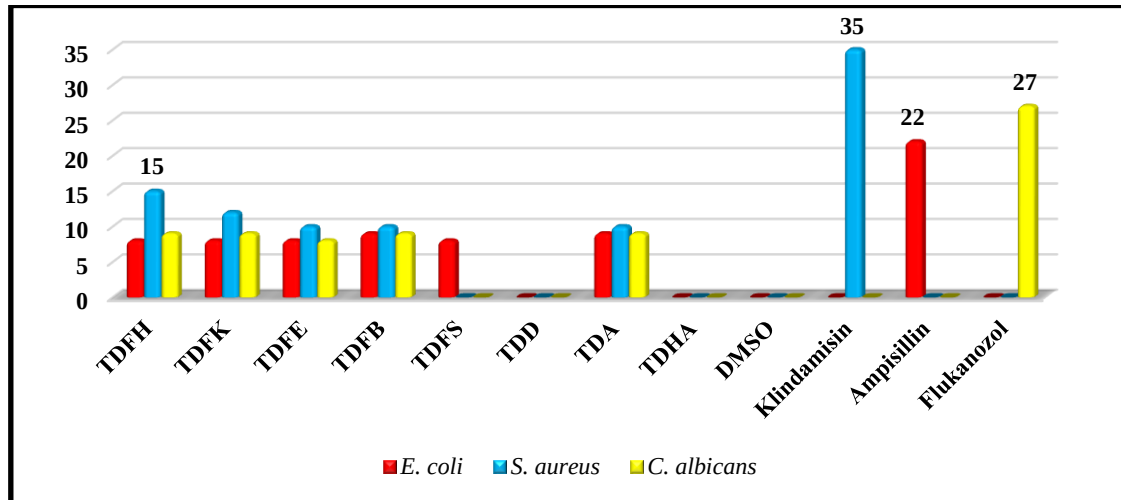
D: Dirençli <15 mm zon



Şekil 52. *C. albicans* ve *S. aureus* disk difüzyon deneyi petri görüntüleri



Şekil 53. MC'nin antibakteriyel-antifungal disk difüzyon zon (mm)



Şekil 54. TD'nin antibakteriyel-antifungal disk difüzyon zon (mm)

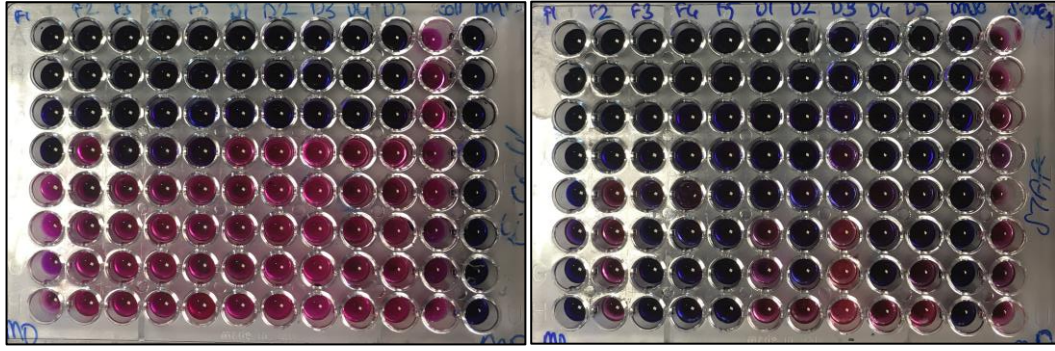
3.3.2. MİK

Minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlenmesinde resazurin mikropalak yöntemi kullanılmıştır. Bulgular Tablo 27’de verilmiştir.

Tablo 27. MC ve TD'nin antibakteriyel-antifungal MİK sonuçları (µg/ml)

Özüt (µg/ml)	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
MCFH	125,000	31,250	125,000
MCFK	62,500	62,500	125,000
MCFE	31,250	31,250	62,500
MCFB	31,250	3,906	125,000
MCFS	125,000	62,500	125,000
MCD	125,000	62,500	250,000
MCA	125,000	15,625	125,000
MCHA	125,000	62,500	125,000
TDFH	62,500	3,906	125,000
TDFK	125,000	62,500	125,000
TDFE	62,500	7,813	125,000
TDFB	62,500	7,813	125,000
TDFS	62,500	7,813	125,000
TDD	125,000	31,250	250,000
TDA	125,000	15,625	125,000
TDHA	125,000	15,625	250,000
DMSO*	0,000	0,000	0,000
Vankomisin**	NT	15,625	NT
Ampisillin**	3,906	NT	NT
Flukanozol**	NT	NT	3,906

*: Negatif kontrol; **: Pozitif kontrol; **NT**: Test edilmedi.



Şekil 55. *E. coli* ve *S. aureus* minimum inhibisyon deneyi mikropate görüntüleri

Disk difüzyonu deneyi CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü bildirmiş olduğu standart değerlere göre karşılaştırılarak değerlendirilmiştir: Klindamisin'nin Duyarlı (S) olduğu değer $S \geq 21$, orta duyarlılık değeri 15-20 ve Dirençli (R) olduğu değer $R < 14$ 'tür. Flukanozol'ün Duyarlı (S) olduğu değer $S \geq 19$, orta duyarlılık değeri 15-18 ve Dirençli (R) olduğu değer $R \leq 14$ 'tür. Ampisillin'nin Duyarlı (S) olduğu değer $S \geq 17$, orta duyarlılık değeri 14-16 ve Dirençli (R) olduğu değer $R \leq 13$ 'tür. Bu değerlere göre MCA ve TDFH özütleri *S. Aureus* üzerinde orta duyarlı etki göstermiştir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu deneyi antibiyotik sonuçları ile karşılaştırıldığında, *S. Aureus*'a karşı elde edilen sonuçlarda MCFB, TDFH, TDFE, TDFB ve TDFS özütleri Vankomisin'den daha düşük derişimlerde etki göstermiştir. MCA, TDA ve TDHA özütleri Vankomisin ile benzer derişimde inhibisyon etkinliği göstermiştir.

3.4. *in vitro* Enzim İnhibisyon Aktivite Sonuçları

Antienflamatuvar aktivite LOX; Antidepresan aktivite için MAO-A ve MAO-B izoenzimleri; Antikolinesteraz aktivite için AChE ve BChE enzimlerine karşı özütlerin inhibe edici özellikleri incelenmiştir. Araştırılan tüm özütler içerisinde MCD özütü orta düzey enflamasyon (%72,63), antidepresan (MAO-A seçici; %52,38) ve antikolinesteraz (AChE; %49,90) etkinliği ile öne çıkmaktadır. Tüm özütlere ait bulgular Tablo 28'de verilmiştir.

Tablo 28. *in vitro* Enzim inhibisyonu sonuçları, %

% İnhibisyon		MAO-A	MAO-B	AChE	BChE	15-LOX
Derişim (µg/mL)		100	100	200	200	100
MC (TIBBİ PAPATYA)	MCFH	45,52 ± 1,36	29,49 ± 1,03	24,54 ± 1,01	65,88 ± 0,91	NI
	MCFK	53,74 ± 2,11	38,33 ± 1,34	28,19 ± 1,99	36,54 ± 0,74	NI
	MCFE	65,78 ± 1,65	53,08 ± 1,81	32,39 ± 1,48	32,74 ± 0,68	NI
	MCFB	69,77 ± 1,71	52,80 ± 2,08	62,19 ± 1,03	66,03 ± 1,42	NI
	MCFS	27,65 ± 1,32	NI	22,39 ± 1,00	NI	49,47 ± 1,23
	MCD	52,38 ± 1,69	6,60 ± 0,76	49,90 ± 1,28	NI	72,63 ± 2,61
	MCA	65,84 ± 0,98	71,49 ± 1,52	2,72 ± 0,15	52,97 ± 1,82	NI
	MCHA	-	-	17,25 ± 0,53	20,94 ± 0,90	NI
TD (SARI PAPATYA)	TDFH	28,28 ± 0,68	82,67 ± 1,43	13,43 ± 1,11	48,71 ± 1,57	NI
	TDFK	60,11 ± 1,56	87,56 ± 2101	20,73 ± 1,35	43,19 ± 1,65	NI
	TDFE	73,35 ± 0,98	86,72 ± 1,32	31,51 ± 2,30	46,32 ± 0,26	NI
	TDFB	76,10 ± 1,32	82,39 ± 1,55	5,47 ± 0,99	47,97 ± 1,90	NI
	TDFS	59,58 ± 0,87	61,42 ± 0,78	8,29 ± 1,44	2,28 ± 0,91	NI
	TDD	55,69 ± 1,62	52,27 ± 0,71	15,92 ± 0,86	NI	NI
	TDA	64,70 ± 1,45	70,27 ± 1,71	NI	49,68 ± 0,34	NI
	TDHA	-	-	NI	23,25 ± 1,68	NI
*	Galantamin	-	-	71,48 ± 0,50	88,06 ± 0,26	-
	NDGA	-	-	-	-	100 ± 0,50
	Selegilin	92,00 ± 0,00	99,00 ± 0,00	-	-	-

*: Standart; NI: İnhibisyon gözlenmedi; (-): Test edilmedi.

3.5. Moleküler Doking Sonuçları

MAO-A, MAO-B, AChE, BChE, 5-LOX ve 15-LOXB enzimleri ile yapılan rijid ve esnek doking çalışmaları her bir ligand için 10 kez tekrarlanmıştır (EK 8-13). Rijid ve esnek doking çalışmalarından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, esnek dokingde enzimin aktif bölgesindeki amino asitlerin esnek seçilmesine bağlı olarak amino asitlerin konformasyonlarında meydana gelen değişiklikler sonucunda, ligandların enzimin aktif bölgesindeki amino asitlerle rijid dokinge göre daha fazla sayıda etkileşim yaparak yerleşmesini sağlamıştır. Dolayısıyla bu durum esnek dokingde ligandların enzimin aktif bölgesine daha yüksek afinite ile bağlanmasına ve bağlanma enerjisi değerlerinin iyileşmesine sebep olmuştur.

Esnek doking sonucu enzime en iyi afinite ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjileri Tablo 29’da verilmiştir. ligand olarak seçilen biyoaktif fitokimyasallardan Apigenin ve Apigetrin’nin bağlanma enerjisi-11.5 $<\Delta G <-8.0$ kcal/mol olan güçlü çoklu-hedefli bileşikler olarak göze çarpmaktadır.

Tablo 29. Enzim ligand bağlanma enerjilerinin incelenmesi

Ligand	MAO-A	MAO-B	AChE	BChE	5LOX	15LOXB
Apigenin	-11,3	-8,5	-10,7	-9,9	-8,3	-9,1
Apigetrin	-11,2	-11,0	-11,5	-10,4	-8,2	-9,1
Astragalin	-7,1	-7,1	-9,8	-10,9	-8,3	-8,5
Kumarin	-7,9	-7,8	-7,7	-6,8	-7,3	-6,7
Sinarozit	-7,9	-7,8	-11,5	-10,8	-8,5	-9,6
Dapnetin	-8,7	-8,4	-8,0	-7,4	-7,7	-6,5
Eskuletin	-8,1	-8,2	-8,2	-7,5	-7,4	-6,5
Herniarin	-8,2	-7,9	-8,0	-6,8	-7,1	-6,5
Hiperozit	-7,2	-7,4	-10,2	-10,3	-7,7	-8,6
İzokersetin	-7,3	-8,1	-9,6	-10,4	-8,3	-8,4
İzorhamnetin	-10,2	-8,1	-11,0	-9,7	-7,9	-8,6
Kemferol	-10,3	-8,7	-10,9	-9,7	-7,8	-9,0
Luteolin	-11,6	-8,7	-10,4	-10,3	-8,5	-8,6
Mirisetin	-10,6	-8,1	-10,4	-10,2	-8,0	-8,0
Mirisitrin	-7,6	-7,5	-10,4	-10,6	-7,6	-9,0
Kersetin	-10,7	-8,1	-10,2	-10,1	-8,1	-8,2
Umbelliferon	-7,8	-7,9	-7,8	-7,3	-7,7	-6,4

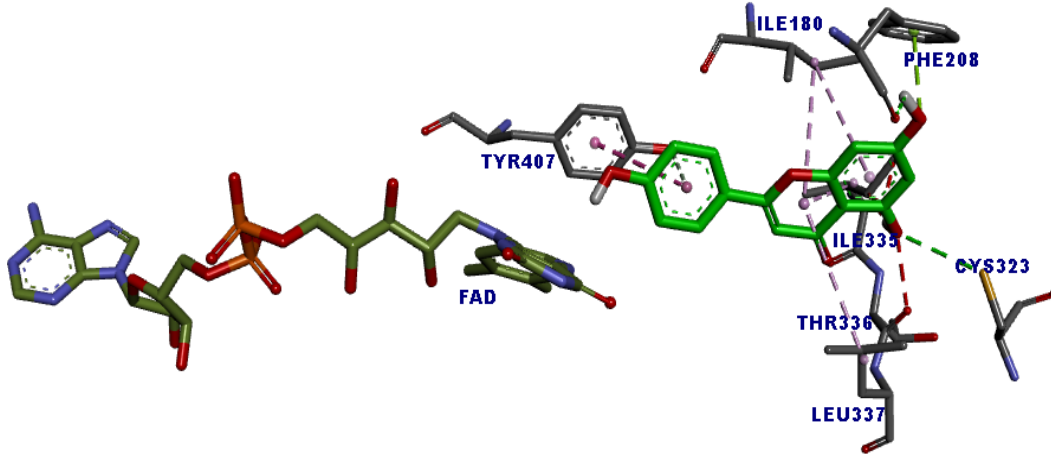
3.5.1. MAO-A ve MAO-B doking sonuçları

MAO-A ve MAO-B enzimlerinin ligandlara bağlanma enerjilerinden (ΔG) K_i değerleri ($\Delta G = RT \ln K_i$ ($R=1.988$ kcal/mol.K. $T=298K$)) hesaplanmış ve iki izoenzim arasındaki seçicilik indeksi olan SI (MAO-A'nın K_i değerinin MAO-B K_i değerine oranı) değerleri Tablo 30'da verilmiştir. Bileşiklerin MAO-A izoenzimine bağlanma afiniteleri ($-7.1 \geq \Delta G \geq -11.6$ kcal/mol), MAO-B izoenzimin bağlanma afinitelerinden ($-7.1 \geq \Delta G \geq -11.0$ kcal/mol) daha iyidir. Luteolin, Apigenin, İzorhamnetin MAO-A enzimine seçici ve çok güçlü afinite ($-10.2 \geq \Delta G \geq -11.6$ kcal/mol) ile bağlanırken MAO-B izoenzimine çok güçlü afinite ($\Delta G = -11.0$) ile bağlanan Apigetrin ve güçlü afinite ($-8.4 \geq \Delta G \geq -8.7$ kcal/mol) ile bağlanan Apigenin, Kemferol, Luteolin ve Dapnetin seçici değildir. MAO-B'ye çok güçlü afinite göstermemekle birlikte seçici olan inhibitör adayları İzokersetin, Eskuletin ve Umbelliferon'dur.

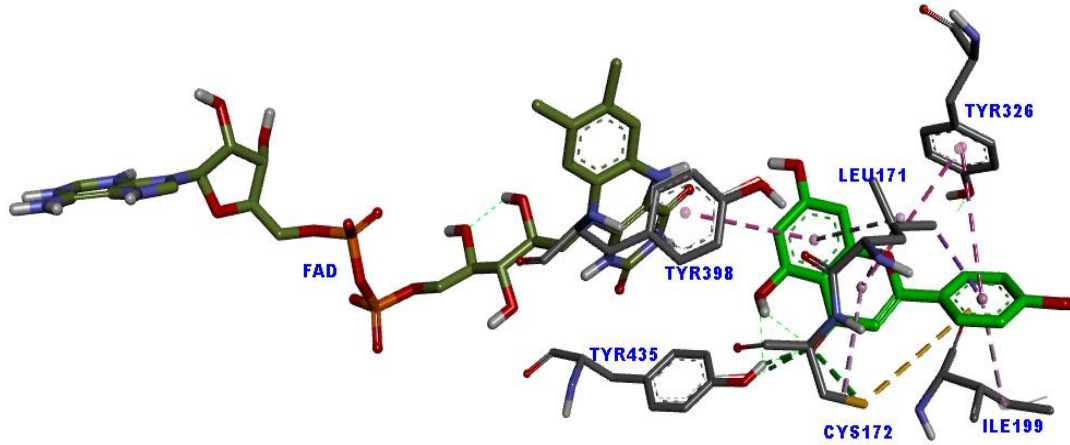
Tablo 30. MAO-A ve MAO-B izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri

Ligand	MAO-A		MAO-B		SI MAO-A/MAO-B
	ΔG	K_i	ΔG	K_i	
Apigenin	-11,3	$5,2 \times 10^{-3}$	-8,5	0,5872	0,00886
Apigetrin	-11,2	$6,2 \times 10^{-3}$	-11,0	0,0086	0,72093
Astragalin	-7,1	6,2392	-7,1	6,2392	1,00000
Kumarin	-7,9	1,6168	-7,8	1,9171	0,84336
Sinarozit	-7,9	1,6168	-7,8	1,9171	0,84336
Dapnetin	-8,7	0,4190	-8,4	0,6952	0,60270
Eskuletin	-8,1	1,1536	-8,2	0,9744	1,18391
Herniarin	-8,2	0,9744	-7,9	1,6168	0,60267
Hiperozit	-7,2	5,2701	-7,4	3,7601	1,40159
İzokersetin	-7,3	4,4516	-8,1	1,1536	3,85888
İzorhamnetin	-10,2	$3,3 \times 10^{-2}$	-8,1	1,1506	0,02894
Kemferol	-10,3	$2,8 \times 10^{-2}$	-8,7	0,4190	0,06706
Luteolin	-11,6	$3,1 \times 10^{-3}$	-8,7	0,4190	0,00740
Mirisetin	-10,6	$6,9 \times 10^{-2}$	-8,1	1,1536	0,06033
Mirisitrin	-7,6	2,6828	-7,5	3,1761	0,84468
Kersetin	-10,7	$1,4 \times 10^{-2}$	-8,1	1,1536	0,01240
Umbelliferon	-7,8	1,9141	-7,9	1,6168	1,18388

Tablo 30’da yer alan SI değeri incelendiğinde MAO-A için Apigenin ve Luteolin en güçlü bağlanan seçici inhibitör adayları olarak önerilirken. MAO-B için Eskuletin seçici ve güçlü bağlanan bir inhibitör adayı olarak değerlendirilmelidir. Apigenin bileşiğinin MAO-A’ya bağlanma görüntüsü Şekil 56’te MAO-B’ye bağlanma görüntüsü Şekil 57’te verilmiştir. MAO izoenzimlerinin Apigenin ligandı ile yapmış olduğu etkileşimler Tablo 31’deki gibidir.



Şekil 56. Apigenin bileşiğinin MAO-A aktif bölgesine yerleşme pozunu



Şekil 57. Apigenin bileşiğinin MAO-B aktif bölgesine yerleşme pozunu

Tablo 31. Apigenin bileşiğinin MAO-A ve MAO-B enzimleri ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
MAO-A ile Apigenin (-11.3 kcal/mol)	MAO-B ile Apigenin (-8.5 kcal/mol)
TYR407...Lig (π - π Stacked=4.51)	TYR 326...Lig (π - π T-shaped=5.65)
TYR407 (O)...Lig (π -donor H Bağı=3.58)	TYR 326...Lig (π - π T-shaped=4.96)
ILE180...Lig (π -Alkil=5.27)	ILE 199...Lig (π -Alkil=3.98)
ILE180...Lig (π -Alkil=5.07)	CYS172(S)...Lig (π -sülfür=5.88)
ILE335...Lig (π -Alkil=3.79)	CYS172...Lig (π -Alkil=5.07)
LEU337...Lig (π -Alkil=5.35)	CYS172(S)...Lig(O) (Hidrojen Bağı=3.64)
PHE208...Lig(O) (H Bağı=2.72)	CYS172(C)...Lig(O) (Hidrojen Bağı=3.80)
PHE208 (O)...Lig (H) (H Bağı=2.49)	TYR435(H)...Lig(O) (Hidrojen Bağı=2.71)
CYS323(S)...Lig(O) (H Bağı=3.39)	TYR398...Lig (π - π stacked=5.84)
FAD...Lig (H) (H Bağı=2.92)	LEU171...Lig (π -Alkil=4.93)
FAD...Lig (H) (H Bağı=3.15)	LEU171...Lig (π -Alkil=4.05)
FAD (N5)...Lig (O) (Distance=3.74)	LEU171(C)...Lig (π -Sigma=3.36)
	TYR326...Lig (π - π T-shaped=5.65)
	FAD (N5)...Lig (O) (Distance=5.51)

Bileşiklerin bağlanmalarını sağlayan etkileşimlerin genellikle enzimdeki aromatik rezidülerin π -elektronları ile oluşan π -hidrofobik çekimleri ve çeşitli aminoasit rezidüleri ile oluşan H-bağları olduğu görülmüştür. Bağlanmalarında en fazla rolü olan aminoasit kalıntıları MAO-A için Phe208, Tyr407 ve Tyr444 MAO-B için Cys172, Tyr326 ve Tyr398 olduğu söylenebilir.

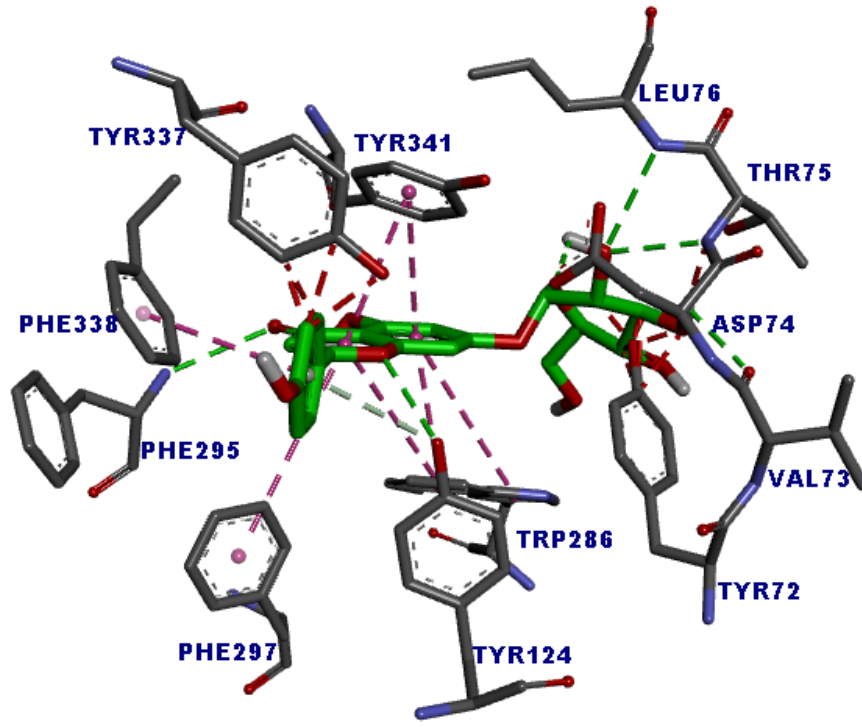
Apigenin bileşiğinin, MAO-A enzimindeki FAD yapısına (N5 atomuna) uzaklığı 3.74 Å iken, MAO-B enzimindeki FAD yapısına (N5 atomuna) uzaklığı 5.51 Å'dur. Apigenin'in MAO-A enzimi ile daha iyi bir bağlanma enerjisi vermesi, bileşiğin aktif bölge boşluğundaki FAD yapısına yaklaşarak daha iyi bir yerleşim göstermesinden kaynaklanabilir.

3.5.2. AChE ve BChE doking sonuçları

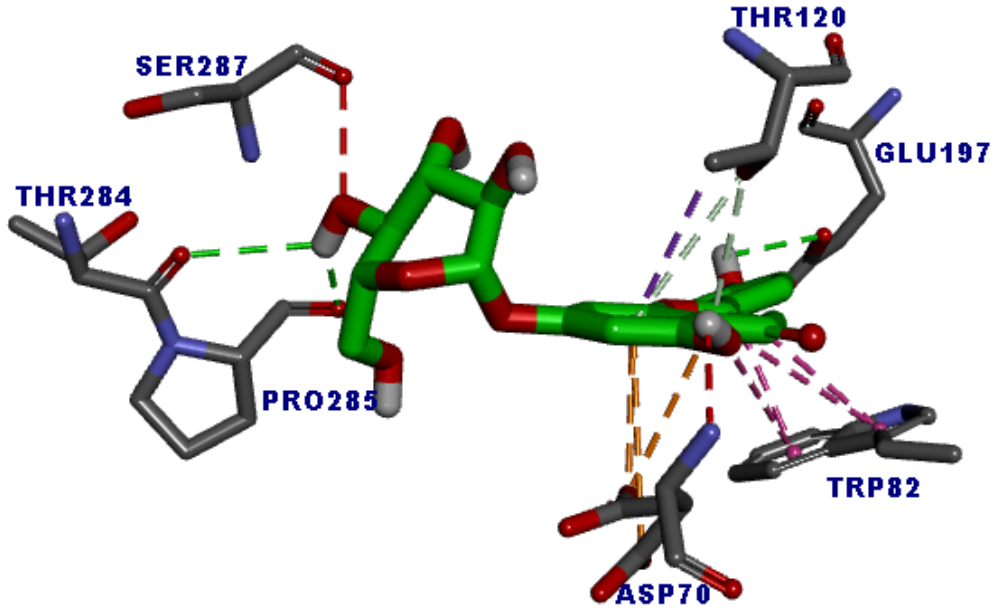
Bileşiklerin AChE enzimine bağlanma afiniteleri ($-7.7 \geq \Delta G \geq -11.5$ kcal/mol), BChE enzimine bağlanma afinitelerinden ($-6.8 \geq \Delta G \geq -10.9$ kcal/mol) daha iyidir. Apigetrin, Apigenin, Sinarozit ve İzorhamnetin bileşikleri AChE enzimine çok güçlü afinite ($-10.7 \geq \Delta G \geq -11.5$ kcal/mol) ile bağlanırken ve BChE enzimine güçlü afinite ($-10.2 \geq \Delta G \geq -10.9$ kcal/mol) ile bağlanan bileşikler Astragalin, İzokersetin, Mirisetin'dir.

Tablo 32. AChE ve BChE enzimlerinin ΔG (kcal/mol) K_i (μM) ve SI değerleri

Ligand	AChE		BChE	
	ΔG	K_i	ΔG	K_i
Apigenin	-10,7	0,0143	-9,9	0,0553
Apigetrin	-11,5	0,0037	-10,4	0,0238
Astragalin	-9,8	0,0654	-10,9	0,0102
Kumarin	-7,7	2,2661	-6,8	10,353
Sinarozit	-11,5	0,0037	-10,8	0,0121
Dapnetin	-8,0	1,3657	-7,4	3,1761
Eskuletin	-8,2	0,9744	-7,5	3,1761
Herniarin	-8,0	1,3657	-6,8	10,353
Hiperozit	-10,2	0,0333	-10,3	0,0281
İzokersetin	-9,6	0,0917	-10,4	0,0238
İzorhamnetin	-11,0	0,0086	-9,7	0,0775
Kemferol	-10,9	0,0102	-9,7	0,0775
Luteolin	-10,4	0,0238	-10,3	0,0281
Mirisetin	-10,4	0,0238	-10,2	0,0331
Mirisitrin	-10,4	0,0238	-10,6	0,0170
Kersetin	-10,2	0,0331	-10,1	0,0394
Umbelliferon	-10,7	0,0143	-9,9	0,0552



Şekil 58. Apigenrin bileşiğinin AChE aktif bölgesine yerleşme pozu



Şekil 59. Apigenrin bileşiğinin BChE aktif bölgesine yerleşme pozu

Tablo 33. Apigetrin bileşiğinin AChE ve BChE Enzimleri ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
AChE ile Apigetrin (-11.5 kcal/mol)	BChE ile Apigetrin (-11.4 kcal/mol)
PHE338...Lig (π - π Stacked=4.39)	THR284 (O)...Lig(H) (H Bağı= 3.05)
PHE295 (N)...Lig (O) (H Bağı=3.12)	PRO285 (O)...Lig (H) (H Bağı=2.16)
PHE297...Lig (π - π T-shaped=5.96)	ASP70 (O)...Lig (π -Anyon= 4.40)
TYR124 (O)...Lig (π -donor H Bağı=3.89)	ASP70 (O)...Lig (π -Anyon= 3.50)
TYR124 (O)...Lig (O) (H Bağı=2.97)	ASP70 (O)...Lig (π -Anyon= 4.83)
TRP286...Lig (π - π Stacked=5.36)	THR120 (C)...Lig (π -sigma= 3.96)
TRP286...Lig (π - π Stacked=4.20)	THR120 (O)...Lig (π -donör H Bağı= 3.34)
TRP286...Lig (π - π Stanked=5.43)	THR120 (O)...Lig (π -donör H Bağı= 4.03)
TYR341...Lig (π - π Stacked=4.27)	GLU197 (O)...Lig (H) (H Bağı= 2.69)
TYR341...Lig (π - π Stacked=4.20)	TRP82...Lig (π - π Stached=5.53)
ASP74 (O)...Lig (H) (H Bağı=2.54)	TRP82...Lig (π - π Stached=5.60)
LEU76 (N)...Lig (O) (H Bağı=3.09)	TRP82...Lig (π - π Stached=3.67)
LEU76 (N)...Lig (O) (H Bağı=2.80)	TRP82...Lig (π - π Stached=4.43)
VAL73 (O)...Lig (H) (H Bağı=2.59)	

Bileşiklerin bağlanmalarını sağlayan etkileşimlerin genellikle enzimdeki aromatik rezidülerin π -elektronları ile oluşan π -hidrofobik çekimleri ve çeşitli aminoasitlerle oluşan H-bağları olduğu görülmüştür. Bağlanmalarında en fazla rolü olan aminoasit kalıntıları AChE için Tyr72, Trp286, Phe295, Tyr337, Phe338 ve Tyr341 iken BChE için Asp70, Trp82 ve Glu194 olduğu söylenebilir.

Apigetrin bileşiğinin AChE enzimiyle, BChE enzimine göre daha iyi bir bağlanma enerjisi vermesi, AChE enzimindeki aminoasitler ile daha güçlü ve fazla sayıda etkileşim kurarak iyi bir aktif bölge yerleşimi yakalamasıyla açıklanabilir.

3.5.3. 5-LOX ve 15-LOXB doking sonuçları

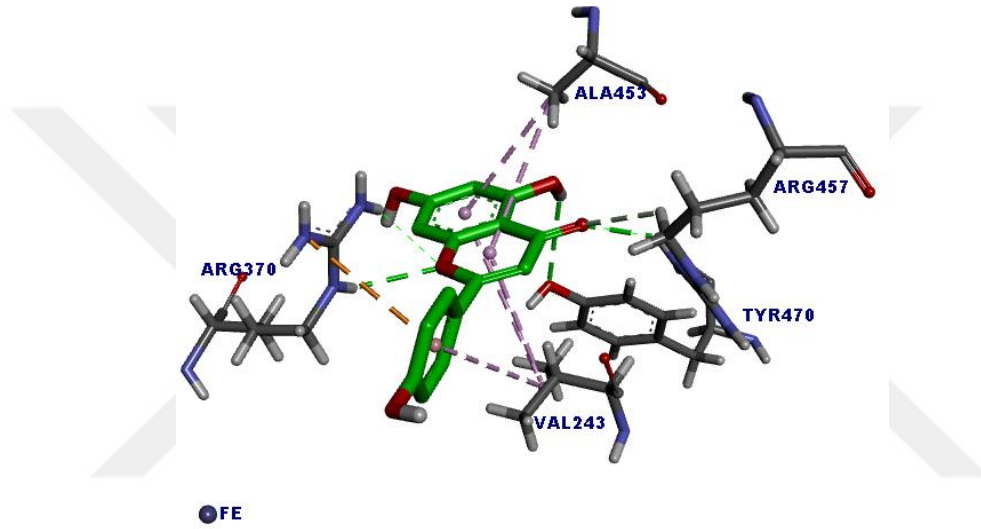
5-LOX ve 15-LOXB enzimlerinin ligandlara bağlanma enerjilerinden (ΔG), K_i değerleri hesaplanmış ve iki izoenzim arasındaki seçicilik indeksi olan SI (5-LOX K_i değerinin 15-LOXB K_i değerine oranı) değerleri Tablo 34’de verilmiştir. Ligandların 15-LOX izoenzimine bağlanma afiniteleri ($-7.1 \geq \Delta G \geq -8.5$ kcal/mol), 5-LOX izoenzimine bağlanma afinitelerinden ($-6.4 \geq \Delta G \geq -9.1$ kcal/mol) daha iyidir.

Tablo 34. 5-LOX ve 15-LOXB izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri

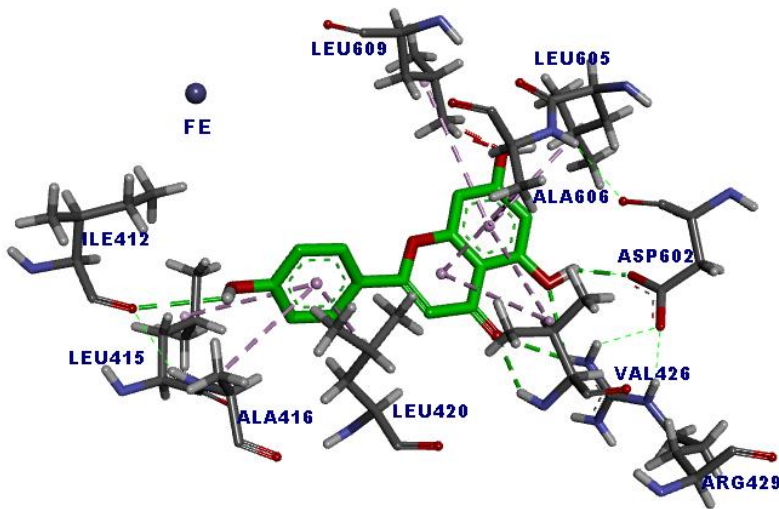
Ligand	5-LOX		15-LOX	
	ΔG	K_i	ΔG	K_i
Apigenin	-8,3	0,823	-9,1	0,213
Apigetrin	-8,2	0,975	-9,1	0,213
Astragalin	-8,3	0,823	-8,5	0,587
Kumarin	-7,3	4,452	-6,7	12,256
Sinarozit	-8,5	0,587	-9,6	0,092
Dapnetin	-7,7	2,266	-6,5	17,178
Eskuletin	-7,4	3,760	-6,5	17,178
Herniarin	-7,1	6,239	-6,5	17,178
Hiperozit	-7,7	2,266	-8,6	0,496
İzokersetin	-8,3	0,823	-8,4	0,695
İzorhamnetin	-7,9	1,616	-8,6	0,496
Kemferol	-7,8	1,914	-9,0	0,253
Luteolin	-8,5	0,587	-8,6	0,496
Mirisetin	-8,0	1,366	-8,0	13,657
Mirisitrin	-7,6	1,683	-9,0	0,253
Kersetin	-8,1	1,154	-8,2	0,974
Umbelliferon	-8,3	0,823	-9,1	0,213

AA’nın LOX yolları pro- veya anti-enflamatuar bileşikler üretir. 5-LOX tek başına pro-enflamatuar lökotrienlerin sentezinden sorumludur ancak anti-enflamatuar lipoksinler 15- ve 5-LOX’un kombine aktiviteleri ile sentezlenebilir. İnsanda 5-LOX’a en yakın homolog 15-LOXB’dır. Beklendiği gibi 5-LOX ve 15-LOXB ortak bir katalitik çekirdeği ve ortak substratı paylaşır. İkisi arasındaki en belirgin fark aktif bölgeleridir bu da inhibitör seçiciliği oluşturur.

SI değerleri incelendiğinde Dapnetin, Mirisetin, Eskuletin, Herniarin ve Kumarin bileşikleri seçici 5-LOX inhibitörü olarak önerilirken, diğer tüm bileşiklerde 15-LOXB izoenzimine seçicilik görünmektedir. Enzimler arası seğicilikten ziyade dual (ikili) inhibisyona yönelmek etki pozitif yönde arttıracaktır, bu sebeple önerilebilecek en iyi iki inhibitör adayı apigenin ve apigetrindir. 5-LOX'a bağlanan apigenin bileşiğinin bağlanma görüntüsü Şekil 60'ta 15-LOXB'ye en iyi bağlanan apigenin bileşiğinin bağlanma görüntüsü Şekil 61'de verilmiştir. Bu bileşiklerin izoenzimlerle yaptığı etkileşimler detaylı olarak Tablo 35'ta verilmiştir.



Şekil 60. Apigenin bileşiğinin 5-LOX aktif bölgesine yerleşme pozı



Şekil 61. Apigenin bileşiğinin 15-LOX aktif bölgesine yerleşme pozı

Tablo 35. Apigenin bileşiğinin 5-LOX ve 15-LOXB Enzimleri ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
5-LOX ile Apigenin (-8.3 kcal/mol)	15-LOX ile Apigenin (-9.1 kcal/mol)
ARG370 (N)...Lig (π -Kasyon=4.40)	ILE412 (O)...Lig (H) (H Bağı=2.91)
ARG370 (H)...Lig (O) (H Bağı=2.54)	LEU415...Lig (π -Alkil = 5.12)
VAL243...Lig (π -Alkil=5.28)	ALA416...Lig (π -Alkil = 5.27)
VAL243...Lig (π -Alkil=4.17)	LEU420...Lig (π -Alkil=3.96)
VAL243...Lig (π -Alkil=5.47)	ALA426...Lig (π -Alkil=4.78)
ALA453...Lig (π -Alkil=4.54)	VAL426...Lig (π -Alkil=5.41)
ALA453...Lig (π -Alkil=4.75)	VAL426 (H)...Lig (O) (H Bağı=2.54)
TYR470 (O)...Lig (H) (H Bağı=3.01)	ALA606...Lig (π -Alkil=4.59)
ARG457 (H)...Lig (O) (H Bağı=2.96)	ALA606...Lig (π -Alkil=4.06)
ARG457 (H)...Lig (O) (H Bağı=2.16)	ARG429 (H)...Lig (O) (H Bağı=2.76)
Fe...Lig (O) (Distance=16.22)	ARG429 (H)...Lig (O) (H Bağı=2.56)
	ASP602 (O)...Lig (H) (H Bağı=2.10)
	LEU609...Lig (π -Alkil=5.25)
	LEU605...Lig (π -Alkil=4.71)
	Fe...Lig (O) (Distance=8.12)

Bileşiklerin bağlanmalarını sağlayan etkileşimlerin genellikle enzimdeki aromatik rezidülerin(kalıntı) π -elektronları ile oluşan π -hidrofobik çekimleri, hidrofobik alkil etkileşimleri ve çeşitli rezidülerle oluşan H-bağları olduğu görülmüştür. Ligand-enzim bağlanmalarında en fazla rolü olan residüler 5-LOX için Arg370, Arg457, Val243 ve Ala453 iken 15-LOX-B için Val426, Leu605, Ala606 ve Leu609 olduğu söylenebilir.

Demirin liganda olan uzaklıkları ve bağlanma alanındaki residüler karşılaştırıldığında apigenin bileşiği 15LOX aktif bölgesine ilerleyebilmişken, 5LOX aktif bölgesi ancak yakınlarında bir bağlanma gösterdiği görülmüştür. Gördüğümüz bu aktif bölge farklılığı iki izoenzim arasındaki inhibitör seçiciliğini doğrular yöndedir.

4. SONUÇLAR

Tıbbi bitkiler eski çağlardan beri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ve içerdikleri fitokimyasallar sayesinde biyolojik aktivite gösteren hastalık riskinin azaltılmasından potansiyel olarak sorumlu olduğu düşünülen materyallerdir.

Papatya, Asteraceae familyasında sınıflandırılan farklı cinslerden bitki türlerine verilen genel isimdir. *Matricaria chamomilla* L., dünyada en çok kullanılan şifalı bitkilerden biridir. Bununla birlikte, *Matricaria chamomilla* L.'nin iyi tanımlanmış fitokimyasalları ve biyolojik faaliyetlerinin aksine, *Tripleurospermum decipiens* Bornm. üzerinde çok az aktivite odaklı çalışma vardır.

Bu bilgiler ışığında, tez çalışmasında 2019 yılında Mersin'den toplanan *Tripleurospermum decipiens* Bornm. ve Gaziantep ilinden toplanan *Matricaria chamomilla* L. türlerinin farklı çözgen sistemler kullanılarak bir dizi özütleri elde edilmiştir. Özütlerin araştırılan enzimler üzerinde inhibisyon etkilerinin hangi biyoaktif fitokimyasal veya fitokimyasallardan kaynaklanmış olabileceği bilgisinin araştırılması hedeflenmiştir. Hastalık riski olan insanlarda bu enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler ve hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması oldukça önemlidir.

Bitkilerin yağ asitleri içerikleri GC-MS/FID kromatografisi ile tayin edilmiştir. Özellikle %3-5 arasında değişen oranlara değerli bir FA olan omega-3 yağ asiti α -linolenik asiti içerdiği tespit edilmiştir.

Özütlerin fitokimyasal içerikleri LC-MS/MS kütle spektrometresi ile analiz edilmiş ve miktarlandırılması yapılmıştır. Bu fitokimyasallar; 3 adet flavon, 3 adet flavon-glikozit, 4 adet flavonol, 4 adet flavonol-glikozit ve 4 adet kumarin'den oluşturulan kütüphanedir. Metodun validasyon çalışması yapılmış, belirlenen paramaterlerin metot performans kabul kriterlerini sağladığı görülmüştür. Elde edilen analitik hesaplamalar MC (tıbbi papatya) bitkisinin %42'si apigetrin, %22 herniarin ve %14 oranları ile apigenin majör bileşenler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca MC'nin yapılan literatür taramalarında rastlanmayan %5 oranında homoplantaginin içerdiği tespit edilmiştir. TD (sarı papatya) bitkisinin %55'si luteolin, %14 kersetin ve %11 oranında sinarozit'in

majör bileşenler olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımıza göre MC ile kıyaslandığında TD türünde deneysel çalışma kapsamında taranan kumarin türevlerine rastlanmamıştır.

Elde edilen özütlerin aktivitelerinin incelenmesinde *in vitro* yöntemler kullanılmıştır. Antioksidan kapasiteleri troloks'a eşdeğer olarak DPPH, CUPRAC ve ABTS yöntemleri ile incelenmiştir. Toplam Fenolik kapasitesi gallik asit'e, toplam flavonoit kapasitesi kersetine eşdeğer olarak incelenmiştir. Toplam fenolik içerik açısından incelendiğinde MCFB özütü 80,18 mg GAE/g özüt ve TDFB özütü 92,68 mg GAE/g özüt olarak en yüksek fenolik içerikli özütler olarak ön plana çıkmaktadır. Toplam Flavonoit içerikleri benzer şekilde MCFB 44,31 mg KE/g özüt ve TDFB 78,75 mg KE/g özüt ile fenolik kapasitesi ile benzerlik göstermektedir. Özütlerin TEAC_{DPPH} ve TEAC_{CUPRAC} antioksidan aktiviteleri Kersetin ile kıyaslandığında en yüksek antioksidan kapasiteye MCFB, TDFB ve TDFE özütlerinin sahip oldukları tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) ve Antifungal (*Candida albicans*) etkinlikleri disk difüzyon ve MİK testleri ile incelenmiştir. Elde edilen deney bulguları neticesinde MCA ve TDFH özütleri *S. Aureus* üzerinde orta duyarlı etki göstermiştir. MİK deneyi antibiyotik sonuçları ile karşılaştırıldığında, *S. Aureus*'a karşı elde edilen sonuçlarda MCFB, TDFH, TDFE, TDFB ve TDFS özütleri Vankomisin'den daha düşük derişimlerde etki göstermiştir. MCA, TDA ve TDHA özütleri Vankomisin ile benzer derişimde inhibisyon etkinliği göstermiştir. Günümüze kadar yapılan araştırmalar sonucunda, bitkiler ve içerdikleri ikincil metabolitlerin, çoklu ilaca dirençli bakterilere ve mantarlara karşı yeni ve yenilikçi antibakteriyel ve antimikotik ilaçların önemli alternatif kaynakları olduğunu göstermektedir. Bitkilerin antibakteriyel özellikleri kıyaslandığında TD (sarı papatya)'nın MC (tıbbi papatya) dan ~2 kat daha fazla fenolik ve flavanoit içeriğinin fazla olması *S. aureus* üzerinde yapılan çalışmalarda TD'nin daha etkili olduğu göstermiştir.

Özütlerin MAO-A ve MAO-B enzim üzerindeki enzim inhibisyon etkisi incelendiğinde MCD özütünün orta düzeyde antidepresan (MAO-A seçici; %52,38) etkisi ile öne çıktığı gözlemlenmiştir. Yapılan *in siliko* çalışmaların neticesinde bu etkinin MCD özütünün kromatografik çalışmaların neticesinde elde edilen bulgularda majör bileşenleri olarak tespit edilen apigenin (217,72 ±8,11 µg/g) fitokimyasalının MAO-A enzimine seçici ve çok güçlü afinite ile bağlanmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Antikolinesteraz aktivitesi AChE ve BChE enzimleri üzerinde inhibisyon (%) özelliği incelenmiştir. Araştırılan tüm özütler içerisinde MCD özütü orta düzeyde antikolinesteraz (AChE; %49,90) etkinliği ile öne çıkmaktadır. Yapılan *in siliko* çalışmaların neticesinde bu etkinin MCD özütünün de majör bileşen olarak bulunan apigenin ($217,72 \pm 8,11 \mu\text{g/g}$) fitokimyasalın'dan ileri geldiği ve AChE enzimine seçici ve çok güçlü afinite ile bağlanmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda antienflamatuvar aktivite Lipoksijenaz İnhibitör tarama kiti kullanılarak (Katalog no: KA1329) gerçekleştirilmiştir. MCD özütü %72,63 inhibisyon göstermiş olup bu etkinin kromatografik analizler sonucunda içeriğinde bulunan apigenin ($217,72 \pm 8,11 \mu\text{g/g}$) ve apigetrin ($33,48 \pm 1,88 \mu\text{g/g}$) biyoaktif fitokimyasallarının *in siliko* değerlendirmeleri neticesinde 15-LOX enzimine seçici ve çok güçlü afinite ile bağlanmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir. LOX enzimini inhibisyon etkisi ile astım, inflamasyon, kanser ve otoimmün rahatsızlıklarında bitkisel ilaç olarak kullanımının uygun olacağı ileri sürülebilir.

Bu çalışmalar değerlendirildiğinde, farklı biyolojik aktiviteleri olduğu gözlenen sarı papatya özütlerinin kimyasal içerik ve aktivite bağlantılarını daha iyi anlayabilmek için diğer biyoaktif fitokimyasal içeriğinin de tespit edilmesi ve ileri *in vitro* ve *in siliko* çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kaya A. Tıbbi Bitkiler ve Etnobotanik Çalışmalar. İSTANBUL: Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği; 2010. Report No.: 978-975-00024-6-5.
2. Bayram E, Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, A. . Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları. Ziraat Mühendisliği VII Teknik Kongresi2010.
3. Ajansı BABK. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sektör Raporu. 2012.
4. ACIBUCA V, BUDAK DB. Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi. 2018;33(1):37-44.
5. Barku VY. Wound healing: Contributions from plant secondary metabolite antioxidants. Wound Healing-Current Perspectives: IntechOpen; 2019.
6. Aftab T. A review of medicinal and aromatic plants and their secondary metabolites status under abiotic stress. Journal of Medicinal Plants. 2019;7(3):99-106.
7. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016;2016.
8. Chauhan ES, Jaya A. Chamomile an Ancient Aromatic Plant-A Review. Journal of Ayurveda Medical Sciences. 2017;2(4).
9. Salamon I. Production of chamomile, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, in Slovakia. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 1992;1(1-2):37-45.
10. Inceer H, Ozcan M. Taxonomic evaluations on the anatomical characters of leaf and achene in Turkish Tripleurospermum with its relative Matricaria (Asteraceae). Flora. 2021;275:151759.
11. MG. S. Plant Systematics. 2 ed. California: Elsevier Academic Press; 2010.
12. Demirkent BP. Datça Papatyasının (*Chrysanthemum coronarium*) Bazı Biyoaktif Bileşenlerinin Belirlenmesi; İlaç Ve Kozmetik Endüstrisinde Hammadde Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması. MUĞLA: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi.
13. Matthews VA KF, Parris BS. Compositae. In: Davis PH, ed. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg: Edinburg University Press; 1975. 1-23 p.
14. Bozdağ B. Türkiye’de Yayılış Gösteren *Bellis L.* (Asteraceae) Türleri Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Bir Araştırma. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi; 2010.

15. Davis PH. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1975.
16. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (2. Baskı). İSTANBUL: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999.
17. Kiraz SE, Tekşen M. Mamasın Barajı Çevresinin Aksaray Florası. Bağbahçe Bilim Dergisi. 2014;1(1):68-93.
18. Çeter T, Pinar NM, İnceer H, Hayirlioğlu-Ayaz S, Yaprak AE. The comparative pollen morphology of genera *Matricaria* L. and *Tripleurospermum* Sch. Bip.(Asteraceae) in Turkey. Plant systematics and evolution. 2013;299(5):959-77.
19. Bitkiler B. Sarıapatya, *Tripleurospermum decipiens* (Fisch. & C.A.Mey.) Bornm.: Bizimbitkiler.org.tr; 2021 [Available from: <http://www.bizimbitkiler.org.tr/v3/demo/details.php?id=3086> (accessed 17th July).
20. Online WF. *Matricaria decipiens* (Fisch. & Mey.) K.Koch: World Flora Online consortium; 2021 [Available from: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000136034>.
21. Herbarium V. *Tripleurospermum decipiens* (FISCH. ET MEY.) BORNM. vanherbarium.yyu.edu.tr: Van Herbarium; [Available from: <http://www.vanherbarium.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/ast/tri/des/index.htm>.
22. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2006;20(7):519-30.
23. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. Herbal medicine. Expanded commission E monographs: Integrative Medicine Communications; 2000.
24. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for herbal medicines: Thomson, Reuters; 2007.
25. Mazokopakis E, Vrentzos G, Papadakis J, Babalis D, Ganotakis E. Wild chamomile (*Matricaria recutita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. Phytomedicine. 2005;12(1-2):25-7.
26. Repčák M, Eliášová A, Ruscancinova A. Production of herniarin by diploid and tetraploid *Chamomilla recutita*. Pharmazie. 1998;53(4):278-9.

27. Maher H Helal SEBaSAA. Chemical Characterization, Antioxidant, Anticancer and Hypolipidemic Activities of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Nutrition Research and Food Science Journal. 2021;4(2):1-8.
28. Cvetanović A, Švarc-Gajić J, Zeković Z, Jerković J, Zengin G, Gašić U, et al. The influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts. Food chemistry. 2019;271:328-37.
29. Srivastava JK, Gupta S. Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. Molecular and cellular pharmacology. 2009;1(3):138.
30. Weber B, Herrmann M, Hartmann B, Joppe H, Schmidt CO, Bertram H-J. HPLC/MS and HPLC/NMR as hyphenated techniques for accelerated characterization of the main constituents in Chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). European Food Research and Technology. 2008;226(4):755-60.
31. Nováková L, Vildová A, Mateus JP, Gonçalves T, Solich P. Development and application of UHPLC–MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. Talanta. 2010;82(4):1271-80.
32. Raal A, Orav A, Püssa T, Valner C, Malmiste B, Arak E. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. Food Chemistry. 2012;131(2):632-8.
33. Medić-Šarić M, Stanić G, Maleš Ž, Šarić S. Application of numerical methods to thin-layer chromatographic investigation of the main components of chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) essential oil. Journal of Chromatography A. 1997;776(2):355-60.
34. Crellin JK, Philpott J, Bass AT. Herbal Medicine Past and Present: A reference guide to medicinal plants: Duke University Press; 1990.
35. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. Pharmacognosy reviews. 2011;5(9):82.
36. Sebai H, Jabri M-A, Souli A, Rtibi K, Selmi S, Tebourbi O, et al. Antidiarrheal and antioxidant activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract in rats. Journal of ethnopharmacology. 2014;152(2):327-32.

37. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial crops and products*. 2013;44:437-45.
38. Omran AM. ANTIMICROBIAL AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF MATRICARIA CHAMOMOLLAL., MENTHALONGI FOLIAL. AND SALVIA OFFICINALIS L. *Plant Archives*. 2018;18(1):387-97.
39. Ionita R, Postu PA, Mihasan M, Gorgan DL, Hancianu M, Cioanca O, et al. Ameliorative effects of *Matricaria chamomilla* L. hydroalcoholic extract on scopolamine-induced memory impairment in rats: A behavioral and molecular study. *Phytomedicine*. 2018;47:113-20.
40. Awad R, Levac D, Cybulska P, Merali Z, Trudeau V, Arnason J. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the γ -aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2007;85(9):933-42.
41. Chang SM, Chen CH. Effects of an intervention with drinking chamomile tea on sleep quality and depression in sleep disturbed postnatal women: a randomized controlled trial. *Journal of advanced nursing*. 2016;72(2):306-15.
42. Smolinski AT, Pestka JJ. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food and Chemical Toxicology*. 2003;41(10):1381-90.
43. Bhaskaran N, Shukla S, Srivastava JK, Gupta S. Chamomile: an anti-inflammatory agent inhibits inducible nitric oxide synthase expression by blocking RelA/p65 activity. *International journal of molecular medicine*. 2010;26(6):935-40.
44. Shipochliev T, Dimitrov A, Aleksandrova E. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Veterinarno-meditsinski nauki*. 1981;18(6):87-94.
45. Al-Hindawi MK, Al-Deen IH, Nabi MH, Ismail MA. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. *Journal of ethnopharmacology*. 1989;26(2):163-8.
46. Zheng P-W, Chiang L-C, Lin C-C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life sciences*. 2005;76(12):1367-79.

47. Lefort ÉC, Blay J. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Molecular nutrition & food research*. 2013;57(1):126-44.
48. KARBALAEI DS, NOURAFSHAN A. Antiulcerogenic effects of *Matricaria chamomilla* extract in experimental gastric ulcer in mice. 2009.
49. Cemek M, Kağa S, Şimşek N, Büyükokuroğlu ME, Konuk M. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of natural medicines*. 2008;62(3):284-93.
50. Kato A, Minoshima Y, Yamamoto J, Adachi I, Watson AA, Nash RJ. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(17):8206-11.
51. Achterrath-Tuckermann U, Kunde R, Flaskamp E, Isaac O, Thiemer K. Pharmacological investigations with compounds of chamomile. V. Investigations on the spasmolytic effect of compounds of chamomile and Kamillosan on the isolated guinea pig ileum. *Planta medica*. 1980;39(1):38-50.
52. Maschi O, Cero ED, Galli GV, Caruso D, Bosisio E, Dell'Agli M. Inhibition of human cAMP-phosphodiesterase as a mechanism of the spasmolytic effect of *Matricaria recutita* L. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(13):5015-20.
53. Weizman Z, Alkrinawi S, Goldfarb D, Bitran C. Efficacy of herbal tea preparation in infantile colic. *The Journal of pediatrics*. 1993;122(4):650-2.
54. Savino F, Cresi F, Castagno E, Silvestro L, Oggero R. A randomized double-blind placebo-controlled trial of a standardized extract of *Matricariae recutita*, *Foeniculum vulgare* and *Melissa officinalis* (ColiMil®) in the treatment of breastfed colicky infants. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2005;19(4):335-40.
55. Gupta AK, Misra N. Hepatoprotective activity of aqueous ethanolic extract of Chamomile capitula in paracetamol intoxicated albino rats. *Am J Pharmacol Toxicol*. 2006;1(1):17-20.
56. Kültür Ş. Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of ethnopharmacology*. 2007;111(2):341-64.
57. Gürdal B, Kültür Ş. An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;146(1):113-26.

58. Šavikin K, Zdunić G, Menković N, Živković J, Čujić N, Tereščenko M, et al. Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;146(3):803-10.
59. Schilcher H, Imming P, Goeters S. *Pharmacology and Toxicology*. U: Franke R, Schilcher H (Ur.), *Chamomile Industrial Profiles*. Boca Raton: CRC Press; 2005.
60. Tuzlacı E, Tolon E. Turkish folk medicinal plants, part III: Şile (Istanbul). *Fitoterapia*. 2000;71(6):673-85.
61. T. B. Türkiye’ de Bitkiler ile Tedavi. 2 ed. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri; 1999.
62. Scherrer AM, Motti R, Weckerle CS. Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (Campania, Southern Italy). *Journal of ethnopharmacology*. 2005;97(1):129-43.
63. Girón LM, Freire V, Alonzo A, Cáceres A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991;34(2-3):173-87.
64. Jarić S, Popović Z, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, Mijatović M, Karadžić B, et al. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of ethnopharmacology*. 2007;111(1):160-75.
65. Sargın SA, Akçicek E, Selvi S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;150(3):860-74.
66. Mojab F, Kamalinejad M, Ghaderi N, Vahidipour HR. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2010(2):77-82.
67. Colak N, Inceer H, Gruz J, Strnad M, Hayirlioglu-Ayaz S, Aksu Kalmuk N, et al. Antioxidant capacity of phenolics in some representatives of the tribe Anthemideae (Asteraceae) from Turkey. *Int J Pharm Sci Res*. 2017;8(8):3265-77.
68. Ayaz FA, Inceer H, Ayaz-Hayırlioğlu S, Kalmuk-Aksu N. Achene fatty acid composition in the tribe Anthemideae (Asteraceae). *Romanian Biotechnological Letters*. 2016;21(3):11576-84.
69. GÖGER G, YAVAŞ İ, YUR S, KÖSE YB, ÖZEK G. Volatiles and fatty acid analyzes of *Tripleurospermum decipiens* (Fisch & CA Mey) Bornm and investigation of the extracts for antimicrobial and enzyme inhibitory activities. *Diabetes*. 2021.

70. Geissman TA. Organic chemistry of secondary plant metabolism. 1969.
71. Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;475(1-2):89-111.
72. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003;62(3):599-603.
73. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine*. 2010;31(6):435-45.
74. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology*. 2001;126(2):485-93.
75. Swain T. Secondary compounds as protective agents. *Annual review of plant physiology*. 1977;28(1):479-501.
76. Wildman RE. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*: CRC press; 2016.
77. Jain P, Joshi H. Coumarin: chemical and pharmacological profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012;2(6):236-40.
78. Das AB, Goud VV, Das C. Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages*: Elsevier; 2019. p. 285-323.
79. Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*. 1995;7(7):957.
80. McGaw L, Jäger A, Van Staden J. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African journal of botany*. 2002;68(4):417-23.
81. Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;85(6):1629-42.
82. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1972;2(1):23-8.
83. Arens N, Doell S, Mock HP. Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Plants: Techniques and Applications. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. 2006:1-9.

84. de Bievre P, Böttger D, Hoechst A, Eastwood GDC, Zeneca Specialties U, Hlavay J, et al. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. The Fitness for Purpose of Analytical Methods EURACHEM Guide First Internet Version. 1998.
85. Magnusson B. Practical Examples on Traceability, Measurement Uncertainty and Validation in Chemistry. 2007.
86. Thompson M, Ellison SL, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry. 2002;74(5):835-55.
87. Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1(20):05.
88. Vessman J, Stefan RI, Van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Burns DT, et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). Pure and Applied Chemistry. 2001;73(8):1381-6.
89. Commission E. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities. 2002;50:8-36.
90. De Bièvre P. The 2012 International Vocabulary of Metrology:“VIM”. Chemistry International--Newsmagazine for IUPAC. 2012;34(3):26-7.
91. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993;90(17):7915-22.
92. Dikci İ. Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni Tıp Fak Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 73s. 1999.
93. Koşar M, Bozan B, Temelli F, Başer K. Sumak (Rhus Coriaria)’ın fenolik bileşikleri ve antioksidan etkileri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. 2002:29-31.
94. Tzia C, Liadakis G. Extraction optimization in food engineering: CRC Press; 2003.

95. Tunalıer Z, Öztürk N, Koşar M, Başer K, Duman H, Kırmıer N. Bazı Sıderıtıs Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir. 2002.
96. Mehta SK, Gowder SJT. Members of antioxidant machinery and their functions. Basic principles and clinical significance of oxidative stress. 2015;60-85.
97. Tatarınga G, Stan C, Mircea C, Jitareanu A, Zbancioc A-M. Antioxidant evaluation of some coumarin derivatives. Farmacia. 2016;64(4):533-8.
98. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. The American journal of medicine. 1991;91(3):S2-S13.
99. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews. 2010;4(8):118.
100. Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, Balkansky S, S Parmar V, K Prasad A, et al. Coumarins as antioxidants. Current medicinal chemistry. 2011;18(25):3929-51.
101. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American journal of clinical nutrition. 2001;74(4):418-25.
102. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry. 2002;13(10):572-84.
103. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. Current medicinal chemistry. 2001;8(7):797-807.
104. Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products. 2000;63(7):1035-42.
105. Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G. Analysis of transcription of the Staphylococcus aureus aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. Journal of bacteriology. 2001;183(24):7260-72.
106. Gulzar M, Zehra A. Staphylococcus aureus: A brief review. Int J Vet Sci Res. 2018;4(1):020-2.
107. Wertheim H, Melles D, Vos M, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh H, et al. The Lancet infectious diseases. Lancet Infect Dis. 2005;5(12):751-62.

108. Coates R, Moran J, Horsburgh MJ. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future microbiology*. 2014;9(1):75-91.
109. Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, et al. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert review of anti-infective therapy*. 2014;12(1):75-89.
110. Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clinical infectious diseases*. 2014;58(suppl_1):S10-S9.
111. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and molecular life sciences*. 2010;67(18):3057-71.
112. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli M, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*. 2017;123(3):570-81.
113. Organization WH. *Escherichia coli* <https://www.who.int/>: World Health Organization; 2018 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>].
114. Gow NA, Van De Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature reviews microbiology*. 2012;10(2):112-22.
115. SEYEDMOUSAVI S, İLKİT M, Durdu M, ERGİN Ç, HAMİTOĞLU POLAT S, Melchers W, et al. *Candida* ve *Kandidoz*: epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2015;45(1):1-11.
116. Naqvi SAR, Nadeem S, Komal S, Naqvi SAA, Mubarik MS, Qureshi SY, et al. *Antioxidants: Natural Antibiotics*. *Antioxidants: IntechOpen*; 2019.
117. Russell AD. Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*. 2004:152-86.
118. Schlegel HG, Zaborosch C. *General microbiology*: Cambridge university press; 1993.
119. Etebu E, Arikekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res*. 2016;4(2016):90-101.

120. Lagrouh F, Dakka N, Bakri Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de mycologie medicale*. 2017;27(3):303-11.
121. Mickymaray S, Alturaiki W. Antifungal efficacy of marine macroalgae against fungal isolates from bronchial asthmatic cases. *Molecules*. 2018;23(11):3032.
122. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current opinion in microbiology*. 2018;45:70-6.
123. Ng W-J, Shit C-S, Ee K-Y, Chai T-T. Plant Natural Products for Mitigation of Antibiotic Resistance. *Sustainable Agriculture Reviews* 49: Springer; 2021. p. 57-91.
124. Al Aboody MS, Mickymaray S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*. 2020;9(2):45.
125. Karpiński T, Adamczak A, Ożarowski M, editors. Antibacterial activity of apigenin, luteolin, and their C-glucosides. *Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*; 2019.
126. Jin Y-S. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2019;29(19):126589.
127. Wen L, Wu D, Jiang Y, Prasad KN, Lin S, Jiang G, et al. Identification of flavonoids in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and evaluation of anticancer activities. *Journal of functional foods*. 2014;6:555-63.
128. Jaisinghani RN. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiology Research*. 2017;8(1):13-4.
129. Alvarez M, Debattista N, Pappano N. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia microbiologica*. 2008;53(1):23.
130. Mazimba O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2017;55(2):223-32.
131. Navarro-García VM, Rojas G, Avilés M, Fuentes M, Zepeda G. In vitro antifungal activity of coumarin extracted from *Loeselia mexicana* Brand. *Mycoses*. 2011;54(5):e569-e71.
132. Kahlmeter G, Brown D, Goldstein F, MacGowan A, Mouton J, Odenholt I, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. Wiley Online Library; 2006.

133. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of neurodegenerative diseases. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2017;9(7):a028035.
134. Sharifi-Rad M, Lankatillake C, Dias DA, Docea AO, Mahomoodally MF, Lobine D, et al. Impact of natural compounds on neurodegenerative disorders: from preclinical to pharmacotherapeutics. Journal of clinical medicine. 2020;9(4):1061.
135. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and molecular biology of plants. 2000;24:1250-319.
136. Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, Pandey DK. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. Biotechnology Advances. 2017;35(2):178-216.
137. Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, Park SJ, Kim S. Baicalein as a potent neuroprotective agent: A review. Biomedicine & pharmacotherapy. 2017;95:1021-32.
138. Carmona V, Martín-Aragón S, Goldberg J, Schubert D, Bermejo-Bescós P. Several targets involved in Alzheimer's disease amyloidogenesis are affected by morin and isoquercitrin. Nutritional neuroscience. 2020;23(8):575-90.
139. Hussain G, Zhang L, Rasul A, Anwar H, Sohail MU, Razzaq A, et al. Role of plant-derived flavonoids and their mechanism in attenuation of Alzheimer's and Parkinson's diseases: An update of recent data. Molecules. 2018;23(4):814.
140. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. Frontiers in aging neuroscience. 2010;2:12.
141. Padureanu R, Albu CV, Mititelu RR, Bacanoiu MV, Docea AO, Calina D, et al. Oxidative stress and inflammation interdependence in multiple sclerosis. Journal of clinical medicine. 2019;8(11):1815.
142. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. Brain pathology. 1999;9(1):119-31.
143. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. Frontiers in neuroanatomy. 2015;9:91.
144. Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, et al. α -Synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. The American journal of pathology. 2000;157(2):401-10.
145. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society. 2003;53(S3):S26-S38.

146. Salehi B, Lopez-Jornet P, Pons-Fuster López E, Calina D, Sharifi-Rad M, Ramírez-Alarcón K, et al. Plant-derived bioactives in oral mucosal lesions: A key emphasis to curcumin, lycopene, chamomile, aloe vera, green tea and coffee properties. *Biomolecules*. 2019;9(3):106.
147. Salehi B, Martorell M, Arbiser JL, Sureda A, Martins N, Maurya PK, et al. Antioxidants: positive or negative actors? *Biomolecules*. 2018;8(4):124.
148. Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan S-D, Stern D, et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(12):5710-4.
149. Piazzzi L, Cavalli A, Colizzi F, Belluti F, Bartolini M, Mancini F, et al. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(1):423-6.
150. Klemann CJ, Martens GJ, Sharma M, Martens M, Isacson O, Gasser T, et al. Integrated molecular landscape of Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*. 2017;3(1):1-7.
151. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2016;139:318-24.
152. Sowell RA, Owen JB, Butterfield DA. Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing research reviews*. 2009;8(1):1-17.
153. Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal of neurology*. 2000;247(2):II3-II10.
154. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6:193-222.
155. Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Progress in neurobiology*. 1998;54(1):99-125.
156. Finberg JP, Rabey JM. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in psychiatry and neurology. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:340.
157. Edmondson DE, Binda C, Mattevi A. Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;464(2):269-76.
158. Bach A, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan S-W, et al. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of

differences in enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(13):4934-8.

159. Nandigama RK, Miller JR, Edmondson DE. Loss of serotonin oxidation as a component of the altered substrate specificity in the Y444F mutant of recombinant human liver MAO A. *Biochemistry*. 2001;40(49):14839-46.

160. Knoll J. The Pharmacological Basis of the Therapeutic Effect of (—)-Deprenyl in Age-Related Neurological Diseases. *Inhibitors of Monoamine Oxidase B*. 1993:145-68.

161. Yu J. Synthesis and mechanistic studies on the monoamine oxidase (MAO) catalyzed oxidation of 1, 4-disubstituted-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridines: Virginia Polytechnic Institute and State University; 1998.

162. Rinne U. Recent advances in research on parkinsonism. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum*. 1978;67:77-113.

163. Tetrad JW, Langston JW. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. *Science*. 1989;245(4917):519-22.

164. Abdelhafez OM, Amin KM, Ali HI, Abdalla MM, Batran RZ. Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochemistry international*. 2013;62(2):198-209.

165. Finberg JP, Gillman K. Selective inhibitors of monoamine oxidase type B and the “cheese effect”. *International review of neurobiology*. 2011;100:169-90.

166. Cesura AM, Pletscher A. The new generation of monoamine oxidase inhibitors. *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques*. 1992:171-297.

167. Finberg JP. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;143(2):133-52.

168. Hartman RE. 16 Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. *Micronutrients and brain health*. 2009:225.

169. Pillay R, Maharaj DS, Daniel S, Daya S. Acetylcholine reduces cyanide-induced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2003;27(1):61-4.

170. Liston DR, Nielsen JA, Villalobos A, Chapin D, Jones SB, Hubbard ST, et al. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*. 2004;486(1):9-17.
171. Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology international*. 1999;49(11):921-37.
172. Barnard EA. Neuromuscular transmission—enzymatic destruction of acetylcholine. *The peripheral nervous system*: Springer; 1974. p. 201-24.
173. Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1991;253(5022):872-9.
174. Li S-Y, Jiang N, Xie S-S, Wang KD, Wang X-B, Kong L-Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine–rhein hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Organic & biomolecular chemistry*. 2014;12(5):801-14.
175. Greig NH, Utsuki T, Yu Q-s, Zhu X, Holloway HW, Perry T, et al. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Current medical research and opinion*. 2001;17(3):159-65.
176. Bartus RT, Dean Rr, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982;217(4558):408-14.
177. McGeer EG, McGeer PL. Clinically tested drugs for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2003;12(7):1143-51.
178. Santos TCd, Gomes TM, Pinto BAS, Camara AL, Paes AMdA. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1192.
179. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007;14(4):289-300.
180. Pathak A, K Srivastava A, K Singour P, Gouda P. Synthetic and natural monoamine oxidase inhibitors as potential lead compounds for effective therapeutics. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*. 2016;16(2):81-97.
181. Han XH, Hong SS, Hwang JS, Lee MK, Hwang BY, Ro JS. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives of Pharmacal Research*. 2007;30(1):13-7.

182. Dhiman P, Malik N, Khatkar A. Exploration of umbelliferone based derivatives as potent MAO inhibitors: Dry vs. wet lab evaluation. *Current topics in medicinal chemistry*. 2018;18(21):1857-71.
183. Li S, Lv X, Cheng K, Tian Y, Huang X, Kong H, et al. Discovery of novel 2, 3-dihydro-1H-inden-1-amine derivatives as selective monoamine oxidase B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2019;29(9):1090-3.
184. Xie Y, Yang W, Chen X, Xiao J. Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure–activity relationship. *Food & function*. 2014;5(10):2582-9.
185. Ali MY, Jannat S, Jung HA, Choi RJ, Roy A, Choi JS. Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2016;9(2):103-11.
186. Hudcová A, Kroutil A, Kubínová R, Garro AD, Gutierrez LJ, Enriz D, et al. Arylaminopropanone Derivatives as Potential Cholinesterase Inhibitors: Synthesis, Docking Study and Biological Evaluation. *Molecules*. 2020;25(7):1751.
187. Hu C, Ma S. Recent development of lipoxygenase inhibitors as anti-inflammatory agents. *Medchemcomm*. 2018;9(2):212-25.
188. Samuelsson B, Dahlen S-E, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987;237(4819):1171-6.
189. Ford-Hutchinson A, Gresser M, Young R. 5-LIPOXYGENASE. *Annual review of biochemistry*. 1994;63(1):383-417.
190. Prigge S, Boyington J, Faig M, Doctor K, Gaffney B, Amzel L. Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie*. 1997;79(11):629-36.
191. Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(34):23679-82.
192. Charlier C, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European journal of medicinal chemistry*. 2003;38(7-8):645-59.
193. Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(22):13182-7.

194. Steele VE, Holmes CA, Hawk ET, Kopelovich L, Lubet RA, Crowell JA, et al. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 1999;8(5):467-83.
195. Kuhn H, Banthiya S, Van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015;1851(4):308-30.
196. Kobe MJ, Neau DB, Mitchell CE, Bartlett SG, Newcomer ME. The structure of human 15-lipoxygenase-2 with a substrate mimic. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(12):8562-9.
197. Snodgrass RG, Brüne B. Regulation and functions of 15-lipoxygenases in human macrophages. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:719.
198. Kuhn H, Walther M, Kuban RJ. Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases: structure, function, and biological implications. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2002;68:263-90.
199. Sadeghian H, Jabbari A. 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2016;26(1):65-88.
200. Stewart JJ. Semiempirical molecular orbital methods. *Reviews in computational chemistry*. 1990;1:45-81.
201. Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of pharmacal research*. 2015;38(9):1686-701.
202. Khanna V, Ranganathan S, Petrovsky N. *Rational Structure-Based Drug Design*. 2018.
203. Taft CA, da Silva VB, da Silva CHTdP. Current topics in computer-aided drug design. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(3):1089-98.
204. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*. 1977;28(1):49-55.
205. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 1965;16(3):144-58.
206. Turkoglu A, Kivrak I, Mercan N, Duru ME, Gezer K, Turkoglu H. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5(11).

207. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 2007;12(7):1496-547.
208. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999;26(9-10):1231-7.
209. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Test Manual.v 3.0 www.eucast.org EUCAST; 2013 [Available from: www.eucast.org]
210. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007;42(4):321-4.
211. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 1961;7(2):88-95.
212. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 2010;31(2):455-61.
213. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009;30(16):2785-91.
214. Mulinacci N, Romani A, Pinelli P, Vincieri F, Prucher D. Characterization of *Matricaria recutita* L. Flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. *Chromatographia*. 2000;51(5):301-7.

EKLER

EK 1. LC-MS/MS örneklerinin derişimleri

Özüt	µg/g	IS µg/g
MCFH	6511,66	3,09
MCFK	6229,30	2,99
MCFE	6164,47	2,77
MCFB	5916,26	3,02
MCFS	6815,70	2,89
MCD	6305,19	2,95
MCA	6376,82	2,58
MCHA	6196,29	3,11
TDFH	6419,82	3,08
TDFK	6152,69	3,32
TDFEA	6191,64	3,25
TDFB	6437,78	3,22
TDFS	6112,65	3,05
TDD	6126,47	3,27
TDA	6196,94	3,12
TDHA	6233,36	2,96

EK 2. LOD, LOQ değerleri

Analit	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)
Apigenin	0,008	0,027
Luteolin	0,008	0,026
Genkvanin	0,008	0,026
Apigetrin	0,009	0,029
Sinarozit	0,010	0,032
Homoplantaginin	0,016	0,054
Kersetin	0,044	0,148
Kemferol	0,001	0,004
İzorhamnetin	0,010	0,035
Mirisetin	0,015	0,050
İzokersetin	0,001	0,004
Rutin hidrat	0,001	0,003
Mirisitrin	0,004	0,013
Astragalin	0,001	0,002
Kumarin	0,011	0,038
Umbelliferon	0,014	0,047
Herniarin	0,007	0,024
Eskuletin	0,005	0,017

EK 3. Tekrarlanabilirlik parametreleri

Tekrarlanabilirlik		Gün İçi			Günler Arası		
Analit	Eklenen analit miktarı (µg/g)	Ort.	SD	%RSD	Ort.	SD	%RSD
Apigenin	0,244	0,254	0,003	1,911	0,255	0,000	0,194
	1,062	1,303	0,020	1,532	1,336	0,002	0,180
	2,784	2,844	0,020	0,714	2,841	0,004	0,152
Luteolin	0,299	0,235	0,004	1,651	0,234	0,001	0,581
	1,302	1,291	0,002	0,170	1,324	0,003	0,220
	3,412	3,310	0,011	0,321	3,272	0,001	0,027
Genkvanin	0,248	0,248	0,001	0,367	0,249	0,001	0,358
	1,081	1,232	0,001	0,082	1,258	0,002	0,144
	2,833	2,583	0,005	0,213	2,510	0,011	0,429
Apigetrin	0,258	0,204	0,001	0,451	0,207	0,001	0,692
	1,124	1,255	0,005	0,360	1,334	0,007	0,544
	2,945	3,291	0,017	0,502	3,314	0,021	0,624
Sinarozit	0,258	0,258	0,000	0,141	0,222	0,000	0,172
	1,124	1,219	0,001	0,070	1,167	0,010	0,816
	2,945	2,796	0,001	0,026	2,758	0,003	0,098

Tekrarlanabilirlik		Gün İçi			Günler Arası		
Analit	Eklenen analit miktarı (µg/g)	Ort.	SD	%RSD	Ort.	SD	%RSD
Homoplantaginin	0,253	0,213	0,001	0,543	0,218	0,003	1,245
	1,102	1,272	0,011	0,828	1,314	0,005	0,377
	2,886	2,541	0,006	0,255	2,507	0,018	0,722
Kersetin	0,258	0,249	0,001	0,615	0,275	0,003	1,984
	1,124	0,945	0,006	0,589	0,955	0,006	0,673
	2,945	2,620	0,002	0,095	2,622	0,022	0,855
Kemferol	0,277	0,262	0,001	0,324	0,276	0,003	0,997
	1,204	1,313	0,003	0,259	1,266	0,011	0,889
	3,156	2,977	0,007	0,222	3,030	0,006	0,213
İzorhamnetin	0,278	0,276	0,000	0,136	0,266	0,003	0,951
	1,212	1,298	0,004	0,285	1,276	0,007	0,515
	3,176	2,954	0,020	0,666	2,912	0,036	1,222
Mirisetin	0,212	0,199	0,001	0,445	0,190	0,002	0,798
	0,925	1,017	0,001	0,087	1,013	0,006	0,574
	2,424	2,244	0,004	0,163	2,206	0,020	0,885

Tekrarlanabilirlik		Gün İçi			Günler Arası		
Analit	Eklen analit miktarı (µg/g)	Ort.	SD	%RSD	Ort.	SD	%RSD
İzokersetin	0,231	0,221	0,001	0,354	0,231	0,002	0,754
	1,007	1,138	0,001	0,067	1,103	0,019	1,712
	2,639	2,460	0,004	0,167	2,456	0,016	0,638
Rutin hidrat	0,266	0,222	0,000	0,063	0,232	0,001	0,518
	1,159	1,307	0,001	0,051	1,310	0,007	0,520
	3,038	2,856	0,002	0,061	2,748	0,004	0,132
Mirisitrin	0,255	0,216	0,003	1,171	0,209	0,002	0,901
	1,110	1,223	0,003	0,232	1,193	0,007	0,616
	2,908	2,707	0,006	0,237	2,669	0,016	0,607
Astragalin	0,259	0,263	0,001	0,348	0,239	0,003	1,393
	1,127	1,280	0,000	0,024	1,296	0,005	0,378
	2,954	2,640	0,002	0,071	2,789	0,007	0,245
Kumarin	0,247	0,247	0,000	0,020	0,242	0,001	0,349
	1,077	1,257	0,001	0,079	1,355	0,002	0,123
	2,822	2,759	0,002	0,072	2,655	0,001	0,041

Tekrarlanabilirlik		Gün İçi			Günler Arası		
Analit	Eklenen analit miktarı (µg/g)	Ort.	SD	%RSD	Ort.	SD	%RSD
Umbelliferon	0,556	0,566	0,002	0,268	0,543	0,003	0,624
	1,141	1,323	0,005	0,377	1,377	0,002	0,120
	2,990	3,109	0,002	0,059	3,353	0,020	0,601
Herniarin	0,226	0,207	0,000	0,060	0,206	0,001	0,273
	0,982	1,079	0,014	1,283	1,059	0,009	0,815
	2,574	2,613	0,008	0,318	2,345	0,018	0,779
Eskuletin	0,516	0,531	0,006	1,195	0,485	0,006	1,163
	1,060	1,033	0,004	0,371	1,015	0,009	0,856
	2,777	2,776	0,006	0,231	2,988	0,005	0,172

EK 4. Doğruluk parametreleri

Doğruluk	Eklenen analit miktarı (µg/g)	Ortalama	SD	%RSD
Apigenin	0,244	0,153	0,002	0,987
	1,062	1,316	0,021	1,578
	2,784	2,845	0,030	1,065
Luteolin	0,299	0,234	0,004	1,761
	1,302	1,317	0,003	0,207
	3,412	3,293	0,007	0,224
Genkvanin	0,248	0,248	0,001	0,472
	1,081	1,232	0,000	0,039
	2,833	2,583	0,008	0,291
Apigetrin	0,258	0,203	0,001	0,388
	1,124	1,265	0,010	0,783
	2,945	3,303	0,008	0,227
Sinarozit	0,258	0,261	0,000	0,143
	1,124	1,207	0,001	0,082
	2,945	2,795	0,001	0,022

Doğruluk	Eklenen analit miktarı (µg/g)	Ortalama	SD	%RSD
Homoplantaginin	0,253	0,217	0,002	0,991
	1,102	1,267	0,008	0,593
	2,886	2,541	0,007	0,280
Kersetin	0,258	0,250	0,001	0,460
	1,124	0,957	0,007	0,710
	2,945	2,631	0,009	0,338
Kemferol	0,277	0,264	0,003	1,145
	1,204	1,314	0,006	0,472
	3,156	2,966	0,012	0,405
İzorhamnetin	0,278	0,276	0,001	0,298
	1,212	1,296	0,002	0,121
	3,176	2,935	0,015	0,516
Mirisetin	0,212	0,198	0,001	0,658
	0,925	1,014	0,003	0,287
	2,424	2,242	0,004	0,181

Doğruluk	Eklenen analit miktarı (µg/g)	Ortalama	SD	%RSD
İzokersetin	0,231	0,223	0,002	0,851
	1,007	1,138	0,002	0,137
	2,639	2,458	0,003	0,122
Rutin hidrat	0,266	0,221	0,000	0,031
	1,159	1,304	0,001	0,052
	3,038	2,855	0,001	0,038
Mirisitrin	0,255	0,210	0,002	1,188
	1,110	1,232	0,011	0,864
	2,908	2,707	0,001	0,042
Astragalin	0,259	0,263	0,001	0,324
	1,127	1,283	0,000	0,031
	2,954	2,639	0,001	0,049
Kumarin	0,247	0,247	0,000	0,024
	1,077	1,257	0,001	0,079
	2,822	2,759	0,001	0,035

Doğruluk	Eklenen analit miktarı (µg/g)	Ortalama	SD	%RSD
Umbelliferon	0,556	0,566	0,002	0,268
	1,141	1,325	0,007	0,552
	2,990	3,093	0,009	0,300
Herniarin	0,226	0,208	0,000	0,220
	0,982	1,122	0,004	0,315
	2,574	2,613	0,022	0,827
Eskuletin	0,516	0,525	0,005	0,964
	1,060	1,055	0,003	0,309
	2,777	2,785	0,007	0,249

EK 5. Geri kazanım parametreleri

Geri Kazanım		MC		TD	
Analit	Katılan analit miktarı (µg/g)	% Geri kazanım	%RSD	% Geri kazanım	%RSD
Apigenin	1	92,722	0,357	96,955	1,261
	2,5	91,009	1,910	95,241	1,324
	5	89,493	0,110	92,462	1,702
Luteolin	1	92,934	0,619	89,606	0,978
	2,5	91,404	1,245	90,006	1,566
	5	94,853	1,625	88,851	0,424
Genkvanin	1	92,642	1,807	94,922	0,582
	2,5	91,780	1,194	89,749	1,058
	5	93,793	0,890	90,608	1,517
Apigetrin	1	95,650	0,527	90,147	0,248
	2,5	94,509	1,758	91,800	0,395
	5	91,744	0,883	91,171	1,640
Sinarozit	1	92,018	1,476	89,353	0,727
	2,5	91,240	0,940	87,686	1,040
	5	93,630	1,891	87,406	1,637

Geri Kazanım		MC		TD	
Analit	Katılan analit miktarı (µg/g)	% Geri kazanım	%RSD	% Geri kazanım	%RSD
Homoplantaginin	1	93,639	1,313	93,131	0,552
	2,5	92,447	1,342	91,903	1,719
	5	94,503	1,265	88,310	1,685
Kersetin	1	91,512	1,757	93,738	1,417
	2,5	88,890	0,932	92,154	1,620
	5	89,869	1,815	92,450	1,466
Kemferol	1	92,240	1,113	92,183	1,936
	2,5	94,762	1,615	90,908	0,995
	5	94,480	1,805	92,323	1,059
İzorhamnetin	1	88,198	0,099	93,923	1,328
	2,5	90,193	1,892	93,883	1,421
	5	91,449	0,171	90,773	1,253
Mirisetin	1	92,126	0,142	89,347	1,603
	2,5	88,348	1,821	85,505	1,776
	5	89,327	0,581	87,240	1,154

Geri Kazanım		MC		TD	
Analit	Katılan analit miktarı (µg/g)	% Geri kazanım	%RSD	% Geri kazanım	%RSD
İzokersetin	1	89,175	0,092	94,238	0,949
	2,5	87,218	0,188	89,795	0,130
	5	87,838	1,650	91,096	0,129
Rutin hidrat	1	92,237	0,558	94,288	1,181
	2,5	91,510	1,923	92,407	0,693
	5	92,044	0,693	90,621	0,213
Mirisitrin	1	93,847	0,190	85,833	1,530
	2,5	90,315	1,260	89,791	0,603
	5	92,937	0,239	87,420	1,553
Astragalin	1	92,631	1,624	89,919	1,466
	2,5	92,750	1,623	90,104	1,395
	5	93,528	1,797	87,121	0,941
Kumarin	1	93,094	0,132	92,026	1,198
	2,5	97,965	0,592	95,954	1,720
	5	95,584	0,693	90,731	0,887

Geri Kazanım		MC		TD	
Analit	Katılan analit miktarı (µg/g)	% Geri kazanım	%RSD	% Geri kazanım	%RSD
Umbelliferon	1	94,751	0,078	94,473	1,825
	2,5	92,931	0,841	93,425	0,731
	5	91,880	0,398	94,868	0,114
Herniarin	1	94,709	0,958	95,967	0,652
	2,5	95,461	0,671	95,710	1,756
	5	92,665	0,545	96,235	0,380
Eskuletin	1	94,741	0,293	90,144	0,809
	2,5	92,895	1,538	90,415	1,811
	5	91,727	1,589	87,487	1,249

EK 6. Metot çalışma aralığı

Analit	Gün	Doğru Denklemi	Regresyon Katsayısı (R²)
Apigenin	1.Gün	$y=1,9820x+0,1592$	0,9935
	2.Gün	$y=1,9203x+0,1708$	0,9911
Luteolin	1.Gün	$y=1,9049x+0,1329$	0,9986
	2.Gün	$y=1,8557x+0,1387$	0,9996
Genkvanin	1.Gün	$y=1,7294x+0,0452$	0,9957
	2.Gün	$y=1,7402x+0,0435$	0,9930
Apigetrin	1.Gün	$y=1,2636x+0,0873$	0,9904
	2.Gün	$y=1,2349x+0,0985$	0,9858
Sinarozit	1.Gün	$y=1,2587x+0,0190$	0,9985
	2.Gün	$y=1,2009x+0,0228$	0,9995
Homopplantaginin	1.Gün	$y=0,1696x+0,0070$	0,9905
	2.Gün	$y=0,1666x+0,0078$	0,9904
Kersetin	1.Gün	$y=0,3035x+0,0098$	0,9969
	2.Gün	$y=0,3108x+0,0102$	0,9965
Kemferol	1.Gün	$y=0,3612x+0,0073$	0,9981
	2.Gün	$y=0,3595x+0,0078$	0,9993
İzorhamnetin	1.Gün	$y=0,3721x+0,0170$	0,9968
	2.Gün	$y=0,3610x+0,0170$	0,9980

Analit	Gün	Doğru Denklemi	Regresyon Katsayısı (R²)
Miricetin	1.Gün	$y=0,1290x+0,0032$	0,9963
	2.Gün	$y=0,1230x+0,0040$	0,9970
İzokersetin	1.Gün	$y=0,6005x+0,0131$	0,9971
	2.Gün	$y=0,5890x+0,0130$	0,9980
Rutin hidrat	1.Gün	$y=0,5160x+0,0144$	0,9970
	2.Gün	$y=0,5070x+0,0130$	0,9960
Mirisitrin	1.Gün	$y=0,0898x+0,0032$	0,9965
	2.Gün	$y=0,0860x+0,0030$	0,9970
Astragalin	1.Gün	$y=0,5367x+0,0103$	0,9941
	2.Gün	$y=0,5200x+0,0140$	0,9980
Kumarin	1.Gün	$y=6,3141x+0,3356$	0,9972
	2.Gün	$y=6,2340x+0,3470$	0,9940
Umbelliferon	1.Gün	$y=2,0304x+0,4375$	0,9943
	2.Gün	$y=2,1300x+0,4360$	0,9920
Herniarin	1.Gün	$y=3,3188x+0,1296$	0,9980
	2.Gün	$y=3,3030x+0,0950$	0,9970
Eskuletin	1.Gün	$y=0,3407x+0,0832$	0,9998
	2.Gün	$y=0,3880x+0,0660$	0,9990

EK 7. Kalibrasyon eğrisi analit derişimi

	0,05 µg/g	0,1 µg/g	0,25 µg/g	0,5 µg/g	1 µg/g	2,5 µg/g	5 µg/g
Apigenin	0,039	0,103	0,244	0,517	1,062	2,784	5,254
Luteolin	0,048	0,127	0,299	0,634	1,302	3,412	6,439
Genkvanin	0,040	0,105	0,248	0,526	1,081	2,833	5,347
Apigetrin	0,041	0,109	0,258	0,547	1,124	2,945	5,558
Sinarozit	0,041	0,109	0,258	0,547	1,124	2,945	5,558
Homoplantaginin	0,041	0,107	0,253	0,536	1,102	2,886	5,448
Kersetin	0,041	0,109	0,258	0,547	1,124	2,945	5,558
Kemferol	0,044	0,117	0,277	0,586	1,204	3,156	5,956
İzorhamnetin	0,045	0,118	0,278	0,590	1,212	3,176	5,995
Mirisetin	0,034	0,090	0,212	0,450	0,925	2,424	4,575
İzokersetin	0,037	0,098	0,231	0,490	1,007	2,639	4,982
Rutin hidrat	0,043	0,113	0,266	0,564	1,159	3,038	5,734
Mirisitrin	0,041	0,108	0,255	0,540	1,110	2,908	5,490
Astragalin	0,042	0,110	0,259	0,549	1,127	2,954	5,575
Kumarin	0,040	0,105	0,247	0,524	1,077	2,822	5,327
Umbelliferon	0,042	0,111	0,262	0,556	1,141	2,990	5,644
Herniarin	0,036	0,096	0,226	0,478	0,982	2,574	4,859
Eskuletin	0,039	0,103	0,243	0,516	1,060	2,777	5,242
Kurkumin (IS)	2,551	2,653	2,646	2,783	2,748	2,693	2,733

EK 8. Her bileşik için MAO-B ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı										
Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Apigenin	-8.4	-8.4	-8.4	-8.3	-8.4	-8.4	-8.4	-8.4	-8.5	-8.4
Apigetrin	-6.7	-7.8	-7.8	-7.8	-7.1	-11.0	-6.7	-7.0	-7.8	-7.8
Astragalin	-6.6	-6.1	-8.2	-6.3	-6.2	-7.1	-7.0	-6.5	-7.0	-6.1
Kumarin	-7.7	-7.7	-5.0	-7.7	-7.7	-7.7	-7.5	-7.7	-7.8	-7.8
Sinarozit	-7.7	-7.8	-7.5	-7.6	-6.8	-7.5	-7.1	-7.8	-7.7	-7.6
Dapnetin	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.4	-8.3	-8.3	-8.3	-5.3	-5.4
Eskuletin	-8.2	-7.5	-8.2	-7.3	-8.1	-8.1	-7.3	-8.1	-8.2	-8.2
Herniarin	-7.8	-7.7	-7.8	-7.8	-7.8	-7.9	-7.7	-5.0	-7.8	-7.8
Hiperozit	-6.7	-7.4	-7.0	-7.3	-6.9	-6.7	-6.7	-6.7	-7.3	-7.1
İzokersetin	-7.1	-7.0	-6.8	-6.9	-6.9	-6.8	-6.9	-6.9	-6.9	-6.8
İzorhamnetin	-7.1	-8.1	-8.1	-8.0	-8.1	-8.1	-6.3	-8.1	-8.1	-8.1
Kemferol	-7.2	-8.1	-7.9	-7.9	-8.1	-7.9	-8.1	-8.0	-8.1	-7.9
Luteolin	-7.0	-8.3	-8.7	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.7	-8.7	-8.7
Mirisetin	-8.0	-8.0	-8.1	-7.6	-8.0	-8.0	-8.0	-7.4	-6.4	-8.0
Mirisitrin	-7.1	-7.2	-7.1	-7.1	-7.1	-7.1	-7.2	-7.1	-7.5	-7.2
Kersetin	-7.9	-7.5	-8.0	-7.9	-8.1	-6.4	-7.5	-6.4	-7.5	-7.5
Umbelliferon	-7.9	-7.9	-5.1	-7.9	-4.9	-7.8	-7.8	-7.8	-5.3	-7.8

EK 9. Her bileşik için MAO-A ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı										
Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Apigenin	-11.2	-	-11.2	-11.3	-11.3	-11.2	-11.2	-11.2	-11.3	-11.3
Apigetrin	-7.1	-7.0	-7.0	-7.1	-7.1	-11.2	-7.1	-6.9	-11.0	-11.1
Astragalin	-6.2	-7.0	-6.8	-6.1	-6.4	-6.8	-7.1	-6.1	-6.5	-6.5
Kumarin	-7.9	7.8	-6.4	-7.4	-7.9	-7.9	-7.5	-7.6	-7.9	-7.9
Sinarozit	-7.9	-7.5	-7.4	-7.9	-6.5	-7.9	-7.9	-7.7	-7.9	-7.8
Dapnetin	-8.0	-8.7	-8.3	-8.4	-5.3	-8.3	-8.0	-8.6	-5.3	-5.3
Eskuletin	-7.9	-7.9	-7.9	-8.0	-7.9	-7.9	-7.9	-5.7	-8.1	-7.9
Herniarin	-8.0	-8.2	-8.2	-7.9	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.1	-8.1
Hiperozit	-7.2	-6.6	-7.2	-7.2	-7.2	-6.6	-6.6	-7.2	-6.6	-6.5
İzokersetin	-7.1	-7.3	-7.1	-7.2	-7.3	-7.3	-6.6	-6.8	-7.3	-6.6
İzorhamnetin	-10.0	-6.5	-10.1	-10.1	-10.1	-10.0	-10.2	-10.1	-10.1	-10.1
Kemferol	-10.3	-10.3	-6.4	-10.3	-10.3	-10.3	-10.2	-10.3	-10.3	-6.5
Luteolin	-6.5	-6.8	-11.6	-11.6	-11.6	-11.6	-11.6	-6.8	-11.6	-11.6
Mirisetin	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.5	-10.6	-10.5	-10.6	-10.6	-6.8
Mirisitrin	-6.9	-7.6	-6.5	-6.9	-7.6	-6.5	-7.5	-7.5	-6.5	-7.5
Kersetin	-10.7	-10.7	-10.7	-6.5	-10.7	-10.7	-10.7	-10.7	-10.7	-10.7
Umbelliferon	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-5.3	-6.4	-7.8	-7.8	-7.8

EK 10. Her bileşik için 5-LOX ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı										
Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Apigenin	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-6.4
Apigetrin	-7.9	-7.0	-7.9	-7.9	-7.9	-8.2	-8.2	-7.9	-6.7	-7.9
Astragalin	-8.2	-8.2	-8.3	-8.3	-8.3	-8.2	-8.2	-8.3	-8.3	-8.3
Kumarin	-7.3	-7.1	-7.3	-7.3	-7.3	-7.3	-6.2	-7.3	-7.3	-7.3
Sinarozit	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.5	-8.3	-8.1
Dapnetin	-7.0	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.4	-7.2	-7.7	-7.7
Eskuletin	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4
Herniarin	-7.1	-7.0	-7.0	-6.9	-7.0	-7.0	-6.9	-7.0	-7.1	-7.0
Hiperozit	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.0	-6.7	-7.7	-7.7
İzokersetin	-8.0	-8.2	-8.3	-7.9	-7.5	-7.6	-7.4	-8.1	-6.7	-7.2
İzorhamnetin	-7.9	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.7	-6.5	-7.6
Kemferol	-7.2	-7.4	-7.2	-6.8	-7.7	-6.4	-7.6	-7.6	-7.8	-7.8
Luteolin	-8.5	-7.8	-8.5	-7.8	-8.5	-8.3	-8.5	-7.6	8.5	-8.5
Mirisetin	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-8.0	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-8.0
Mirisitrin	-7.6	-6.8	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6
Kersetin	-7.9	-7.7	-7.4	-7.4	-6.5	-7.9	-8.1	-7.4	-8.1	-7.9
Umbelliferon	-7.7	-7.3	-7.3	-7.7	-7.7	-7.7	-7.4	-7.4	-7.7	-7.1

EK 11. Her bileşik için 15-LOX ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı										
Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Apigenin	-8.9	-8.8	-8.9	-8.8	-8.8	-9.1	-9.1	-9.1	-8.8	-9.1
Apigetrin	-8.9	-8.8	-8.9	-8.8	-8.8	-9.1	-9.1	-9.1	-8.8	-9.1
Astragalin	-8.4	-8.4	-8.4	-8.4	-8.5	-8.4	-8.4	-8.0	-8.0	-7.9
Kumarin	-6.1	-6.1	-5.6	-6.1	-6.6	-6.5	-6.7	-6.1	-6.1	-6.1
Sinarozit	-8.8	-9.3	-9.7	-8.9	-8.7	-9.5	-8.9	-9.6	-9.5	-8.5
Dapnetin	-6.5	-6.3	-6.5	-6.3	-6.5	-6.5	-6.5	-6.5	-6.2	-6.5
Eskuletin	-6.3	-6.3	-6.5	-6.3	-6.3	-6.5	-6.5	-6.3	-6.3	-6.5
Herniarin	-6.2	-6.1	-6.2	-6.5	-6.3	-6.3	-6.2	-6.1	-6.2	-6.1
Hiperozit	-8.6	-8.1	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.1	-8.1	-8.6	-8.6
İzokersetin	-8.1	-8.3	-8.2	-8.4	-8.2	-8.1	-8.1	-8.2	-8.3	-8.0
İzorhamnetin	-7.9	-8.0	-8.6	-8.6	-8.6	-8.0	-8.1	-8.0	-8.6	-8.0
Kemferol	-8.1	-9.0	-8.0	-8.2	-8.0	-8.1	-7.9	-8.1	-8.0	-8.0
Luteolin	-8.0	-8.6	-8.2	-8.2	-8.6	-8.5	-8.2	-8.0	-8.5	-7.9
Mirisetin	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.8	-8.0	-7.9
Mirisitrin	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9	-9.0	-8.9	-8.9	-9.0	-8.9	-8.9
Kersetin	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-7.9	-8.2	-8.2	-8.2
Umbelliferon	-6.0	-6.0	-6.4	-6.2	-5.8	-6.0	-6.4	-6.4	-6.0	-6.4

EK 12. Her bileşik için ACHE ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı										
Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Apigenin	-10.1	-10.1	-10.6	-9.4	-10.7	-9.7	-10.7	-9.8	-10.6	-10.1
Apigetrin	-11.5	-11.5	-8.4	-11.4	-11.5	-11.5	-11.5	-11.5	-11.5	-8.4
Astragalin	-9.7	-9.7	-9.8	-9.7	-9.7	-9.2	-9.7	-9.7	-9.8	-7.9
Kumarin	-7.3	-7.1	-7.3	-7.3	-7.3	-7.3	-7.7	-7.3	-7.3	-7.3
Sinarozit	-8.4	-8.7	-11.4	-11.5	-11.4	-11.4	-11.5	-9.3	-9.1	-11.1
Dapnetin	-8.0	-8.0	-7.9	-7.9	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-6.7
Eskuletin	-8.1	-8.2	-8.1	-7.1	-7.9	-8.1	-8.2	-8.1	-8.1	-8.1
Herniarin	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-6.8	-7.8	-8.0	-6.2	-7.8	-7.9
Hiperozit	-9.2	-9.4	-10.2	-9.2	-7.7	-9.2	-9.2	-9.4	-9.4	-9.8
İzokersetin	-9.3	-9.3	-9.3	-8.9	-9.4	-9.5	-8.3	-9.2	-9.6	-9.3
İzorhamnetin	-11.0	-9.8	-9.7	-9.8	-9.6	-10.0	-9.3	-9.7	-9.7	-9.5
Kemferol	-9.3	-10.8	-10.8	-10.8	-9.4	-9.3	-10.8	-7.5	-10.8	-10.9
Luteolin	-10.4	-10.4	-10.4	-7.6	-9.3	-10.3	-9.5	-10.3	-10.4	-10.3
Mirisetin	-9.4	-10.3	-9.3	-9.4	-10.3	-9.5	-10.3	-10.3	-9.4	-10.4
Mirisitrin	-8.9	-10.3	-10.2	-8.9	-10.3	-10.0	-8.9	-10.3	-10.2	-10.4
Kersetin	-9.7	-10.1	-10.2	-9.7	-10.2	-9.6	-10.2	-7.4	-9.7	-9.6
Umbelliferon	-7.8	-7.7	-7.8	-7.8	-7.8	-7.7	-6.8	-7.6	-7.7	-6.6

EK 13. Her bileşik için BChE ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı										
Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Apigenin	-9.9	-9.9	-9.9	-9.3	-9.9	-9.6	-9.8	-9.9	-9.3	-9.1
Apigetrin	-10.2	-10.2	-10.2	-10.2	-10.2	-10.2	-10.4	-10.0	-8.6	-10.2
Astragalin	-10.9	-10.5	-10.5	-10.9	-10.9	-10.5	-10.5	-10.8	-10.3	-10.8
Kumarin	-6.7	-6.8	-6.6	-6.6	-6.6	-6.7	-6.0	-6.6	-6.0	-6.6
Sinarozit	-8.6	-9.8	-10.0	-9.8	-9.8	-9.9	-10.8	-10.5	-10.1	-9.9
Dapnetin	-7.4	-7.4	-7.4	-6.9	-6.4	-6.6	-6.4	-7.4	-7.4	-7.1
Eskuletin	-7.5	-7.4	-7.5	-7.4	-7.5	-7.1	-6.4	-7.4	-7.4	-7.4
Herniarin	-6.1	-6.7	-6.1	-6.8	-6.5	-6.5	-5.8	-6.7	-6.1	-6.8
Hiperozit	-10.3	-9.8	-9.8	-9.8	-9.8	-9.8	-9.6	-9.8	-9.8	-10.2
İzokersetin	-10.4	-10.2	-9.8	-10.2	-10.2	-9.1	-10.2	-9.3	-10.1	-10.3
İzorhamnetin	-9.7	-9.6	-9.6	-9.7	-9.7	-9.4	-9.7	-9.6	-9.7	-9.5
Kemferol	-9.5	-9.5	-9.4	-9.5	-9.2	-9.7	-9.5	-9.3	-9.7	-9.7
Luteolin	-10.1	-10.1	-9.8	-10.0	-10.2	-10.2	-9.5	-10.3	-9.2	-9.9
Mirisetin	-10.0	-10.2	-10.2	-9.5	-10.1	-10.1	-9.9	-9.7	-9.8	-10.0
Mirisitrin	-8.3	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.5
Kersetin	-10.1	-9.6	-10.1	-9.8	-9.5	-9.5	-10.1	-10.1	-9.8	-9.8
Umbelliferon	-7.0	-6.0	-6.2	-6.3	-6.5	-7.3	-7.3	-7.3	-7.3	-7.3

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Nihal
Soyadı : ZORLU
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

EĞİTİM

YÜKSEK LİSANS (M.Sc.)	MARMARA ÜNİVERSİTESİ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya A.B.D., 2022
LİSANS (B.Sc.)	KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya, 2014