

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MYRTUS COMMUNIS L. ÜZERİNE FARMASÖTİK BOTANİK
ARAŞTIRMALAR

Ecz. Zeliha PARLAR

Farmasötik Botanik Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MYRTUS COMMUNIS L. ÜZERİNE FARMASÖTİK BOTANİK
ARAŞTIRMALAR

Ecz. Zeliha PARLAR

Farmasötik Botanik Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İ. İrem ÇANKAYA

ANKARA
2024

**MYRTUS COMMUNIS L. ÜZERİNE FARMASÖTİK BOTANİK
ARAŞTIRMALAR**

Öğrenci: Zeliha PARLAR

Danışman: Prof. Dr. İ. İrem ÇANKAYA

Bu tez çalışması 23.08.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Botanik Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Erdal BEDİR*

(İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. İffet İrem ÇANKAYA*

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Golshan ZARE*

(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

2 n Eylül 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. (2)
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. (3)

23.08.2024
Ecz. Zeliha PARLAR

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine enstitü veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir
* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu Prof. Dr. İ. İrem ÇANKAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Zeliha PARLAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana öğrettikleriyle pek çok farklı yönde gelişmemi sağlayan ve yaptığım her çalışmada bana destek olan, beni fazlasıyla cesaretlendiren ve gayretlendiren sevgili danışmanım Prof. Dr. İ. İrem ÇANKAYA'ya,

Fitokimyasal çalışmalarında bilgisini ve deneyimlerini sunan, laboratuvar olanaklarını sonuna kadar açan, misafir araştırmacısı olmaktan gurur duyduğum ve örnek aldığım Sayın Prof. Dr. Erdal BEDİR'e,

Tez çalışmalarımın başından sonuna kadar geçen sürede her konuda ellerinden geleni yapan Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'mızın öğretim üyeleri değerli hocalarım Doç. Dr. Golshan ZARE, Dr. Öğr. Üyesi Z. Ceren ARITULUK AYDIN, Dr. Öğr. Üyesi N. Yağmur DİKER'e ve değerli çalışma arkadaşım Ecz. İrem BEKRET'e

Metabolomiks çalışmalarımın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER ve Dr. Kim. Ozan KAPLAN'a

Çalışmalarında bana laboratuvarlarını açan Farmakognozi Anabilim Dalı ve Farmakoloji Anabilim Dalı'na,

TYL-2023-20836 proje kodlu tez desteği için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tez sürecimde motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan kıymetli arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca her an yanımda ve destekleriyle daha güçlü hissetmemi sağlayan, bugünkü konumumu borçlu olduğum; babam Ahmet PARLAR, annem Fatma PARLAR, abilerim İsa PARLAR ve Adem PARLAR'a,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Parlar, Z. *Myrtus communis* L. Üzerine Farmasötik Botanik Araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024. Myrtaceae familyasının bir üyesi olan *Myrtus communis* L. ülkemizde doğal olarak yetişen, herdem yeşil bir bitkidir. Halk arasında dahilen stres yönetiminde, yara iyileştirici ve kolesterol düşürücü olarak, diyabet, diyare ve kabızlık tedavisinde kullanımı mevcuttur. Bu tez çalışmasında *M. communis* yaprak ekstreleri, fraksiyonları ve kromatografik yöntemlerle izole edilmiş saf bileşiklerin Parkinson patolojisinde önemli yeri bulunan oksidatif stres, enflamasyon ve α -sinüklein fibril proteini üzerine etkileri *in vitro* testler ile araştırılmıştır. Bu kapsamda *M. communis*, anatomik ve morfolojik olarak incelenmiş ve farmakope analizleri yapılarak bitkinin farmakope monografi için referans kaynak oluşturulmuştur. Bitki içeriğindeki sekonder metabolit grupları, genel teşhis reaksiyonları ile kalitatif olarak belirlenmiş ve kantitatif olarak madde miktar tayinleri yapılmıştır. Bitki yapraklarının %80'lik EtOH ekstraksiyonundan çeşitli kromatografik yöntemlerle izole edilmiş altı adet saf bileşik 1D NMR ve HR-ESI-MS yöntemleriyle tayin edilmiştir. Mirsitrin (**MC-02**), kersitrin (**MC-05**) olmak üzere iki flavonoid, ursolik asit (**MC-09**), korosolik asit (**MC-11**) ve asiatik asit (**MC-18**) olmak üzere üç triterpen ve floroglusinol yapısında gallomirtukommulon C (**MC-04**) saf bileşikleri izole edilmiştir. Bitkinin %80'lik EtOH ve sulu ekstresi, %80'lik EtOH'tan kromatografik yöntemlerle elde edilmiş alt fraksiyonları üzerinde *in vitro* ABTS, CUPRAC, DPPH, FRAP ve NO olmak üzere beş farklı antioksidan aktivite testi; *in vitro* elastaz, kolajenaz ve tirozinaz olmak üzere üç farklı enzim inhibisyon testi uygulanmıştır. Bütün numuneler antioksidan özellik göstermekle beraber en yüksek antioksidan aktivitenin ekstreler düzeyinde olduğu anlaşılmıştır. Numunelerin elastaz enzimini inhibe etmediği anlaşılmıştır. Kolajenaz enzim inhibisyonu testi sonuçlarına bakıldığında en yüksek aktiviteyi bitkinin sulu ekstresi göstermiştir. Tirozinaz enzim inhibisyon testinin sonuçlarında en yüksek aktivite bitkinin %80'lik EtOH ekstresinde görülmüştür. Bitkiden izole edilmiş saf bileşiklerin, bitki ekstreleri ve kromatografik yöntemlerle elde edilmiş alt fraksiyonlarda bulunan yüzde içerikleri metabolomiks yöntemlerle analiz edilmiştir. Metabolomiks analizi sonucunda kromatografik yöntemler ve izolasyonun devamı için uygun en uygun ekstre ve alt fraksiyonların seçildiği desteklenmiştir. Western blot yöntemiyle ekstre ve alt fraksiyonların düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein fibrilleri üzerine etkileri analiz edilmiştir. **MCE-Fr.E** kodlu fraksiyonun düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein fibrillerinin azalmasında en etkili numune olduğu tespit edilmiştir. İzole edilmiş saf bileşiklerin *in silico* moleküler kenetleme metoduyla Parkinson patolojisinde bulunan α -sinüklein üzerinde etkisi analiz edilmiştir. Bunun sonucunda α -sinüklein üzerinde en etkili bileşiğin korosolik asit olduğu görülmüştür (**MC-11**). Son olarak bitkinin %80'lik EtOH ve sulu ekstresinin, etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle elde edilmiş alt fraksiyonlarının ve saf bileşiklerin, SH-SY5Y hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Gallomirtukommulon C'nin (**MC-04**) IC₅₀ değerinin en yüksek olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Myrtus communis*, fitokimya, parkinson, fenolik bileşikler, flavonoid.

ABSTRACT

Parlar, Z. Pharmaceutical Botanical Studies on the *Myrtus communis* L., Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences Department of Pharmaceutical Botany Master of Sciences Thesis, Ankara, 2024. *Myrtus communis* L., a member of the Myrtaceae family, is a naturally growing, evergreen plant in our country. It is used internally in stress management, diabetes treatment, wound healing, cholesterol lowering, diarrhea and constipation treatment. In this thesis study, the effects of *M. communis* leaf extracts, fractions and pure compounds isolated by chromatographic methods on oxidative stress, inflammation and α -synuclein fibrils linked to Parkinson's pathology were investigated with *in vitro* tests. Within this scope, *M. communis* was examined anatomically and morphologically and pharmacopoeial analyses were performed to create a reference source for the plant's pharmacopoeial monograph. The secondary metabolite groups in the plant content were determined qualitatively by general diagnostic reactions and quantitative substance amount determinations were made. Six pure compounds isolated from the 80% EtOH extraction of the plant leaves by various chromatographic methods were determined by 1D NMR and HE-ESI-MS methods. Two flavonoids, myricitrin (**MC-02**), quercitrin (**MC-05**); three triterpenes, ursolic acid (**MC-09**), corosolic acid (**MC-11**) and asiatic acid (**MC-18**), and gallomirtukommulon C (**MC-04**) in phloroglucinol structure were isolated as pure compound. 5 different antioxidant activity tests, namely ABTS, CUPRAC, DPPH, FRAP and NO *in vitro*; 3 different enzyme inhibition tests, namely elastase, collagenase and tyrosinase *in vitro* were applied on 80% EtOH and water extract of the plant, and subfractions obtained from 80% EtOH by chromatographic methods. Although all samples showed antioxidant properties, it was understood that the highest antioxidant activity was at the level of the extracts. It was understood that the samples did not inhibit the elastase enzyme. When the collagenase enzyme inhibition test results were examined, the highest activity was shown by the water extract of the plant. In the results of tyrosinase enzyme inhibition test, the highest activity was seen in 80% EtOH extract of the plant. The percent contents of pure compounds isolated from the plant, plant extracts and subfractions obtained by chromatographic methods were analyzed by metabolomics methods. As a result of metabolomics analysis, it was supported that the most appropriate extracts and subfractions were selected for chromatographic methods and continuation of isolation. The effects of extracts and subfractions on low and high molecular weight α -synuclein fibrils were analyzed by Western blot method and it was determined that the **MCE-Fr.E** was the most effective sample in reducing α -synuclein fibrils. The effect of isolated pure compounds on α -synuclein found in Parkinson's pathology was analyzed by *in silico* molecular docking method. As a result, it was seen that the most effective compound on α -synuclein was corosolic acid (**MC-11**). Finally, the effects of 80% EtOH and water extract of the plant, subfractions obtained from 80% EtOH by chromatographic methods and isolated pure compounds on cell viability in SH-SY5Y cell line were investigated. It was observed that gallomirtukommulon C (**MC-04**) had the highest IC₅₀ value.

Key Words: *Myrtus communis*, phytochemistry, parkinson, phenolic compounds, flavonoid.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xx
TABLolar	xxiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Morfolojik Özellikler	5
2.1.1. Myrtaceae	5
2.2. <i>M. communis</i> Üzerinde Yapılan Çalışmalar	6
2.2.1. Etnobotanik Çalışmalar	6
2.2.2 Fitokimyasal çalışmalar	12
2.2.3 Farmakolojik Çalışmalar	45
2.3. Parkinson Hastalığı	90
2.3.1. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi	90
2.3.2 Parkinson Hastalığının Patogenez	91
2.3.3. Parkinson Hastalığının Belirtileri	92
2.3.4. Parkinson Hastalığı Tedavisi	93
3. GEREÇ VE YÖNTEM	94
3.1 Botanik Çalışmalar	94
3.1.1 Bitki Materyali	94
3.1.2 Morfolojik Çalışmalar	95

3.1.3 Anatomik Çalışmalar	95
3.2 Fitokimyasal Çalışmalar	97
3.2.1 Genel Teşhis Reaksiyonları	97
3.2.2 Ekstraksiyon Çalışmaları	103
3.2.3. Kromatografik Yöntemler	104
3.2.4 İzolasyon Çalışmaları	108
3.2.5 Metabolomik Çalışmalar	110
3.2.6 Toplam Madde Miktar Tayinleri	111
3.3. Kullanılan Cihazlar	113
3.4. <i>In Vitro</i> Biyolojik Aktivite Çalışmaları	114
3.4.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	114
3.4.2 Enzim İnhibisyon Testleri	117
3.4.3 Hücre Canlılığı Tayini	119
3.4.4. Western Blot Analizi	120
3.5. <i>In Silico</i> Moleküler Kenetlenme Çalışmaları	124
3.6. Farmakope Analizleri	125
3.6.1 Makroskobik ve Mikroskobik Analiz	125
3.6.2 Farmakope Sınır Testleri	126
4. BULGULAR	129
4.1. Morfolojik Çalışmalara ait Bulgular	129
4.2. Anatomik Çalışmalara ait Bulgular	133
4.2.1. Yaprak epidermisi	133
4.2.2. Yaprak enine kesiti	135
4.2.3. Dal enine kesiti	136
4.2. Fitokimyasal Çalışmalara ait Bulgular	137
4.2.1. Genel Teşhis Reaksiyonlarına ait Bulgular	137
4.2.2. Ekstraksiyonlara ait Bulgular	140
4.2.3. İzolasyon Çalışmalarına ait Bulgular	143
4.2.2 Metabolomiks Çalışmalara ait Bulgular	187
4.2.3 Toplam Madde Miktar Tayinlerine ait Bulgular	200

4.3. <i>In Vitro</i> Biyolojik Aktivite Çalışmalarına ait Bulgular	205
4.3.1. <i>In Vitro</i> Antioksidan Aktivite Tayin Testlerine ait Bulgular	205
4.3.2. <i>In vitro</i> Enzim İnhibisyon Çalışmalarına ait Bulgular	214
4.3.3. <i>In Vitro</i> Hücre Canlılığı Tayinine ait Bulgular	218
4.3.4 Western Blot Analizine ait Bulgular	222
4.4. Moleküler Kenetleme Çalışmalarına ait Bulgular	227
4.5. Farmakope Analizlerine ait Bulgular	229
4.5.1 Makroskobik ve Mikroskobik Analizlere ait Bulgular	229
4.5.2 Farmakope Sınır Testlerine ait Bulgular	230
5. TARTIŞMA	234
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	250
7. KAYNAKLAR	256
8. EKLER	277
EK-1: Tez Orijinallik Raporu	
EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuzu	
9. ÖZGEÇMİŞ	279

SİMGELER VE KISALTMALAR

!	Yazar tarafından görülen örnek
%	Yüzde
°C	Derece Selsiyus
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
1D NMR	1 Dimension Nuclear Magnetic Resonance-1 Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans
2D	2 Dimension-2 Boyutlu
8-OHdG	8-Hidroksi-2-deoksiguanozin
A	Absorbans
AAE	Askorbik Asit Eşdeğeri
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ACh	Asetilkolin
AchE	Asetilkolinesteraz
ACN	Asetonitril
ADAM10	Metaloproteaz 10
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariyumu
AKK	Açık Kolon Kromatografisi
Ala	Alanin
AlCl₃	Alüminyum Klorür
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
ANK	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariyumu
Arg	Arjinin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
AST	Aspartat Aminotransferaz
Aβ	Amiloid Beta
BChE	Bütirilkolinesteraz

BDNF	Brain Derivated Neurotrophic Factor-Beyinden Türetilmiş Nörotropik Faktör
BV2	Fare Mikroglial Hücreleri
C₅D₅N	Dötero Piridin
CAT	Katalaz
CCl₄	Karbon Tetraklorür
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
CHCl₃	Kloroform
cm	Santimetre
COX-2	Siklooksijenaz-2
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity-Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
d	Dublet
dd	Dublet dublet
DGQA	3,5-O-Digalloilkinik Asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPD	N,N-Dimetil- <i>p</i> -fenilendiamin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMSO-<i>d</i>₆	Dötero Dimetilsülfoksit
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EC₅₀	Maksimum Etkinin %50'sini Oluşturan Konsantrasyon
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ENTPDaz	Ekto-Nükleozit Trifosfat Difosfohidrolaz
ERK	Dış Sinyal Düzenleyici Kinaz
EtOAc	Etil Asetat
EtOH	Etanol
FALGPA	N-(3-[2-Furil]Akrilolil)-Leu-Gly-Pro-Ala
FeCl₃	Demir (III) Klorür
FeSO₄	Demir Sülfat
Fr.	Fraksiyon

FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power-Demir İndirgeyici Antioksidan Güç
g	Gram
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GAZI	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariumu
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectroscopy-Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
GIS	Gastrointestinal Sistem
Gl. asetik asit	Glasiyel asetik asit
Glu	Glutamat
Gly	Glisin
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	İndirgenmiş Glutayon
Gy	Gray
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
H₂SO₄	Sülfürik Asit
HAD	Sıcak Havayla Kurutma
HCl	Hidroklorik Asit
HFD	Yüksek Yağlı Diyet
HNO₃	Nitrik Asit
HO1	Heme-Oksijenaz-1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography-Yüksek Performanslı Sıvı Kromaografisi
HPSA	Hidrojen Peroksit Süpürücü Aktivite
HR-ESI-MS	High Resolution- Electrospray İonization- Mass Spectroscopy-Yüksek Çözünürlüklü-Elektrosprey İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi
HT-29	İnsan Kolorektal Kanser Hücre Hattı
HUB	Hacettepe Üniversitesi Herbariumu
HUEF	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariumu

Hz	Hertz
IC₅₀	%50'yi İnhibe Eden Konsantrasyon
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL	İnterlökin
IR-HAD	Birleşik Kızılötesi-Sıcak Havayla Kurutma
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
J	Kenetlenme Sabiti
JNK	C-Jun. N-Terminal Kinaz
K-562	Kronik Myeloid Lösemi
KAE	Kateşin Eşdeğeri
Kcal	Kilokalori
KE	Kersetin Eşdeğeri
Kg	Kilogram
KK	Kolon Kromatografisi
Km	Kilometre
L	Litre
LC/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy- Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
LDL	Low Density Lipoproteins-Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
LL	Liquid-liquid Partition- Sıvı-sıvı Partisyon
LPSSD	Low Pressure Superheated Steam Drying -Düşük Basınçlı Kızgın Buharla Kurutma
Lys	Lizin
M	Metre
<i>M. communis</i>	<i>Myrtus communis</i>
<i>m/z</i>	Kütle/iyon Yüğü
MAO	Monoamin Oksidaz
MCA	Metal Şelatlayıcı Aktivite
MCE	<i>M. communis</i> 'in %80'lik Etanol Ekstresi
MCE-Fr.A	MC-RC[3-5]

MCE-Fr.B	MC-RC6-8]
MCE-Fr.C-BuOH	MC-RC[9-22]-LL-n-BuOH
MCE-Fr.C-Su	MC-RC[9-22]-LL-Su
MCE-Fr.D	MC-RC[23]
MCE-Fr.E	MC-RC[24-28]
MCE-Fr.F	MC-RC[29-30]
MCF-7	Meme Kanseri Hücresi
MCI	<i>M. communis</i> 'in İnfüzyon Ekstresi
MDA	Malondialdehit
MeHg	Metil cıva
MeOH	Metanol
Met	Metionin
Mg	Miligram
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
min	Minute-Dakika
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MMP	Matriks Metaloproteinaz
Mol. Ağ.	Molekül Ağırlığı
MPO	Myeloperoksidaz
MPP⁺	1-Metil-4-Fenil-Piridin
MPTP	1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridin
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolium Bromür
MWM	Morris Su Labirenti
Na⁺-K⁺ ATPaz	Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz
NaOH	Sodyum Hidroksit
NF-κB	Nükleer Faktör-Kappa B
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol

NMR	Nuclear Magnetic Resonance-Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik Oksit
NORT	Yeni Nesne Tanıma Testi
NQO1	NAD(P)H-Oksidoredüktaz
NR2B	N-Metil-D-Aspartat Reseptörü 2B Alt Birimi
Nrf2	Nükleer Faktör-Eritroid 2- İlişkili Faktör 2
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity-Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
<i>p</i>	Para
P815	Fare Mastositoma Hücresi
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PC12	Sıçan Feokromositoma Hücreleri
PCR	Polimerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD	Parkinson's Disease-Parkinson Hastalığı
Phe	Fenilalanin
PKK	Poliamit Kolon Kromatografisi
ppm	Part per million-Milyonda Birlik Kısım
PRAP	Fosfomolibden İndirgeyici Antioksidan Gücü
PSA-NCAM	Polisialile Edilmiş Nöral Hücre Yapışma Molekülü
QE	Kersetin Eşdeğeri
qRT-PCR	qReal Time-Polimerase Chain Reaction-Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qTOF-LC-MS	quadrupole Time Of Flight-Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy- Dört Kutuplu Uçuş Süreli-Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopisi
RC	Reçine Kolon
RGC	Retina Ganglion Hücresi
RKK	Reçine Kolon Kromatografisi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RP	Reverse Phase-Ters Faz

s	Singlet
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastoma Hücresi
SKK	Silika jel Kolon Kromatografisi
Skov-3	Yumurtalık Kanseri Hücresi
SN	Substantia Nigra
SNpc	Substantia Nigra pars kompakta
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAC	Toplam Antioksidan Kapasite
TACE	Tümör Nekroz Faktörü-A Dönüştürücü Enzimin
TE	Troloks Eşdeğeri
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity-Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi
TH	Tirozin Hidroksilaz
ThT	Tioflavin T
TLR4	Toll Like Receptor 4-Toll Benzeri Reseptör 4
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
t-PA	Doku Plazminojen Aktivatörü
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
TYRO	Tirozinaz
UV	Ultraviyole
VDAC	Voltaja Bağlı Anyon Kanalının
vs.	Karşı
VSK	Vakum Sıvı Kromatografisi
WST-1	(2-(4-Iyodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4-Disulfofenil)-2H-Tetrazolium, Monosodyum Tuzu
α	Alfa
α7-nAChR	Nöronal Nikotinik Asetilkolin Reseptörünün A7 Alt Birimi
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

μmol

Mikromol

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Tablo 2.3.'te bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları	14
2.2. Tablo 2.15.'te bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları	35
2.3. Tablo 2.16.'da bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları	39
2.4. Tablo 2.19.'da bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları	43
3.1. <i>M. communis</i> genel görünüşü, habitatı ve herbaryum örneği	94
3.2. Epidermis hücrelerinin boyutlarının belirlenmesi.	96
4.1. <i>M. communis</i> subsp. <i>communis</i> 'in Türkiye'de yayılışı.	129
4.2. <i>M. communis</i> 'in morfolojik çalışmalarına ait bulgular.	132
4.3. <i>M. communis</i> yaprak üst epidermisin kloralhidrat reaktifi ile görüntüsü.	133
4.4. <i>M. communis</i> yaprak alt epidermisinin kloralhidrat reaktifi ile görüntüsü.	134
4.5. <i>M. communis</i> yaprak enine kesitinin görüntüleri.	135
4.6. <i>M. communis</i> dal enine kesitinin sartur reaktifi (sol) ve ikili boyama (sağ) görüntüsü	136
4.7. <i>M. communis</i> dal enine kesitinin sartur reaktifi (sol) ve ikili boyama yöntemi ile (sağ) görüntüsü.	136
4.8. İTK analizi görüntüsü	140
4.9. Maserasyonlara ait Silika jel 60 F ₂₅₄ kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analizinin görüntüsü.	141
4.10. Maserasyonlara ait Silika jel RP-18 F _{254s} kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analizinin görüntüsü.	141
4.11. %80 EtOH (MCE) ve su ekstresinin (MCI) karşılaştırmalı İTK analizinin görüntüsü	142
4.12. <i>M. communis</i> yaprakları izolasyon şeması	143
4.13. %80'lik EtOH ekstresinin reçine kolon kromatografisinden elde edilmiş fraksiyonların Silika jel 60 F ₂₅₄ kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analiz görüntüleri	144
4.13. %80'lik EtOH ekstresinin reçine kolon kromatografisinden elde edilmiş fraksiyonların Silika jel 60 F ₂₅₄ kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analiz görüntüleri (devam).	145
4.14. İzole edilmiş saf bileşiklerin İTK analizinin görüntüleri	147
4.15. Mirisetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit (MC-02)'in ¹ H-NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	152
4.16. Mirisetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit (MC-02)'in ¹³ C-NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	153

4.17. Mirisetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit (MC-02)'in HR-ESI-MS spektrumu.	154
4.18. Kersetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit (MC-05)'in ¹ H-NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	158
4.19. Kersetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit (MC-05)'in HR-ESI-MS spektrumu.	159
4.20. Ursolik asit (MC-09)'in ¹ H-NMR spektrumu (piridin- <i>d</i> ₅ , 400 MHz)	164
4.21. Ursolik asit (MC-09)'in ¹³ C-NMR spektrumu (piridin- <i>d</i> ₅ , 100 MHz)	166
4.22. Ursolik asit (MC-09)'in HR-ESI-MS spektrumu.	167
4.23. Korosolik asit (MC-11)'in ¹ H-NMR spektrumu (piridin- <i>d</i> ₅ , 400 MHz)	171
4.24. Korosolik asit (MC-11)'in HR-ESI-MS spektrumu.	172
4.25. Asiatik asit (MC-18)'in ¹ H-NMR spektrumu (piridin- <i>d</i> ₅ , 400 MHz)	176
4.26. Asiatik asit (MC-18)'in ¹³ C-NMR spektrumu(C ₅ D ₅ N,100 MHz)	178
4.27. Asiatik asit (MC-18)'in HR-ESI-MS spektrumu.	179
4.28. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin ¹ H-NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	183
4.29. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin ¹³ C-NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	185
4.30. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin HR-ESI-MS spektrumu.	186
4.31. Ekstrelere ait temel pik kromatogramları.	187
4.32. MC-02'ye ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-02'ye ait ayrılmış iyon kromatogramı.	188
4.33. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-02 bileşiğinin iyon kromatogramları.	189
4.34. MC-04'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-04'e ait ayrılmış iyon kromatogramı	190
4.35. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-04 bileşiğinin iyon kromatogramları.	191
4.36. MC-05'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-05'e ait ayrılmış iyon kromatogramı	192
4.37. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-05 bileşiğinin iyon kromatogramları.	193
4.38. MC-09'a ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-09'a ait ayrılmış iyon kromatogramı	194
4.39. MCE, MCI kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-09 bileşiğinin iyon kromatogramları	195
4.40. MC-11'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-11'e ait ayrılmış iyon kromatogramı.	196

4.41. MCE, MCI kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-11 bileşiminin iyon kromatogramları.	197
4.42. MC-18'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-18'e ait ayrılmış iyon kromatogramı.	198
4.43. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-18 bileşiminin iyon kromatogramları.	199
4.44. Gallik asit standart grafiği ve doğru denklemi	201
4.45. Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçları	201
4.46. Kersetin standart grafiği ve doğru denklemi	202
4.47. Toplam flavonoit madde miktar tayini sonuçları	203
4.48. Kateşin standart grafiği ve doğru denklemi	204
4.49. Toplam proantosiyanidin madde miktar tayini sonuçları	204
4.50. Kersetin standardına ait DPPH radikal süpürücü kapasitesinin % inhibisyon değerleri	205
4.51. Numunelerin DPPH Radikal Süpürücü Kapasite Tayininde IC ₅₀ değerleri	206
4.52. Trolox standart grafiği ve doğru denklemi	207
4.53. Numunelerin ABTS radikal katyonu süpürücü aktivite tayininde mg TE/g numune değerleri	208
4.54. Kersetin standardına ait NO radikal süpürücü etkinliğinin % inhibisyon değerleri	208
4.55. Numunelerin NO radikal süpürücü etki tayininde IC ₅₀ değerleri	209
4.56. Gallik asit standart grafiği ve doğru denklemi	210
4.57. Numunelerin bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi tayininde mg GAE/g numune değerleri	211
4.58. Kersetin standart grafiği ve doğru denklemi	212
4.59. Numunelerin demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü tayininde mg KE/g ekstre değerleri	213
4.60. Kojik asit standardına ait tirozinaz enziminin % inhibisyon değerleri	214
4.61. Numunelerin tirozinaz enzim inhibisyonuna karşı IC ₅₀ değerleri	215
4.62. Epigallokateşin gallatın % kolajenaz enzim inhibisyonu	216
4.63. Numunelerin kolajenaz enzim inhibisyonuna karşı IC ₅₀ değerleri	217
4.64. <i>M. communis</i> ekstrelerinin hücre canlılığı üzerine etkisi	218
4.65. Sonikasyon sonrası α -sinüklein fibrillerinin TEM görüntüsü	223
4.66. α -Sinüklein fibrillerinin uzunluğa karşı göreceli frekans yüzdelere ait grafik	223
4.67. Ekstre ve fraksiyonların düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein protein yoğunluğu üzerine etkileri	224

4.68. Ekstre ve fraksiyonların düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein protein yoğunluğu üzerine etkileri	224
4.69. Ekstre ve fraksiyonların yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein protein yoğunluğu üzerine etkileri	225
4.70. α -Sinüklein proteinine en güçlü bağlanan korosolik asit molekülünün iki boyutlu konformasyon modeli	228
4.71. <i>M. communis</i> yapraklarının toz drog anatomisi.	230
4.72. Yabancı madde analizi	231
4.73. Clevenger düzeneği ve toplanan uçucu yağın görüntüsü	233

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. <i>M. communis</i> 'in Türkiye'de geleneksel tedavide kullanımı	7
2.2. <i>M. communis</i> 'in diğer ülkelerdeki geleneksel kullanımı	9
2.3. Fenolik asitler ve glikozitleri	13
2.4. Flavonlar, flavonoller ve glikozitleri	17
2.5. Flavanlar, flavanoller ve glikozitleri	18
2.6. Flavanonlar ve glikozitleri	19
2.7. Antosiyanidinler ve glikozitleri	20
2.8. Fenilpropanoitler	23
2.9. Kumarinler	24
2.10. Lignan glikoziti	24
2.11. Kromonlar	25
2.12. Kalkonlar	25
2.13. Floroglusinoller	26
2.14. Monoterpenler	34
2.15. Seskiterpenler	39
2.16. Diterpenler	40
2.17. Triterpenler	41
2.18. Meroterpenler	42
2.19. Steroidal bileşikler	44
3.1. Çalışmalarda kullanılan İTK bilgileri	104
3.2. Çalışmalarda kullanılan reçine kolon kromatografisi bilgileri	105
3.3. Çalışmalarda kullanılan poliamit kolon kromatografisi bilgileri	106
3.4. Çalışmalarda kullanılan silika jel kolon kromatografisi bilgileri	106
3.5. Çalışmalarda kullanılan Sefadeks kolon kromatografisi bilgileri	107
3.6. Ekstre ve fraksiyonlara ait kısaltmalar	109
3.7. qTOF-LC-MS analizlerinde kullanılan gradient elüsyon programı	110
3.8. Çalışmalarda kullanılan cihazlar	113
4.1. Sulu ekstre üzerinde yapılmış teşhis reaksiyonları ve sonuçları	137
4.2. Etanol ekstresinde yapılmış teşhis reaksiyonunun sonucu	138
4.3. Alkaloit ekstresinde yapılmış teşhis reaksiyonlarının sonuçları	138

4.4. İTK analiz sonuçları	139
4.5. Ekstraksiyon sonucu madde miktarları ve ekstraksiyon verimleri	140
4.6. Elde edilen bileşiklerin kodları ve isimleri	147
4.7. <i>M. communis</i> 'ten izole edilen flavanol-3- <i>O</i> glikozitleri	148
4.8. Mirisetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit (MC-02)'e ait ^{13}C - ve ^1H -NMR spektroskopik değerleri (DMSO- d_6 ; ^{13}C : 100 MHz, ^1H : 400 MHz)	151
4.9. Kersetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit (MC-05)'in ait ^1H -NMR spektroskopik değerleri (DMSO- d_6 , ^1H -NMR: 400 MHz)	157
4.10. <i>M. communis</i> 'ten izole edilen triterpenler	160
4.11. Ursolik asit (MC-09)'in ^{13}C - ve ^1H -NMR spektral değerleri (piridin- d_5 ; ^{13}C : 100 MHz, ^1H : 400 MHz)	163
4.12. Korosolik asit (MC-11)'in ^1H -NMR spektroskopik değerleri (piridin- d_5 , ^1H : 400 MHz)	170
4.13. MC-18'e ait ^{13}C - ve ^1H -NMR spektroskopik değerleri (piridin- d_5 ; ^{13}C :100 MHz, ^1H : 400 MHz)	175
4.14. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin ^{13}C - ve ^1H - NMR spektroskopik değerleri (DMSO- d_6 ; ^{13}C :100 MHz, ^1H : 400 MHz,)	182
4.15. Saf bileşiklerin ekstre ve fraksiyonlardaki % içerik miktarları	200
4.16. Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçları	201
4.17. Toplam flavonoit madde miktar tayini sonuçları	202
4.18. Toplam proantosiyanidin madde miktar tayini sonuçları	204
4.19. Numunelerin DPPH radikaline karşı IC_{50} değerleri	206
4.20. ABTS radikal katyonu süpürücü aktivite tayini sonuçları	207
4.21. Numunelerin NO radikaline karşı IC_{50} değerleri	209
4.22. Numunelerin bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi	210
4.23. Numunelerin demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü	212
4.24. Numunelerin tirozinaz enzim inhibisyonuna karşı IC_{50} değerleri	214
4.25. Numunelerin elastaz enzim inhibisyonuna karşı IC_{50} değerleri	215
4.26. Numunelerin kolajenaz enzim inhibisyonuna karşı IC_{50} değerleri	216
4.27. MCE ve MCI'nın hücre canlılığı üzerine etkisi	218
4.28. Fraksiyonlara ait IC_{50} değerleri	220
4.29. <i>M. communis</i> 'ten izole edilen saf bileşiklere ait IC_{50} değerleri	221
4.30. Ekstre ve fraksiyonların Western Blot analizinde kullanılan konsantrasyonları	222
4.31. α -Sinüklein proteini ile 6 bileşik arasındaki moleküler kenetleme çalışmasından elde edilen sonuçlar	227

4.32. Kurutmada kayıp analizinin sonuçları	231
4.33. Toplam kül miktar tayini sonuçları	232
4.34. Hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları	232
5.1. Yaprak droglarının monograflarında bulunan sınır testlerinin değerleri	249

1.GİRİŞ

İnsanlar ilk çağlardan bugüne kadar doğada bulunan bitkisel, hayvansal ve madensel kökenli her türlü kaynağı kullanma eğiliminde olmuştur. Günümüze kadar yapılmış olan etnobotanik çalışmalar sonucu elde edilen bulgular, insanların bitkileri, barınma, beslenme, tedavi etme gibi temel ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla kullandıklarını göstermektedir. Yani bitkiler, insanların hem temel besin kaynakları hem de ilk ilaçları olmuştur. İnsanoğlu, hastalıklardan korunmak, önlem almak ve hastalıkları iyileştirebilmek için doğaya ve bitkilere yönelmiş, dermanı doğada ve özellikle bitkilerde aramışlardır. Günümüze kadar ulaşan bitkilerin kullanımına ait bilgiler, etnobotanik çalışmalar, araştırmacılara kaynak olmuş ve bu sayede birçok bitkinin etkisi kanıtlanmış, etkiden sorumlu birçok maddenin de yapısı aydınlatılmıştır. Bugün, bu bilgiler bilim süzgecinden geçirilerek yeni ilaçlar/bitkisel ilaçlar keşfedilmeye veya geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin tedavi edici özellikleri farmakolojik olarak ispat edilmeye başlanmıştır (1). İlaç kimyasının gelişmesiyle pek çok doğal kaynaklı ilaç hammaddesi sentezlenebilir olmuştur. İlaç moleküllerinin sentetik ve yarı-sentetik türevleri de oluşturulmuştur. Bu ilaç moleküllerinden günümüze ulaşanlara asetilsalisilik asit, morfin, paklitaksel örnek verilebilir (2-5). Sentetik ilaçların yan etkilerinin, maliyetlerinin artması; kronik hastalıkların tedavisinde bu ilaçların yetersiz kalması, halk sağlığı açısından önem arz eden antibiyotiklerin enfeksiyonlara karşı istenilen etkiyi gösterememesi insanları yeniden doğal olana yönlendirmiştir (6-12). Her ne kadar gelişen modern tedavi kavramı içerisinde antibiyotikler, kortikosteroidler gibi geniş farmakolojik etki profiline sahip sentetik ilaçlar pazarda yer alsada, günümüzde 70.000'den fazla bitkiden tıbbi olarak yararlanıldığı tahmin edilmekte, hızla gelişen kimya ve farmakoloji tekniklerinin sağladığı olanaklarla yapısı ve etkinliği kanıtlanan moleküller ile doğal kaynaklı tıbbi ürünler pazara sunulmaya başlamıştır. Dünya üzerinde yaklaşık 450.000 bitki türü bulunmakta ve yeni türler keşfedilmeye devam etmektedir. Tıbbi olarak yararlanan 70.000 bitkiden, yaklaşık 21.000'i hastalıkları tedavi etmek amacıyla tıbbi ürün hazırlamak için kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, WHO), "Geleneksel Tıp Stratejisi 2014-2023" programıyla, geleneksel tıbbi bitkilerin kullanımını dünyada artırmaya çalışarak, insanların sağlığını korumaya yönelik politikalar uygulamaktadır.

Ülkemiz, üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği yerde olması yanında, iklim farklılıkları, topografik ve jeolojik çeşitlilik, 0-5000 m arasında değişen yükseklik farklılıkları, farklı habitatları barındırması gibi nedenlerle, bitki zenginliği açısından, dünyada ılıman iklim kuşağındaki ülkelerin başında gelmektedir. Ayrıca Anadolu'nun Avrupa ve Asya kıtaları arasında köprü konumunda olması, buna bağlı olarak iki kıta arasında karşılıklı bitki göçleri ve Anadolu Diyagonali'nin doğusu ve batısı arasında ekolojik çeşitlilik de ülkemizin florasına yansımıştır. Ülkemiz, iklimsel ve coğrafik özelliklerin kısa aralıklarla değişmesi sonucu orman, dağ, step, sulak alan, kıyı ve deniz ekosistemlerine, bu ekosistemlerin farklı formlarına ve farklı kombinasyonlarına sahip olması nedeniyle, dünyanın çok önemli gen ya da orijin merkezinin örtüştüğü bir konumdadır. Türkiye, dünyanın 8 gen merkezinden ikisinin (Akdeniz ve Yakın Doğu) kesiştiği noktada yer almaktadır. Ülkemizde yaklaşık 12.000 tanımlanmış takson bulunmaktadır ve bunun %35'i endemiktir (13, 14). bu açıdan Avrupa kıta florasındaki sayıya denk bir zenginlik ortaya çıkmaktadır. Endemizm oranı yüksek bu floristik çeşitlilik ülkemizin sahip olduğu ve sahip çıkılması gerek en önemli değerlerindedir. İnsanoğlu, bitkileri daha iyi tanıdıkça, farklı hastalıkların tedavisinde farklı bitkileri kullanmaya başlamıştır. Bunun sonucu olarak fitoterapi, yani en genel anlamda “bitkilerle yapılan tedavi” ortaya çıkmıştır. Fitofarmakoterapi ise hastalıklardan korunmak ve tedaviyi desteklemek amacı ile tıbbi bitkilerden ve onların etkin maddelerini taşıyan kısımlarından veya bir işlem yoluyla elde edilmiş doğal ürünlerinden hareketle standardize edilmiş farmasötik formlar (tablet, kapsül, vb.) kullanarak yapılan çağdaş uygulamaya verilen isimdir.

M. communis L. bir Akdeniz elementidir. Akdeniz bölgesinde doğal olarak veya kültürü yapılarak yetiştirilmektedir. Etnobotanik çalışmalar göstermektedir ki ülkemizde tedavi amacıyla kullanılan bitkiler oldukça fazladır ve geleneksel halk tıbbında *Myrtus* cinsi de yer almaktadır. Myrtales ordusunun Myrtaceae familyasına ait *Myrtus* cinsi ülkemizde *Myrtus communis* subsp. *communis* olarak bir alt tür ile temsil edilmektedir. Ülkemizde Akdeniz, Ege ve Karadeniz Bölgelerinde yetişmektedir (15).

Geleneksel Türk halk tıbbında *M. communis* ‘murt’, ‘mersin’ veya ‘hambeles’ adlarıyla bilinmektedir. *M. communis* yapraklarının infüzyonu şeker hastalığında ve stres yönetiminde, taze meyvelerinin yenilmesi diyareyi tedavi etmek amacıyla

kullanılmaktadır (16). Aynı zamanda halk arasında dahilen öksürük kesici, mide bulantısını azaltıcı ve ateş düşürücü etkileri de bulunmaktadır (17). Ayrıca *M. communis*'in antienflamatuvar, nöroprotektif, analjezik, antidiyabetik, antiproliferatif ve peptik ülser tedavi edici etkilerine ait farmakolojik çalışmalar da mevcuttur (18).

M. communis üzerine yapılan çalışmalar incelediğinde kurutulmuş yaprakların kersetin, kateşin ve mirsetin türevi flavonoidler, mirtukommulon A, mirtukommulon B ve semimirtukommulon türevi açılfloroglusinoller, tanenler ve uçucu yağ açısından zengin olduğu görülmektedir (18).

Bitki yapraklarının antioksidan, antienflamatuvar ve nöroprotektif etkileri göz önüne alındığında (18) farklı aktivite çalışmaları ile Parkinson hastalığı üzerinde etkilerinin çalışılabileceği düşünülmüştür .

Parkinson hastalığı (PD), idiyopatik tremor felci olarak da bilinen ve Alzheimer Hastalığı'ndan sonra ikinci en büyük nörodejeneratif hastalıktır. Substantia nigradaki (SN) dopaminerjik nöronların dejenerasyonu, Lewy cisimcikleri oluşumunun yanı sıra nöroenflamasyon ile karakterizedir. Parkinson patogeneğinde; oksidatif stres, mitokondriyal hasar, enflamasyon ve anormal α -sinüklein birikimi görülmektedir (19).

Bitkinin nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcut olmakla birlikte bitki yapraklarının ekstresi ve bu ekstreden elde edilen alt fraksiyonların Parkinson hastalığı üzerine olası etkilerinin araştırıldığı herhangi bir *in vitro* ve *in silico* çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez kapsamında geleneksel bitkisel tıbbi ürünler için etkin madde olarak standardize bitkisel preparatların elde edilmesi, ülkemizde ve global olarak çok önemli olduğundan yükselen bitkisel ürün pazarında yer almak üzere tezimizde *Myrtus communis* L. bitkisinin yaprakları kullanılarak bilimsel araştırmalar yapılmıştır. *M. communis* L.'nin farmakope analizleri ve Farmasötik Botanik incelemelerinin yapılıp farmakolojik aktiviteye sahip bazı ekstralarının içerik analizlerinin yapılması, bitkinin taşıdığı bileşiklerin izole edilmesi; ekstre ve fraksiyonların serbest radikallere karşı antioksidan etkinliklerinin ölçülmesi ve enzim inhibisyonlarının tayin edilmesi, bu ekstre ve fraksiyonlar ile birlikte izole edilmiş bileşiklerin hücre canlılığı ve *in silico*

moleküler kenetleme metoduyla bileşiklerin Parkinson hastalığının bir etkeni olan α -sinüklein proteini üzerinde etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Morfolojik Özellikler

2.1.1. Myrtaceae

Herdem yeşil ağaç veya çalılardır. Yapraklar basit, bütün, karşılıklı, almaşık, kulakçiksız, şeffaf aromatik yağ bezelidir. Çiçekler, yaprak akslarında veya koltuk altı şemsiyelerinde tek, erdişi, aktinomorf, 4-5 parçalıdır. Kaliks tüpü yumurtalığa bitişiktir(adnat). Çok sayıda stamen bulunur. Ovaryum alt durumlu, plasentasyon eksensel, 1-çok gözlü), her lokulus çok sayıda ovüllüdür. Meyve, kalıcı kaliks dişleri veya bir kapsül ile taçlandırılmış bir üzüksü meyvedir; tohumlar çok sayıda, endosperm genellikle yoktur (15).

Ülkemizde Myrtaceae familyasına ait 2 cins ve 3 tür bulunmaktadır. Myrtaceae familyasından *Myrtus* cinsine ait tayin anahtarı aşağıda verilmiştir:

- 1.Çalılar; yapraklar karşılıklı; meyve üzüksü1. *Myrtus*
 1.Ağaçlar; olgun yapraklar alternat; meyve odunsu kapsül.....2. *Eucalyptus*

***Myrtus* L. Cinsi**

Çalı. Yapraklar basit, karşılıklı, glandüler-noktalı, aromatiktir. Çiçekler yaprak koltuklarında tek başına, beyaz; meyvesi kalıcı kaliks dişleriyle taçlandırılmış bir meyvedir. Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Batı Suriye, Kıbrıs, Orta Asya, Doğu Pakistan'da yayılış göstermektedir. Subsp. *tarentina* (L.) Arc kısa boylu, daha küçük yapraklı (2 cm'den az) ve subgloboz meyveleri olan bitki, Güney Avrupa'da bulunur (15).

2.2. *M. communis* Üzerinde Yapılan Çalışmalar

M. communis üzerine yapılmış pek çok bilimsel çalışma mevcuttur. Bunlar etnobotanik, fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalar olmak üzere 3 ayrı başlıkta incelenmiştir.

2.2.1. Etnobotanik Çalışmalar

Bu başlık kapsamında *M. communis*'in Türkiye'de ve dünyada geleneksel kullanımına ait bilgiler tablolar halinde sunulmuştur.

***M. communis*'in Türkiye'de Geleneksel Tedavide Kullanımı**

Türkiye'de 2013'ten günümüze kadar yapılmış etnobotanik çalışmalar incelenmiş ve *M. communis*'in geleneksel tedavide kullanımına ilişkin bilgiler tablo halinde sunulmuştur (Tablo 2.1.). Bir Akdeniz elementi olan bitkinin, özellikle ülkemizin Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanıldığı tespit edilmiştir. En çok yaprakları kullanılmakla birlikte bitkinin meyveleri, çiçekleri ve uçucu yağı da halk arasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Tablo 2.1. *M. communis*'in Türkiye'de geleneksel tedavide kullanımı

Kullanıldığı yöre	Yöresel adı	Kullanılan kısım	Kullanım amacı	Hazırlama ve uygulama şekli	Kaynaklar
Kumluca (Antalya)	mersin, sazak	meyve ve toprak üstü	diyabette, kolesterol düşürücü olarak,	çiğ olarak; dahilen	(20)
Turgutlu (Manisa)	mersin	yapraklar	prostat rahatsızlıklarında	dekoksiyon; dahilen	(21)
			diüretik olarak	infüzyon; dahilen	(22)
	mersin, murt	yapraklar ve meyveler	antiseptik olarak, bel soğukluğunda, bronşitte, diyabette, kabızlıkta, tüberkülozda, üriner sistem sorunlarında, yara iyileştirici olarak		(23)
Alaşehir (Manisa)	mersin	yaprak ve meyve	idrar kaçırılmaya karşı, mesane enfeksiyonlarına karşı	infüzyon, çiğ olarak; dahilen	(24)
Gündoğmuş (Antalya)	mersin	yaprak	kolesterol düşürücü olarak, kilo kaybı için	infüzyon; dahilen	(25)
Antakya (Hatay)	hambeles, mersin, murt reyhan,	meyve	diyabette, kolesterol düşürücü olarak	çiğ olarak; dahilen	(26)
		yaprak	bebek bezi döküntüsünde, iltihaplı yaralarda antiseptik olarak	kavrulup toz edilerek; haricen	
		yaprak	ağız kokusuna karşı, ağız yaralarında,	dekoksiyonu gargara şeklinde; haricen	
		yaprak	ateş düşürücü olarak	dekoksiyon; dahilen	
Balıkesir	mersin	yapraklı dallar, yapraklar	saç bakımında, kalp hastalıklarında	infüzyon; dahilen	(27)
Akdeniz Bölgesi	hambeles, murt	yaprak	diyabette, stres yönetiminde	infüzyon; dahilen	(16)
		meyve	ishale karşı	çiğ olarak ;dahilen	
Marmaris (Muğla)	mersin	uçucu yağ	diyabette	dahilen	(28)

			ağrı ve felçte	haricen	
Erzincan	mersin	yaprak	bağışıklık sistemi güçlendirici olarak, üriner sistem enfeksiyonlarına karşı	infüzyon; dahilen	(29)
Acıpayam (Denizli)	mersin	yaprak	bebeklerde karın ağrısına karşı, diyabette	infüzyon; dahilen	(30)
			çocuklarda deri kızarıklığında	dekoksiyon; haricen	
Acıpayam ve Kale (Denizli)	mersin	yaprak	ishale karşı	dekoksiyon; dahilen	(31)
		çiçek	cilt hastalıklarında	çiğ olarak; haricen	(31)
Karaisalı (Adana)	murt	yaprak	diyabette, ishale karşı	infüzyon; dahilen	(32)
Kumluca (Antalya)	mersin	yaprak	kolesterol düşürücü olarak	infüzyon, dahilen	(33)
Gülнар (Mersin)	arapmurt, mersin, murt	yaprak ve meyve	diyabetli erkeklerde afrodizyak olarak	çiğ olarak; dahilen	(34)
Mersin	hambelez, mersin, merta, murt	meyve	diyabette	çiğ olarak; dahilen	(35)
		yaprak	kabızlığa karşı	infüzyon; dahilen	

Türkiye’de geleneksel olarak pek çok hastalık için farklı yöntemlerle kullanılan *M. communis*’in aynı zamanda Akdeniz’e kıyısı olan diğer ülkelerde de etnobotanik kullanımları mevcuttur.

***M. communis*’in Dünyada Geleneksel Kullanımı**

M. communis’in dünyada etnobotanik kullanımına ilişkin yapılmış çalışmalar derlenmiştir. Bitkinin genellikle Akdeniz ülkelerinde yaprak, meyve ve tohumları kullanılmakla birlikte İran, Etiyopya ülkelerinde de pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. *M. communis*’in dünyada geleneksel kullanımını içeren çalışmalar aşağıdaki tabloda sunulmaktadır (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. *M. communis*'in diğ er ÷lkelerdeki geleneksel kullanımı

Kullanıldığı ÷lke	Yöresel adı	Kullanılan kısım	Kulanım amacı ve/veya etkisi	Hazırlama ve uygulama şekli	Kaynaklar
Cezayir	cilmum, elrayhan rihan, rihene	yaprak	ateş düşürücü olarak, diyabette, ishale karşı, kabızlığa karşı, karın ağrılarında, romatizma ağrılarında, sindirim sistemi rahatsızlıklarında, stres yönetiminde, tansiyon düşürücü olarak, vücut ağrılarında	infüzyon; dahilen	(36-40)
			diyabette, şişkinliğe karşı	dekoksiyon; dahilen	
			egzamaya karşı	dekoksiyon; haricen	
		tohum	diyabette	dekoksiyon; dahilen	
		meyve	diyabette, ishale karşı, romatizma	çiğ olarak; dahilen	

Tablo 2.2. *M. communis*'in diğ er ÷lkelerdeki geleneksel kullanımı (devamı)

			ağ rılarında, stres yönetiminde, tansiyon düş ürücü olarak		
Etiyopya	ades	yaprak	baş ağ rısına karşı, uyuza karşı	dekoksiyon/da hilen, kuru bitki/haricen	(41, 42)
Fas	arraihan, raihane, rayhan rihan, rihane	yaprak	cilt hastalıklarında, hazımsızlıkta	infüzyon; haricen	(43-47)
			diyabette, besin zehirlenmelerinde, hazımsızlıkta, kalp güçlendirici olarak	dekoksiyon;da hilen	
			migren ağ rısında, saç bakımında, saç dökülmesine karşı	lapa şeklinde; haricen	
		meyve	sindirimi kolaylaştırıcı olarak	kurutulmuş ve toz edilmiş meyvelerin kaynatılmasıyla; dahilen	
İran	daneh, moord, moordaneh, mourdeneh, murd	yaprak	diüretik olarak, hazımsızlıkta, soğ uk algınlığında	infüzyon; dahilen	(48-50)
			topikal enfeksiyonların tedavisinde	infüzyon; haricen	
			diüretik olarak, hazımsızlıkta, sakinleştirici	dekoksiyon;da hilen	

Tablo 2.2. *M. communis*'in diğ er ÷ lkelerdeki geleneksel kullanımı (devamı)

			olarak, soğ uk algınlı ğ ında ter kokusunu önleyici olarak,		
			topikal enfeksiyonların tedavisinde	dekoksiyon;ha ricen	
		meyve	sakinleştirici olarak, soğ uk algınlı ğ ında	dekoksiyon; dahilen	
İtalya	mirtidda, mirtu, mortella, murtedda, murtidda, murtilla, murtua, murtuekka	yaprak	diş ağrısında, diüretik olarak, göğ üs yumuşatıcı olarak	dekoksiyon; dahilen	(51-57)
			ayak ağrılarında, çocuklarda cilt kızarıklı ğ ına karşı, terlemenin azaltılmasında	kuru tozun ayaklara uygulanmasıyl a; haricen	
		meyve ve dal	artritte	dekoksiyon	
		toprak üstü	hemoroitte	dekoksiyon	
		meyve	hazımsızlıkta,	meyvenin suyu sıkılarak; dahilen,	
			ayak terlemesini yatıştırıcı olarak	meyvenin suyu sıkılarak; haricen	

Tablo 2.2. *M. communis*'in diğer ülkelerdeki geleneksel kullanımı (devamı)

Lübnan	hemblas	meyve	tansiyon düşürücü olarak	meyvelerin yağda masere edilmesiyle;da hilen	(58)
Tunus	jedra	yaprak	baş ağrısında	infüzyon; dahilen	(59)

2.2.2 Fitokimyasal alışmalar

'Bitki kimyası' anlamına gelen fitokimya, bitkilerin içerdiği sekonder metabolit gruplarının ve saflaştırılan moleküllerin kimyasının incelenmesini temel almaktadır. Biyosentez yolaklarına göre fenolik bileşikler, terpenoitler ve alkaloitler olmak üzere üç ana başlıkta incelenmektedir (60, 61). Bu kısımda *M. communis*'in üzerine yapılmış fitokimyasal çalışmalardan elde edilmiş sekonder metabolitler tablolar halinde gruplandırılmıştır. Bitki üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda alkaloit grubuna ait bileşik izolasyonuna rastlanmadığından fitokimyasal çalışmalar başlığı altında fenolik bileşikler ve terpenoit grubu bileşikler sunulmuştur.

Fenolik Bileşikler

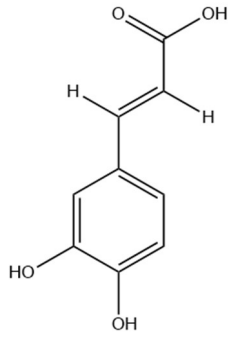
Fenolik bileşikler şikimik asit ve/veya asetat-malonat yolaklarından türeyen sekonder metabolit gruplarıdır. *M. communis*'in fitokimyasal içeriği incelendiğinde; fenolik asitler, flavonoitler (flavan grubu bileşikler ve bunların glikozitleri, flavanon glikozitleri, flavon grubu bileşikler ve bunların glikozitleri), fenilpropanoitler, floroglusinoller, antosiyanidin grubu bileşikler ve bunların glikozitleri, kalkonlar, kromonlar, kumarin glikoziti ve lignan glikoziti fenolik bileşikleri oluşturmaktadır.

Fenolik asitler ve glikozitleri

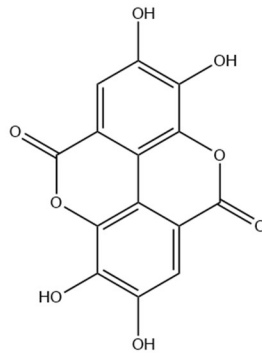
M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş fenolik asitler ve glikozitlerinin isimleri, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.3. Fenolik asitler ve glikozitleri

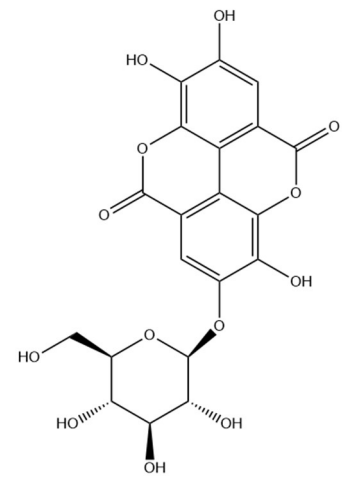
Bileşik adı	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
3,5-digalloil kinik asit	Yaprak	(62)
Ellajik asit	Meyve	(63)
Digalloil- β -D-glukopiranoz	Yaprak	(64)
Ellajik asit hekzozit	Yaprak	(64)
Gallik asit	Meyve	(64)
Galloil glukoz	Yaprak	(64)
Kinik asit	Yaprak	(64)
Kornusiin C	Yaprak	(64)
Striktinin	Yaprak	(64)
Trigalloil glukoz	Yaprak	(64)
Kafeik asit	Yaprak ve meyve	(65)
Ferulik asit	Yaprak, gövde, meyve	(66, 67)
Klorojenik asit	Meyve	(67)
<i>p</i> -Kumarik asit	Meyve	(67)
Siringik asit	Meyve	(67)
Vanilik asit	Meyve	(67)
Searoin	Toprak üstü	(67)
Usnon A	Toprak üstü, yaprak	(68, 69)
İzousnik asit	Çiçek	(69)



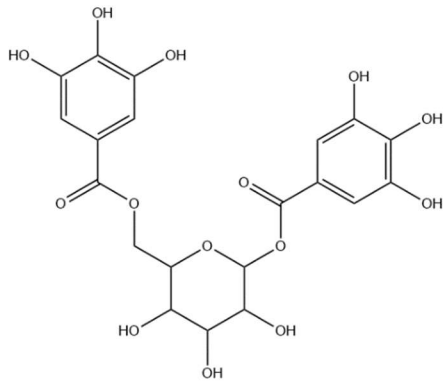
Kafeik asit



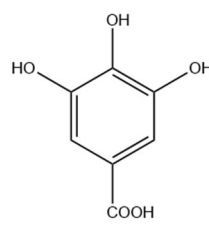
Ellajik asit



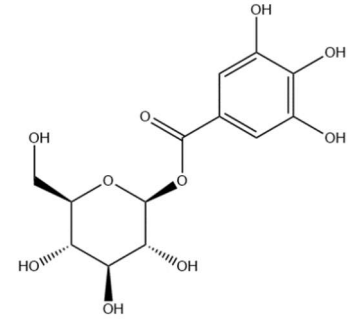
3,5-digalloil kinik asit



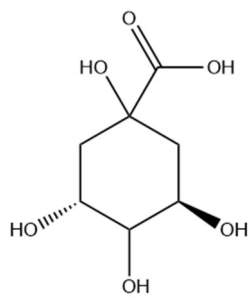
Digalloil-β-D-glukopiranoz



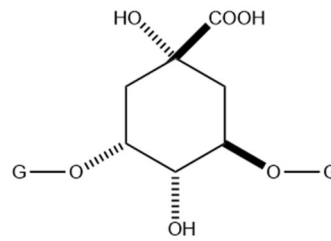
Gallik asit



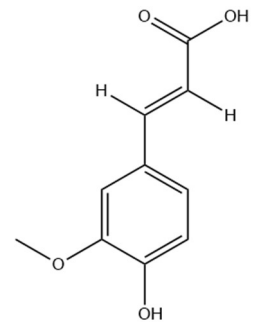
Galloil glukoz



Kinik asit

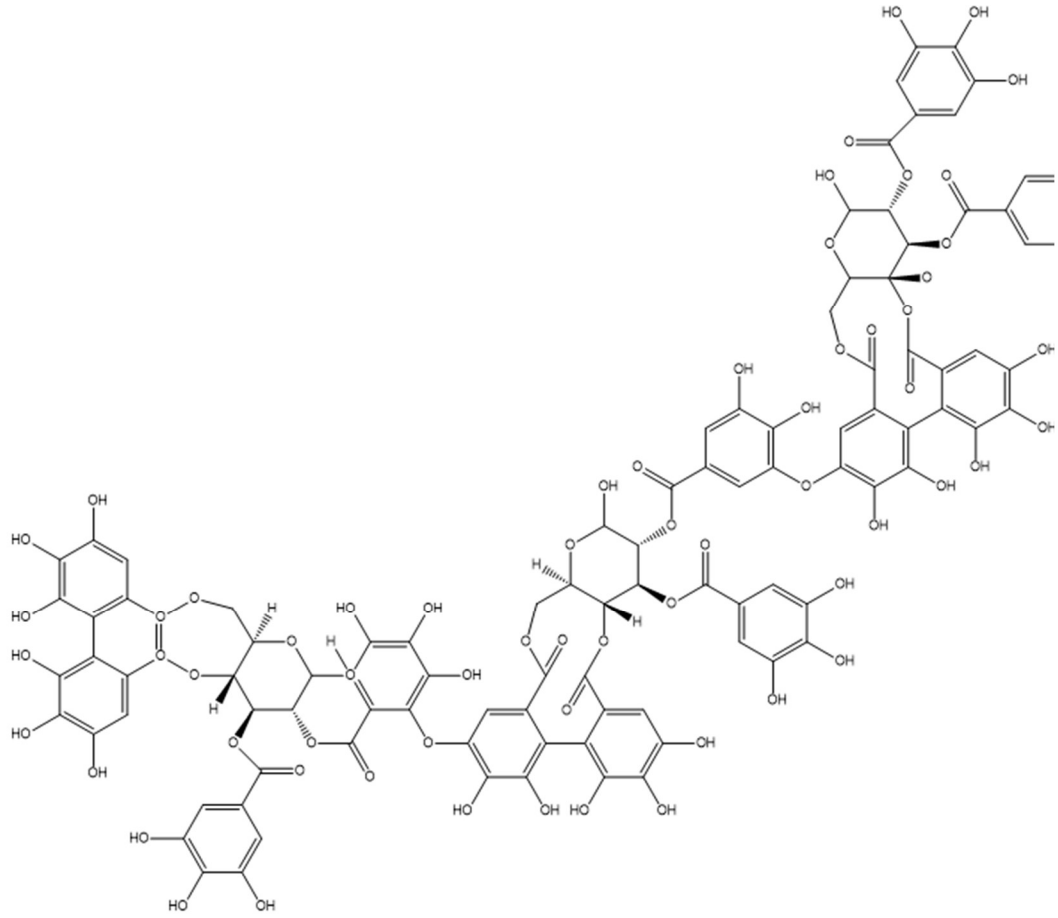


Kinik asit 3,5-digallat

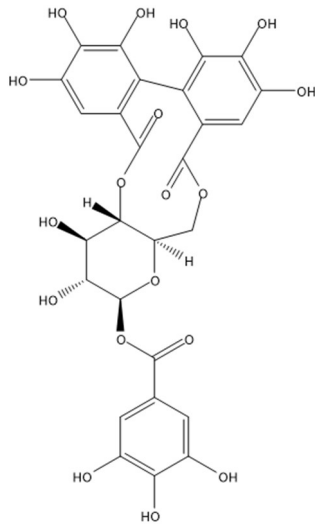


Ferulik asit

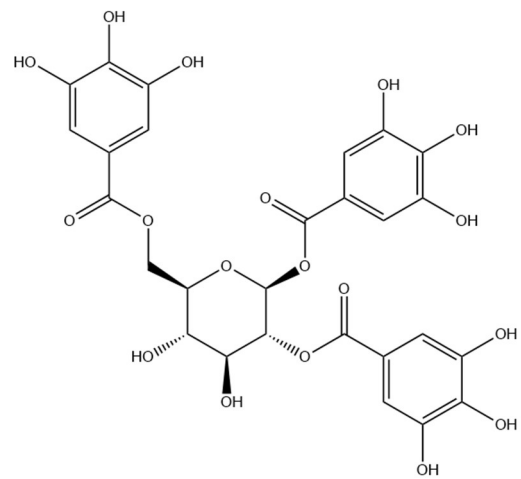
Şekil 2.1. Tablo 2.3.'te bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları



Kornusiiin C

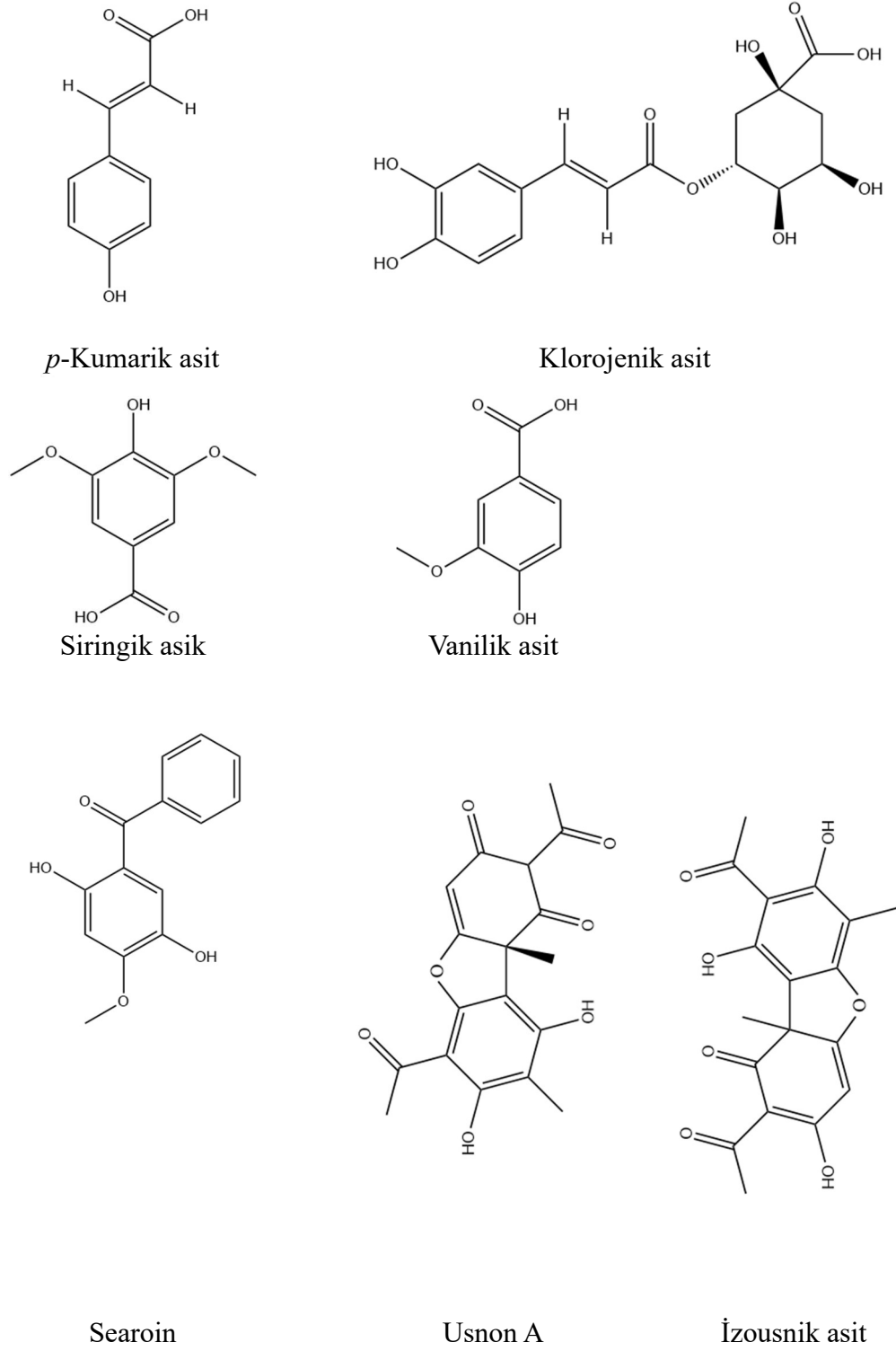


Striktinin



Trigalloil glukoz

Şekil 2.1. Tablo 2.3.'te bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları (devam)

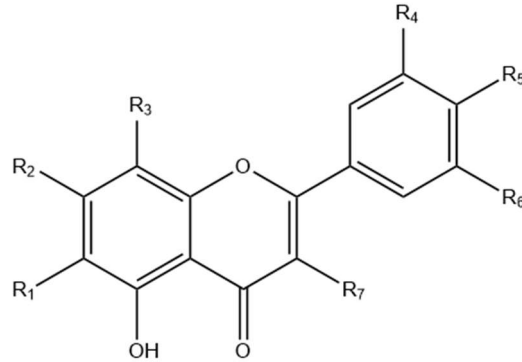


Şekil 2.1. Tablo 2.3.'te bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları (devam)

Flavonlar, flavonoller ve glikozitleri

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş flavonlar, flavonoller ve glikozitlerinin isimleri, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.4. Flavonlar, flavonoller ve glikozitleri

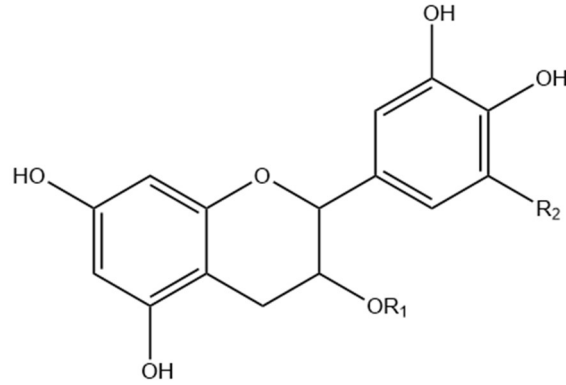


Bileşik adı	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
Mirsetin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH	Meyve	(70)
Mirsetin-3-O-β-D-galaktoz	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-β-galaktoz	Yaprak	(62)
Mirsetin-3-O-β-D-galaktoz 6''-O-gallat	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-galloilgalaktoz	Yaprak	(62)
Mirsetin-3-O-β-D-ksiloz	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-β-ksiloz	Yaprak	(62)
Mirsetin-3-O-α-L-ramnoz	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-α-ramnoz	Yaprak	(62)
Mirsetin 3-arabinoz	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-α-arabinoz	Yaprak	(64)
Mirsetin galloil ramnopiranoz	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-galloilramnoz	Yaprak	(64)
Kersetin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	Meyve	(70)
Kersetin-3-O-ramnoz	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-α-ramnoz	Yaprak	(64)
Kersetin 3-O-galaktoz	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-β-galaktoz	Meyve	(67)
İzokersetin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-β-glukoz	Yaprak ve meyve	(65, 67)
Luteolin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-H	Yaprak ve meyve	(65)
İzorametin	-H	-OH	-H	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	Meyve	(67)
Sideroksilin	-CH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	-H	-OH	-H	-H	Toprak üstü	(68)
Tektoriksin	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H	-H	Toprak üstü	(68)
Kemferol	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH	Meyve	(67)
Kemferol-O-galloilgalaktoz	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H	-galloilgalaktoz	Yaprak	(64)

Flavanlar, flavanoller ve glikozitleri

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş flavanlar, flavanoller ve glikozitlerinin isimleri, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.5. Flavanlar, flavanoller ve glikozitleri

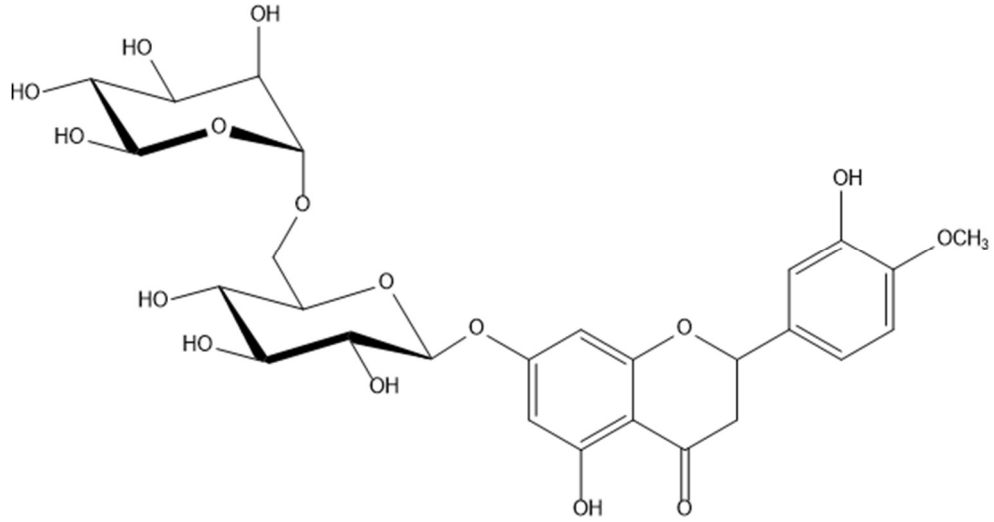


Bileşik adı	R ₁	R ₂	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
(-)-Epigallokateşin	-H	-OH	Meyve	(71)
(-)-Epigallokateşin-3-O-gallat	-galloil	-OH	Yaprak, meyve	(64, 71)
Epikateşin 3-O-gallat	-galloil	-H	Meyve	(71)

Flavanonlar ve glikozitleri

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş flavanon ve glikozitlerinin isimleri, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.6. Flavanonlar ve glikozitleri



Bileşik adı

Hesperidin

**Elde edildiği
kısım**

Meyve

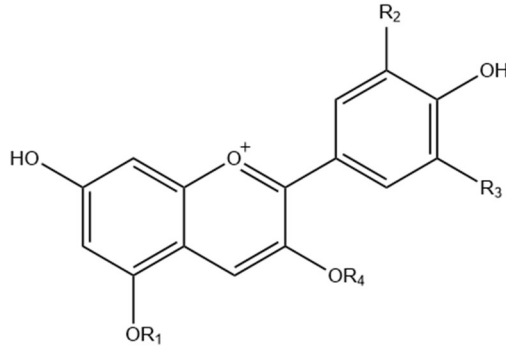
Kaynak

(72)

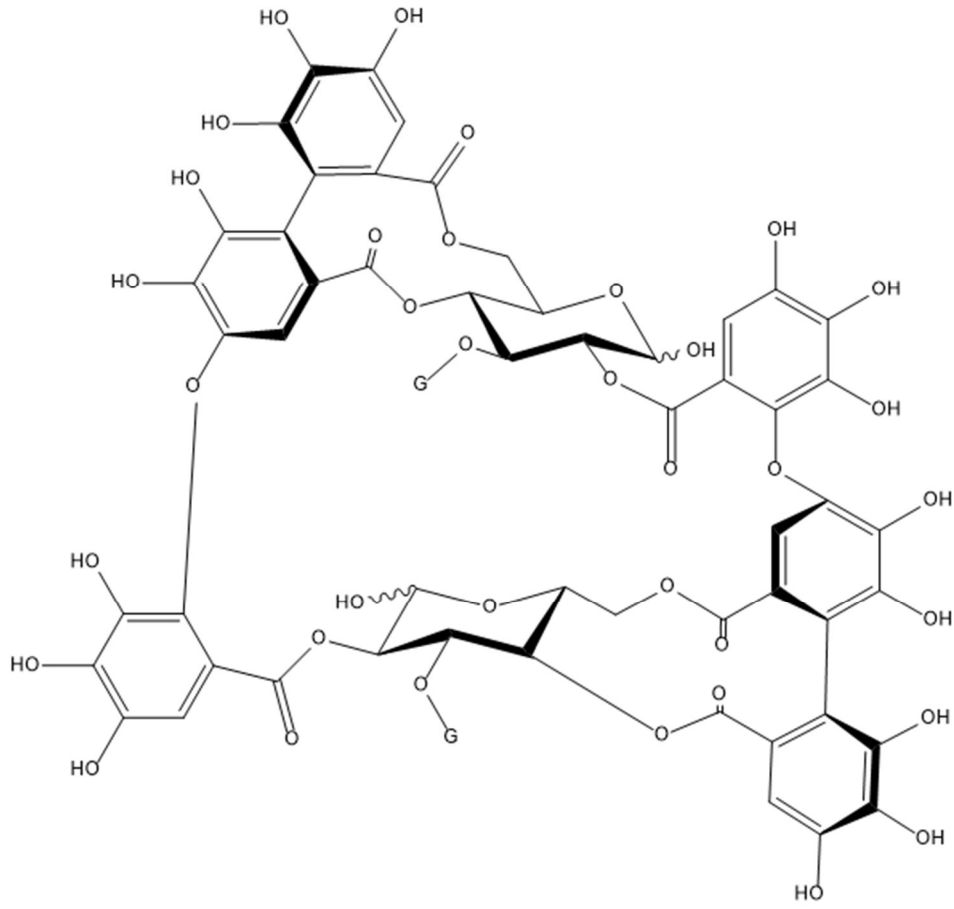
Antosiyanidinler ve glikozitleri

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş antosiyanidin glikozitlerinin isimleri ve referansları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Bitki içeriğinde bulunan antosiyanin grubu bileşikler bitkinin yalnızca meyvesinde bulunmaktadır.

Tablo 2.7. Antosiyanidinler ve glikozitleri



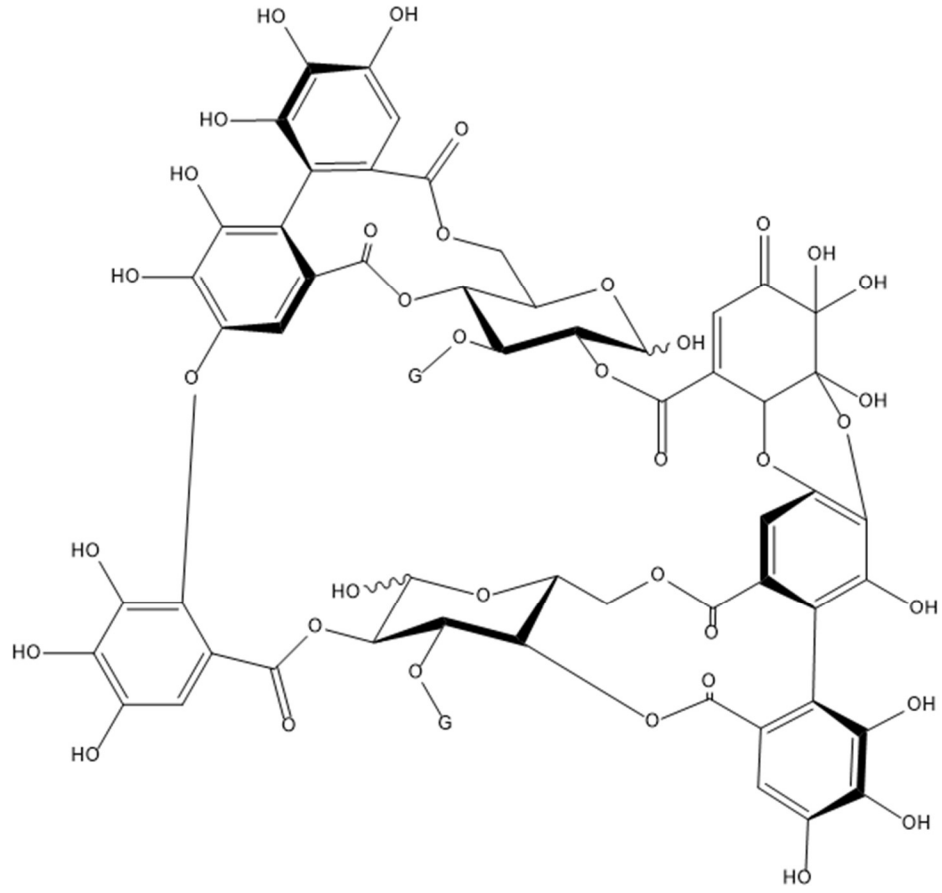
Bileşik adı	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Kaynaklar
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozit	-H	-OH	-OH	-β-glukoz	(65, 70)
Delfinidin-3- <i>O</i> -arabinozit	-H	-OH	-OH	-α-arabinoz	(73)
Delfinidin 3,5-diglukozit	-β-glukoz	-OH	-OH	-β-glukoz	(73)
Delfinidin kumaroil glukozit	-OH	-OH	-OH	- <i>p</i> -kumaroilglukoz	(73)
Delfinidin 3- <i>O</i> -rutinozit	-H	-C ₂ H ₅	-H	-rutinoz	(73)
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozit	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-β-glukoz	(70)
Malvidin-3- <i>O</i> -arabinozit	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-α-arabinoz	(73)
Malvidin 3- <i>O-p</i> -kumaroilglukozit	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	- <i>p</i> -kumaroilglukoz	(73)
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glukozit	-H	-H	-H	-β-glukoz	(73)
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozit	-H	-H	-OCH ₃	-β-glukoz	(73)
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozit	-H	-OCH ₃	-OH	-β-glukoz	(70)
Petunidin-3-arabinozit	-H	-OH	-OCH ₃	-α-arabinoz	(65)
Siyanidin-3- <i>O</i> -glukozit	-H	-H	-OH	-β-glukoz	(65)
Siyanidin-3- <i>O</i> -arabinozit	-H	-OH	-H	-α-arabinoz	(73)
Siyanidin-3,5-di- <i>O</i> -glukozit	-β-glukoz	-H	-OH	-β-glukoz	(73)

Tablo 2.7. Antosiyanidinler ve glikozitleri (devam)

Bileşik
Oenotein B

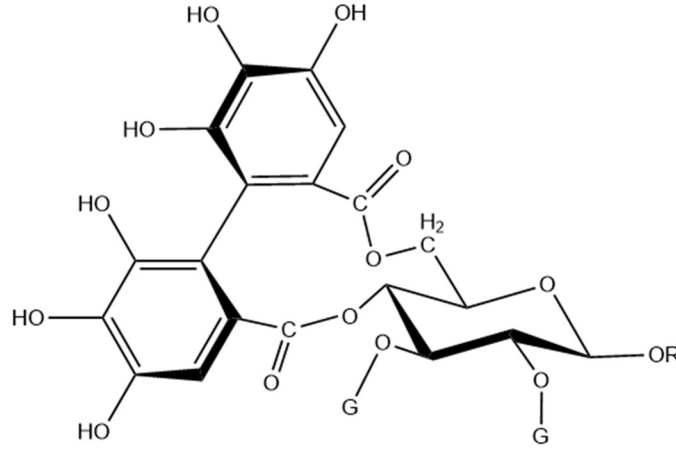
Kaynak
(64)

G: Galloili temsil etmektedir.

Tablo 2.7. Antosiyanidinler ve glikozitleri(devam)

Bileşik
Öjeniflorin D₂

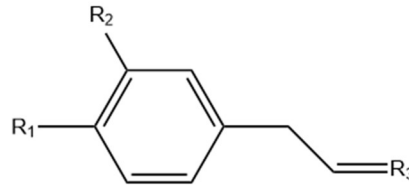
Kaynak
(64)

Tablo 2.7. Antosiyanidinler ve glikozitleri(devam)

Bileşik adı	R	Kaynaklar
Tellimagrandin I	-H	(64)
Tellimagrandin II	-G (galloil)	(64)

Fenilpropanoitler

M. communis üzerine yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiş fenilpropanoitlerin isimleri, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

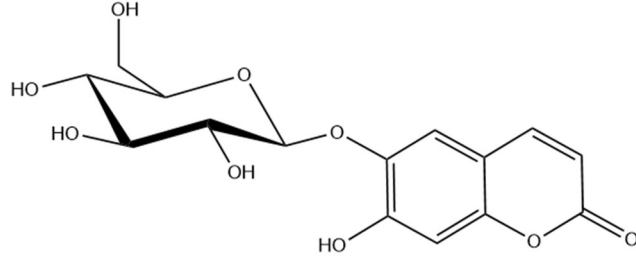
Tablo 2.8. Fenilpropanoitler

Bileşik adı	R ₁	R ₂	R ₃	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
Estragol	-OCH ₃	-H	-H	Toprak üstü	(74)
Öjenol	-OH	-OCH ₃	-H	Yaprak, çiçek	(66)
Metilöjenol	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	Toprak üstü	(74)
Sinnamil sinnamat	-H	-H	-sinnamat	Yaprak	(75)

Kumarinler

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş kumarinin ismi, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.9. Kumarinler



Bileşik adı
Eskulin

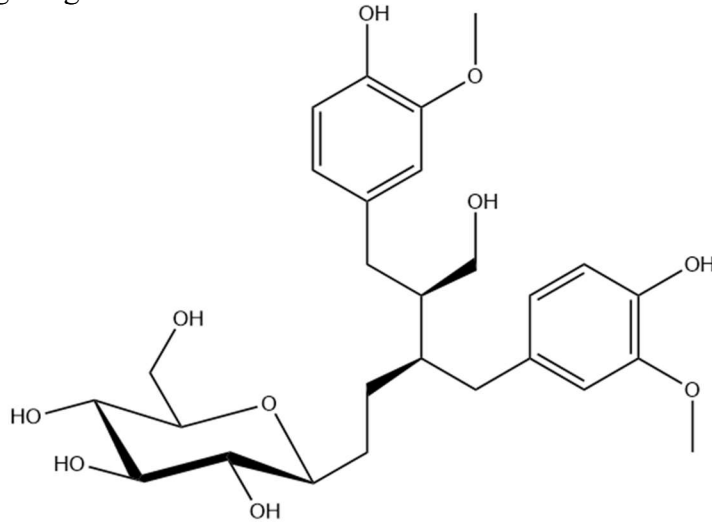
Elde edildiği kısım
Meyve

Referans
(72)

Lignanlar ve glikozitleri

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş lignan glikozitin ismi, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.10. Lignan glikoziti



Bileşik adı
Sekoizolarisiresinol- β -glukozit

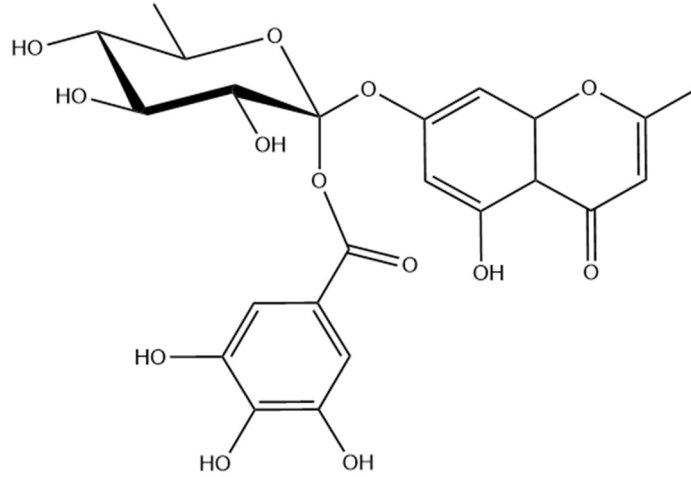
Elde edildiği kısım
Yaprak

Kaynak
(64)

Kromonlar

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş kromonun ismi, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.11. Kromonlar



Bileşik adı
Undulatozite A 6'-O-gallat

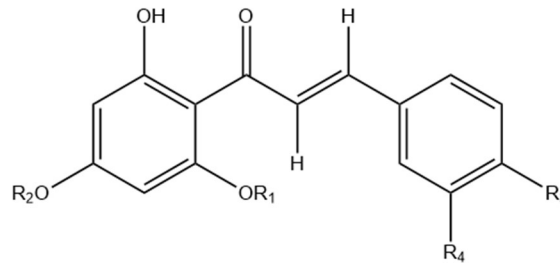
Elde edildiği kısım
Yaprak

Kaynak
(76)

Kalkonlar

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş kalkonların ismi, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.12. Kalkonlar

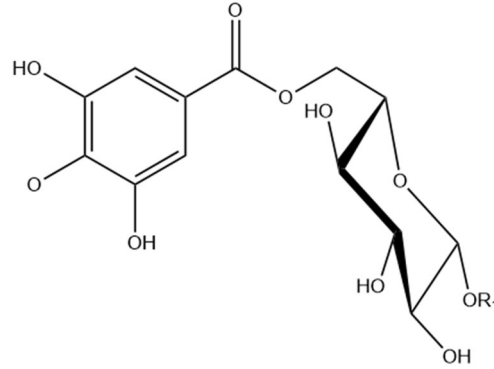


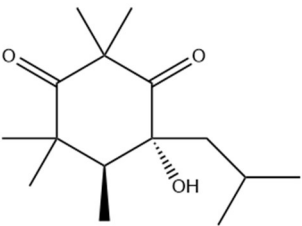
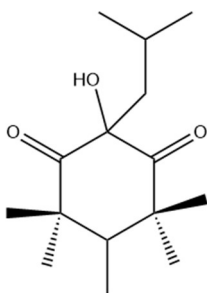
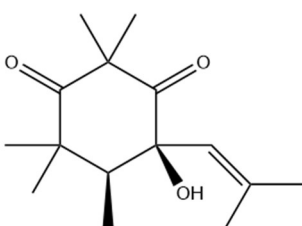
Bileşik adı	R1	R2	R3	R4	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
Hesperidin metilkalkon	-CH ₃	-mannoz	-OCH ₃	-OH	Meyve	(72)
Pinostrobin kalkon	-H	-CH ₃	-H	-H	Yaprak	(75)

Floroglusinoller

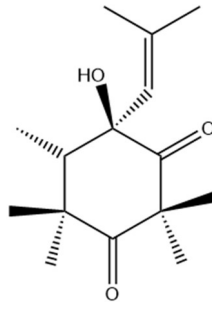
M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş floroglusinollerin ismi, bitkiden elde edildiği kısımları ve referansları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.13. Floroglusinoller



Bileşik adı	R ₁	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
Gallomirtukommulon A		Yaprak	(64)
Gallomirtukommulon B		Yaprak	(77)
Gallomirtukommulon C		Yaprak	(64)

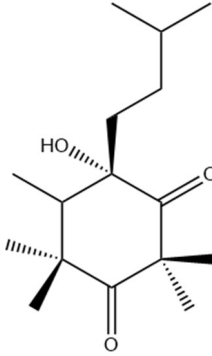
Gallomirtukommulon D



Yaprak

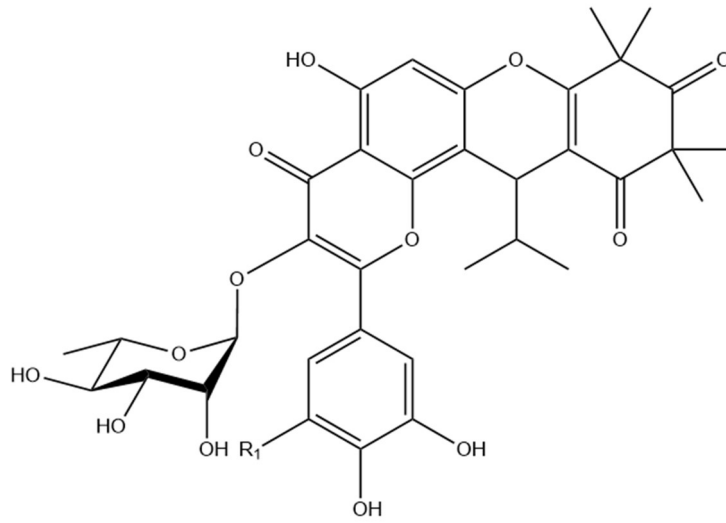
(77)

Gallomirtukommulon F



Çiçek

(69)

**Bileşik adı**

Mirtukommunin A
Mirtukommunin B
Mirtukommunin C
Mirtukommunin D

R₁

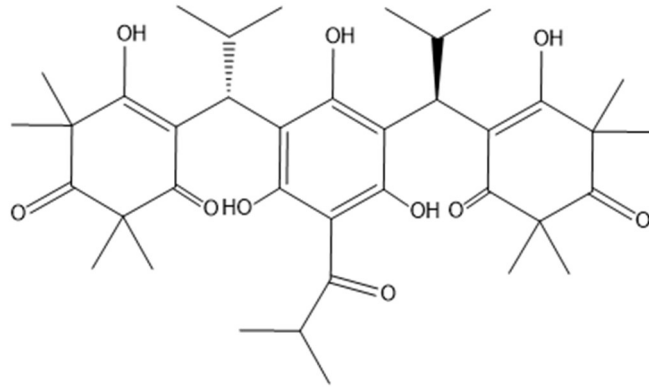
-OH (21 *R*)
-OH (21 *S*)
-H (21 *R*)
-H (21 *S*)

Elde edildiği kısım

Yaprak
Yaprak
Yaprak
Yaprak

Kaynaklar

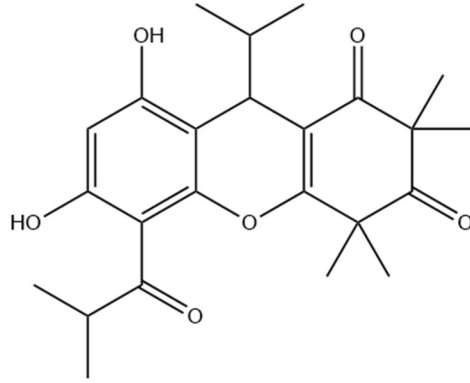
(76)
(76)
(76)
(76)



Bileşik
Mirtukommulon A

Elde edildiği kısım
Yaprak

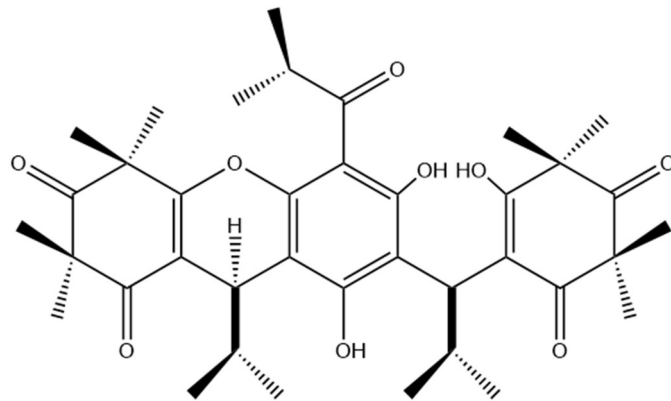
Kaynak
(78)



Bileşik
Mirtukommulon B

Elde edildiği kısım
Yaprak

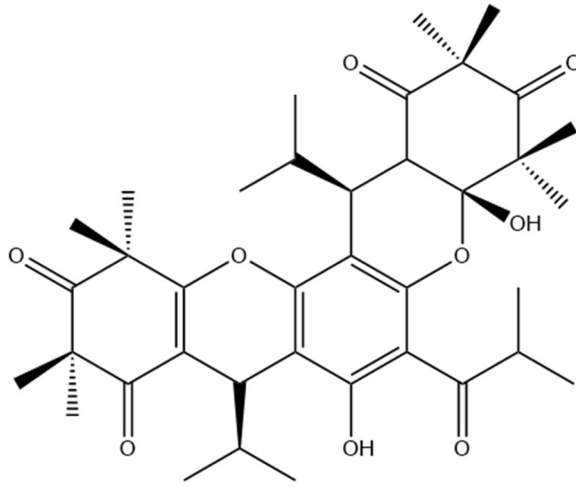
Kaynak
(78)



Bileşik
Mirtukommulon C

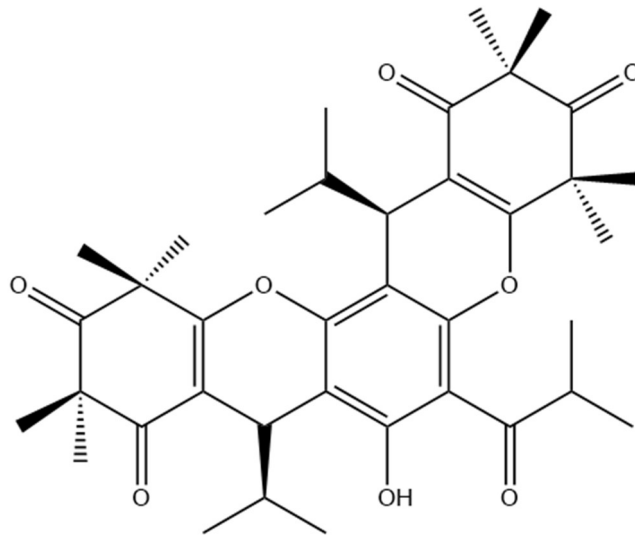
Elde edildiği kısım
Toprak üstü, çiçek

Kaynaklar
(68, 69)



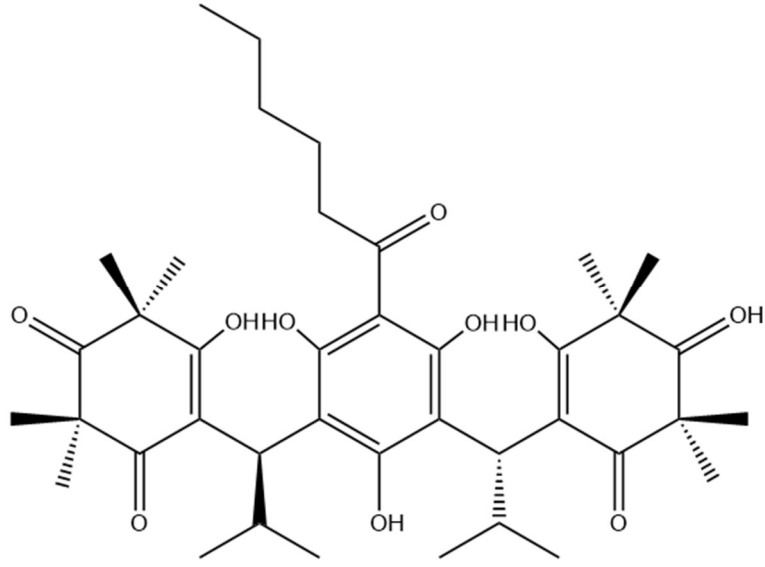
Bileşik
Mirtukommulon D

Kaynaklar
(79)



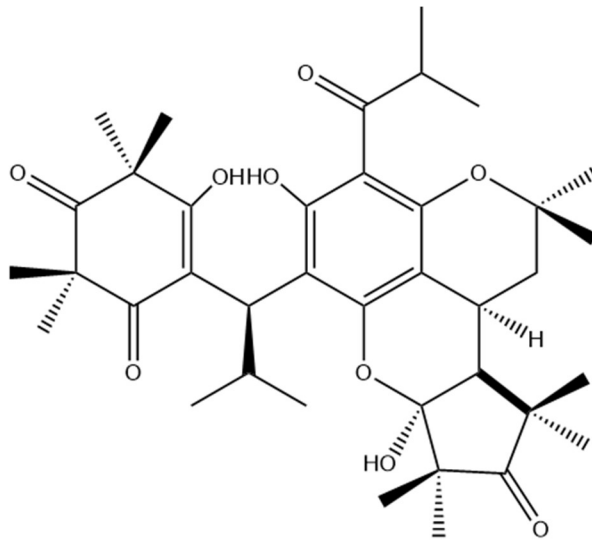
Bileşik
Mirtukommulon E

Kaynak
(79)



Bileşik
Mirtukommulon F

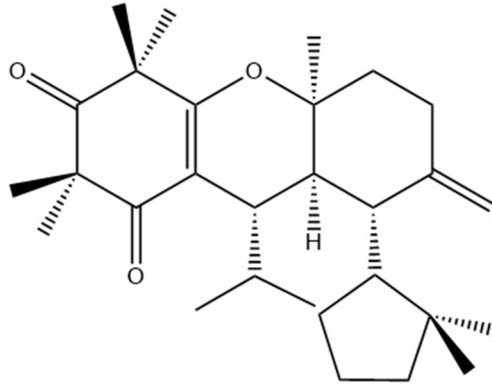
Kaynak
(79)



Bileşik
Mirtukommulon J

Elde edildiği kısım
Yaprak

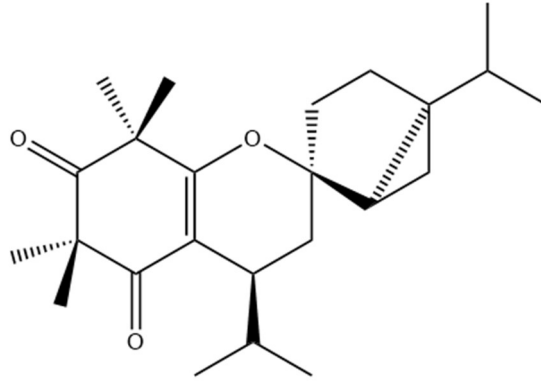
Kaynak
(80)



Bileşik
Mirtukommulon K

Elde edildiği kısım
Yaprak

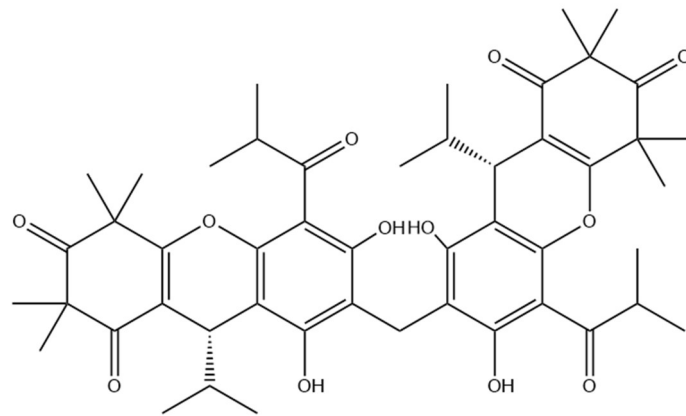
Kaynak
(80)



Bileşik
Mirtukommulon L

Elde edildiği kısım
Yaprak

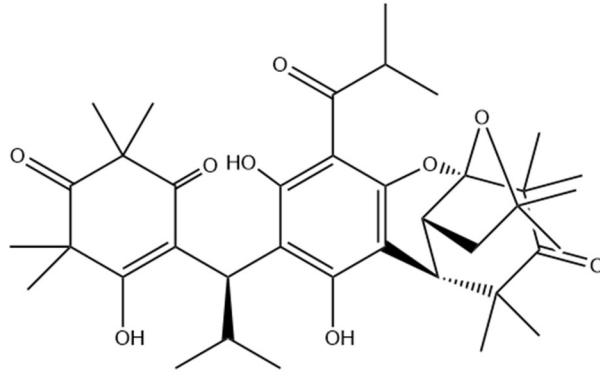
Kaynak
(80)



Bileşik
Mirtukommulon M

Elde edildiği kısım
Çiçek

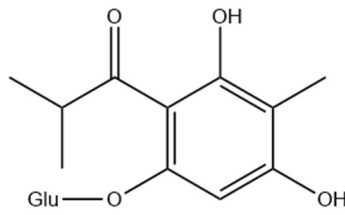
Kaynak
(69)



Bileşik
Mirtukommuloasetalon

Elde edildiği kısım
Çiçek

Kaynak
(69)

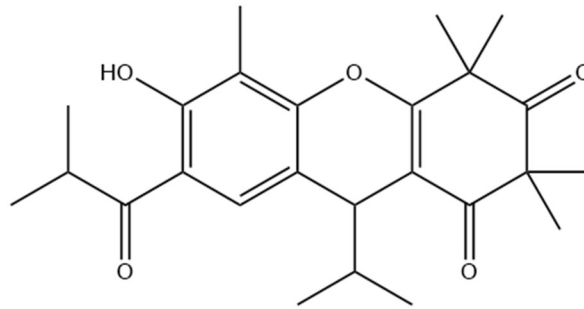


Bileşik
2-izobutiril-4-metilfloroglusinol 1-*O*- β -D-glukopiranozit

Elde edildiği kısım
Yaprak

Kaynak
(76)

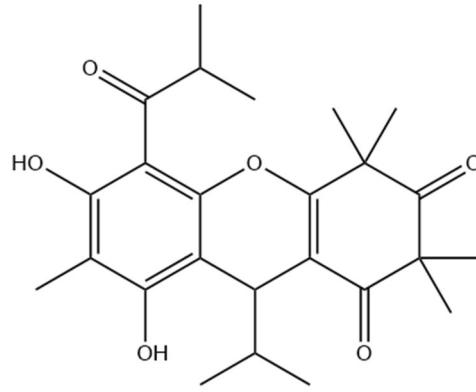
Glu: Glukopiranozili temsil etmektedir.



Bileşik
6-metilizomirtukommulon B

Elde edildiği kısım
Yaprak

Kaynak
(76)



Bileşik
4-metilmirtokommulon B

Elde edildiği kısım
Yaprak

Kaynak
(76)

Terpenoitler

Terpenoitler asetat-mevalonat yolağından elde edilen sekonder metabolit gruplarıdır. *M. communis*'in fitokimyasal içeriğı incelendiğinde; monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler, meroterpenler ve steroidal bileşikler terpenoit bileşik grubunu oluşturmaktadır.

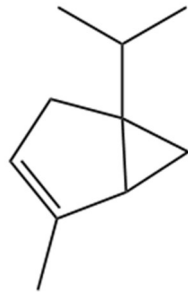
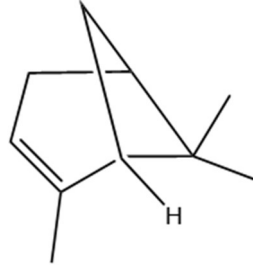
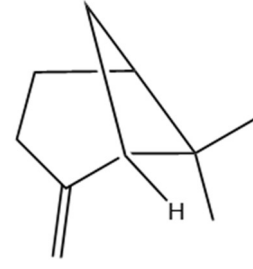
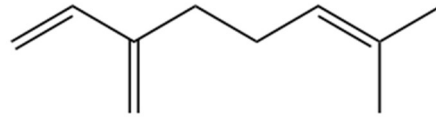
Monoterpenler

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş monoterpenlerin isimleri, bitkiden elde edildiğı kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

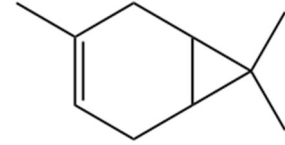
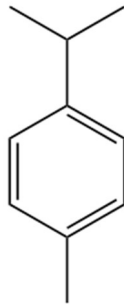
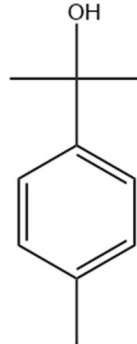
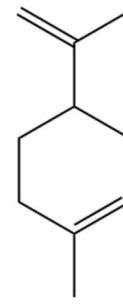
Tablo 2.14. Monoterpenler

Bileşik adı	Elde edildiğı kısım	Kaynaklar
α -Tuyen	Çiçek, gövde	(66)
α -Pinen	Çiçek, gövde	(66)
β -Pinen	Çiçek, gövde	(66)
Mirsen	Çiçek, gövde	(66)
δ -3-Karen	Çiçek, yaprak	(66)
<i>p</i> -Simen	Çiçek, yaprak	(66)
<i>p</i> -Simen-8-ol	Yaprak, gövde	(66)
Limonen	Çiçek, yaprak	(66)
γ -Terpinen	Toprak üstü	(74)
α -Terpineol	Toprak üstü	(74)
Terpinolen	Toprak üstü	(74)
4-Terpineol	Toprak üstü	(74)
α -Terpinil asetat	Toprak üstü	(74)
1,8-Sineol	Toprak üstü	(74)
Linalool	Toprak üstü	(74)
Linalil asetat	Toprak üstü	(74)
<i>trans</i> -Linalool oksit	Yaprak	(81)
Geraniol	Yaprak, gövde	(66)
Geranil asetat	Toprak üstü	(74)
Geranil 2-metilbütirat	Yaprak, gövde	(66)
Sabinen	Gövde, çiçek	(66)
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	Yaprak	(81)
Trisiklen	Yaprak, gövde	(66)
Borneol	Yaprak, gövde	(66)
Bornil asetat	Yaprak, gövde	(66)
Mirtenol	Yaprak, gövde	(66)
Mirtenil asetat	Yaprak, gövde	(66)

Nerol	Yaprak, gövde	(66)
Neril asetat	Yaprak, gövde	(66)
Germakren D	Yaprak, gövde	(66)
Spatulenol	Yaprak, gövde	(66)
Timol	Yaprak	(81)
β -Fellandren	Yaprak	(81)

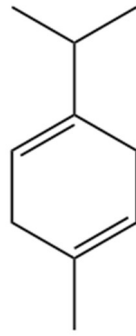
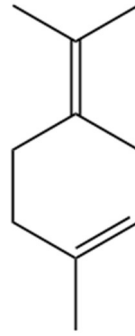
 α -Tuyen α -Pinen β -Pinen

Mirsen

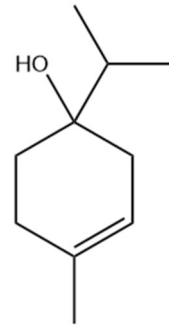
 δ -3-Karen*p*-Simen*p*-Simen-8-ol

Limonen

Şekil 2.2. Tablo 2.15.'te bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları

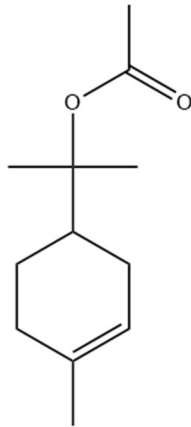
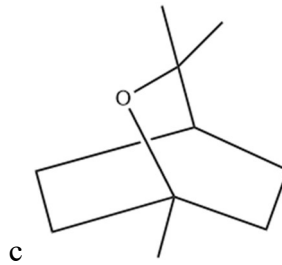
 γ -Terpinen

Terpinolen

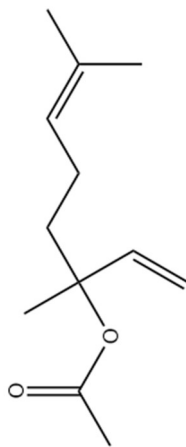


4-Terpineol

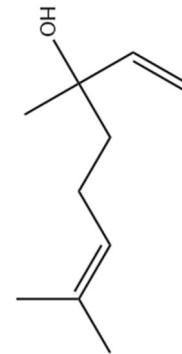
Şek

 α -Terpinil asetat

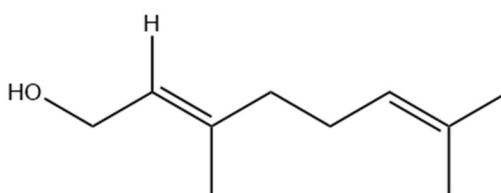
1,8-Sineol

*trans*-Linalol oksit

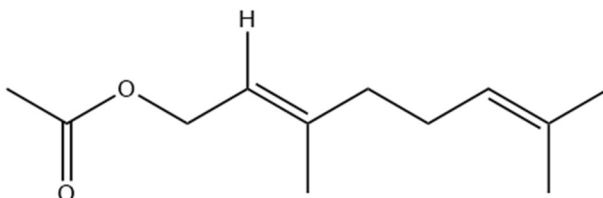
Linalil asetat



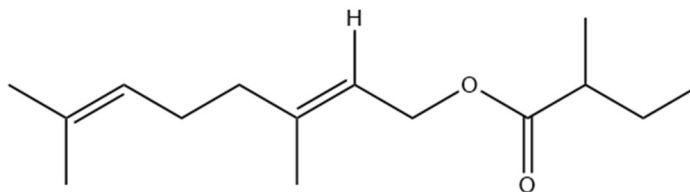
Linalool



Geraniol



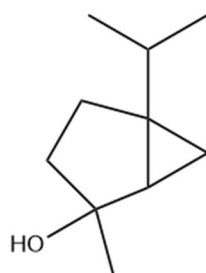
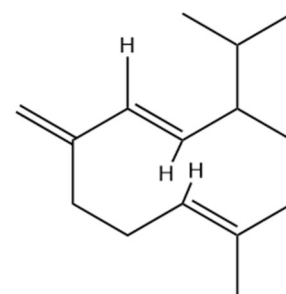
Geranyl asetat



Geranyl 2-metilbütirat



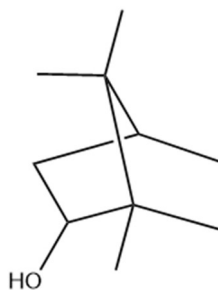
Sabinen

*cis*-Sabinen hidrat

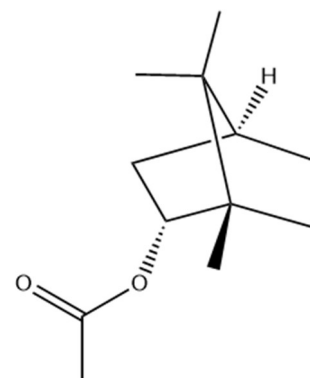
Germakren D



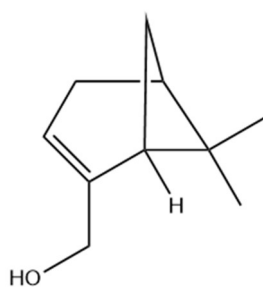
Trisiklen



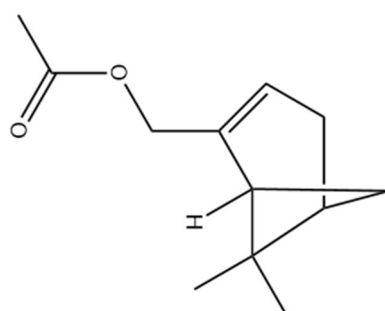
Borneol



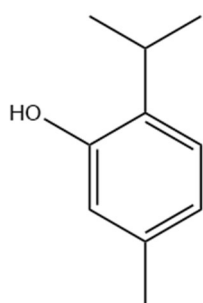
Bornil asetat



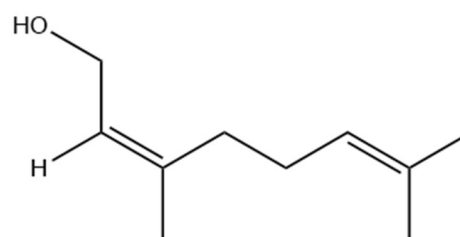
Mirtenol



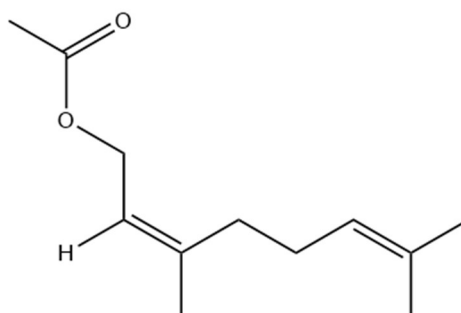
Mirtenil asetat



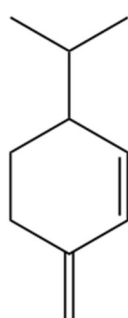
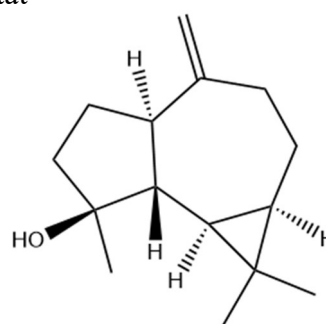
Timol



Nerol



Neril asetat

 β -Fellandren

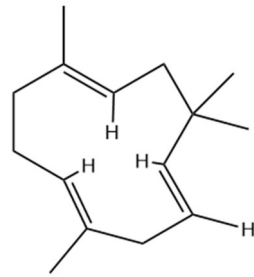
Spatulenol

Seskiterpenler

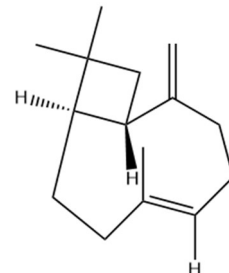
M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş seskiterpenlerin isimleri, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.15. Seskiterpenler

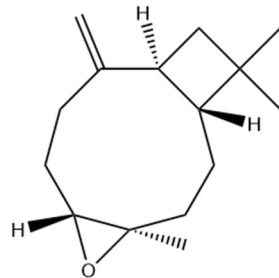
Bileşik adı	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
α -Humulen	Toprak üstü	(74)
(E)- β -Karyofillen	Toprak üstü	(74)
Karyofillen oksit	Toprak üstü	(74)
Hedikaryol	Yaprak	(75)
Humulen epoksit II	Yaprak	(81)
β -elemen	Gövde, yaprak	(66)



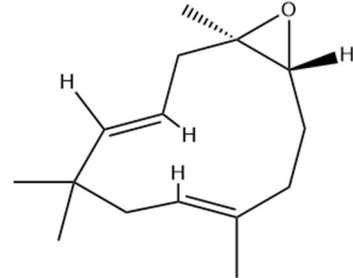
α -Karyofillen



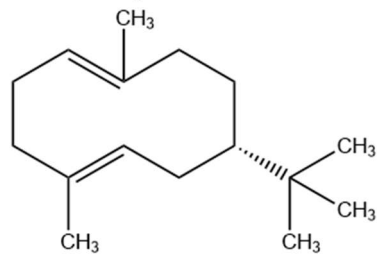
β -Karyofillen



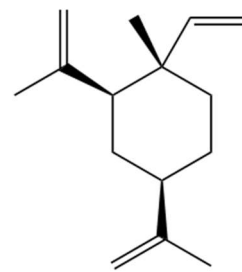
Karyofillen oksit



Humulen epoksit II



Hedikaryol



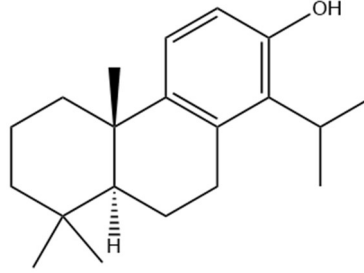
β -elemen

Şekil 2.3. Tablo 2.16.'da bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları

Diterpenler

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş diterpenin ismi, bitkiden elde edildiği kısım ve kanyak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.16. Diterpenler



Bileşik adı
Totarol

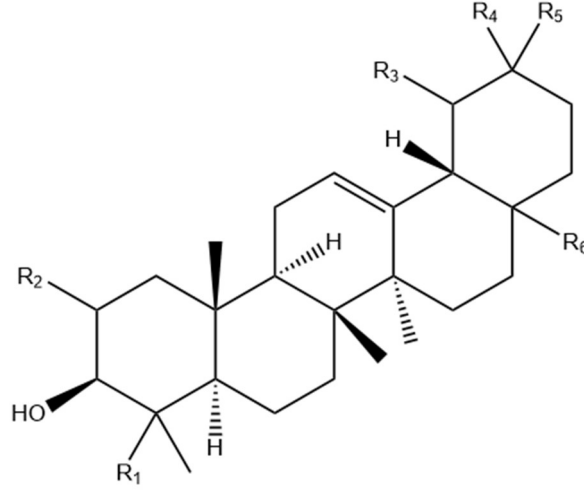
Elde edildiği kısım
Yaprak

Kaynak
(75)

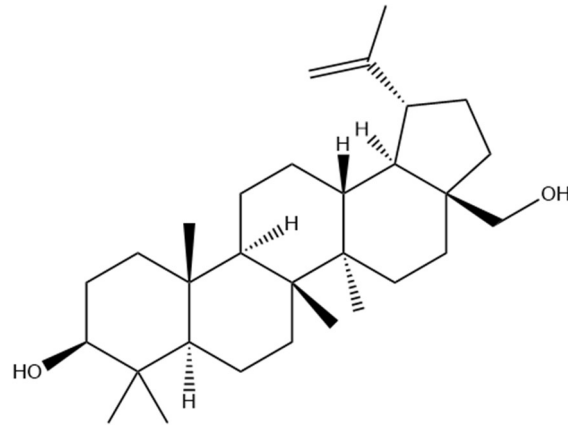
Triterpenler

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş triterpenlerin ismi, bitkiden elde edildiği kısım ve kaynak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.17. Triterpenler



Bileşik adı	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
Arjunolik asit	-CH ₂ OH	-OH	-H	-CH ₃	-CH ₃	-COOH	Toprak üstü	(68)
Asiatik asit	-CH ₂ OH	-OH	-CH ₃	-CH ₃	-H	-COOH	Toprak üstü	(68)
Betulin							Toprak üstü	(68)
Eritrodiol	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ OH	Toprak üstü	(68)
Korosolik asit	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-CH ₃	-H	-COOH	Toprak üstü	(68)
Oleanolik asit	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	-CH ₃	-COOH	Toprak üstü	(68)
Ursolik asit	-CH ₃	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H	-COOH	Toprak üstü	(68)



Bileşik adı
Betulin

Elde edildiği kısım
Toprak üstü

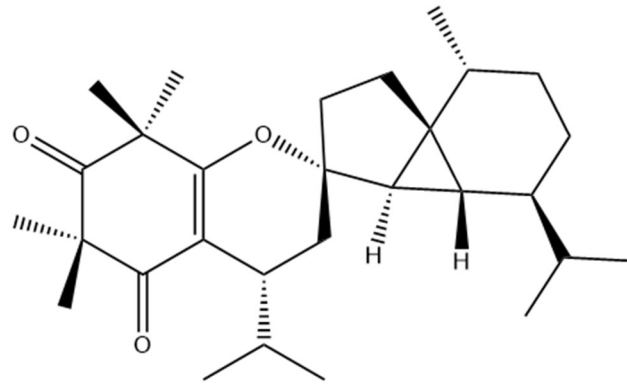
Kaynak
(68)

Meroterpenler

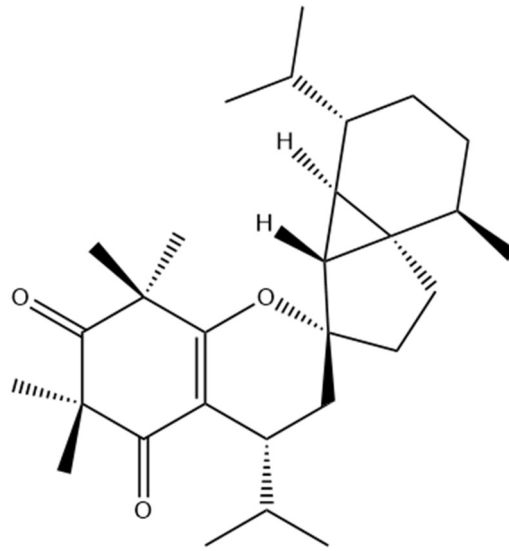
M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş meroterpenlerin isimleri, bitkiden elde edildiği kısımları ve kaynakları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.18. Meroterpenler

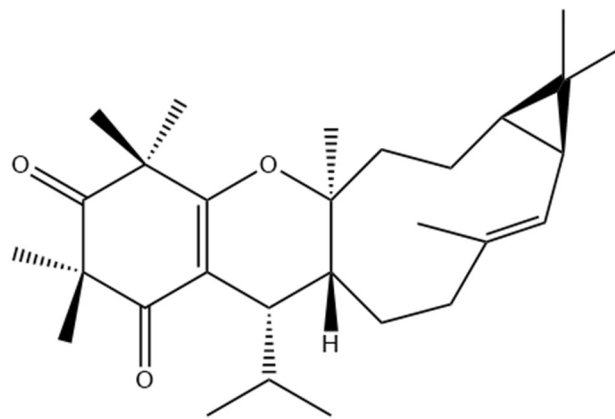
Bileşik adı	Elde edildiği kısım	Kaynaklar
Mirtukomvalon A	Yaprak	(82)
Mirtukomvalon B	Yaprak	(82)
Mirtukomvalon C	Yaprak	(82)



Mirtukomvalon A



Mirtukomvalon B



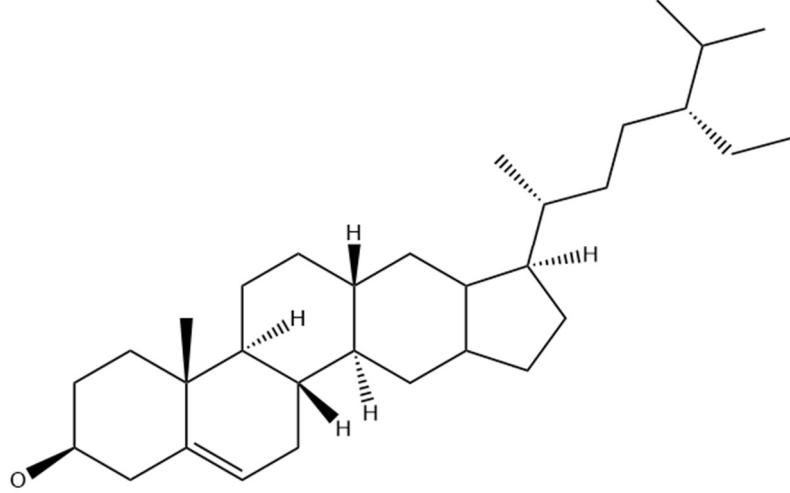
Mirtukomvalon C

Şekil 2.4. Tablo 2.19.'da bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları

Steroidale Bileşikler

M. communis üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilmiş steroidale bileşiğin ismi, bitkiden elde edildiği kısmı ve kaynağı aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.19. Steroidal bileşikler



Bileşik adı
β-Sitosterol

Elde edildiği kısm
Toprak üstü

Kaynak
(68)

2.2.3 Farmakolojik Çalışmalar

M. communis'in farklı kısımlarının üzerinde yapılmış *in vitro* ve *in vivo* pek çok farmakolojik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar temelini öncelikle geleneksel kullanımdan almakla birlikte biyokimyasal yollardaki etkilerinin aydınlatılmasıyla ileri çalışmalara yol gösterici olmuşlardır.

Bitki üzerinde yapılmış çalışmalar başlıklar halinde aşağıda gruplanmıştır.

Nöroprotektif etki

Aykaç ve ark. (83) tarafından yapılmış çalışmada Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli rol oynayan faktörlerin araştırılması ve galantamin tedavisinin *M. communis* bitkisinin etkileriyle karşılaştırılması amacıyla, asetilkolin (ACh), beyinden türetilmiş nörotropik faktör (BDNF) ve muskarinik reseptör 1 (M₁)'in ekspresyonu; asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyi, malondialdehit (MDA) ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi; ayrıca AChE gen ekspresyonu skopolamin ile indüklenen sıçan modelinde araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, bitkinin yapraklarının %96'lık etanol ekstresinin skopolaminin neden olduğu nesne tanıma süresindeki azalmayı önemli ölçüde iyileştirdiği ve farklı beyin bölgelerinde BDNF, M₁ ve asetilkolin (ACh) reseptör ekspresyon seviyelerini artırdığı, bununla birlikte GSH aktivitesini artırarak, MDA seviyesini ve MPO aktivitesini azaltarak AChE aktivitesinde bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak *M. communis* ekstresinin, Alzheimer hastalığının önlenmesinde ve tedavisinde değerli bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

Yalman ve ark. (84) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis* subsp. *communis* yapraklarının %96'lık etanol ekstresinin, sıçanlarda alüminyum klorür ve D-galaktoz ile oluşturulan Alzheimer hastalığı üzerinde olası koruyucu ve tedavi edici etkileri araştırılmıştır. Farelere koruyucu tedavi olarak 90 gün süreyle oral olarak bitki ekstresi verilmiş ve diğer iki gruba ise 60. günden itibaren alüminyum klorür ve D-galaktoz ile birlikte bitki ekstresi uygulanmıştır. Öğrenme ve hafıza fonksiyonları, davranış testleri ile değerlendirilmiştir. Bitkinin biyolojik aktivitesi hipokampal dokularda ELISA testleri ile incelenmiştir. D-Galaktoz ve alüminyum klorür uygulaması yapılan sıçanlarda amiloid beta (A β) ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-

OHdG) seviyelerinde, asetilkolinesteraz aktivitesinde artış ve neprilisin, sodyum potasyum adenzin trifosfatazda (Na^+/K^+ ATPaz) azalma görülmüştür. Diğer yandan, bitki ekstresi davranış bozukluklarına etki ederek öğrenme ve hafızayı geliştirmiştir. Ayrıca ekstre tedavisi $A\beta$ ve 8-OHdG düzeylerini ve asetilkolinesteraz aktivitesini azaltırken, neprilisin düzeylerini, Na^+/K^+ ATPaz düzeylerini arttırmıştır. Bu çalışmaya göre *M. communis* ekstresinin antikolinesteraz ve antioksidan özellikleri sayesinde bilişsel ve nöronal işlevler üzerinde faydalı etkileri olduğu görülmüştür.

Kadioğlu Yaman ve ark. (85) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis* subsp. *communis*'in yumurtalıkları alınmış diyabetik sıçanlarda bilişsel bozulma üzerindeki olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bitki yapraklarının %96'lık etanol ekstresi sıçanlara uygulanmıştır. Deneilerin başında ve sonunda kan şekeri ölçümleri yapılmıştır. Hayvanlara yeni nesne tanıma testi uygulanmıştır. Hipokampal dokularda; $A\beta$, neprilisin düzeyleri, AChE, kolin asetiltransferaz (ChAT) aktiviteleri, polisialile edilmiş nöral hücre adhezyon molekülü (PSA-NCAM), nöronal nikotidik asetilkolin reseptörünün $\alpha 7$ alt birimi ($\alpha 7$ -nAChR) ve BDNF gen ekspresyonları incelenmiştir. Yumurtalıkları alınmış ve diyabetli hayvanlarda yeni nesne tanımının azalmasına paralel olarak kan şekeri, AChE aktivitesi ve $A\beta$ seviyelerinde artış, ChAT aktivitesinde, $\alpha 7$ -nAChR, PSA-NCAM ve BDNF gen ifadelerinde azalma görülmüştür. Öte yandan bitki ekstresi ile tedavi edilen grupta, kan şekeri düzeylerinde ve AChE aktivitelerinde anlamlı azalma gözlenirken, yeni nesne tanıma testi performanslarında (NORT) iyileşme ve hipokampal ChAT aktivitesinde, $\alpha 7$ -nAChR, PSA-NCAM ve BDNF ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Bu çalışma doğrultusunda *M. communis* ekstresinin antikolinesteraz ve antihiperglisemik özellikleriyle bilişsel ve nöronal fonksiyonları iyileştirebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Tümen ve ark. (86) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis*'in yaprak ve meyvelerinin diklorometan, aseton, etil asetat ve metanol ekstrelerinin AChE, butirilkolinesteraz (BChE) ve tirozinaz (TYRO) aktivitelerine göre taranmıştır. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve N,N-dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD) radikallerine karşı radikal süpürücü aktiviteler, metal şelasyon kapasiteleri, demir indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) ve fosfomolibden indirgeyici antioksidan gücü (PRAP) kullanılarak test edilmiştir. Ekstreler orta derecede AChE ve TYRO inhibisyonu göstermiştir. Yaprak ekstreleri

BChE'yi inhibe etmemiştir. Meyve ekstralarının BChE inhibitör aktivitesi sırasıyla: metanol ekstresi (%36,80±2,01) > etil asetat ekstresi (%29,59±3,38) > aseton ekstresi (%28,84±2,17) > diklorometan ekstresi (%21,83±3,82) şeklinde bulunmuştur. En yüksek TYRO inhibisyonu meyvelerin etil asetat ekstresinde gözlenmiştir (%40,53 ± 0,47). Yaprak ekstralarının BChE'ye karşı etkisiz olduğu gözlenmiş, meyve ekstraları ise inhibisyon göstermiştir. Polar ekstraların, DPPH ve DMPD'de en yüksek aktivite gösteren ekstralar oldukları görülmüş ve ayrıca meyvelerin diklorometan ekstresinin en iyi metal şelasyon kapasitesine sahip olduğu FRAP testinde gözlenmiştir. Bu çalışma *M. communis*'in *in vitro* nöroprotektif etkilerini gösteren ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

Çevikelli-Yakut ve ark. (87) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarının %96'lık etanol ekstresinin deneysel renovasküler hipertansif sıçanların bilişsel işlevlerindeki değişiklikler üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Tedavinin sonunda kan basıncı kayıtları alındıktan sonra hayvanlara yeni nesne tanıma testi ve Morris su labirenti (MWM) testleri uygulanmıştır. Bu testlerin ardından her gruptaki hayvanlardan bir kısmının kan beyin bariyeri bütünlüğü incelenmiştir ve gruptaki diğer hayvanların dekapitasyon sonrası kan örneklerinde osteopontin ve interleükin (IL)-10 düzeyleri ölçülmüştür. Hipokampal dokularda matriks metaloproteinaz (MMP)-13, Na⁺/K⁺-ATPaz, A β , ve AChE aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları *M. communis* ekstresinin antihipertansif, antiinflamatuvar ve antikolinesteraz aktiviteleri yoluyla hipertansiyondaki bilişsel işlev bozukluklarını iyileştirilebileceği görülmüştür.

Özbeyle ve ark. (88) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarının %96'lık etanol ekstresinin yüksek yağlı diyetin (HFD) neden olduğu oksidatif beyin hasarı üzerindeki etkilerinin davranışsal ve biyokimyasal parametreler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. 24 Wistar albino sıçan üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu (C) standart bir diyet alırken, HFD grupları 16 hafta boyunca HFD almıştır. HFD+Ekstre (HFDE) grubuna ise son 4 hafta boyunca ekstre verilmiştir. Çalışmanın sonunda yeni nesne tanıma testi uygulanarak hipokampus ve kan örnekleri toplanmıştır. Hipokampal örneklerde AChE, Na⁺/K⁺-ATPaz aktiviteleri; MDA, 8-OHdG ve GSH seviyeleri ölçülmüştür ve serumlarda kolesterol seviyeleri analiz edilmiştir. Bulgular, HFD grubunun yeni nesne tanıma testi performansının düştüğünü,

ekstre uygulamasının bu azalmayı önlediğini ve buna paralel olarak artan AChE ve azalan Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitelerinin ekstre uygulanmasıyla düzeldiğini göstermiştir. HFD grubunda gözlenen MDA ve 8-OHdG düzeylerindeki artış, HFDE grubunda azalmıştır. Sonuçlar bitki ekstresinin yüksek yağlı beslenmenin neden olduğu obezitede hipokampal oksidatif stres ve bilişsel bozulma üzerinde iyileştirici etkilere sahip olduğuna işaret etmiştir.

Caputo ve ark. (89) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis* yapraklarından elde edilmiş uçucu yağın ana bileşenlerinin kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antibakteriyel, sitotoksik ve antiasetilkolinesteraz aktivitelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Uçucu yağın ve ana bileşeninin biyofilm oluşumundaki artışı engelleme kapasitesi ve biyofilm hücrelerinin metabolik aktivitesi MTT yöntemiyle farklı zamanlarda değerlendirilmiştir. Ayrıca, insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattında MTT yöntemi ile potansiyel sitotoksik aktivite ve antiasetilkolinesteraz aktivite araştırılmıştır. *Staphylococcus aureus* hariç test edilen tüm suşlarda biyofilm hücre metabolizmasını inhibe etme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca uçucu yağın sitotoksik ve antiasetilkolinesteraz aktiviteleri görülmüştür. Sonuçta uçucu yağın, dirençli türler olan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı etkili olabilecek olası ürünler olarak kullanılabilceği, diğer taraftan nörolojik hastalıkların tedavisinde olası yardımcı madde olarak kullanılabilceği anlaşılmıştır.

Hussein ve ark. (90) tarafından yapılan bir çalışmada bitkinin yaprak ve meyvelerinin metanol ekstrelerinin kolinesteraz (ChE) inhibitör potansiyeli araştırılmış ve hesaplamalı olarak incelenmiştir. Bitkideki metabolitlerin emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite özelliklerinin SwissADME kullanılarak hesaplanması, ilaç benzerliği veya kurşun benzerliğinin admetSAR software programı kullanılarak tahmin edilmesi, toksisite sınıfı, kimyasal etkileşimlerini öngörmek için *in silico* yöntemler kullanılmıştır. Yaprak ve meyve ekstrelerinin AChE'nin olası inhibitör aktiviteleri eserin (standart madde) aktivitesi ile karşılaştırıldığında sırasıyla %37,33 ve %70,00 iken, yaprak ve meyve ekstrelerinin BChE inhibitör aktiviteleri sırasıyla %19,00 ve %50,67 olarak hesaplanmıştır. Orta sınıf (Sınıf II) toksik maddeler arasında beta-kamigren daha spesifik bir AChE bağlayıcısıyken, semimirtukommulon ve mirtukommulon A'nın daha spesifik BChE bağlayıcısı olduğu görülmüştür. Sonuç

olarak bitkiden elde edilen metabolitlere sülfonat veya sülfamat gruplarının eklenmesi gibi yapısal değişiklik ve stereoselektif sentezin, bu metabolitleri Alzheimer hastalığının klinik öncesi araştırmalarında daha uygun adaylar haline getirebileceği öngörülmüştür.

Maggio ve ark. (91) tarafından yapılmış çalışmada, *M. communis*'in farklı konumlardan toplanmış yapraklarından elde edilen uçucu yağların GC-MS ile bileşenleri ve uçucu yağın nöroprotektif etkileri, antioksidan özellikleri ve AChE ve BChE inhibitör aktivitesi analiz edilerek araştırılmıştır. 5 adet uçucu yağ örnekleri arasında, 1 ve 2 numaralı uçucu yağ radikal süpürme potansiyeli gösterirken, 5 numaralı uçucu yağ da, AChE ve BChE için sırasıyla 96,0 ve 87,9 µg/mL IC₅₀ değerleriyle en yüksek kolinesteraz inhibitör aktivitesini göstermiştir. 1 numaralı uçucu yağ uygulandığında da BChE inhibisyonunda anlamlı sonuç elde edilmiştir (IC₅₀, 77,8 µg/mL).

Rhyaf (92) tarafından yapılmış çalışmada arsenik ile indüklenmiş beyin dokusu hasarı oluşturulan sıçanlarda *M. communis* yapraklarının %20'lik etanol ekstresinin doku hasarı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Beyin dokusundan alınan histopatolojik kesitler sonucunda arsenik zehirlenmesinin sıçanların beyin dokularında ciddi oksidatif hasara ve bozulmaya yol açtığı ve ekstre uygulamasının toksisiteyi azaltabileceği görülmüştür.

Begum ve ark. (93) tarafından yapılan bir çalışmada *M. communis*'in metanol ekstresi ve bu ekstreden partiyon ile elde kloroform, etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları, AChE, BChE ve lipoksijenaz inhibitör aktiviteleri açısından incelenmiştir. Metanol ekstresi ve fraksiyonları, AChE'ye karşı önemli bir enzim inhibisyon aktivitesi (%81-91) gösterirken, BChE'ye karşı yüksek enzim inhibe edici aktivite (%72,5-99) göstermiştir. Metanol ekstresi ve bunun çeşitli fraksiyonları da lipoksijenaza karşı önemli bir aktivite (%79-94,5) göstermiştir.

Ma ve ark. (94) tarafından yapılmış çalışmada kersitrinin karbon tetraklorürün (CCl₄) neden olduğu beyin hasarına karşı etkileri değerlendirilmiş ve olası mekanizmalar aydınlatılmıştır. Farelere, 4 hafta boyunca kersitrin ile birlikte veya kersitrin uygulaması olmadan intraperitoneal olarak CCl₄ uygulanmıştır. Kersitrinin reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini ve MDA içeriğinin artışı önemli ölçüde

baskıladığı, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) aktivitesini azalttığı, antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı görülmüştür. Ayrıca kersitrinin monoamin oksidaz (MAO), AChE ve N-metil-D-aspartat reseptörü 2B alt biriminin (NR2B) aktivitelerini inhibe etme yeteneği ile ilişkili CCl₄ kaynaklı serebral fonksiyon bozukluklarını da önlemiştir. Western blot analizi sonucunda, kersitrinin, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınımını baskıladığı görülmüştür. Bulgular doğrultusunda kersitrinin nöroprotektif ajan olabileceği öngörülmüştür.

Wang ve ark. (95) tarafından yapılmış bir çalışmada Alzheimer hastalığının tedavisinde kersitrinin etkisi ve mekanizması transgenik fareler üzerinde araştırılmıştır. Üç ay boyunca kersitrin takviyeli diyetle beslenen farelerin bilişsel yeteneği değerlendirmek için davranışsal deneyler yapılmış, proenflamatuvar sitokinlerin üretimi değerlendirilmiş ve mikroglia aktivasyonunu aydınlatmak için immünohistokimya kullanılmıştır. Alzheimer hastalığı oluşturulmuş farelerde kersitrinin yeni nesneleri keşfetme sıklığını artırdığı, kaçış gecikmesini kısalttığı ve platformu geçme sıklığını artırdığı görülmüştür. Kersitrinin, mikroglia aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe ettiği, enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanmasını inhibe ettiği ve hastalık oluşturulmuş farelerde A β plaklarının birikimini azalttığı da gözlemlenmiştir.

Wagner ve ark. (96) tarafından yapılmış çalışmada kersetin ve glikozit analoglarından ikisinin (rutin ve kersitrin) metil cıva (MeHg) toksisitesine karşı potansiyel koruyucu etkisi sıçan kortikal beyin kısımlarında değerlendirilmiştir. MeHg (100 μ M), sıçanlarda lipid peroksidasyonuna ve ROS oluşumuna neden olmuştur. Kersitrin (10 μ g/mL) ve kersetin (10 μ g/mL), mitokondriyi MeHg kaynaklı değişikliklerden korumuştur. Buna karşılık rutin, kortikal beyin dilimlerinde MeHg kaynaklı lipid peroksidasyonuna ve ROS üretimine karşı önemli bir koruyucu etki sağlamamıştır.

Rattanajarasroj ve ark. (97) tarafından yapılmış çalışmada kersitrinin sıçan hipokampal nöronlarında A β kaynaklı nörotoksisite üzerindeki potansiyel koruyucu etkileri hücre canlılığı, oksidatif durum ve antioksidatif potansiyeller kullanılarak 17 β -estradiol ile karşılaştırılmıştır. Nöronların 72 saat boyunca kersitrin veya 17 β -estradiol (50-100 μ M) ile A β ₂₅₋₃₅'e birlikte maruz bırakılması, A β ₂₅₋₃₅'in indüklediği

nörotoksisiteyi ve lipid peroksidasyonunu zayıflatmış ancak $A\beta_{25-35}$ 'in indüklediği ROS birikimini azaltmamıştır. Bununla birlikte; yalnızca 17β -estradiol ile muamele edilmiş nöronlardaki glutatyon içeriğinde azalmayı etkisiz hale getirmiştir ve yalnızca kersitrin muamelesi, GPx aktivitesindeki azalmayı etkisiz hale getirmiştir. Bulgular doğrultusunda, kersitrin ve 17β -estradiolün, $A\beta_{25-35}$ 'in neden olduğu nörotoksisiteyi karşılaştırılabilir bir şekilde hafiflettiği gözlemlenmiştir.

Nakayama ve ark. (98) tarafından yapılmış çalışmada nikotiflorin, rutin ve kersitrinin; hipoksi, yüksek glutamat düzeyleri ve oksidatif stresin neden olduğu retina ganglion hücresi (RGC) ölümü üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca flavonoidlerin yapı-aktivite ilişkilerini değerlendirmek için farklı sayıda hidroksil grubuna ve şeker zinciri çeşitlerine sahip üç tip flavonoid incelenmiştir. RGC'lerinin ölümü, 12 saat boyunca hipoksik koşullar (%5 O₂, %5 CO₂, 37°C), üç gün boyunca 25 µM glutamat veya antioksidanların ortamdaki 24 saat boyunca tüketilmesiyle oksidatif stres ile indüklenmiştir. Stres kaynaklı apoptoz ve nekrozdan sonra hücre ölümü sinyalinin flavonoidler tarafından değiştirilmesi immünoaktivite analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Hipoksik ve glutamat stresi altında hem nikotiflorin hem de rutin, RGC hayatta kalma oranını 1 nM veya daha yüksek düzeyde önemli ölçüde artırırken, kersitrin bunu 100 nM veya daha yüksek bir düzeyde artırmıştır. Oksidatif stres altında nikotiflorin, rutin ve kersitrin RGC hayatta kalma oranını sırasıyla 1 nM, 0,1 nM ve 100 nM veya daha yüksek düzeyde önemli ölçüde artırmıştır. Nikotiflorin ve rutin, 1 nM veya daha yüksek konsantrasyonlarda hipoksi, glutamat veya oksidatif stresin neden olduğu RGC ölümü üzerinde nöroprotektif etkiler göstermiştir. Spesifik bir şeker yan zincirinin (rutin) varlığı nöroprotektif aktiviteyi artırmıştır.

Rajamanickam ve ark. (99) tarafından yapılmış bir çalışmada *Phyllanthus niruri* Linn. bitkisinden biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yoluyla izole edilmiş kersitrin ve niruriflavon üzerinde *in silico* moleküler kenetleme çalışmaları ve *in vivo* AlCl₃ ile indüklenmiş sıçan modelinde biyokimyasal incelemeler yapılmıştır. Her iki bileşik de moleküler kenetleme çalışmalarında AChE ve 5-lipooksijenaz hedeflerinde iyi kenetleme skorları göstermiştir. 100 mg/kg oral alüminyum klorür (AlCl₃), sıçanlarda antioksidatif enzimleri azaltmıştır, lipid peroksidasyonunu ve AChE aktivitesini artırmıştır. Niruriflavonun ağız yoluyla uygulanması, AlCl₃'ün neden

olduğu nörodavranışsal değişiklikleri tersine çevirmiştir. Niruriflavon tedavisi ayrıca antioksidan enzimleri onarmıştır. AChE ve lipid peroksidasyonunu zayıflatmıştır.

Kim ve ark. (100) tarafından yapılmış bir çalışmada *Acer okamotoanum* Nakai.'den elde edilen üç flavonoit kersitrin, izokersitrin ve afzelinin, SH-SY5Y nöron hücrelerinde $A\beta$ kaynaklı nörotoksisiteye karşı nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Hücreye $A\beta_{25-35}$ uygulanması, hücre canlılığının azalmasına ve çekirdek yoğunlaşması ve parçalanmasının artmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, izokersitrin tedavisi doza bağımlı olarak hücre canlılığını artırmıştır. Çekirdek yoğunlaşmasını ve parçalanma seviyelerini azaltmıştır. $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilen SH-SY5Y hücreleri, $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilmeyen hücelere kıyasla ROS üretiminde artış göstermiştir. Üç flavonoitin ayrı ayrı uygulandığı grupları, $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ROS üretimini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Nöroprotektif mekanizmaların daha yakından incelenmesi için, disintegrin ve metalloproteaz 10'un (ADAM10) ve TACE'nin ekspresyonu ölçülmüştür. İzokersitrin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ADAM10'un ekspresyonunu artırmıştır. Ek olarak üç flavonoitin, TACE'nin upregülasyonu ilre amiloidojenik olmayan yolu aktive ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde amiloidojenik olmayan yolun regülasyonu ile *A. okamotoanum*'dan gelen üç flavonoitin, özellikle izokersitrinin nörotoksisite üzerindeki nöroprotektif etkileri gösterilmiştir.

Lu ve ark. (101) tarafından, *Malus pumila* Mill. üzerinde yapılmış çalışmada yapraklarındaki polifenollerin kapsamlı değerlendirilmesini sağlamak amaçlanmıştır. Elma yapraklarının petrol eteri, etil asetat ve %75'lik etanol ekstralarının toplam fenolik ve flavonoit içerikleri analiz edilmiştir. Aynı zamanda ekstralar, antioksidan aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Üç ekstre arasında %75'lik etanol ekstresi en yüksek fenolik (56,74 mg/g) ve flavonoit (37,56 mg/g) içeriğine ve DPPH radikaline karşı en yüksek antioksidan aktiviteye (EC_{50} değeri 50,96 mg/L) sahip olduğu anlaşılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi profili oluşturma ve yüksek hızlı karşı akım kromatografi ayırımına göre, %75'lik etanol ekstresinin; floridzin (P, 66,1 mg/g), izokersitrin (IQ, 8,4 mg/g), kersetin 3-O-ksilozit (9,5 mg/g), kersetin 3-O-arabinozit (10,7 mg/g) ve kersetin 3-O-ramnozid (28,5 mg/g) olmak üzere beş ana polifenol içerdiği görülmüştür. Ek olarak, beş polifenolün antioksidan aktiviteleri ve

sıçan hipokampal nöronlarında *in vitro* hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkinlikleri açısından araştırılmıştır. Beş polifenolün, sentetik antioksidanlar olan butillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve *tert*-butilhidrokinon (TBHQ) ile benzer antioksidan aktivitelere sahip olduğu ve bunların arasında izokersitrinin en yüksek antioksidan aktiviteyi (EC_{50} değeri 2,92 mg/L) gösterdiği tespit edilmiştir. Floridzin veya butillenmiş hidroksitoluen ile izokersitrin kombinasyonu, antioksidan aktivitede sinerjistik etki göstermiştir. İzokersitrin, 0,5-1,0 mg/L konsantrasyonlarında anlamlı nöroprotektif etki gösterirken, floridzin ve butillenmiş hidroksitoluenin nöroprotektif etkisi görülmemiştir. *tert*-Butilhidrokinonun yüksek konsantrasyonlarda (0,5-5,0 mg/L) nörotoksik etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır.

Plekratoke ve ark. (102) tarafından yapılmış bir çalışmada *Mesua ferrea* L. çiçeklerinden kolon kromatografisi yöntemiyle izole edilmiş kemferol-3-*O*-ramnozid ve kersetin-3-*O*-ramnozid bileşiklerinin antioksidan aktivite, AChE inhibisyonu, $A\beta$ agregasyonu ve nöroproteksiyon da dahil olmak üzere Alzheimer hastalığı patogenezi ile ilgili aktiviteleri açısından incelenmiştir. Her iki bileşik de ABTS deneyi ile antioksidan etki, Ellman yöntemiyle AChE inhibisyonu ve tioflavin T (ThT) deneyi ile $A\beta$ agregasyonu ve hücre tabanlı deneyler ile nöroprotektivite dahil olmak üzere Alzheimer patogenezi üzerindeki etkileri açısından değerlendirilmiştir. AChE inhibisyonu ve $A\beta$ agregasyonunun mekanizmasını açıklamak için test bileşikleriyle AChE ve $A\beta$ arasındaki bağlanma enerjileri *in silico* olarak incelenmiştir. Kemferol-3-*O*-ramnozid ve kersetin-3-*O*-ramnozid sırasıyla $424,57 \pm 2,97$ ve $308,67 \pm 9,90$ μ M IC_{50} değerleri ile ABTS radikalini süpürme ve sırasıyla $769,23 \pm 6,23$ ve $520,64 \pm 5,94$ IC_{50} değerleri ile AChE'yi inhibe etme yeteneği göstermiştir. ThT deneyi, her iki bileşiğin de $A\beta$ agregasyonunu sırasıyla $406,43 \pm 9,95$ ve $300,69 \pm 1,18$ μ M IC_{50} değerleriyle inhibe ettiğini göstermiştir. Nöroproteksiyon çalışması, iki bileşiğin de hidrojen peroksidin neden olduğu SH-SY5Y hücre hattında hücre ölümünü azaltabildiğini ortaya çıkarmıştır. *In silico* çalışmada, her iki bileşiğin de AChE'yi ilgili kısımlarından bağladığı görülmüştür. Ek olarak *in silico* yöntemlerle test edilen iki bileşik de, önemli bölgelerle etkileşime girerek $A\beta$ agregasyonunu önlemiştir. Sonuçlar kemferol-3-*O*-ramnozid ve kersetin-3-*O*-ramnozitin; antioksidan aktiviteye sahip olduğu, AChE inhibisyonu yaptığı, $A\beta$ agregasyonunu önlediği ve

nöroproteksiyon dahil olmak üzere Alzheimer hastalığı patogenezinde yer alan birçok etki mekanizması sergilediği görülmüştür.

Azib ve ark. (103) tarafından yapılmış çalışmada *Pistacia lentiscus* L. yaprak ekstresinin erkek albino farelerde alüminyumun neden olduğu davranışsal, histolojik ve biyokimyasal bozukluklar üzerindeki nöroprotektif etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak farelere alüminyum (100 ppm) ve bitki ekstresi (150 ve 300 ppm) iki ay boyunca günlük olarak birlikte uygulanmıştır. Ekstre, alüminyum uygulaması sonucu oluşan kafa daldırma ve siyah/beyaz ve yükseltilmiş artı labirent testlerinde kaygıyı azaltmış, Morris su labirenti testinde hafıza performansını artırmış ve histolojik değişiklikleri inhibe etmiştir. Ekstre ve fenolik bileşikleri (mirisetin-3-*O*-ramnozid, kersetin-3-*O*-ramnozid, gallik asit, mirisetin ve kersetin), lipid peroksidasyonuna karşı test edilmiştir. Sonuçlar, ekstre ve fenolik bileşiklerinin doza bağımlı bir etkiye sahip olduğunu ve en yüksek etkinin mirisetin-3-*O*-ramnozid ($IC_{50} = 0,04$ mM) ile elde edildiğini göstermiştir.

Franco ve ark. (104) tarafından yapılmış çalışmada tıbbi bitkilerden elde edilen üç flavonoitin (mirisetin, mirisitrin ve rutin) MeHg neden olduğu mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna karşı *ex vivo* potansiyel koruyucu etkilerini araştırılmıştır. Fare beyni mitokondrisinin MeHg ile inkübasyonu, mitokondriyal fonksiyonda önemli bir azalmaya neden olmuştur. Azalan GSH seviyelerinin, artan ROS üretimi ve lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Fare beyni mitokondrisinin mirisetin veya mirisitrin ile birlikte inkübasyonu, konsantrasyona bağlı olarak, MeHg'nin neden olduğu mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda ve oksidatif strese azalmaya neden olmuştur. Rutin, MeHg toksisitesine karşı etkisiz bulunmuştur. Test edilen üç flavonoit arasında MeHg kaynaklı mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna karşı korumada en etkili bileşik mirisetin olmuştur. Ayrıca mirisetin, MeHg'nin neden olduğu ROS oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu tamamen bloke etmiştir. Aynı zamanda MeHg'nin neden olduğu GSH tükenmesini kısmen önlemiştir. Mirisetinin MeHg'nin neden olduğu mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu ve oksidatif stresi hafifletme yeteneği, mirisitrin ve rutin ile karşılaştırıldığında daha yüksek radikal süpürme kapasitesi ile ilişkili olduğu öngörülmüştür.

Li ve ark. (105) tarafından yapılmış bir çalışmada bir pentasiklik triterpenoit asit olan ursolik asidin, nükleer faktör-eritroid 2- ilişkili faktör 2 (Nrf2) yolu aktive edilerek serebral iskemi oluşturulmuş sıçanlarda nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. İskemik beyindeki davranışsal işlev bozukluğu, enfarktüs boyutu ve Nrf2 ve enflamatuvar faktörlerin (TLR4 ve NF- κ B) ekspresyonu felçten 24 saat sonra ölçülmüştür. Sonuç olarak ursolik asit uygulanmış sıçanların, iskemi sonrası oluşan nörolojik hasarı iyileştirdiği ve enfarktüs boyutunu azalttığı görülmüştür. Ayrıca, ursolik asit farelerde lipit peroksidasyonu azaltmış, Nrf2 yolunun aktivasyonunu teşvik etmiş ve felç sonrası TLR4 ve NF- κ B ekspresyonunu azaltmıştır. Ursolik asidin, sıçanlarda oluşturulmuş iskemi sonrası antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerle farelerde beyni iskemik hasara karşı koruduğu ve Nrf2 yolunun aktivasyonunun serebral iskemide ursolik asidin nöroprotektif etkilerine katkıda bulunduğu görülmüştür. Ding ve ark. (106) tarafından yapılmış benzer bir çalışmada da fareler üzerinde travmatik beyin hasarı modeli ve altta yatan mekanizma kullanılarak ursolik asidin Nrf2 yolunun aktivasyonundaki potansiyel rollerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Farelerin nörolojik sonuçları, travmatik beyin hasarından 24 saat sonra ve ayrıca Nrf2, NAD(P)H-oksidoredüktaz (NQO1), heme-oksijenaz-1 (HO1), süperoksit dismutaz (SOD), GPx ve MDA ekspresyonu bakımından değerlendirilmiştir. Travmatik beyin hasarı sonrası ursolik asit tedavisi beyin ödemi ve nörolojik yetersizlikleri önemli ölçüde iyileştirmiştir. Ek olarak ursolik asit tedavisi, Nrf2 proteininin nükleer translokasyonunu belirgin şekilde güçlendirmiştir. Aynı zamanda ursolik asit, protein kinaz B'nin (AKT) ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır ve bu da ursolik asidin Nrf2-ARE sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla nöroprotektif bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu veriler doğrultusunda ursolik asidin antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı ve Nrf2 faktörü yoluyla beyin hasarını azalttığını görülmüştür.

Zahra ve ark. (107) tarafından yapılmış çalışmada ursolik asidin nöroprotektif potansiyeli, farelerde rotenon ile indüklenmiş Parkinson hastalığı modelinde araştırılmıştır. Farelerde davranışsal parametreler, biyokimyasal parametreler, oksidatif stres ve enflamatuvar faktörler incelenmiştir. Tirozin hidroksilaz, α -sinüklein, serin-treonin protein kinaz (Akt), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz ve NF- κ B ve TNF- α enflamatuvar parametreleri immünohistokimya kullanılarak

değerlendirilmiştir. Tirozin hidroksilaz ve α -sinüklein ekspresyonunu kontrol etmek için Western blotlama da yapılmıştır. Ayrıca α -sinüklein, β -sinüklein, IL-1 β ve IL-10 gibi Parkinson hastalığı ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı-PCR kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, ursolik asidin davranış anormalliklerini hafifletmesi ve dopaminerjik nöronları oksidatif stres ve nöroenflamasyondan korumasının yanı sıra, α -sinükleinin aşırı ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı ve hayatta kalma ile ilişkili kinazların (serin-treonin protein kinaz, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz) fosforilasyonunu düzenlediği görülmüştür.

Liu ve ark. (108) tarafından yapılmış çalışmada, sıçanlar üzerinde lityum-pilokarpin ile epilepsi modeli oluşturulmuştur ve ursolik asidin epilepsinin neden olduğu nöbet davranışı ve bilişsel bozulma üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ursolik asidin genellikle epilepsi oluşumuna eşlik eden hipokampal nöron hasarını iyileştirdiği görülmüştür. Çalışma kapsamında ursolik asit uygulandığında TNF- α ve IL-1 β dahil olmak üzere enflamasyon faktörlerinin azalmasıyla, nöroenflamasyon dikkate değer şekilde azalmıştır. Benzer şekilde, mitokondrinin oksidatif stres hasarı belirteçleri ve oksidatif fosforilasyon enzim komplekslerinin ekspresyon seviyeleri de ursolik asit uygulaması ardından azalmıştır. Bu durum ursolik asidin, yüksek oksidatif stresin neden olduğu hasarı ve tekrarlayan epilepsi tarafından indüklenen kusurlu mitokondriyal fonksiyonu bastırdığını düşündürmüştür.

Salau ve ark. (109) tarafından yapılmış bir çalışmada, ursolik asidin oksidatif hasara karşı olası nöroprotektif etkisi, izole edilmiş sıçan beyinde araştırılmıştır. İzole edilmiş sıçan beyinlerinde 0,1 mM FeSO₄ ile oksidatif hasarın indüksiyonu yapılmıştır. Oksidatif hasar indüksiyonu, malondialdehit ve nitrik oksit (NO) seviyelerini, α -kimotripsin, ATPaz ve AChE aktivitelerini artırmış ve aynı zamanda GSH, SOD, katalaz ve ekto-nükleozit trifosfat difosfohidrolaz (ENTPDaz) aktivitelerinde azalmaya yol açmıştır. Bu seviyeler ve aktiviteler, beyin dokularının ursolik asit ile muamelesinin ardından önemli ölçüde tersine dönmüştür. Moleküler kenetleme çalışmaları ursolik asit, katalaz ve ATPaz arasında güçlü moleküler etkileşimleri ortaya çıkarmıştır.

Rai ve ark. (110) tarafından yapılmış bir çalışmada, farelerde 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde ursolik

asidin olası nöroprotektif etkinliği araştırılmıştır. 21 günlük tedaviden sonra farklı davranış parametreleri ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Substantia nigradaki dopaminerjik nöronların tirozin hidroksilaz (TH) immün boyanmasının yanı sıra dopamin ve onun metabolitleri olan 3,4-dihidroksifenilasetik asit (DOPAC) ve homovanilik asidin (HVA) HPLC ölçümü de gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda ursolik asidin, MPTP ile indüklenmiş Parkinson hastalığı olan farelerde davranış bozukluklarını iyileştirdiği, değişen dopamin seviyesini düzelttiği ve dopaminerjik nöronları koruduğu kanıtlanmıştır.

Bang ve ark. (111) tarafından yapılmış bir çalışmada, farelerde rotenon ile indüklenmiş Parkinson hastalığının patolojisinde bulunan protein agregatlarının otofajik klirensi, hastalığın patolojisi ve karakteristik semptomları üzerine ursolik asidin etkileri araştırılmıştır. Rotenon enjeksiyonunun, önemli bir dopaminerjik nöron kaybı oluşturduğu görülmüştür. Substantia nigra ve striatumda p62 ve ubikitin gibi proteinlerin birikmesiyle birlikte önemli motor eksikliği ve prodromal motor olmayan semptomlara neden olduğunu gösterilmiştir. Ursolik asidin (10 mg/kg) enjeksiyonu, rotenonun neden olduğu tüm patolojik değişiklikleri iyileştirmiştir. İnsan nöroblastoma hücrelerinde (SH-SY5Y), bir proteazom inhibitörü MG132 (0,25, 2,5 µM) ile iki aşamalı tedavi, belirgin şekilde ubikuitin ve p62'nin birikimini indüklemişken, ursolik asit (5 µM) MG132'nin indüklediği etkiyi önemli ölçüde zayıflatmıştır. Ayrıca ursolik asidin (5 µM) nöron hücrelerinde ve SH-SY5Y hücrelerinde otofajik akışı teşvik ederek otofajik klirensi önemli ölçüde artırdığı görülmüştür.

Rai ve ark. (112) tarafından yapılmış bir çalışmada, ursolik asidin (25 mg/kg) farelerde MPTP ile indüklenmiş Parkinson hastalığı modelindeki olası antienflamatuvar aktivitesi araştırılmıştır. MPTP uygulamasından sonra immünohistokimyasal incelemeler sonucunda farelerin substantia nigra pars kompaktasında (SNpc) iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü 1 (Iba1), TNF- α ve NF- κ B seviyelerinin değiştiği görülmüştür. Bu parametrelerin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler, öncelikle MPTP uygulanmış farelerde kontrole kıyasla artan enflamatuvar yanıtları göstermiştir. Bununla birlikte ursolik asit ve MPTP'nin neden olduğu nöroenflamasyonu inhibe eden transkripsiyon faktörü NF- κ B; Iba1 ve TNF- α enflamatuvar parametrelerini önemli ölçüde azaltmıştır. TH

immünoreaktivitesi, Parkinson oluşturulmuş farelerin SNpcsinde ursolik asit uygulaması ile önemli ölçüde artırılmıştır. Ursolik asit ile nöroenflamasyon ve nörodejenerasyonun yanı sıra biyokimyasal ve davranışsal parametrelerdeki bozuklukların geri döndüğü görülmüştür.

Mirza ve ark. (113) tarafından yapılmış çalışmada Alzheimer hastalığının $A\beta_{1-42}$ ile indüklenen fare modelinde *Rosmarinus officinalis* L. ve onun aktif bileşiklerinin (ursolik asit ve rosmarinik asit) olası nöroprotektif etkileri donepezil ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. *R. officinalis*'in etanol ekstresi, ursolik asit, rosmarinik asit veya donepezil oral olarak uygulanmıştır. Farelerde davranış analizi yapılması amacıyla Morris su labirenti testi, yeni nesne tanıma testi ve yükseltilmiş artı labirent testleri uygulanmıştır. Uygulamalar sonrası farelerin beyinlerinden izole edilmiş hipokampal doku, immünohistokimya için kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, rosmarinik asit ve ursolik asidin, $A\beta_{1-42}$ 'nin neden olduğu kaygı değişikliklerinin yanı sıra uzaysal ve tanıma hafızasındaki eksiklikleri tersine çevirmede koruyucu bir etki göstermiştir.

Peshattiwar ve ark. (114) tarafından yapılmış çalışmada ursolik asidin sıçanlar üzerinde rotenon kaynaklı patofizyolojik değişikliklere karşı nöroprotektif potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışma sırasında rotarod, açık alan ve Barnes labirentinden oluşan nörodavranış testleri yapılmıştır. 30 günün sonunda antioksidan etki (GSH, SOD, katalaz ve lipid peroksidasyonu), enflamatuvar (TNF- α), mitokondriyal kompleks I, mitokondriyal biyogenez (MB) parametreleri değerlendirilmiş ve immünohistokimyasal analiz yapılmıştır. Barnes labirent testinde ursolik aside bağlı olarak bilişsel işlevlerde anlamlı bir iyileşme gözlenmiştir. Biyokimyasal olarak rotenonun tetiklediği oksidatif stres ve enflamasyon, ursolik asit ile önemli ölçüde azalmıştır. Aynı zamanda ursolik asit, mitokondriyal kompleks I inhibisyonunu önemli ölçüde ortadan kaldırmış ve mitokondriyal biyogenezi teşvik etmiştir.

Lu ve ark. (115) tarafından yapılmış bir çalışmada, ursolik asidin D-galaktoz kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Ursolik asidin D-galaktoz kaynaklı öğrenme ve hafıza bozulmasını davranış testleriyle belirgin şekilde tersine çevirmiştir. SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) antioksidan enzimleri ölçülmüştür. Lipid peroksidasyon ürünü MDA miktarı da analiz edilmiştir. Ursolik asidin D-galaktoz kaynaklı nörotoksisiteye karşı

nöroprotektif etkisinin, lipid peroksidasyonunun azalmasından ve buna bağlı olarak antioksidan enzimlerin aktivitesindeki artıştan kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Ayrıca ursolik asidin, D-galaktoz ile tedavi edilen farelerin beynindeki büyümeyle ilişkili protein GAP43 seviyesini önemli ölçüde artırdığı anlaşılmıştır.

Lu ve ark. (116) tarafından yapılmış bir çalışmada ursolik asidin yüksek yağlı diyetin neden olduğu bilişsel bozulma üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve bu etkiye aracılık eden potansiyel mekanizmalar araştırılmıştır. Ursolik asit uygulaması hem adım testinde hem de Morris su labirenti testinde, yüksek yağlı diyet ile beslenen C57/BL6J farelerin davranışsal performansını önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, endoplazmik retikulum stresi ve I κ B kinaz β /NF- κ B aracılı enflamatuvar sinyalinin inhibisyonu, insülin sinyalinin ve fosfoinositid 3 kinaz (PI3K)/Akt/rapamisin memeli hedefi yolunun restorasyonu (mTOR) ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ursolik asit uygulaması yüksek yağlı diyet verilen farelerin hipokampusunda hafızayla ilişkili protein ekspresyonunu da artırmıştır.

Zhang ve ark. (117) tarafından yapılmış çalışmada, ursolik asidin oligodendrosit olgunlaşması ve santral sinir sistemi miyelin onarımını üzerine etkisi araştırılmıştır. Ursolik asit etkisinin mekanizmaları, astrositlerde PPAR γ /CREB sinyali yoluyla promiyelinizan nörotrofik faktörün indüklenmesini ve PPAR γ aktivasyonu yoluyla oligodendrosit olgunlaşması sırasında miyelinle ilişkili gen ekspresyonunun düzenlenmesi olarak bulunmuştur. Veriler sonucunda ursolik asidin, hem immün modülasyon hem de sinir onarımındaki kapasitesi nedeniyle, özellikle kronik ilerleyici aşamada multiple skleroz için potansiyelinin yüksek olduğu görülmüştür.

Tang ve ark. (118) tarafından yapılmış bir çalışmada 5 Gy ile akut ışınlamanın veya 10 gün boyunca sürekli olarak 0,5 Gy ile fraksiyonel maruziyetin (toplam 5 Gy doz) etkisi, fare modelinde değerlendirilmiştir. Ursolik asidin radyokoruyucu etkisi de (akut veya fraksiyone ışınlamaların her birinden 1 saat sonra ve 30 gün boyunca sürekli olarak uygulanan 25 mg/kg/gün dozunda) araştırılmıştır. Davranış testleri, 5 Gy'deki akut ışınlamanın bağlamsal korku koşullandırma testinde öğrenme ve hafızada eksikliklere neden olduğunu göstermiştir. Yeni nesne tanımaya yönelik hafıza da bozulmuştur. İmmünohistokimyasal çalışma, akut ve fraksiyone ışınlamaların, dentat girusun subgranüler bölgesindeki (SGZ) nörogenezde bozulmaya neden olduğunu,

ancak fraksiyone maruz kalmanın yeni oluşturulan nöronların çok daha az kaybına neden olduğunu açıkça göstermiştir. Işınlamadan sonra 30 gün boyunca 25 mg/kg/gün dozunda uygulanan ursolik asit, SGZ'de radyasyonun neden olduğu nörojenez azalmasını şiddetlendirmesine rağmen, bağlamsal öğrenme ve bellekte ve yeni nesne tanıma belleğinde akut ışınlamanın neden olduğu eksiklikleri büyük ölçüde iyileştirmiştir.

Wang ve ark. (119) tarafından yapılmış çalışmada ursolik asidin *Caenorhabditis elegans* transgenik patolojik modelinde $A\beta$ kaynaklı semptomlar üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır. Ursolik asit, *Caenorhabditis elegans*'ta $A\beta$ kaynaklı felç ve serotonine aşırı duyarlılığı başarıyla baskılamıştır. İnsan $A\beta$ 'sını aşırı eksprese eden transgenik nematodlarda ursolik asit uygulamasından sonra $A\beta$ monomerleri, oligomerleri ve parçacıklarının seviyeleri azalmış; ancak ursolik asit, ekzojen transgen transkripsiyonunu ve ekspresyon seviyelerini etkilememiştir. Ursolik asit, ubikuitin-proteazom sistemini transkripsiyonel olarak güçlendirmiş ve *in vivo* proteazom aktivitesini artırmıştır. Ancak proteazom inhibitörü MG132, ursolik asidin davranış felci üzerindeki terapötik etkisini ortadan kaldırmıştır. Sonuçlar, ursolik asidin, özellikle $A\beta$ miktarını azaltarak ve *in vivo* proteazom aktivitesini artırarak $A\beta$ kaynaklı proteotoksik stresi önlediğini ortaya koymuştur. Ayrıca ursolik asidin $A\beta$ 'yi eksprese eden transgenik nematodlar üzerindeki terapötik etkisinin, proteozomun artan aktivitesine bağlı olduğu öngörülmüştür.

Liang ve ark. (120) tarafından yapılmış çalışmada ursolik asidin farelerde $A\beta_{25-35}$ kaynaklı nörotoksisiteye karşı olası etkileri araştırılmıştır. Ursolik asidin $A\beta_{25-35}$ 'in neden olduğu öğrenme ve hafıza eksikliklerini önemli ölçüde tersine çevirdiği görülmüştür. Ursolik asidin nöroprotektif etkisinin potansiyel mekanizmalarından birinin, hipokampusta $A\beta_{25-35}$ 'in neden olduğu MDA birikimi ve GSH tükenmesini hafifletmek olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca ursolik asit, $A\beta_{25-35}$ uygulanmış farelerin hipokampusunda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α faktörü seviyelerinin artışını önemli ölçüde inhibe etmiştir.

Machado ve ark. (121) tarafından yapılmış bir çalışmada, *Rosmarinus officinalis* L.'den izole edilmiş ursolik asidin antidepresan benzeri etkisi, farelerde kuyruk süspansiyon testi ve zorla yüzme testi yöntemleriyle araştırılmıştır. Ursolik

asit, fluoksetin, imipramin ve bupropion benzer şekilde kuyruk süspansiyon testinde ve zorla yürüme testinde hareketsizlik süresini azaltmıştır. Ursolik asidin kuyruk süspansiyon testindeki etkisi, farelerin SCH23390 ve sülpirid ile ön muamelesi sonucu önlenmiştir. Ursolik asidin subetkili dozunun; SKF38393, apomorfın veya bupropionun subetkili dozları ile kombinasyonları, her bir ilacın tek başına uygulanmasına kıyasla kuyruk süspansiyon testinde hareketsizlik süresini kısaltmıştır. Ursolik asit ve dopaminerjik ajanlar tek başına veya kombinasyon halinde lokomotor ve keşif faaliyetlerinde önemli değişikliklere neden olmamıştır. Bu sonuçlar, ursolik asidin kuyruk süspansiyon testinde antidepresan benzeri etkisinin muhtemelen dopamin D₁ ve D₂ reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla olduğunu göstermektedir.

Yoon ve ark. (122) tarafından yapılmış çalışmada, PC12 hücrelerinde A β ₂₅₋₃₅'in neden olduğu toksisiteye karşı *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.'ten izole edilmiş *p*-kumarik asit ve ursolik asidin olası nöroprotektif etkileri ve moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. *p*-Kumarik asit ve ursolik asit, A β ₂₅₋₃₅ ile hasar görmüş PC12 hücrelerinde indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir. NF- κ B p65 alt ünitesinin nükleer translokasyonunun blokajı ve I κ B- α 'nın fosforilasyonu, *p*-kumarik asit ve ursolik asit uygulamasından sonra da gözlenmiştir. Her iki bileşik de NF- κ B aktivitesini, farklı upstream yolları ile kapsamlı bir şekilde inhibe etmiştir.

Wang ve ark. (123) tarafından yapılmış çalışmada, ursolik asidin farelerde lipopolisakkarit kaynaklı bilişsel eksikliklere karşı olası koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Ursolik asidin açık alanda lipopolisakkarit ile muamele edilen farelerde bilişsel eksiklikleri önemli ölçüde iyileştirdiği, pasif kaçınma ve Morris su labirenti testlerinde adım adım ilerlediği görülmüştür. Lipopolisakkarit ile muamele edilen fare beyinde COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-2 ve IL-6 dahil proenflamatuvar belirteçlerin üretiminin azalması, ursolik asidin etki mekanizması olarak belirlenmiştir. Ursolik asit, mekanik olarak fare beyinde lipopolisakkarit kaynaklı I κ B α fosforilasyonu ve bozulmasını, NF- κ B p65 nükleer translokasyonunu ve p38 aktivasyonunu belirgin şekilde inhibe etmiştir, ancak Toll benzeri reseptör 4 (TLR4), ERK, JNK ve Akt'nin aktivasyonunu etkilememiştir. Elde edilmiş veriler doğrultusunda ursolik asidin, p38/NF- κ B sinyal yollarını bloke ederek

proenflamatuvar faktörlerin üretimini kısmen inhibe ettiği ve enflamasyon ile bağlantılı nörolojik problemleri hafifletebileceği düşünülmüştür.

Nguyen ve ark. (124) tarafından yapılmış bir çalışmada *Ocimum sanctum* Linn.'in demans karşıtı etkilerinden sorumlu olan biyoaktif bileşenlerin açıklanması amaçlanmıştır. Demansın bir hayvan modeli olan koku alma ampulektomili fareler kullanılarak etanol ekstresi (OS), etanol ekstresinden oluşturulmuş *n*-hekzan (OS-H), etil asetat (OS-E) ve *n*-butanol fraksiyonlarının (OS-B), farelerin bilişsel eksiklikleri üzerindeki etkileri, değiştirilmiş Y-labirent testi ile aydınlatılmıştır. Etanol ekstresinin en aktif fraksiyonunun ana bileşenlerinin etkileri de referans ilaç donepezil kullanılarak aydınlatılmıştır. Etanol ekstresi ve etil asetat alt fraksiyonu uygulanması, koku alma ampulektomili farelerde demansın neden olduğu bilişsel eksiklikleri iyileştirmiştir. *n*-Hekzan ve *n*-butanol alt ekstrelerinde etki görülmemiştir. Etil asetat alt ekstresinden izole edilmiş, ursolik asit ve oleanolik asit koku alma ampulektomili farelerde demansın neden olduğu bilişsel eksikliklere karşı test edilmiştir. Ursolik asit (6 ve 12 mg/kg) ve oleanolik asit (24 mg/kg), bu farelerde bilişsel eksiklikleri hafifletmiştir. Ursolik, AChE *ex vivo* aktivitesini, donepezil ile benzer etkinlikle inhibe etmiştir. Ursolik asit, AChE'in *in vitro* aktivitesini de inhibe etmiştir (IC₅₀=106,5 µM). Etanolik ekstre, etil asetat alt fraksiyonu ve diğer izole bileşiklerin *in vitro* AChE üzerindeki etkileri ihmal edilebilir düzeyde bulunmuştur. Sonuçlara göre ursolik ve oleanolik asidin, etanol ekstresinin antidemans etkisinden sorumlu olduğu, aynı zamanda ursolik asidin, izomeri olan oleanolik asitten daha güçlü bir antidemans etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır.

Yamamoto ve ark. (125) tarafından yapılmış bir çalışmada ursolik asidin farelerde multiple kuprizon ile indüklenmiş demiyelinizasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Motor dengesi ve koordinasyonun ölçülmesi amacıyla farelere yönelik hızlanan bir rotarod koşu bandı kullanılmıştır. İzole beyin dokuları ELISA ve western blot yöntemleriyle analiz edilmiştir. Ursolik asidin oral olarak uygulanması, demiyelinize lezyonlarda IGF-1 seviyelerinin artırılması yoluyla kuprizonun neden olduğu demiyelinizasyonu ve motor fonksiyon bozukluğunu etkili bir şekilde baskılamıştır.

Li ve ark. (126) tarafından yapılmış bir çalışmada, *Pyrola incarnata* (DC.) Freyn'in farelerde $A\beta$ kaynaklı hafıza bozukluğuna karşı nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. *P. incarnata*'nın etanol ekstresi oluşturulmuş ve bu ekstreden ursolik asit elde edilmiştir. Farelere intraserebroventriküler olarak $A\beta_{25-35}$ enjekte edilmiş ve patoloji oluşturulmuştur. Etanol ekstresi ve ursolik asidin biliş süreçlerini değerlendirmek için farelere açık alan testi, Barnes labirent testi ve Morris su labirenti testi yapılmıştır. Etanol ekstresi, öğrenme ve hafıza eksikliklerini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Aynı zamanda etanol ekstresinin immünohistokimyasal incelemelerde $A\beta_{25-35}$ birikimini azalttığı görülmüştür. Diğer yanda ursolik asidin, mikroglia hücrelerini aktive ederek ve hipokampustaki Iba1 seviyesini artırarak düzenlemiş ve bu şekilde uzamsal hafıza performansını iyileştirmiştir. Bunlara ek olarak ursolik asit $A\beta_{25-35}$ birikimini azaltmıştır.

Chen ve ark. (127) tarafından yapılmış çalışmada asiatic asidin Parkinson hastalığında potansiyel antiinflamatuvar mekanizmalarının anlaşılması amacıyla *in vitro* yöntemlere tabi olan lipopolisakkarit ile indüklenen BV2 mikroglia hücreleri ve 1-metil-4-fenil-piridin (MPP^+) ile indüklenen SH-SY5Y hücreleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Asiatic asidin dopaminerjik nöronlar üzerindeki etkisinin incelenmesi için SH-SY5Y hücreleri ve asiatic asidin nöroprotektif etkilerine yönelik potansiyel mekanizmaları araştırmak için BV2 mikroglia hücrelerinde NLRP3 enflamozomu aktive edilmiştir. Asiatic asidin mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin hücre içi üretimini azalttığı, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu düzenlemek için mitokondriyal membran potansiyelini değiştirdiği ve mikroglia hücrelerinde NLRP3 enflamozomunu baskıladığı görülmüştür. Ayrıca asiatic asit uygulaması yapılan SH-SY5Y hücre canlılığını ve MPP^+ 'nin neden olduğu mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu doğrudan iyileştirmiştir. Sonuçlar doğrultusunda asiatic asidin dopaminerjik nöronları doğrudan korumanın yanı sıra mikroglia hücrelerinde NLRP3 enflamozom aktivasyonunu baskılayarak dopaminerjik nöronları nöroinflamasyondan koruduğu tespit edilmiştir.

Nataraj ve ark. (128) tarafından yapılmış çalışmada asiatic asidin SH-SY5Y hücre hattında rotenon (mitokondriyal kompleks I inhibitörü) ile indüklenmiş Parkinson modeli üzerinde olası etkileri araştırılmıştır. Rotenon uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin üretiminde artış, mitokondriyal fonksiyon

bozukluğu ve apoptoz gözlenmiştir. Asiatik asidin ön tedavi ile hücrelere uygulanması bu parametrelerde iyileşmeyi sağlamıştır. Asiatik asidin gözlenen etkisi antioksidan, mitoprotektif ve antiapoptotik özelliklerine atfedilmiştir.

Zhang ve ark. (129) tarafından yapılmış çalışmada *Centella asiatica* (L.) Urb.'dan elde edilmiş bir triterpenoit olan asiatik asidin, sıçan kortikal nöronlarında C₂-seramidlerin neden olduğu hücre ölümüne karşı potansiyel nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Asiatik asit (0,01-1,0 µmol/L), nöronlarda konsantrasyona bağlı bir şekilde C₂-seramid kaynaklı hücre ölümünü azaltmıştır. Ayrıca asiatik asit, C₂-seramid tedavisinin ardından ROS üretimini azaltmıştır. Asiatik asit, C₂-seramidin proapoptotik etkilerini kısmen ortadan kaldırmıştır. Sonuçlara bakıldığında asiatik asidin nöronları, mitokondriye bağlı apoptozu antagonize ederek C₂-seramid kaynaklı hücre ölümünden koruduğu görülmüştür.

Xu ve ark. (130) tarafından yapılmış bir çalışmada *Centella asiatica* (L.) Urb.'dan elde edilmiş asiatik asidin *in vitro* ve *in vivo* olası nöroprotektif etkileri ve bu etkilerin altında yatan mekanizmalar belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalar insan SH-SY5Y hücre hattında yapılmıştır. Hücre canlılığının analizi için MTT yöntemi kullanılmıştır. Apoptozu incelemek için Hoechst 33342 boyama ve akım sitometrisi kullanılmıştır. Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ve reaktif oksijen türleri (ROS), floresan boya kullanılarak ölçülmüştür. *In vivo* çalışmalar için farelere, monosodyum glutamat (2,5 mg/g) verilmiş ve asiatik asit 30 gün boyunca oral olarak uygulanmıştır. Farelerin öğrenme hafızası Morris su labirenti testi ile değerlendirilmiştir. Asiatik asit uygulaması sonrasında SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde monosodyum glutamat tarafından indüklenen toksisiteyi hafifletmiştir. Asiatik asit (10 nmol/L), apoptotik hücre ölümünü ve ROS'u azaltmıştır, mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) stabilize etmiştir, Morris su labirenti testindeki bilişsel eksiklikleri önemli ölçüde azaltmıştır.

Ding ve ark. (131) tarafından yapılmış çalışmada 0,5-2 mg asiatik asit/100 g diyetinin *Drosophila*'nın tırmanma yeteneğini önemli ölçüde iyileştirdiği ve yaşam süresini uzattığı gözlenmiştir. Asiatik asit, SH-SY5Y hücre hattında rotenon ile oluşturulmuş modelde mitokondriyi oksidatif strese ve apoptozu karşı korumuştur. Asiatik asit, izole edilmiş mitokondri modelinde, α -sinüklein tarafından indüklenen

mitokondriyal membran potansiyelindeki düşüşü hafifletmiştir. Aynı zamanda asiatic asit α -sinükleinin mitokondriye translokasyonunu bloke ederek mitokondriyi korumuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda Parkinson hastalığının tedavisinde asiatic asidin iyi bir aday olabileceği anlaşılmıştır.

Xiong ve ark. (132) tarafından yapılmış bir çalışmada asiatic asidin SH-SY5Y hücre hattında rotenon veya H_2O_2 kaynaklı hücresel hasara ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Asiatic asidin nöroprotektif etkisinin olası mekanizmalarının anlaşılabilmesi için hücresel hasarın ardından mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ve voltaja bağlı anyon kanalının (VDAC) ifadesi, asiatic asit ön tedavisi ile veya olmadan tespit edilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, asiatic asidin (0,01-100 nM) ön tedavisinin, hücreleri rotenon veya H_2O_2 'nin neden olduğu toksisiteye karşı koruduğu gözlenmiştir. Rotenona maruz kalmanın ardından MMP kaybı meydana gelmiştir. Asiatic asidin önceden uygulanması, VDAC mRNA'nın yükselmesini inhibe etmiştir. Aynı zamanda rotenon (100 nM) veya H_2O_2 (300 μ M) tarafından indüklenen protein seviyelerini inhibe etmiştir. Bu sonuçlar asiatic asidin nöronal hücreleri mitokondriyal hasara karşı koruyabileceğini göstermiştir. Aynı zamanda asiatic asidin Parkinson hastalığının önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olabileceği öngörülmüştür.

Loganathan ve ark. (133) tarafından yapılmış bir çalışmada asiatic asidin sıçanlarda kinolinik asidin neden olduğu bilişsel bozulmayı ve oksidatif stresi önlemedeki olası etkileri araştırılmıştır. Sıçanlarına 28 gün boyunca oral olarak asiatic asit (30 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Kinolinik asit toksisitesinin indüklendiği hayvanlara 15. günden 28. güne kadar 14 gün boyunca kinolinik asit (1,5 mmol/kg/gün) verilmiştir. Asiatic asit uygulaması, yeni nesne konum testi kullanılarak belirlenmiştir ve kinolinik asit kaynaklı toksisitesi sonucunda oluşan uzaysal hafıza kaybını önlemiştir. Ayrıca asiatic asit uygulaması, kinolinik asidin neden olduğu beyindeki oksidatif stresin artması, antioksidan durumun azalması ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon fonksiyon bozukluğu gibi etkileri azaltmıştır.

Suryavanshi ve ark. (134) tarafından yapılmış bir çalışmada asiatic asidin alüminyumun neden olduğu nörotoksisiteye karşı olası nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Sıçanlara, 8 hafta alüminyum klorür çözeltisi ($AlCl_3$; 100 mg/kg vücut

ağırlığı) veya $AlCl_3$ ile kombinasyon halinde asiatik asit (75 mg/kg vücut ağırlığı) oral olarak uygulanmıştır. $AlCl_3$ uygulamasının hafızada bozulmaya neden olduğu, anksiyete benzeri davranış oluşturduğu, sıçan beyninin korteks ve hipokampus bölgelerinde AChE aktivitesini, MDA seviyesini artırdığı ve buna eşlik eden SOD ve CAT aktivitelerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak $AlCl_3$ uygulanması her iki bölgede de nöron kaybını ve reaktif astroglia artırmıştır. Asiatik asidin $AlCl_3$ ile birlikte uygulanması davranış değişikliklerini azaltmıştır. SOD ve CAT aktivitelerini geri kazandırmış, AChE aktivitesini ve MDA seviyesini azaltmıştır. Sıçan beynindeki nöron kaybını ve reaktif astroglia da azaltmıştır. Sonuç olarak asiatik asit, $AlCl_3$ nörotoksitesine karşı koruyucu etki göstermiştir.

Islamie ve ark. (135) tarafından yapılmış bir çalışmada asiatik asidin biyoyararlanımını artırmak için burun boşluğundaki emilimini artırma stratejisi olarak katı lipit nanopartiküllere yüklenmiştir. $A\beta_{1-42}$ oligomerinin fare beynine doğrudan enjeksiyonu ile bellek bozukluğu oluşturulmuştur. Olası nöroprotektif etki ve etkinin altında yatan mekanizmalar, hafıza davranışı incelemeleri ve moleküler teknikler kullanılarak araştırılmıştır. Nanopartikül oluşturulmuş asiatik asit intranasal uygulanması, Morris su labirentinde ve yeni nesne tanıma testlerinde $A\beta_{1-42}$ 'nin neden olduğu öğrenme ve hafıza bozulmasını azaltmıştır. Asiatik asit, pTau-S396 ve pTau-T231'in tau hiperfosforilasyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ek olarak asiatik asit, $A\beta_{1-42}$ ile bellek bozukluğu oluşturulmuş farelerin hipokampusunda astrosit reaktivitesini ve mikroglial aktivasyonu önlemiştir. Ayrıca fare beynindeki yüksek IL-1 β , TNF- α ve MDA seviyelerini de azaltmıştır.

Zhao ve ark. (136) tarafından yapılmış çalışmada asiatik asidin farelerde MPTP kaynaklı Parkinson hastalığı benzeri motor semptomlar üzerindeki etkileri ve nöroprotektif etkisinin mekanizması araştırılmıştır. Farelere davranış testleri yapılmıştır. Substantia nigra TH pozitif hücreler immünohistokimya ile tespit edilmiştir. iNOS, COX mRNA ekspresyonları, TNF- α , IL-1 β ve MDA içeriği ölçülmüştür. Serumdaki IL-1 β ve TNF- α seviyeleri ELISA kitleri kullanılarak tespit edilmiştir. Asiatik asit ile tedavi edilen fareler davranış testlerinde daha iyi sonuçlar göstermiştir. Aynı zamanda asiatik asidin, TH ekspresyonunu artırarak regüle etmesi ve TH pozitif hücre sayısını arttırması nedeniyle substantia nigradaki dopaminerjik nöronları korumuştur. Asiatik asit ile tedavi edilen farelerin orta beyindeki IL-1 β ,

TNF- α , iNOS ve COX-2 mRNA ifadeleri belirgin şekilde bastırılmıştır. Ayrıca serumda IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde azalmalar gözlenmiştir. Asiatik asidin farelerde motor fonksiyon bozukluğunu ve dopaminerjik nöronal eksiklikleri hafiflettiği anlaşılmıştır. Nöroprotektif etki mekanizmaları, antioksidatif ve antiinflamatuvar aktivitelerine atfedilebilmiştir.

Upaganlawar (137) tarafından yapılmış çalışmada sıçanlarda streptozosinle indüklenmiş diyabetik nöropati modeli üzerinde korosolik asidin olası nöroprotektif ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Ağrı, diyabetik sıçanlarda mekanotaktik allodini, mekanik hiperaljezi ve soğuk allodini ile değerlendirilmiştir. Tedavi periyodunun sonunda siyatik sinirdeki plazma glikoz düzeyi, endojen antioksidanlar (lipit peroksidasyonu, GSH, SOD ve CAT) gibi biyokimyasal değişiklikler değerlendirilmiştir. Ayrıca korosolik asit, nöropatik hayvanlarda ağrıya doza bağımlı bir azalma göstermiştir. Endojen antioksidan enzimler, Na⁺/K⁺ ATPaz ve nitrik oksit düzeyi önemli ölçüde önlenmiştir. Sonuç olarak diyabetik nöropati oluşturulmuş sıçanlarda korosolik asidin antidiyabetik, antioksidan ve nöroprotektif etkileri olduğu anlaşılmıştır.

Yuan ve ark. (138) tarafından yapılmış çalışmada, *Potentilla parvifolia* Fisch. ex Lehm.'in etanol ekstresinin etil asetat alt fraksiyonundan oleanolik asit, betulinik asit, pomolik asit, platanik asit, öskafik asit ve korosolik asit olmak üzere altı adet triterpen bileşik izole edilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde okadaik asit ile indüklenmiş Alzheimer hastalığı modelinde triterpenlerin nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Western blot ve morfoloji analizinden elde edilen sonuçlara göre pomolik asit, platanik asit, öskafik asit ve korosolik asidin daha iyi nöroprotektif etkilere sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu bileşiklerin potansiyel nöroprotektif mekanizmasının araştırılması için SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin seviyesi ve bu bileşiklerin mitokondriyal membran potansiyeli, akım sitometri teknolojisi ile test edilmiştir. Bunun sonucunda öskafik asit ve korosolik asit mekanizmasının hücreyi mitokondriyal oksidatif stresten kaynaklanan hasardan korumak olabileceği öngörülmüştür.

Venkateswarulu ve ark. (139) tarafından yapılmış çalışmada korosolik asit ve tau proteinin moleküler kenetlenmesi *in silico* Pyrx-V.0.8 yazılımı kullanılarak

incelenmiştir. Absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite özellikleri belirlenmiştir ve bağlı kompleksin moleküler dinamiği araştırılmıştır. Kenetlenme skoru ve etkileşimlerine bakıldığında, korosolik asidin Alzheimer hastalığını önlemek için tau proteine bağlanabileceği düşünülmüştür.

Analjezik etki

Hosseinzadeh ve ark. (140) tarafından yapılan bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarının dekoksasyonu ve etanol ekstresi hazırlanmıştır. Fareler üzerinde antinosiseptif aktivitelerine bakılmıştır. Sıcak plaka ve kıvranma testleriyle ekstrelerin aktivitesi tayin edilmiştir. Su ve etanol ekstreleri sıcak plaka testinde antinosiseptif aktivite göstermiştir. Ekstreler, asetik asit kaynaklı kıvranmaya karşı antinosiseptif aktivite sergilemiştir. Bitkinin toprak üstü kısımlarının su ve etanol ekstreleri antinosiseptif etkiler göstermiştir ve bunlara opioid reseptörlerin aracılık ediyor olabileceği düşünülmüştür.

Mubarak ve ark. (141) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarının uçucu yağı, analjezik ve gastrointestinal (GİS) hareketlilikler açısından test edilmiştir. Analjezik etki, farelerde asetik asit kaynaklı kıvranma testi kullanılarak değerlendirilmiş ve GİS motilitesi üzerindeki etki ise bağırsakta işaretleyici olarak aktif kömür kullanılarak test edilmiştir. Uçucu yağlar, standart ile karşılaştırıldığında doza bağımlı analjezik etki göstermiş, 100 ve 150 mg/kg'da kıvranmayı önemli ölçüde ($p<0.05$) inhibe ederken, 50 mg/kg'lık dozda analjezik etki anlamlı bulunmamıştır. GİS motilitesi durumunda yağlar düşük dozda (50 mg/kg) iyi müshil etkisi gösterirken, dozun artırılmasıyla motilitede anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Yağların kabızlık için düşük dozda, analjezik etki için ise yüksek dozda kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Mirzaee ve ark. (142) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* kreminin yara iyileşmesi ve epizyotomi ağrı şiddeti üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma Temmuz-Kasım 2018 tarihleri arasında Zabol Amiralmomenin Ali Hastanesi'nde 100 hamile kadın üzerinde gerçekleştirilmiştir. Katılımcılara rastgele krem veya plasebo verilmiş ve kremler on gün boyunca günde iki kez kullanılmıştır. Daha sonra doğumdan sonraki ilk iki saatte, beşinci ve onuncu günde ağrı şiddeti ve iyileşme oranı incelenmiştir. Doğum sonrası ilk 2 saatteki demografik ve obstetrik değişkenler ile ağrı

şiddeti açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0,05$). *M. communis* krem ve plasebo krem gruplarında doğumdan sonraki beşinci ($p=0,009$) ve onuncu gün ($p=0,012$) ağrı şiddeti arasındaki ortalama fark anlamlı olup, *M. communis* krem grubunda ağrı şiddetinin daha az olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda *M. communis* kreminin yara iyileştirici özelliğinden dolayı epizyotomi yarasının iyileşmesini hızlandırdığı ve ağrı şiddetini azalttığı görülmüştür.

Panahi ve ark. (143) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'ten elde edilen uçucu yağ ile hazırlanan losyonun, hemoroid belirtilerinin hafifletilmesindeki klinik etkinliğinin değerlendirilmesi ve etkinin antihemoroid merhemlerin (hidrokortizon, lidokain, alüminyum subasetat, çinko oksit içeren) etkileriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. *M. communis* losyonu, ürünün her mL'sinde 30 mg 1,8-sineol içerecek şekilde standardize edilmiştir. Çalışma sonunda hastalarda kanama, sürekli ağrı, defekasyon sırasında ağrı, anal kaşıntı ve tahriş semptomları her iki grupta da önemli oranda azalmıştır. Bunun sonucunda bitkinin uçucu yağının hemoroid tedavisinde kullanılabileceği görülmüştür.

Antioksidatif etki

Gardeli ve ark. (144) tarafından yapılan çalışmada, *M. communis* L. ve *Pistacia lentiscus* L. bitkilerinin Şubat, Mayıs ve Ağustos aylarında toprak üstü kısımları toplanmıştır. %30'luk metanol ekstraktları ve su buharı distilasyonu ile uçucu yağları elde edilmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri ve FRAP, DPPH yöntemleri ile antioksidan aktiviteleri ölçülmüştür. *M. communis* için en güçlü antioksidan aktivite ve en yüksek fenolik içerik çiçeklenme döneminde (Ağustos) elde edilmiştir.

Tuberoso ve ark. (145) tarafından yapılmış bir çalışmada Akdeniz bölgesindeki üç tipik gıda ürününün antioksidan ve vazodilatör özelliklerinin değerlendirilmesi ve bu aktivitelerin fenolik içerikleriyle ilişkilendirilmesi için farklı analizlerin yapılması amaçlanmıştır. Bu nedenle Cannonau kırmızı şarapları, *M. communis* meyvelerinin soğuk maserasyonuyla elde edilen likörler ve *Arbutus unedo* L. çiçeklerinden elde edilen acı balların toplam fenolik içerikleri; DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri ile antioksidan aktiviteleri analiz edilmiştir. *In vitro* vazodilatör etkinin analizi norepinefrin ile kasılmış sıçan aortu üzerinde incelenmiştir. Cannonau şarapları ve *M. communis* likörleri; FRAP, ABTS ve DPPH analizlerinin sonuçlarıyla doğrusal olarak

yüksek seviyelerde toplam fenolik içerik (sırasıyla 1978 ± 279 ve 1741 ± 150 mg gallik asit eşdeğeri/L) göstermiştir. Maksimum vazodilatör aktiviteleri sırasıyla $\%61,7 \pm 4,1$ ve $\%53,0 \pm 3,0$ olarak bulunmuştur.

Tuberoso ve ark. (70) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in meyvelerinin su, etanol ve etil asetat ile hazırlanmış ekstrelerinin antioksidan özelliklerini değerlendirmek amacıyla DPPH ve FRAP testleri yapılmıştır. Biyolojik molekülleri koruma yetenekleri, kolesterol ve LDL oksidasyon analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. En yüksek antiradikal ve antioksidan aktiviteler etanol ve etil asetat ekstralarında bulunmuştur. Aynı zamanda en yüksek fenolik bileşik içeriği bu ekstralarda görülmüştür. Etil asetat ekstresi, LDL oksidasyonu analizlerinde en yüksek koruyucu etkinliği göstermiş, çoklu doymamış yağ asitleri ve kolesterolün azalmasını ve bunların oksidatif ürünlerinin artışıını inhibe etmiştir.

Ines ve ark. (146) tarafından yapılan bir çalışmada *M. communis*'in yapraklarından saflaştırılan 3,5-*O*-digalloilkinik asidin (DGQA) antioksidan, antiproliferatif ve antigenotoksik özellikleri araştırılmıştır. Antioksidan aktivite için bileşiğin K562 hücre hattında H_2O_2 tarafından lipid peroksidasyonu indüklenmiştir ve DGQA'nın bu peroksidasyonu engelleme oranı analiz edilmiştir. DGQA, H_2O_2 kaynaklı genotoksisiteyi önleyici bir etki sergilemiştir. DGQA'nın hücreleri oksidatif strese karşı koruyabildiği sonucuna varılmıştır.

Gortzi ve ark. (147) tarafından yapılmış bir çalışmada, 160 ppm'ye kadar olan konsantrasyonlarda sonuçlar *M. communis* yaprağının metanol ekstresinin α -tokoferolden daha güçlü antioksidan aktivitesi olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Ayrıca, lipozom formunda enkapsülasyon sonrasındaki antioksidan aktivitenin, saf formundan daha yüksek olduğu görülmüştür.

Benchikh ve ark. (148) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis* yapraklarından elde edilmiş metanol, kloroform, etil asetat ve sulu ekstralarının toplam polifenol, flavonoid ve tanen içerikleri değerlendirilmiştir. Aynı zamanda ekstraların ABTS radikal katyon dekolorizasyon, DPPH radikal süpürücü aktivite, $OH\cdot$ radikal süpürücü aktivite, H_2O_2 süpürücü aktivite, demir iyonu şelatlama aktivitesi, β -karoten ağartma aktivitesi yöntemleri, demir tiyosiyanat ve tiyobarbitürik asit metotları kullanılarak antioksidan aktiviteleri analiz edilmiştir. Metanol ekstresinin en yüksek

toplam fenolik içeriğe (149,25±3,11 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre) sahip olduğu, sulu ekstrenin ise en yüksek tanen içeriğine (83,35±0,36 mg tannik asit eşdeğeri/g ekstre) sahip olduğu görülmüştür. En yüksek toplam flavonoit içeriği etanol ekstresinde (38,4±0,9 mg kersetin eşdeğeri/g ekstre) görülmüştür. Etanol ekstresinin, ABTS radikal katyon dekolizasyon testi sonucunda IC₅₀ değeri 0015 mg/mL, DPPH testinde 0,004 mg/mL, OH• radikal süpürücü aktivite tayini sonucunda 0,18 mg/mL, H₂O₂ süpürücü aktivite tayini sonucunda 0,023 mg/mL, demir iyonu şelatlama aktivite tayini sonucunda 6,14±0,058 mg/mL olarak; antioksidan aktivite β-karoten ağartma tayini sonucunda %90,29±0,42, demir tiyosiyanat analizi sonucunda %92,77±1,77 ve tiyobarbitürik asit analizi sonucunda %94,77±3,52 olarak tespit edilmiştir.

Bouyahya ve ark. (149) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in yapraklarından elde edilmiş etanol, metanol ve *n*-hekzan ekstrelerinin antiradikal etkinliği değerlendirilmiştir. Toplam fenolik içerik, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak toplam flavonoit içeriği ise kersetin standardı ile AlCl₃ kolorimetrik yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH radikali kullanılarak değerlendirilmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik içeriği 122,72±1,16 ila 137,46±0,35 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre arasında değişirken, flavonoit içeriği ise 18,41±0,43 ila 31,24±1,23 mg kersetin eşdeğeri/g ekstre arasında bulunmuştur. Etanol ekstresinin toplam fenolik içeriği 126,41±1,03 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre, toplam flavonoit içeriği 18,41±0,43 mg kersetin eşdeğeri/g ekstre olarak bulunmuştur. Ayrıca *n*-hekzan ekstresi, etanol ve metanol ekstrelerinden daha fazla aktivite göstermiştir. IC₅₀ ve T_{IC₅₀} zaman eşdeğeri, ekstrelerin antiradikal kapasitesi üzerinde etkili parametrelerdir. Metanol, etanol ve *n*-hekzan ekstrelerinin askorbik asit standardına göre antiradikal kapasiteleri sırasıyla (IC₅₀) 514,64 mg/g DPPH, 633,07 mg/g DPPH, 317,51 mg/g DPPH olarak bulunmuştur.

Mozdastan ve ark. (150) tarafından yapılmış çalışmada mersin yaprağının ekstraksiyon yönteminin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri ile antioksidan aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Maserasyon, ultrasonik yardımcı ve soxhlet destekli ekstraksiyon olmak üzere üç farklı yöntemle metanol kullanılarak ekstreler oluşturulmuştur. Antioksidan kapasitesi : DPPH ve NO serbest radikalleri süpürücü etki, indirgeme gücü ve demir şelatlama aktivitesi olmak üzere dört farklı yöntem

kullanılarak değerlendirilmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi soxhlet destekli ekstraksiyonla elde edilmiştir. Aynı zamanda en yüksek miktarda toplam fenolik ve flavonoit içeriği göstermiştir. DPPH radikal süpürücü etkisinde, soxhlet ekstresi ($IC_{50}=11,3\pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) diğer ekstrelerden daha yüksek aktiviteye sahip bulunmuştur. NO radikal süpürücü etkisinde; ultrasonik ekstre, soxhlet destekli ekstraksiyon ve maserasyon için IC_{50} değerleri sırasıyla 355,1, 402,9 ve 173,3 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. NO radikal süpürücü etkisinde maserasyon en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Sonuçlara bakıldığında kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin antioksidan kapasiteleri ve toplam fenolik ve flavonoit içeriğini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Mersin bitkisinin antioksidan bileşenlerinin ekstraksiyonunda soxhlet destekli ekstraksiyon ve maserasyon yöntemlerinin daha etkili olduğu bulunmuştur.

Ali ve ark. (151) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarının su, kloroform, *n*-hekzan ve metanol ekstrelerinin toplam fenol içeriği, toplam flavonoit içeriği, toplam kondanse tanen içeriği ve serbest radikal süpürücü potansiyeli değerlendirilmiştir. Toplam fenolik içeriğin belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yöntemi, flavonoitlerin belirlenmesinde kolorimetrik yöntem ve kondanse tanen analizi için vanilin analiz prosedürü kullanılmıştır. H_2O_2 süpürücü etki, SOD benzeri aktivite ve NO süpürücü etki deneylerinde standart olarak askorbik asit kullanılmıştır. En yüksek toplam fenolik içerik (gallik asit eşdeğerleri/g ekstre), toplam flavonoitler (rutin eşdeğerleri/g ekstre) ve kondanse tanenler (mg kateşin eşdeğeri/g ekstre) metanol ekstresinde ölçülmüştür, H_2O_2 süpürücü etki $\%84\pm 1,0$, SOD benzeri aktivite $\%85\pm 0,5$ ve NO süpürücü etki $\%75\pm 1,0$ şeklinde bulunmuştur.

Çelik ve ark. (152) tarafından yapılmış bir çalışmada mürver çiçeğindeki antioksidan polifenol bileşenleri HPLC ile tanımlanmıştır. Kolon sonrası türevlendirme işlemi yapılarak HPLC-CUPRAC analizi ile bileşiklerin antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir. Kolon çıkışında HPLC ile ayrılmış antioksidan polifenoller, 450 nm'de maksimum absorpsiyona sahip bakır(I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) şelatına indirgenmesi için bir reaksiyon bobininde bakır(II)-neokuproin ile reaksiyona sokulmuştur. Test edilen bileşiklerin kolon sonrası türevlendirme sonucunda 450 nm'de tespit limitleri, türevlendirme olmadan 340 nm UV tespitindeki limitlerle karşılaştırılmıştır. Kersetin ve glikozitlerinin 450 nm'deki limit değerleri

($\mu\text{g/mL}$), 340 nm'deki UV tespitinden daha düşük bulunmuştur. Bu yöntem mürver çiçeği ekstresinde başarıyla uygulanmıştır. Numunede çeşitli şeker bileşenlerine bağlı kersetin ve kemferolün flavonol glikozitleri tanımlanmıştır. Flavonol glikozitlerinin CUPRAC deneyi sonucunda antioksidan aktiviteleri trolox eşdeğeri olarak verilmiştir ve kersetin-3-*O*-ramnozid için antioksidan aktivite $3,42 \pm 0,04$ bulunmuştur.

Ajileye ve ark. (153) tarafından yapılmış bir çalışmada, *Anacardium occidentale* L. yaprağından elde edilen ekstrelerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Ham ekstrenin etil asetat alt fraksiyonunun DPPH analizi kullanılarak biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlanması sonucunda, agatisflavonun (1), kersetin 3-*O*-rutinozit (2) ve kersetin 3-*O*-ramnozid (3) bileşikleri izole edilmiştir. Örneklerin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürücü etki, toplam antioksidan kapasite (TAC) ve FRAP kullanılarak test edilmiştir. Antioksidan aktivite için kersetin (QE) ve askorbik asit eşdeğerleri (AAE) belirtilmiştir. Kersetin 3-*O*-rutinozit ve kersetin 3-*O*-ramnozid bileşiklerinin karışımının (2:1), DPPH testinde ($\text{IC}_{50} = 0,96 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) serbest radikalleri süpürücü kapasitesi açısından en aktif numune olduğu görülmüştür. Kersetin 3-*O*-rutinozit ve kersetin 3-*O*-ramnozid bileşikleri, TAC analizinde ($5332,00 \pm 3,38 \text{ mg AAE/g}$, $8562,00 \pm 5,43 \text{ mg QE/g}$) ve FRAP analizinde ($15136,00 \pm 7,14 \text{ mg AAE/g}$, $199530,00 \pm 94,12 \text{ mg QE/g}$) en yüksek aktiviteleri sergilemiştir. Ekstrenin fraksiyonlarından etil asetat fraksiyonu antimikrobiyal aktivitede en geniş spektrumu göstermiştir ve aynı zamanda gram-negatiflere karşı gram-pozitif olanlara göre nispeten daha iyi etki göstermiştir.

Hashim ve ark. (154) tarafından yapılmış bir çalışmada *Anacardium occidentale* L. yapraklarının %80'lik metanol ekstresinden elde edilen dört flavonol glikozitin ve sulu ekstreden elde edilen üç flavonol aglikonunun antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Antioksidan aktivitelerin tayini için DPPH, FRAP, ABTS, β -karoten ve metal şelasyon testleri kullanılmıştır. Sulu ekstresinin %80'lik metanol ekstresinden daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Mirisetin, en düşük minimum inhibisyon konsantrasyonu ile test edilen tüm bakteri ve mayalara karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Mirisetin, $2,23 \mu\text{g/mL}$ ile $6,40 \mu\text{g/mL}$ arasında değişen %50 aktivite (EC_{50}) değerleri ile en iyi birincil antioksidan aktiviteyi sergilemiştir. En yüksek ikincil antioksidan aktivite mirisetin-3-*O*-ramnozid tarafından

gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında mirisetin-3-*O*-ramnozitin EC₅₀ değeri 11,9±0,07 µg/mL olarak bulunmuştur.

Niamnuy ve ark. (155) tarafından yapılmış bir çalışmada seçilen kurutma yöntemlerinin ve sıcaklığın kurutulmuş *Centella asiatica* (L.) Urb.'un antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *C. asiatica*'nın içerdiği triterpenlerin ve gallik asidin antioksidan aktivitesi ABTS ve FRAP yöntemleriyle analiz edilmiştir. FRAP deneyi sonucu asiatik asidin antioksidan aktivitesi 4,14±0,10 mmol FeSO₄/g olarak bulunmuştur. Sıcak havayla kurutma (HAD), kızılötesi-sıcak havayla kurutma (IR-HAD) ve düşük basınçlı kızgın buharla kurutma (LPSSD), çeşitli sıcaklıklarda (50, 60, 70°C) gerçekleştirilmiştir. Daha yüksek kurutma sıcaklıkları daha yüksek kuruma hızı sağlamıştır. Kurutma sıcaklığı yükseldikçe fenolik bileşik, toplam triterpen, antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivitede azalma görülmüştür. Aynı kurutma sıcaklığında IR-HAD en yüksek kurutma hızını sağlamıştır; bunu azalan sırayla LPSSD ve HAD takip etmiştir. Bununla birlikte LPSSD, test edilen biyoaktif bileşikler, antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivite açısından en yüksek seviyede görülmüştür. 50°C'deki LPSSD, en iyi genel kaliteye sahip kurutulmuş *C. asiatica*'yı vermiştir.

Butkevičiūtė ve ark. (156) tarafından yapılmış çalışmada *Malus domestica* Borkh.'ın (elma) mevsimsel olarak triterpen miktarları ve *in vitro* antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Triterpen miktarının en yüksek olduğu büyüme aşamasını belirlemek için HPLC kullanılmıştır. En yüksek triterpenik bileşik miktarları meyve gelişiminin başlangıcında tespit edilmiş ve olgunlaştıkça triterpen miktarının 2,63±0,26 mg/g'den 1,6±0,28 mg/g'a düştüğü görülmüştür. Bu çalışmada, triterpenik asitlerin kantitatif bileşimi betulinik asit<korosolik asit<oleanolik asit<ursolik asit olmak üzere artan sıraya göre düzenlenmiş dört triterpenik bileşik tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Elma ekstralarının *in vitro* antioksidan aktivitesi, meyvenin büyüme aşamaları boyunca değişiklik göstermiştir. En güçlü antiradikal ve indirgeyici aktiviteler elma gelişiminin başlangıcında gözlenmiştir. DPPH, ABTS, CUPRAC ve FRAP analizleri ile değerlendirilen elmaların aseton ekstralarının antioksidan aktivitesi ile bu ekstradaki toplam triterpenik asit miktarı arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır. En güçlü pozitif korelasyon,

oleanolik asit miktarı ile DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemleriyle değerlendirilen antioksidan aktivite arasında gözlenmiştir. FRAP analizi sonucunda betulinik asit, korosolik asit, oleanolik asit, ursolik asit bileşiklerin antioksidan aktiviteleri sırasıyla 0,593 μmol troloks eşdeğeri (TE)/g ekstre, 0,447 μmol TE/g ekstre, 0,632 μmol TE/g ekstre, 0,388 μmol TE/g ekstre olarak bulunmuştur. CUPRAC analizi sonucunda ise bileşiklerin antioksidan aktiviteleri sırasıyla 0,606 μmol TE/g ekstre, 0,474 μmol TE/g ekstre, 0,720 μmol TE/g ekstre, 0,352 μmol TE/g ekstre olarak bulunmuştur.

Santiago ve ark. (157) tarafından yapılmış bir çalışmada *Ficus pseudopalma* Blanco'da bulunan triterpenlerin antioksidan kapasitesinin karşılaştırılması mikrotitre plaka yöntemi kullanılarak yapılmıştır. DPPH ve FRAP antioksidan testleri ve NO \bullet , süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$) ve lipit peroksit (LOO \bullet) süpürücü etkisine yönelik testler yapılmıştır. *F. pseudopalma*'da tespit edilmiş α -amirin, oleanolik asit ve ursolik asit ile birlikte, ekstredeki iki lekenin standart bileşiklere karşılık geldiği görülmüştür. Sonuçlar, α -amirin, oleanolik asit ve ursolik asidin proton donörleri olduğunu göstermiştir. FRAP analizi sonucunda α -amirin, oleanolik asit ve ursolik asidin indirgeme gücü % olarak ifade edilmiştir ve ursolik asidin indirgeme gücü %14,19 bulunmuştur. Mikrotitre plaka yöntemi, triterpenlerin güçlü antioksidanlar olduğunu ve bu bileşiklerin muhtemelen *F. pseudopalma*'nın antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisinden sorumlu olduğunu açıkça göstermiştir.

Dzoyem ve ark. (158) tarafından yapılmış bir çalışmada *Entada abyssinica* Steud. ex A.Rich.'ten dan izole edilen üç flavonoit, üç terpenoit, bir monogliserit ve bir fenolik bileşiği içeren sekiz bileşiğin sitotoksisite, antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Entadanin ve kersitrin, 1,56 ve 3,12 $\mu\text{g/mL}$ minimum inhibitör konsantrasyon değerleri ile *Salmonella typhimurium*'a karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bileşiklerin Vero hücrelerine karşı sitotoksisitesi düşük görülmüştür. Ursolik asit, THP-1 ve RAW 264.7 hücrelerine karşı en güçlü sitotoksisiteyi göstermiştir. İncelenen terpenoit ve flavonoit grubu bileşikler arasında entadanin'in *S. typhimurium*'a karşı en yüksek seviyede antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ve bakteriyel hastalıkların tedavisi için geliştirilebileceğini göstermiştir. Ayrıca FRAP analizi sonuçlarına bakıldığında ursolik asit ve kersitrin için sırasıyla $1,43 \pm 0,80$ μmol FeSO $_4$ /g ekstre ve $76,01 \pm 1,10$ μmol FeSO $_4$ /g ekstre değerleri bulunmuştur.

Etsassala ve ark. (159) tarafından yapılmış çalışmada *Salvia chamelaeagnea* P.J.Bergius'un metanolik ekstresinden izole edilmiş bileşiklerin (karnosol, karnosik asit, 7-etoksirosmanol, ursolik asit, rosmanol ve ladanein) *in vitro* antioksidan aktivitesi ve elektrokimyasal redoks özellikleri araştırılmıştır. Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC), FRAP, oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) ve ayrıca Fe²⁺ kaynaklı lipid peroksidasyonunun inhibisyonundan elde edilen sonuçlar, karnosol ve rosmanol için güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Karnosol, karnosik asit, 7-etoksirosmanol, ursolik asit, rosmanol ve ladanein bileşiklerinin FRAP analizi yapılmıştır. Demir indirgeyici antioksidan gücü askorbik asit eşdeğeri olarak sırasıyla 9338,92±1,72, 4695,98±2,59, 1113,05±5,6, 117,26±2,6, 8622,73±1,92, 5027,55±4,62 µM AAE/g olarak bulunmuştur.

Antienflamatuvar etki

Hosseinzadeh ve ark. (140) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis*'in toprak üstü kısımlarının dekoksasyonu ve etanol ekstresi hazırlanmıştır. Bu iki ekstrenin antienflamatuvar etkisi, ksilen ve pamuk pellet ile indüklenmiş kulak ödemi testi yapılarak araştırılmıştır. Etanol (0,05 g/kg) ve sulu ekstraları (0,005, 0,015 ve 0,03 g/kg), kronik enflamasyona karşı antienflamatuvar etkiler göstermiştir.

Maxia ve ark. (160) yaptığı bir çalışmada ise *M. communis* uçucu yağının topikal antienflamatuvar aktivitesi, farelerde kroton yağı ile indüklenmiş kulak ödemi ve MPO aktivitesi, sıçanlarda pamuk pellet ile indüklenmiş granülom ve serum TNF- α ve IL-6 kullanılarak incelenmiştir. Topikal uygulamada yağ, MPO aktivitesinin yanı sıra kulak ödeminde de önemli bir azalma sergilemiştir. Yağ, granülomu ve serum TNF- α ve IL-6'yı da inhibe etmiştir. *M. communis* uçucu yağının hasarlı dokuya lökosit göçünü azalttığı ve antienflamatuvar aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Touaibia (161) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* uçucu yağının farelerde karagenan ile indüklenmiş pençe ödeminde antienflamatuvar etkisi araştırılmıştır ve uçucu yağ, üç farklı dozda oral olarak uygulanmıştır. Uçucu yağ (100 mg/kg), diklofenak uygulanan grupta (pozitif kontrol) karşılaştırıldığında pençe ödeminin azalttığı görülmüştür. Bu çalışma, bitki uçucu yağının önemli bir antienflamatuvar aktivitesi olduğunu göstermiştir.

Şen ve ark. (17) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarından elde edilen etanol ekstresinin sıçanlarda asetik asit kaynaklı ülseratif kolit üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Kolit, makroskopik ve mikroskopik incelemeler ve MDA, GSH seviyeleri, MPO aktivitesi, NO ve peroksinitrit seviyesi ölçülmüştür. Kolit; kolonik MDA düzeylerinde, MPO aktivitesinde, makroskopik ve mikroskopik hasar skorlarında anlamlı artışlara, doku GSH düzeyinde ise anlamlı düşüşe neden olmuştur. Ekstrenin uygulanması ile birlikte, asetik asitin neden olduğu histopatolojik parametrelerde değişiklikler gözlenmiştir. Çalışma, *M. communis* ekstresinin sıçanlarda koliti hafifletebileceğini ve enflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde alternatif bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

Romani ve ark. (162) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarından farklı çözücülerle sıvı-sıvı partiyonu yapılmış ve antioksidan içeriği zengin fraksiyonlar hazırlanmıştır. Alt fraksiyonların antioksidan aktivitesini değerlendirmek için bakır iyonlarına maruz bırakılan insan LDL'si kullanılmıştır. Bu ekstrelerin eklenmesi, LDL'nin bazal oksidasyonunu etkilememiştir ancak bakır iyonlarının neden olduğu oksidasyonu doza bağımlı olarak azaltmıştır. Alt fraksiyonlar arasından antioksidan etkisi en yüksek numune hidroalkolik ekstre olarak bulunmuştur. En düşük aktivite sıvı-sıvı partiyondan sonra kalan sulu kısımda gözlenmiştir.

Chiocchio ve ark. (163) tarafından yapılmış çalışmada doğal kozmetik ürünlerin bulunması amacıyla 100 bitkinin, *in vitro* elastaz ve tirozinaz enzim inhibisyon testleri yapılmıştır. Bu enzim inhibitörlerinin cilt beyazlatma, yaşlanma karşıtı, kırışıklık önleyici maddeler olarak ve ayrıca dermatolojik bozuklukların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Test edilen numuneler arasında on yedi ekstre aktif sonuç vermiştir. Özellikle bunlardan on bir tanesi her iki enzimi de inhibe edebilmiştir; beşi yalnızca tirozinaza karşı, biri ise yalnızca elastaza karşı güçlü bir aktivite göstermiştir. Seçilen örneklerin IC₅₀ değerleri, elastaz ve tirozinaza karşı sırasıyla 7-100 µg/mL ve 20-100 µg/mL arasında değişiklik göstermiştir. *Pistacia lentiscus*'un yaprak ekstresi en güçlü elastaz inhibitörü olarak bulunmuştur ve *Cytinus hypocistis* (toprak üstü kısımları) ve *Limonium morisianum* (toprak üstü kısımları) ile

birlikte aynı zamanda tirozinaz inhibisyonunun en düşük IC₅₀ değerini vermiştir. *M. communis* yaprakları ve meyveleri de elastaz ve tirozinaz enzimlerine karşı test edilmiştir. *M. communis* yaprakları elastaz ve tirozinaza karşı sırasıyla %22 ve %49, meyveleri ise %36 ve %55 inhibisyon göstermiştir.

Alyousef ve ark. (164) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis*'in metanol ekstresi, bakterilerin büyümesini etkilemeden *C. violaceum*'un viyolasin üretiminde %65 inhibisyon göstermiştir. Ayrıca ekstre, *P. aeruginosa*'da (elastaz, proteaz, piyosiyenin ve kitinaz) ve *S. marcescens*'te (prodigiosin ve proteaz) virülans üretimine önemli ölçüde müdahale etmiştir. Yaprak ekstresi, artan konsantrasyonlarda *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. baumannii* ve *S. marcescens* biyofilm biyokütlesine sırasıyla %16-74, %31-84, %12-66 ve %19-71 inhibisyon göstermiştir. Ekstre, 50-400 µg/mL aralığındaki alt MİK'lerdeki elastaz aktivitesini azaltmıştır. En yüksek enzim inhibisyonu 400 µg/mL'de ve %74 olarak kaydedilmiştir. Bu etkilerden başlıca sorumlu bileşik linalool olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan, *M. communis* ve biyoaktif bileşiği linaloolün tıbbi etkileri olabileceği ve üropatojenik bakterilerin neden olduğu biyofilm bazlı kalıcı enfeksiyon tehdidiyle mücadelede etkili bir terapötik ajan olarak kanıtlanabileceği öngörülmüştür.

Antimikrobiyal etki

Cherrat ve ark. (165) tarafından yapılmış bir çalışmada *Laurus nobilis* L. ve *M. communis* L.'ten su buharı distilasyonu ile elde edilmiş uçucu yağların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde yapılmıştır. *L. nobilis* ve *M. communis* uçucu yağının bu mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal etkisinin olmadığı görülmüştür fakat her bir uçucu yağın (0,2 µL/mL) hafif ısı (10 dakika boyunca 54°C) veya yüksek hidrostatik basınçla birleştirildiğinde sinerjistik öldürücü etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Mansouri ve ark. (166) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in metanol ekstresinin 6 gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*) ve 4 gram-negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Proteus*

vulgaris, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Campylobacter jejuni*) üzerinde antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir. Metanol ekstresi, *C. jejuni* dışında test edilen tüm bakterilerin büyümesini inhibe etmiştir. 0,5 mg/mL metanol ekstresinin dietil eter, etil asetat ve etanol ile alt fraksiyonlar oluşturulmuştur. Bu alt fraksiyonlar kolay üreyen bakterilere (*S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. vulgaris* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite açısından tarandığında dietil eter alt fraksiyonu, 0,5 mg/mL metanol ekstresi ve diğer alt fraksiyonlara göre en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Farklı fraksiyonlarda antibakteriyel aktivitenin varlığı, ekstrenin farklı aktivitelere sahip farklı bileşikler bulundurduğunu göstermiştir.

Messaoud ve ark. (167) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in 3 farklı zamanda hazırlanan yaprak infüzyonlarının fenolik ve uçucu bileşenleri ile antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Bitki infüzyonlarının antibakteriyel aktiviteleri, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Shigella flexneri*'ye karşı test edilmiştir. İnfüzyonlar 6 bakteriye karşı önemli bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir ancak standart antibiyotik imipeneme kıyasla daha az etkili bulunmuştur. Tüm infüzyonlar için en güçlü inhibisyonlar *P. mirabilis* ve *S. flexneri*'ye karşı elde edilmiştir.

Antifungal etki

Mehrabani ve ark. (168) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in %80'lik metanol ekstresi, bu ekstreden sıvı-sıvı partiyon ile elde edilmiş petrol eteri, diklorometan, etil asetat alt fraksiyonları ve bu partiyon sonunda kalan su fazının *Microsporum canis*, *M. gypseum* ve *Trichophyton mentagrophytes* üzerinde antifungal aktivitesinin biyootografi ile değerlendirilmesi için yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Biyootografi İTK'sini gerçekleştirmek için İTK'de çözücü sistemi geliştirilmiş (çözücü sistemi: trifloroasetik asit, etil asetat, metanol, su: 0,1:10:0,04:0,04)), biyootografi için aynı çözücü sistemi kullanılmıştır. Etil asetat ve %80'lik metanol ekstresi sırasıyla test edilen üç dermatofit cinsine karşı en iyi antifungal etkiyi göstermiştir. Diğer fraksiyonlarla karşılaştırıldığında etil asetat alt fraksiyonu ve metanol ekstresinin en fazla inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Test edilen fraksiyonlarda flavonoidlerin varlığı, *M. communis* yapraklarının önemli tıbbi özellikleri olabileceğini göstermiştir.

Alyousef (169) tarafından yapılmış çalışmada Suudi Arabistan'da geleneksel olarak kullanılan bir bitki olan *M. communis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinden elde edilmiş %95'lik metanol ekstrelerinin *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'e karşı antifungal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Kök ve yaprak ekstreleri, standart kontrol olarak uygulanan flukonazol ile kıyaslandığında *C. glabrata*'ya karşı güçlü inhibitör aktivite sergilemiştir. *M. communis* kök ve yaprak ekstrelerinin *Candida* hücreleri üzerindeki etkisi 37°C'de 1 saat süreyle tedaviden sonra 260 nm'de absorbans ölçülerek belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, *M. communis* köklerinin ve yapraklarının metanol ekstreleri, *C. glabrata* suşuna karşı iyi bir antifungal aktivite sergilemiştir. Taramalı elektron mikroskopisinin sonuçları ve 260 nm absorbans değerlerine göre, ekstrenin *Candida* hücrelerinin hücre duvarı ve hücre zarı üzerinde etki göstererek hücre ölümüne yol açabileceğini kanıtlanmıştır.

Sadeghi Nejad ve ark. (170) tarafından yapılmış bir çalışmada da *M. communis* yapraklarının %80'lik etanol ekstresinin *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* ve *A. terreus* üzerinde minimum inhibitör konsantrasyonları bulunup antifungal aktiviteleri incelenmiştir. Sonuç olarak bitki ekstresinin bu çalışmadaki bütün patojen mantarlara karşı aktivitesi olduğu anlaşılmış ve doğal bir antifungal ajan olduğu sonucuna varılmıştır.

Barac ve ark. (171) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* uçucu yağının *Malassezia* sp.'ye karşı antifungal aktivitesi araştırılmıştır. Mantar, *Pityriasis versicolor* hastalarının derisinden izole edilmiştir. *M. communis* uçucu yağının *Malassezia* büyümesi üzerinde önleyici aktivitesi bulunmuştur.

Hmiri ve ark. (172) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* ve *Rosmarinus officinalis* uçucu yağlarının kimyasal bileşimi ve *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* ve *Alternaria alternata* üzerindeki antifungal aktivitesini incelenmiştir. Kromatografik analiz, *M. communis* (%37,0) ve *R. officinalis* (%43,16) ana bileşeninin 1,8-sineol olduğunu göstermiştir. Uçucu yağların antifungal aktivitesi, elma çürüğüne sebebiyet veren üç mantara karşı incelenmiştir. *M. communis*'in uçucu yağları daha aktif olup, sırasıyla 400, 600, 1800 µL/L konsantrasyonlarda *B. cinerea*, *P. expansum* ve *A. alternata*'nın gelişimini tamamen inhibe etmiştir. *R. officinalis* uçucu yağı ile yalnızca *A. alternata* için 800 µL/L ve *B. cinerea* için 1200 µL/L'nin

üzerindeki konsantrasyonlarda inhibisyona ulaşılamazken, *P. expansum* üzerinde 1800 µL/L konsantrasyonda %89'luk bir inhibisyon yüzdesi elde edilmiştir.

Antikanser ve antimutajenik etki

Güzelmeriç ve ark. (173) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in çiçek tomurcukları, çiçekleri, yaprakları ve meyvelerinden hazırlanan %70'lik etanol ekstrelerinin kimyasal bileşimleri, antioksidan, antikanser ve antimutajenik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Yapraklardan hazırlanan hidroalkolik ekstre, WST-1 testinde 8,2 mg/mL IC₅₀ değeriyle insan kolorektal kanser hücre hattı HT-29'a karşı en yüksek antikanser aktiviteyi sergilemiştir. Antimutajenite testindeki numunelerin hiçbiri test edilen konsantrasyonlarda mutajenik bulunmamıştır. Aslında antimutajenite analizinin sonuçları, yaprakların test edilen türlere karşı en güçlü aktiviteyi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Roozitalab ve ark. (174) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* uçucu yağını içeren nanojel dozaj formu hazırlanarak uçucu yağın antioksidan, antikanser ve antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Nanoemülsiyon, karboksimetil selüloz (%3 a/h) ilavesiyle jelleştirilmiştir. IC₅₀=132,6 µg/mL'ye sahip nanojelin, A-375 melanom hücrelerine karşı uçucu yağdan (IC₅₀=580,8 µg/mL) 4 kat daha güçlü olduğu görülmüştür. Ayrıca DPPH antioksidan testine göre nanojel, incelenen tüm konsantrasyonlarda uçucu yağdan daha güçlü bulunmuştur.

Harassi ve ark. (175) tarafından yapılmış çalışmada Fas'ın farklı bölgelerinden elde edilen *M. communis* uçucu yağının kimyasal bileşimi, sitotoksik ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Uçucu yağ GC-MS ile analiz edilmiştir. Sitotoksik aktivite, murin mastositoma P815 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Antioksidan etki, β-karotenin ağartılması ve DPPH radikal süpürme yöntemleriyle ölçülmesiyle belirlenmiştir. GC-MS analizinde Benslimane bölgesinden elde edilen uçucu yağda yüksek miktarlarda metil öjenol (%18,7), α-terpineol (%15,5) ve geranil asetat (%11,64) görülmüştür. Buna karşılık, 1,8-sineol (%36,3) açısından en zengin uçucu yağın Ouazzane'den elde edilen uçucu yağ olduğu bulunmuştur. Sitotoksikite sonuçları, Ouazzane ve Benslimane bölgelerinden elde edilen uçucu yağların MCF-7 hücrelerin üzerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 4 ve 6,25 µg/mL bulunmuştur. Sonuçlar, MCF-7 hücrelerinin P815

hücrelerinden daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Test edilen uçucu yağlar güçlü antioksidan aktivite göstermemiştir.

Kadhem ve ark. (176) tarafından yapılmış çalışmada, *M. communis* bitkisinden elde edilmiş alkaloit ekstresi ve uçucu yağların antikanser aktivitesi, MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Antianjiyogenez aktivitesi, ekstrelerin anjiyogenezde önemli olan 43 sitokin seviyesi üzerindeki etkisini değerlendirilerek incelenmiştir. Sonuçlar her iki ekstrenin de yumurtalık kanseri (Skov-3) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hattına karşı belirli bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Yangui ve ark. (177) tarafından yapılmış bir çalışmada üç farklı *M. communis* genotipinin yapraklarından elde edilmiş %70'lik etanol ekstrelerinin, toplam fenolik ve terpenik içerik analizi yapılmıştır. Fenolik profiller ve uçucu bileşikler genotipler arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Tüm yaprak ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi ve β -karoten ağartma inhibisyon kapasitesi sırasıyla $IC_{50}=3,81$ mg/mL, $IC_{50}=3,58$ mg/mL olarak ölçülmüştür. MTT deneyi, *M. communis* genotiplerinin PC12 kanser hücresi çoğalmasına karşı etkinliğini ve seçici sitotoksitesini göstermiştir. Tedavi edilen kanser hücre hatlarında Kaspas 3/7 indüksiyonu, apoptoz ve hücre içi ROS birikimi, *M. communis* genotiplerinin sitotoksik etkisini kanıtlamıştır. Bu sitotoksik aktivite, çalışılan ekstrelerin antioksidan özellikleriyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Antioksidan ve antiproliferatif aktiviteler genotipler arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir.

Terzi ve ark. (178) tarafından yapılmış bir çalışmada, *M. communis* uçucu yağının A549 hücrelerinden türetilen kanser sferoidleri üzerindeki etkisinin, hücre canlılığı, belirgin kanser kök hücresi ve apoptoz belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edilerek araştırılması amaçlanmıştır. Uçucu yağın etkisi, hücrelerin klonojenitesi üzerinde değerlendirilmiştir. Uçucu yağ, 24 saat ve 72 saat sonra A549 hücrelerinin hücre canlılığını azaltmıştır. 7 gün boyunca uçucu yağ tedavisinden sonra kanser kürelerinin sayısında bir azalma gözlenmiştir. 24 saatlik uçucu yağ uygulamasından sonra PROM1, POU5F1, ABCG2 ve CASP3 gen ekspresyonları azalmış, ancak 72 saat sonra bazal seviyelere dönmüştür. Uçucu yağ antitümorejenik etkilerini; kanser hücrelerinin hücre canlılığını azaltarak, sferoid oluşum verimliliğini

inhibe ederek ve çeşitli kanser kök hücre belirteçlerinin downregülasyonu ile A549 hücrelerinden türetilen akciğer kanseri sferoidleri üzerinde göstermiştir.

Bilgiç ve ark. (179) tarafından yapılmış bir çalışmada Türkiye'nin güneyinde bulunan *M. communis*'in uçucu yağlarının GC/MS yöntemiyle analiz edilmesi ve A549 hücreleri üzerindeki proapoptotik etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Hücreler 24 saat boyunca farklı uçucu yağ konsantrasyonuyla (200'den 31,25 µg/mL'ye kadar) işleme tabi tutulmuştur. Kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, Bcl-2 ve p21 genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile yapılmıştır. 62,5 µg/mL ve bu konsantrasyondan daha yüksek uçucu yağ konsantrasyonlarının, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 24 saatlik inkübasyon sonunda hücre canlılığını önemli ölçüde baskıladığı görülmüştür. İntrinsik yolak araçları olan kaspaz 3 ve kaspaz 9 genlerinin ekspresyon seviyeleri, 31,25 µg/mL uçucu yağ konsantrasyonunun uygulanmasıyla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (sırasıyla, $p=0,0129$ ve $p=0,0180$). p21 geninin ekspresyon seviyesi, 156,25 µg/mL uçucu yağ konsantrasyonunun uygulanmasıyla önemli ölçüde artmıştır ($p=0,0002$). Türkiye'nin güneyinden gelen *M. communis* uçucu yağlarının doğal olarak apoptozu indüklediği bulunmuştur.

Antidiyabetik etki

Panjeshahin ve ark. (180) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarının %70'lik etanol ekstresinin bileşenlerinin ve olgun Charles-River erkek sıçanlar üzerinde antidiyabetik etki mekanizmasının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bitkinin yaprakları Soxhlet aparatı ile petrol eteri kullanılarak ekstre edilmiştir. Soxhlet aparatında kalan posanın 100'er gramı 2 farklı perkolatöre alınarak 72 saat içinde etanol:su (1:1) ve ayrıca distile su ile ekstre edilmiştir. Sulu ekstreten geri kalan posa tekrar etanol kullanılarak perkolasyon metoduyla ekstre edilmiştir. Bitkinin hidroalkolik, su ve etanol ekstreleri 5 gün boyunca günde iki kez uygulanmıştır. Yapraklarının hidroalkolik ekstresinin orta derecede antidiyabetik etki gösterdiği, diyabetik sıçanlarda etanol ekstresinin (2 g/kg) sulu ekstreyle karşılaştırıldığında daha iyi bir hipoglisemik etkiye sahip olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca birlikte kullanıldığında etanol ekstresinin (2 g/kg) oral yoldan uygulanmasının, sıçanlarda glibenklamidin (oral uygulama 5 mg/kg) hipoglisemik etkisi üzerinde ilave bir etkiye

sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma, ekstrelerin, pankreasın β hücrelerinin insülin salgılaması için uyarabileceğini düşündürmüştür.

Demir ve ark. (181) tarafından yapılmış bir çalışmada streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda *M. communis* meyvelerinin olası antidiyabetik ve hepatoprotektif etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Sıçanlarda diyabet oluşturulduktan sonra 3 gruba 250, 500 veya 1000 mg/kg meyvenin sulu ekstresi uygulanmıştır. Serumda alanin aminotransferaz (ALT), alkalin fosfataz (ALP) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri, karaciğer dokusunda ise GSH, MDA düzeyleri ve SOD aktivitesi belirlenmiştir. Meyve ekstresi uygulaması, tüm diyabet gruplarında serum glukozu, AST, ALT ve ALP düzeylerinde anlamlı bir azalma sağlamıştır. Ekstre, diyabetik sıçanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SOD aktivitesini ve GSH düzeyini artırarak ve MDA düzeylerini azaltarak önemli antioksidan aktivite göstermiştir ($p<0.05$). Meyvenin sulu ekstresinin antidiyabetik ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, bitkinin şeker hastalığında kullanılan bir bitki olarak geleneksel kullanımını doğrulamaktadır.

Talebianpoor ve ark. (182) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* meyvelerinin hidroalkolik ekstresinin (%70'lik etanol) Wistar sıçanları üzerinde streptozotosin ile oluşturulmuş Tip I diyabet ve deksametazon ile oluşturulmuş Tip II diyabet üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *M. communis* meyvelerinin hidroalkolik ekstresi, 45 günlük tedavi sonunda serumdaki glukoz, trigliserit, idrar hacmi, idrar proteini ve MDA düzeylerini azaltmıştır. *M. communis* meyvelerinin hidroalkolik ekstresinin, özellikle insülin direnci ile başlayan Tip II diyabetik hayvanlarda, diyabet komplikasyonlarının iyileştirilmesi üzerinde etkili olabileceği öngörülmüştür.

Taş ve ark. (183) tarafından yapılmış bir çalışma *M. communis* meyveleri hidroalkolik ekstresinin (%70'lik etanol) hipoglisemik ve hipolipidemik etkilerini araştırmak için tasarlanmış ve aynı zamanda streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda oksidan-antioksidan sistemlerdeki rolünün değerlendirilmesini de hedeflemiştir. Böbrek, kalp, karaciğer ve kas dokularındaki MDA düzeyleri tayin edilmiştir. Ek olarak serum insülin seviyeleri değerlendirilmiştir. Toplam kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol, trigliserit, eritrosit SOD ve tam kan GPx parametreleri analiz edilmiştir. Meyve ekstresi ile tedavi edilen deney sıçan gruplarının

serum glukozunda, lipit profilinde ve doku MDA düzeylerinde bir azalma ve insülin, serum paraoksonaz, arilesteraz, eritrosit SOD ve tam kan GPx'inde artış göstermiştir. Buna göre, meyve ekstresinin streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda hipoglisemik, hipolipidemik ve oksidatif stres önleyici aktivitelere sahip olduğu görülmüştür.

Issa ve ark. (184) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yapraklarının sulu ve metanolik ekstralarının antidiyabetik aktivitesi ve toksisite değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ekstrelerin antidiyabetik etkisi, bu ekstraların alloxanla indüklenen diyabetik farelere 500, 750 ve 1000 mg/kg tek dozunda oral olarak uygulanmasıyla ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Öte yandan, sulu ekstrenin toksisite çalışmaları, ekstrenin toksik olmadığını ve güvenli olduğunu göstermiştir. *M. communis*'in sulu ekstresi, diyabetik farelerin ortalama kan şekeri seviyesini 500 mg/kg dozunda 5. saatte %61,8 oranında ($p<0,003$) düşürmüştür. Buna karşılık *M. communis*'in metanol ekstresi de 1000 mg/kg dozda ortalama kan şekeri seviyesini %48 ($p<0,00003$)'e kadar düşürmüştür.

Nöroprotektif etki başlığı altında da yer verilmiş olan Kadioğlu Yaman ve ark. (85) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis* subsp. *communis*'in yumurtalıkları alınmış diyabetik sıçanlarda bilişsel bozulma üzerindeki olası etkilerinin araştırılması sonucunda *M. communis* ekstresinin antikolinesteraz ve antihiperglisemik özellikleriyle bilişsel ve nöronal fonksiyonları iyileştirebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Aggöl ve ark. (185) tarafından yapılmış bir çalışmada zengin fenolik içeriği ve sağlığa faydalı etkileri nedeniyle iyi bilinen *M. communis* L. meyvelerinin etanol ekstresinin streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda oksidatif strese karşı koruyucu etkinlikleri değerlendirilmiştir. Diyabet indüksiyonu sonrasında ALT, AST, MDA ve kan şekeri düzeylerinde anlamlı artış, SOD aktiviteleri ve GSH düzeylerinde ise anlamlı azalma gözlenmiştir. Sıçanlar, 14 gün boyunca mersin meyvelerinin üç farklı etanol ekstresi (0,25, 0,5 ve 1 g/kg) ile tedavi edilmiştir. Deney sonunda sıçanların ALT, AST, MDA ve kan şekeri düzeylerinde anlamlı düşüşler görülürken, GSH düzeylerinde ve SOD aktivitelerinde önemli artışlar gözlenmiştir.

Ibrahim ve ark. (186) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in siyah meyveli ve beyaz meyveli olan iki farklı çeşidinin toprak üstü kısımlarından izole

edilen uçucu yağlarının serbest radikal süpürücü etkileri, 5 farklı yöntemle (DPPH, ABTS, NO, SOR, LP) vitamin C ve BHT standartları kullanılarak test edilmiştir. 5 kanser hücre hattında (PC3, MCF-7, A549, HepG2, HCT-116) ve 1 normal hücre hattında (Rpel-1) iki çeşit uçucu yağın sitotoksik aktiviteleri taranmıştır ve her iki uçucu yağın da PC3 ve MCF-7 hücre hatlarında etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. Uçucu yağlar normal hücre hattında (Rpel-1) güvenli bulunmuştur. Yağların α -amilaz enzim inhibisyon aktivitesi, referans inhibitör olarak akarboz kullanılarak araştırılmıştır ve her iki uçucu yağın da standarttan daha fazla aktiviteye sahip olduğu anlaşılmıştır.

Çiftçi Yegin ve ark. (187) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis*'in hipoglisemik etkisinin ve antioksidan aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Beyaz ve siyah meyveli bitki toplanmıştır. Meyveler etanol ile ekstre edilmiştir. Bu çalışmada DPPH radikal süpürücü aktivite, hidrojen peroksit süpürücü aktivite (HPSA), metal şelatlayıcı aktivite (MCA), FRAP, toplam fenol-flavonoit içerikleri ve α -amilaz, α -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Hipoglisemik etki α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon analizleri ile araştırılmıştır. Beyaz ve siyah mersin örneklerinin DPPH, HPSA, FRAP, MCA değerleri sırasıyla 56,75-63,52 $\mu\text{g/mL}$, 193,95-207,73 $\mu\text{g/mL}$, %81,68-90,87 $\mu\text{g/mL}$ ve %20,88-27,71 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Bitki numuneleri hipoglisemik etki göstermiştir.

Gastrointestinal sistem üzerine etki

Jabri ve ark. (188) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* tohumlarının sulu ekstresinin, sıçanlarda asetik asit ile oluşturulmuş kolit hastalığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ekstrenin enflamasyon kaynaklı uyarılmış nötrofilleri doza bağımlı şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Sıçanlara asetik asit uygulanması sonucu kolonda oluşan hücre içi tüm bozulmaların ekstre uygulandıktan sonra engellendiği görülmüştür. Sonuç olarak bitki tohumlarının sulu ekstresinin, sıçan kolonunda asetik asidin oluşturduğu hasara ve oksidatif strese karşı koruyucu etkinliğe sahip olduğu anlaşılmıştır.

Jabri ve ark. (189) tarafından *M. communis* tohumlarının sulu ekstresi üzerinde yapılmış bir başka çalışmada ekstrenin sıçanlarda hint yağı ile oluşturulan ishale karşı

etkileri araştırılmıştır. Ekstre uygulaması ishal ve buna bağlı bağırsakta hipersekresyona karşı doza bağımlı olarak etkili bulunmuştur. Hint yağı ile indüklenen hipersekresyona bağırsakta oksidatif stres eşlik etmektedir. Çalışmada, akut ishale intestinal mukoza hidrojen peroksit (H₂O₂), kalsiyum ve serbest demir düzeylerinde artış eşlik ederken, ekstre uygulamasının hint yağı kaynaklı tüm hücre içi bozulmaları engellediği gösterilmiştir. Sonuç olarak akut ishale bitki tohumlarının sulu ekstresinin güçlü bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Jabri ve ark. (190) tarafından *M. communis* tohumlarının sulu ekstresi üzerinde yapılmış bir başka çalışmada, sıçanlarda oluşturulmuş özefageal reflü indüklü özefagus mukoza hasarına karşı ekstrenin etkinliğine bakılmıştır. Özefageal reflü, lipid peroksidasyonunda artış, sülfidril grupları ve glutasyon düzeylerinde ve antioksidan enzim aktivitelerinde azalma ile değerlendirilen oksidatif stres ile eşlik etmektedir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda ekstrenin fenolik bileşiklerce zengin olduğu ve antioksidan özellikte olduğu görülmüştür. Bu etkiler doğrultusunda ekstrenin sıçanlarda özefageal reflü üzerinde koruyucu etkisi olduğu anlaşılmıştır.

Jabri ve ark. (191) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* meyve suyunun sıçanlarda mide-bağırsak hareketliliği ve mide boşalması üzerine etkileri araştırılmıştır. Meyve suyunun bağırsak hareketliliğini ve mide boşalmasını anlamlı düzeyde ve doza bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür. Sıçanlara hint yağı uygulamasıyla gelişen ishal ve bağırsakta sıvı birikmesine karşı doza bağımlı bir koruma sağlamıştır.

Jabri ve ark. (192) tarafından yapılmış bir çalışmada bitki tohumlarının sulu ekstresinin sıçanlarda etanol ile indüklenmiş peptik ülser modelindeki antiülser ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Ekstrenin DPPH ve süperoksit anyon süpürücü etki testleri sonucunda antioksidan aktivitesi bulunmuştur. Ayrıca ekstre doza bağımlı olarak peptik ülserle karşı koruyucu etki göstermiştir.

Zohalinezhad ve ark. (193) tarafından yapılmış bir çalışmada, reflü hastalığında *M. communis*'in meyve ekstresi içeren kapsül formu omeprazol ile karşılaştırılarak değerlendirmiştir. Meyve ekstresi kapsülü, omeprazol ve bu ikisini bir arada kullanan gruplar olmak üzere hastalar üç gruba ayrılmıştır. Tüm gruplarda, hem

reflü hem de dispeptik skorlar, ilgili başlangıç değerlerine kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Mansour ve ark. (194) tarafından yapılmış çalışmada *M. communis* uçucu yağı, maltodekstrin ile mikrokapsüllenmiştir. Mikrokapsüllenmiş mersin uçucu yağı daha sonra sıçanlarda etanol/hidroklorik asit kaynaklı akut mide ülseri modelinde gastroprotektif aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Sıçanlara mikrokapsül uygulanması sonrası iyileşme ve koruma yüzdeleriyle ilişkili olarak gastrik lezyonlarda ve asiditede kayda değer bir inhibisyona neden olmuştur. Mide mukozası üzerinde güçlü bir antienflamatuvar etki göstererek etanolün neden olduğu mide lipoperoksidasyonunu önlemiştir.

Sumbul ve ark. (195) tarafından yapılmış bir çalışmada, *M. communis* meyvelerinin su ve metanol ekstrelerinin sıçanlarda gastrik ülsera karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sıçanlarda ülser oluşturulmadan önce sıçanlara ekstreler uygulanmıştır. Düşük dozda sulu ekstre ve yüksek dozda metanol ekstresi omeprazol ile karşılaştırıldığında daha anlamlı etki göstermiştir. Hem su hem de metanol ekstresi dozları aynı zamanda bu çalışmada kullanılan tüm ülser modellerinde mide suyu hacmini, toplam asiditeyi azaltmış, mide pH'sını ve mide duvarı mukus içeriğini artırmıştır.

Kardiyotonik etki

Janbaz ve ark. (196) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* toprak üstü kısımlarının %70'lik metanol ekstresinin gastrointestinal, solunum ve damar hastalıklarındaki etkinliği araştırılmıştır. Ekstre, izole tavşan aort preparatlarında fenilefrin (1 μ M) ve K⁺ (80 mM) kaynaklı kasılmalarda gevşemeye neden olmuştur. Bu etkiler standart bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamile benzemektedir. Bu bulgular doğrultusunda ekstrelin spazmolitik, bronkodilatör ve vazodilatör aktivitelerini olası kalsiyum kanalı bloke etmesiyle gösterdiği düşünülmüştür.

Abutaleb ve ark. (197) tarafından yapılmış bir çalışmada *M. communis* yaprak ve meyvelerinin %70'lik etanol ekstreleri hazırlanmış ve sıçanlarda izoproterenol kaynaklı kalp yetmezliği üzerine koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Ekstrelerin uygulanması sonucunda ELISA yöntemleri kullanılarak oksidatif stres faktörlerinin

(MDA, SOD, GSH) düzeyleri ölçülmüştür. Ekstrelerin oksidatif stres ve miyokardiyal fibrozisin azaltılması yoluyla kardiyoprotektif etkiler sağlayabileceği öngörülmüştür.

Anksiyolitik/Sedatif-Hipnotik Etki

Hajiaghaee ve ark. (198) tarafından yapılmış bir çalışmada fare ve sıçanlarda *M. communis* yapraklarının %80'lik etanol ekstresinin uyku ve anksiyete üzerine etkisi araştırılmıştır. Ekstre (tümü için $p=0,001$) önemli ölçüde kas tonusunu zayıflatmıştır. Ayrıca hayvanlara 200 mg/kg ekstre ($p=0,01$) uygulandığında önemli bir hipnotik etki gözlenmiştir. Veriler, yaprak ekstresinin anksiyolitik ve kas gevşetici etkisi olduğunu göstermiştir.

Walle ve ark. (199) tarafından yapılmış bir çalışmada, *M. communis* uçucu yağının fareler üzerindeki sedatif-hipnotik aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Uçucu yağın motor koordinasyonu ve kas gevşemesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Uçucu yağ ilaçla tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında pentobarbital kaynaklı uyku süresini uzatmıştır. *M. communis*'in uçucu yağının, doza bağımlı sedatif-hipnotik aktiviteye ve merkezi sinir sisteminde anksiyolitik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Hailu ve ark. (200) tarafından yapılmış çalışmada, *M. communis* uçucu yağının fareler üzerindeki anksiyolitik etkisi farklı kaygı modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir. 100 mg/kg'lık bir dozda uçucu yağın oral olarak uygulanması sonucunda, standarda göre daha iyi anksiyolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, kaygı tedavisinde bitkinin uçucu yağının Etiyopya'da geleneksel kullanımını desteklemiştir.

2.3. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı, ilerleyici nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre dünya üzerinde Alzheimer'dan sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Substantia nigra dopaminerjik nöron hasarı ile karakterizedir ve substantia nigra başta olmak üzere hastalığın ilerleyen süreçlerinde beynin diğer bölgelerinde de hasara neden olmaktadır. Hastalığın sebebi net olarak bilinmemektedir (201).

2.3.1. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi

Parkinson hastalığının etiyolojisinde temel olarak üç faktör rol almaktadır. Bunlar genetik faktörler, çevresel faktörler ve yaşlılıktır. Bu faktörlerin yanı sıra yaşam tarzı da hastalığın oluşumunda rol almaktadır.

Son 25 yılda yapılan çalışmalar doğrultusunda hastalığın kalıtsal özellikleri üzerinde rol oynayan genler ile ilgili bilgiler derlenmiştir. Özellikle otozomal dominant kalıtımda rol oynayan gen lokusları SNCA, LRRK2, VPS35 olarak bilinmektedir. Otozomal resesif kalıtımda rol oynayan gen lokusları ise PINK1, DJ-1, ATPaz tipi 13A2 ve Parkin olarak bilinmektedir (201).

Hastalığın patolojisinde bulunan Lewy cisimcikleri, α -sinüklein proteininin birikimi sonucunda oluşmaktadır. α -sinüklein proteinlerinden sorumlu olan SNCA geni, Lewy cisimcikleri oluşumu ve Parkinson hastalığının seyri açısından önem arz etmektedir. Bu gen üzerine mutasyonlar nadiren gerçekleşmektedir. Mutasyon tipine bağlı olarak hastalığın seyri değişiklik göstermektedir. Gen duplikasyonuna sahip hastalar klasik Parkinson semptomları gösterirken genin triplikasyonuna sahip hastalar daha şiddetli semptom göstermektedirler.

Parkinson hastalığının oluşumunda herbisit, pestisit tarım ilaçlarına maruziyet, ağır metal toksisitesi, sigara ve alkol kullanımı çevresel faktörleri oluşturmaktadır.

Yaşlanmayla birlikte oksidatif stresin artması, gen ifadelerinde değişiklik oluşturabilmektedir (202). 60 yaşın üzerinde toplumun %1'inde bu hastalık gözlenirken, 85 yaşın üzerinde bu oran %5'e çıkmaktadır ve substantia nigradaki dopaminerjik nöronlar yaşlanmayla birlikte her on yılda %4.7-%9.8 oranında azalış göstermektedir (203, 204).

2.3.2 Parkinson Hastalığının Patogenezi

Hastalığın patogenezinde temel olarak mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, demir birikimi ve enflamasyon rol almaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon ile Parkinson hastalığının bağlantısı ilk kez 1983 yılında nörotoksik bir ajan olan MPTP'ye maruz kalmış olan hastaların bulunmasıyla kurulmuştur (205).

İlerleyen zamanlarda Parkinson hastalarının beyin örnekleri incelendiğinde substantia nigradaki mitokondriyal kompleks I aktivitesinin belirgin olarak azaldığı ve mitokondriyal DNA silinmesinin yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür. Bulgular, mitokondriyal hasarın Parkinson hastalığı ile ilişkisini kanıtlamaktadır (206). Aynı zamanda hücre içinde reaktif oksijen türlerinin birikiminin, mitokondriyal kompleks I üzerinde hasar oluşturarak mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu bilinmektedir (207).

Substantia nigradaki dopaminerjik nöronlar, dopaminin oksidatif deaminasyonunu ve otooksidasyonunu, monoaminoksidaz enzimi aracılığıyla sağlamaktadırlar. Dopaminin otooksidasyonu sonucu melanin oluşmaktadır ve melanin miktarı hücredeki oksidasyon hakkında bilgi vermektedir. Melanin sağlıklı hücrelerde toksik metabolitlerin birikimini engellemektedir, reaktif oksijen türlerinin nöronlardan atılımını sağlamaktadır. Aynı zamanda ölmekte olan nöronlar nöromelanin pigmenti salarak kronik enflamasyona neden olmaktadır. Kronik enflamasyon da reaktif oksijen türlerinin artışına sebebiyet vermektedir (208).

Nöroenflamasyonun sebeplerinden biri de mikrogial hücrelerin aktivasyonudur. Bu hücreler, zarar görmüş hücreleri ve yabancı maddeleri fagosite etmektedirler. Mikrogial hücreler aktivasyon sırasında TNF- α , IL-1- β , NO enflamasyon parametrelerini salgılamaktadır. Mikrogialların bu şekilde aktive olmalarında α -sinükleinin, LRRK2, Parkin gibi proteinlerin etkisi bulunmaktadır (201).

İnsan beynindeki demir iyonu oranında gözlenen değişiklikler nörodejeneratif hastalıklara sebebiyet verebilmektedir. Normal insan beyinde bulunan demir iyonu oranı, beyin bölümlerine göre değişiklik göstermektedir. Yaşlanmayla birlikte substantia nigra ve beyin farklı bölgelerinde toplam demir konsantrasyonu artış

göstermektedir (209, 210). Nörodejenerasyondan sonra aktive olan mikroglialar demir içeren artık hücresel bileşenleri fagositozlayıp hücrelerdeki demir konsantrasyonunu artırabilmektedir. Buna ek olarak ölmekte olan mikroglialar demirlerini serbest bırakarak komşu hücrelerin oksidatif stresini yükseltebilmektedirler. Bu olaylar birbiri ile yakından bağlantılı olduğu için hastalığın seyrinde hızlanmaya sebebiyet verebilmektedir (201).

2.3.3. Parkinson Hastalığının Belirtileri

Hastalığın patogeneğinde ilerlemeler belli bir seviyeye ulaştıktan sonra hastalığın semptomları belirginleşmektedir. Semptomlar hareket bozuklukları, kaslarda rijidite, postüral instabilite, donma ve tremor ile karakterizedir. Bu semptomlar, tüm vücut hareketlerinde yavaşlık ve beceri gerektiren ince hareketlerde bozukluk ile anlaşılmaktadır. Bahsi geçen hareket bozuklukları ve hareket bozukluklarının açıklamaları aşağıda verilmiştir:

Hipokinezi: Hareket sıklığında azalma.

Bradikinezi: Hareketlerde yavaşlama.

Akinezi: Hareket kaybı.

Rijidite: Herhangi bir eklemden pasif harekete karşı ortaya çıkan artmış kas tonusudur ve genellikle eklemlerde hareket kısıtlılığına neden olmaktadır.

Postüral instabilite: Postüral reflekslerin kaybı, yürümede donmalar ile beraber en sık düşme nedenidir.

Donma: Motor harekette, özellikle yürümede geçici bir duraklama şeklinde görülmektedir. Akinezinin bir formu olarak kabul edilmektedir. İstemli motor hareketler, agonist ve antagonist kasların kasılmasına bağlı olarak durur ve gerçekleşemez.

Tremor: Bir vücut parçasının sabit frekans ve değişken genliğe sahip, antagonist kasların kontraksiyonlarından kaynaklanan, ritmik ve istemsiz hareket olarak tanımlanır.

2.3.4. Parkinson Hastalığı Tedavisi

Parkinson hastalığının tedavisinde öncelikle levodopa, dopamin agonistleri, katekol-*O*-metiltransferaz inhibitörleri ve MAO-B inhibitörleri tercih edilmektedir (211). Levodopa, Parkinson hastalığının semptomatik tedavisinde en güçlü ilaçtır. Motor davranış bozukluklarını hızla kontrol altına aldığı bilinmektedir (212). Fakat dopamin prekürsörü olan levodopanın 3-5 yıl kullanımından sonra motor davranışlarda dalgalanmaların görülmesi sebebiyle yeni arayışlara başlanmıştır (213).

Levodopa/karbidopa ilaç kombinasyonu hastalığın ilk evrelerinde sıklıkla tercih edilen ilaç tedavilerinden biridir. Dekarboksilaz inhibitörü olan ve kan beyin bariyerinde geçemeyen karbidopa, levodopanın periferde dopamine çevrilmesini engellemektedir. Bu sayede beyne ulaşan levodopa oranı artırılmaktadır (212).

Hastalığın başlangıcında ilaç tedavisine karar verilirken, daha az motor davranış dalgalanmasına neden olan dopamin agonistleri, levodopaya tercih edilmektedir. Dopamin agonistleri, dopamin metabolizmasına girmemektedir ve postsinaptik dopamin reseptörlerini uyararak etkilerini göstermektedirler. Levodopadan sonra en güçlü antiparkinson ilaç grubunu oluşturmaktadırlar (212). Apomorfın hastalığın tedavisinde sıkça tercih edilen bir dopamin agonistidir ve D2 reseptör agonisti olduğu kabul edilmektedir. Apomorfın, dopamin agonisti olması nedeniyle sedasyon, halüsinasyon ve psikoz gibi nöropsikiyatrik sorunlara yol açabilmektedir (213). Dopamin agonisti olan ilaç grubunda apomorfının yanı sıra bromokriptin, pergolid ve pramipeksol ilaçları da bulunmaktadır.

MAO-B inhibitörleri, beyinde dopamin yıkımından sorumlu MAO izoformu olan monoamin oksidaz-B'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir. Rasajilin ve selejilin ilaçları bu grupta yer almaktadır. Bu grup ilaçlar beyinde dopamin yıkımını azaltarak endojen dopamin etkisini artırmaktadır, fakat semptomatik etkileri zayıftır (212). Aynı zamanda MAO-B inhibitörlerinin, klinik öncesi verileri doğrultusunda Parkinson hastalığı için nöroprotektif etkileri olduğu görülmüştür (214).

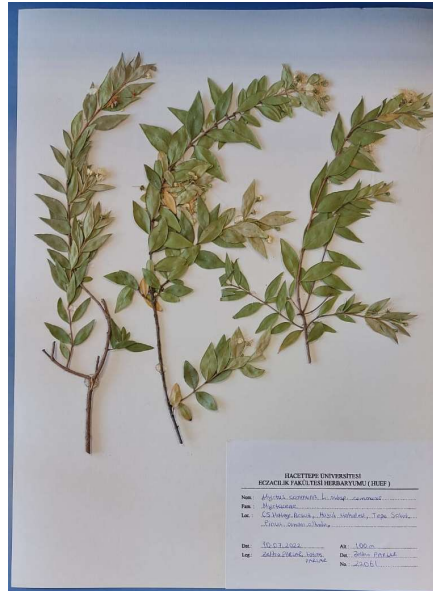
Antikolinergik ilaçların, dopamin azalmasıyla ortaya çıkan striatal dopamin ve asetilkolin aktiviteleri arasındaki dengesizliği düzelttiği öngörülmüştür. Antikolinergik ilaçlar, levodopa ve dopamin agonistleri hastalığın motor semptomlarını hafifletmediğinde, tremor şiddetini azaltmak amacıyla tedavide yer almaktadır (212).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Botanik Çalışmalar

3.1.1 Bitki Materyali

Myrtus communis L. 2022 yılının temmuz ayında Hatay ilinin Arsuz ilçesine bağlı Hüyük Mahallesi'nin makiliklerinden toplanmıştır. Bitkinin herbaryum örneği oluşturulmuştur ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda HUEF 22061 numarasıyla muhafaza edilmektedir.



Şekil 3.1. *M. communis* genel görünüşü, habitatu ve herbaryum örneği

3.1.2 Morfolojik Çalışmalar

Bitki çiçeklenme zamanında 10 Temmuz 2022'de Arsuz'dan toplanmıştır. Çiçeklenme döneminde toplandığı için morfoloji çalışmaları kapsamında yaprakları ve çiçekleri üzerinde inceleme yapılmıştır. Bitkinin teşhisi için yapılan morfoloji çalışmalarında araziden toplanan bitki örneği, Ankara'da ziyaret edilen herbaryumlardaki örnekler ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca yaprak ve çiçeklerin literatürdeki betimlemelere uygunluğu Leica EZ4 marka stereomikroskop yardımıyla incelenmiştir.

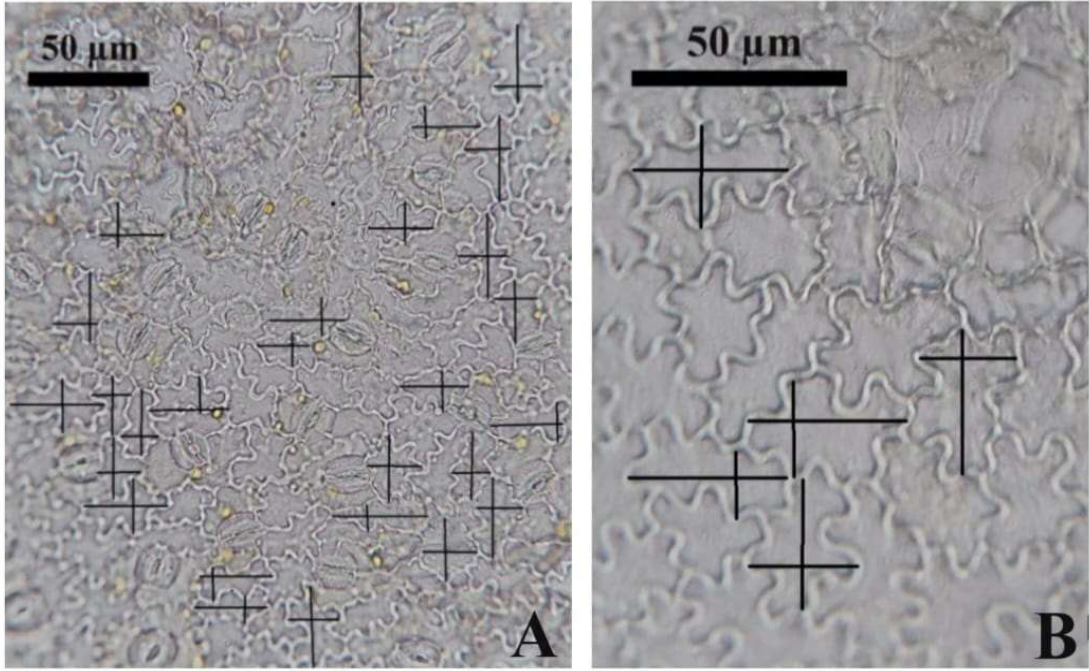
3.1.3 Anatomik Çalışmalar

Bitkinin yaprakları dalları ile birlikte toplandığından anatomik çalışmalar yaprakları ve dalları üzerinde yapılmıştır. Bu kısımlar %70'lik etanol içerisine alınarak anatomik çalışmalar için gerekli olan materyal hazırlanmıştır. Keskin jilet yardımıyla yaprak üst ve alt yüzey kesitleri, yaprak enine kesitleri, dal enine kesitleri alınmıştır. Anatomik yapıların tanımlanmasında bitkinin literatürdeki çalışmalarından yararlanılmıştır (215-217).

Bu çalışma kapsamında su, kloral hidrat çözeltisi, Sartur reaktifi ve ikili boyama yöntemi kullanılmıştır.

Görüntüleme için Leica CME Işık mikroskobu kullanılmış, 4X, 10X, 40X ve 100X'lik objektifler yardımıyla incelenmiştir.

Yaprak üst epidermisinde bulunan epidermis hücrelerinin, yaprak alt epidermisinde bulunan epidermis ve stoma hücrelerinin ortalama boyutları en ve boy olarak μm cinsinden verilmiştir. Epidermis hücrelerinin boyutları Şekil 3.2.'de gösterildiği şekilde belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Epidermis hücrelerinin boyutlarının belirlenmesi.

A: Alt epidermis, B: Üst epidermis.

Bunu takiben stoma hücrelerine ait stoma indisi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Stoma indisi} = \left[\frac{S}{S+E} \right] \times 100 \quad (3.1.)$$

S= Yaprığın belirli alanındaki stoma sayısı

E= Yaprığın aynı alanındaki (tüyleri de taşıyan) epiderma hücreleri sayısı.

Dokuların boyanmasında kloralhidrat, SARTUR ve ikili boyama yöntemi olmak üzere üç farklı yöntem kullanılmıştır.

Kloralhidrat reaktifi: Kesitleri berraklaştırmak için kullanılmaktadır. Nişastaları eritmekle birlikte kalsiyum okzalat kristallerinin görüntüsünü değiştirmemektedir. Lamın üzerindeki dokuya damlatılıp üstü lamel ile kapatıldıktan sonra bek alevinde hafifçe ısıtılmaktadır. Bu işlemler sonrasında doku incelenmeye hazır hale gelmektedir.

SARTUR reaktifi: Karışım bir reaktiftir. Reaktifin içeriğinde bulunan sudan III, yağ, kütin ve süberini turuncu renge boyamaktadır. Anilin, lignin ile sarı renk oluşturmaktadır. Bu nedenle odunlaşmış dokular sarı renkte görülmektedir. İyot,

nişastayı mavi-mor renge boyamaktadır. Lamın üzerindeki dokuya damlatılıp üstü lamel ile kapatıldıktan sonra bek alevinde hafifçe ısıtılmaktadır. Bu işlemler sonrasında doku incelenmeye hazır hale gelmektedir (218).

İkili boyama yöntemi: Astra mavisi ve safraninden oluşmaktadır. Safranin odunlaşmış yapıları kırmızı renge, astra mavisi kollenkimayı mavi renge boyamaktadır. Lamın üzerindeki dokuya damlatılıp üstü lamel ile kapatıldıktan sonra doku incelenmeye hazır hale gelmektedir.

3.2 Fitokimyasal Çalışmalar

3.2.1 Genel Teşhis Reaksiyonları

Genel teşhis reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için sulu ekstre, etanol ekstresi ve alkaloit ekstreleri hazırlanmış ve ilgili tayinlerin yapılabilmesi için kullanılmıştır. İzolasyon çalışmaları, toplam fenolik, toplam flavonoit ve toplam proantosiyanidin içerik tayinleri, biyolojik aktivite ve omiks çalışmaları için hazırlanan ekstreler ise 3.2.2 Ekstraksiyon başlığı altında verilmiştir.

Sulu ekstre: Bitkinin kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yapraklarından 4,0232 gram tartılmış ve 250 mL'lik erlene aktarılmıştır. Üzerine 200 mL kaynamış distile su eklenmiştir. Erlenin ağzı tıpa ile kapatılarak sıcak su banyosunda 15 dakika boyunca bekletilmiş, sıcakken süzümüştür. Sulu ekstre kullanılarak saponozitlerin, antrasen türevi glikozitlerin, flavonoitlerin, tanenlerin, antosiyanın glikozitlerin, ozların, nişasta ve kumarin gruplarının teşhis reaksiyonları yapılmıştır.

Saponozitler: 10 mL sulu ekstre bir deney tüpüne alınmıştır. Tüpün ağzı baş parmak ile sıkıca kapatılmış ve yatay olarak 30 saniye boyunca çalkalanmıştır. Tüp kendi haline bırakılmış, 15 dakika sonra köpük seviyesi gözlemlenmiştir. 15 dakikanın sonunda deney tüpünde 1 cm'ye yakın köpük kalmış olması saponozit varlığını göstermektedir. Saponozit bileşiklerinde aglikonun tespit edilebilmesi için aşağıdaki reaksiyon gerçekleştirilmiştir:

Hager-Salkowski Reaksiyonu: Bitkinin 1,0763 g kurutulmuş ve öğütülmüş yaprakları 5 mL kloroform ile ekstre edilmiş ve süzümüştür. Üzerine eşit miktarda derişik H₂SO₄ eklenmiş ve tabakalardaki renk değişimleri incelenmiştir. Steroidal

yapıda sapogenol bulunması durumunda kloroformlu tabakada kan kırmızısı renk, asitli tabakada yeşil bir floresan görüntü oluşmaktadır.

Brieskorn-Briener Reaksiyonu: Triterpenik sapogenollerin kloroformdaki çözeltileri klorosülfonik asitle kırmızı renk verirler.

Antrasen türevi glikozitler: Börntrager reaksiyonu bu grup için özel bir reaksiyondur. 10 mL sulu ekstre üzerine 5 damla derişik H_2SO_4 eklenmiş ve 5 dakika bek alevi üzerinde içi su dolu beherde ısıtılmıştır. Bu basamak glikozitin hidroliz olması ve aglikonun serbest hale gelmesi amacıyla yapılmıştır. Ekstre sıcakken süzölmüş, süzöntü soğutulmuş ve 5 mL eter ile partisyona tabi tutulmuştur. Eter fazı ayrılmış ve sıcak su banyosunda kuruluğa kadar uçurulmuştur. Oda sıcaklığına geldikten sonra %10'luk NH_3 çözeltisi ile çalkalanmış ve renk değişimi incelenmiştir. Eter fazında antrasen türevi olması durumunda sarı renk gözlenmektedir. Ayrıca amonyak ilavesi ile gül pembesinden kiraz kırmızısına değişen bir renk gözlenmesi antrasen türevi glikozitlere işaret etmektedir. Aglikon bir antronol ise renk önce sarı, 5 dakika sonra karakteristik kırmızıya dönüşmektedir.

Flavonoitler: Siyanidin reaksiyonu flavonoitlere özel bir reaksiyondur. 20 mL sulu ekstre ayırma hunisinde 6 mL EtOAc ile partisyona tabi tutulmuştur. EtOAc fazı bir behere alınarak sıcak su banyosunda kuruluğa kadar uçurulmuştur. Tamamen kuruduktan ve oda sıcaklığına getirildikten sonra 2 mL HCl:MeOH:H₂O (1:1:1) çözeltisi ve spatül ucu kadar Mg talaşı eklenmiştir. Kapsüldeki renk değişimi incelenmiştir. Flavon iskeleti bulunduğu durumda turuncu-kırmızı, flavonol iskeleti bulunduğu durumda kiraz kırmızısı, flavonon iskeleti bulunduğu durumda mor-kırmızı renk gözlenmektedir.

Tanenler: İki farklı deney tüpüne 5 mL sulu ekstre koyulmuştur. İlk tüpteki ekstrenin üstüne 2 mL tuzlu jelatin çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpteki renk ve/veya çökelti gözlemlenmiştir. Krem rengi çökelti oluşması tanen varlığını göstermektedir. İkinci tüpteki ekstre üzerine seyreltik %5'lik $FeCl_3$ çözeltisinden 3 damla ilave edilmiş ve renk değişimi incelenmiştir. Esmer-zeytin yeşili renk ve/veya çökelek kateşik tanen, mavi-siyah renk ve/veya çökelek gallik tanen varlığını göstermektedir.

Antosiyenin glikozitleri: Bu deney antosiyeninlerin farklı pH'lerde farklı renkler vermesi esasına dayanmaktadır. 4 adet deney tüpüne sırasıyla 2'şer mL sulu ekstre eklenmiştir. İlk deney tüpüne 1 mL dilüe H₂SO₄, ikinci deney tüpüne NaOH çözeltisi eklenmiş ve dilüe HCl ile asitlendirilmiştir. Üçüncü deney tüpüne bir miktar amil alkol koyulup çalkalanmıştır. Dördüncü deney tüpüne 1 mL dilüe H₂SO₄ eklenmiş, hafifçe ısıtılmış ve soğutulduktan sonra amil alkolle çalkalanmıştır. Her bir deney tüpündeki renk değişimleri incelenmiştir.

Ozlar: 2 mL sulu ekstre bir deney tüpüne alınmıştır. Üstüne 3 mL Fehling A, 3 mL Fehling B çözeltileri ilave edilmiştir. Bek üzerinde bulunan kaynar su içeren beherde bir süre ısıtılmış ve çökelek oluşumu incelenmiştir. Kırmızı renkte çökelti oluşumu oz varlığını göstermektedir.

Nişasta: 3 mL sulu ekstre bir deney tüpüne alınmıştır. 3 damla 0,5 N iyot çözeltisi eklenmiş ve renk değişimi incelenmiştir. 0,5 N iyot çözeltisi eklendikten sonra mor renk oluşması nişasta varlığını göstermektedir.

Kumarinler: 5 mL sulu ekstre yoğunlaştırılmıştır. Yoğun ekstre bir süzgeç kağıdına damlatılmıştır. Kuruduktan sonra üzerine 1 N NaOH damlatılmış ve kurutulmuştur. UV₃₆₆ da incelenmiştir. UV₃₆₆ da görünen yeşil floresan renk kumarin varlığını göstermektedir.

Etanol ekstresi: Bitkinin kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yapraklarından 0,4855 gram tartılmış ve 250 mL'lik erlene aktarılmıştır. 10 mL %50'lik EtOH ve 2 mL MeOH ilave edilip 3-5 dakika bekletilmiş ve süzümüştür. Süzüntüye 1 mL kurşun subasetat eklenmiş ve süzümüştür. Temizlenmiş süzüntü kloroform ile partisyona tabi tutulmuştur. Kloroform fazı ayrılmıştır. Bu faz kardiyoaktif glikozit aranması için kullanılmıştır.

Kardiyoaktif glikozitler: Kloroformlu faz kapsül içinde sıcak su banyosu üzerinde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kapsüle 3 mL %3,5'lik FeCl₃/glasiyel asetik asit çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika bekletilmiştir. İçinde 2 mL derişik H₂SO₄ bulunan deney tüpüne tabaka yapacak şekilde çeperden sızdırılmıştır. Tabakalardaki renk

değişimleri incelenmiştir. Bekledikçe tabakaların ayrılma yüzeyinde esmer tabaka oluşması deoksipentoz varlığını, asetik asitli üst tabakada soluk yeşil renk oluşması digitoksisenin varlığını göstermektedir.

Alkaloit ekstresi: Bitkinin kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yapraklarından 0,4820 g gram tartılmış ve 250 mL'lik erlene aktarılmıştır. Üzerine 20 mL 1 N HCl ilave edilmiştir. 15 dakika boyunca çalkalanarak ekstre edilmiş ve süzümüştür. 10 mL eter ile partisyona tabi tutulmuş ve eterli faz atılmıştır. Kalan sulu asitli faz derişik NH_3 ile alkalilendirilmiştir. Bu çözelti 2 defa 10 mL eter ile partisyona tabi tutulmuş ve eterli fazlar toplanmıştır. Bu faz alkaloit aranmasında kullanılmıştır.

Alkaloitler için genel teşhis reaksiyonu: Dragendorf reaktifi ile doyurulmuş süzgeç kağıdına 2-3 damla alkaloit ekstresi damlatılmış ve renk değişimi incelenmiştir. Alkaloit varlığı düşünüldüğünden bazı alkaloitler için özel teşhis reaksiyonları yapılmıştır.

Tropan türevi alkaloitler: Vitali-Morin reaksiyonu Solanaceae alkaloitleri için spesifiktir. Kapsüle alınan 2 mL alkaloit ekstresinin üstüne derişik HNO_3 eklenmiştir. Sıcak su banyosunda kuruluğa kadar uçurulmuştur. Oda sıcaklığına gelince 2 damla %5'lik alkollü potas çözeltisi ilave edilmiş ve renk değişimi incelenmiştir. Çabuk solan mor rengin görülmesi tropan türevi alkaloitlerin varlığına işaret etmektedir.

İzokinolein türevi alkaloitler: Alkaloit ekstresinden 2'şer mL olacak şekilde 3 deney tüpüne alınmıştır. Ekstrenin bulunduğu 1. deney tüpüne 3 mL derişik H_2SO_4 ve 2 damla Marquis reaktifi eklenmiştir. 2. deney tüpüne 2 damla Froehde reaktifi eklenmiş ve deney tüpü sıcak su banyosunda kısa bir süre ısıtılmıştır. 3. deney tüpüne de 2 damla H_2SO_4 ve 1 damla HNO_3 eklenmiştir. Oluşan renkler (mor-pembe, mavi, kırmızı) incelenerek izokinolein türevi alkaloitlerin varlığı tespit edilmiştir.

İndol türevi alkaloidler:

İçinde 2 mL alkaloid ekstresi bulunan deney tüpüne 2 damla derişik HNO₃ eklenmiş ve oluşan renkler (kan kırmızısı, sarı) gözlemlenerek indol türevi alkaloidlerin varlığı tespit edilmiştir.

Müreksit Deneyi: Porselen kapsülde bulunan numune üzerine 1 mL HCl ve spatül ucu kadar KClO₃ eklenmiştir. Sıcak su banyosunda kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kapsül oda sıcaklığına geldiğinde içinde derişik NH₃ bulunan şişenin ağzına kapatılmış ve renk değişimi gözlemlenmiştir. Kafein varlığında kapsülde erguvani renk oluşması beklenmektedir.

İnce Tabaka Kromatografisi

İnce Tabaka Kromatografisinde sekonder metabolit gruplarının teşhisi için uygun numune çözeltileri, sabit faz ve hareketli fazlar seçilerek analiz yapılmıştır.

Antrasen Türevi Glikozitler

- Numune çözeltisi: *M. communis*'in sulu ekstresi
- Sabit faz: İTK Silika jel 60 F₂₅₄ plak (MERCK)
- Hareketli faz: *n*-Propanol:etil asetat:gl. asetik asit:su (40:40:30:1 h/h/h)
- Püskürtme reaktifi: %20'lik Nitrik asit, 5 dakika 105°C'de ısıtma.
- Görüntüleme: Görünür ışıktta kırmızı-kahverengi leke.

Flavonoitler

- Numune çözeltisi: *M. communis*'in sulu ekstresi
- Sabit faz: İTK Silika jel 60 F₂₅₄ plak (MERCK)
- Hareketli faz: Kloroform:metanol:su (70:30:3 h/h/h)
- Püskürtme reaktifi: %1'lik Vanilin/sülfürik asit, 5 dakika 105°C'de ısıtma.
- Görüntüleme: Görünür ışıktta sarı leke, UV₃₆₆'da sarı-yeşil floresan leke.

Tanenler

- Numune çözeltisi: *M. communis*'in sulu ekstresi
- Sabit faz: İTK Silika jel 60 F₂₅₄ plak (MERCK)

- Hareketli faz: Toluen:aseton:formik asit (5:5:1 h/h/h)
- Püskürtme reaktifi: %1'lik Vanilin/sülfürik asit, ve 5 dakika 105°C'de ısıtma.
- Görüntüleme: Görünür ışıktta kırmızı leke.

Alkaloitler

- Numune çözeltisi: *M. communis*'in alkaloit ekstresi
- Sabit faz: İTK Silika jel 60 F₂₅₄ plak (MERCK)
- Hareketli faz: Etil asetat:metanol:su (100:13,5:10 h/h/h)
- Püskürtme reaktifi: Seyreltik Dragendorf, 5 dakika 105°C'de ısıtma.
- Görüntüleme: Görünür ışıktta kahverengi/kahverengi-turuncu leke.

Terpenik maddeler

- Numune çözeltisi: *M. communis*'in etanol ekstresi
- Sabit faz: İTK Silika jel 60 F₂₅₄ plak (MERCK)
- Hareketli faz: Petrol eteri:etil asetat (85:15 h/h)
- Püskürtme reaktifi: %1'lik Vanilin/sülfürik asit, 5 dakika 105°C'de ısıtma.
- Görüntüleme: Görünür ışıktta mor renk, UV₃₆₆'da kırmızı-turuncu floresan leke.

Kafein

- Numune çözeltisi: *M. communis*'in alkaloit ekstresi
- Sabit faz: İTK Silika jel 60 F₂₅₄ plak (MERCK)
- Hareketli faz: Etil asetat:metanol:su (100:13,5:10 h/h/h)
- Püskürtme reaktifi: Açık havada kurutma.
- Görüntüleme: UV₂₅₄'te floresansı engelleyen leke.

3.2.2 Ekstraksiyon Çalışmaları

Hatay'dan toplanmış *M. communis* yaprakları açık havada ve gölgede kurutulmuştur. Etnobotanik ve halk ilacı çalışmaları dikkate alındığında halk arasında genel olarak infüzyon yöntemiyle hazırlandığı tespit edildiğinden ilk olarak sulu ekstresi hazırlanmıştır. Diğer taraftan fitokimyasal çalışmalar için geniş profilde madde grubunun elde edilebilmesi amacıyla %80'lik etanol ekstresi hazırlanmıştır.

Bitkinin sulu ekstresi (MCI) için bir kısım bitki materyali üzerine 10 kısım kaynatılmış distile su eklenmiştir. 30 dakika bekletildikten sonra distile su ile ıslatılmış süzgeç kağıdı ve huni yardımıyla süzölmüştür. Hazırlanan infüzyon rotavapor yardımıyla 40°C'de düşük basınçta kuruluğa kadar uçurulduktan sonra elde edilen madde miktarı 4,44 g olarak hesaplanmış ve verim %14,23 olarak belirlenmiştir (Sulu ekstre=4,44 g).

%80'lik etanol ekstresi (MCE) 3 tekrarlı hazırlanmıştır. Bir kısım bitki materyali üzerine 8 kısım çözücü (%80'lik etanol) eklenerek 12 saat maserasyona bırakılmıştır. Oda sıcaklığında ve açık hava basıncında ekstre edilen bitkisel droglar 12 saatin sonunda %80'lik etanol ile ıslatılmış pilili süzgeç kağıdı yardımıyla süzölmüştür. Her süzöntüde elde edilen madde miktarının ölçülebilmesi ve verim hesabının yapılabilmesi için süzöntüler rotavapor yardımıyla 40°C'de alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulmuştur. İlk ekstraksiyondan 39,27 g, ikinci ekstraksiyondan 14,29 g, üçüncü ekstraksiyondan 8,46 g madde alınmış ve birleştirilerek toplam verim %31,01 olarak hesaplanmıştır. Ekstrelerin içerdiği madde gruplarını ve bunların nitel olarak yoğunluklarının anlaşılabilmesi amacıyla her ekstrenin uygun derişimdeki çözeltisi ince tabaka kromatografisi yardımıyla gözlenmiştir (etanol ekstresi=62,02 g).

3.2.3. Kromatografik Yöntemler

Çalışmalar süresince kullanılmış tüm kromatografik yöntemler ve şartları, kullanılan kısaltmalarla birlikte aşağıda verilmiştir.

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarının takibinde normal faz silika jel, ters faz silika jel ve poliamit ile kaplı hazır plaklardan faydalanılmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılan İTK bilgileri

Adsorban	-Silika jel (Alüminyum plak, Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Merck) -Silika jel (Alüminyum plak, Kieselgel 60 RP-18 F _{254S} , Merck) -Poliamit (abcr)
Çözücü sistemleri	-EtOAc:gl. asetik asit:formik asit:H ₂ O (100:11:11:27) -CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (90:10:1, 85:15:0,5, 80:20:2, 80:20:1, 70:35:5, 70:30:3, 75:25:5, 70:25:5, 61:32:7, 60:40:10, 50:50:10) -EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:25:20, 100:17,5:13,5, 100:17,5:12, 100:15:10, 100:10:5, 85:15:3, 85:15:0,5, 55:35:10) - <i>n</i> -Hekzan:EtOAc:MeOH (4:6:4, 10:10:3, 10:10:4, 10:10:4,5, 10:10:0,5) -Sikloheksan:EtOAc:MeOH (10:10:3, 10:10:2,5, 7:3:2) -Sikloheksan: CHCl ₃ :MeOH (10:10:3, 10:10:3,5, 4:5:2) - <i>n</i> -BuOH:asetik asit: H ₂ O (40:10:20) CHCl ₃ :MeOH (99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 90:10, 88:12) - <i>n</i> -Hekzan:EtOAc (7:3) -MeOH:H ₂ O (95:5, 90:10, 80:20, 80:15, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 40:60, 35:65, 25:75, 20:80) -ACN:H ₂ O (85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 25:75) -İzopropil alkol: H ₂ O (50:50)
Tatbikler	Pastör pipeti yardımıyla plağın alt ucunun 1 cm yukarisına ve tatbik noktaları arasında birer cm bırakılarak yapılmıştır.
Sürüklenme mesafesi	5-7 cm
Lekelerin belirlenmesi	1) UV 254 ve 366 nm'da Camag UV lambası altında gözlenen floresan 2) %20'lik sülfürik asit çözeltisi püskürtüldükten sonra 105 °C'de 2 dakika ısıtma 3)%1'lik vanilin/sülfürik asit çözeltisi püskürtüldükten sonra 105°C'de 2 dakika ısıtma 4) Daldırma yöntemi (Plak püskürtme reaktifi içerisine daldırılır ve kurutma tabancasıyla kurutulur.)

Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK)

VSK, ön fraksiyonlama ve saflaştırma amacıyla kullanılmıştır. Tam kapalı sistem haline getirilebilen Spectra/Chrom™ LC Column marka ve model cam kolon kullanılmıştır. Kolon boyutlarına, tatbik edilecek numune miktarına göre karar verilmiştir. Kolon dolgu materyali olarak ters faz silika jel (LiChroprep C₁₈, Merck) kullanılmıştır. Kolonlar yaş yöntemle hazırlanmıştır. Çözücü sistemleri H₂O→MeOH olarak belirlenmiştir. Numune tatbik edildikten sonra, belirlenen çözücü sistemiyle polarite değişikliği yapılarak izolasyona devam edilmiştir. Toplanan fraksiyon hacimleri 10 ve 25 mL olarak belirlenmiştir. Nüçe erlenine bağlanan bir hortum yardımıyla kolonun altından vakum uygulanmış ve BOYU marka hava pompası ile kolonun üst vidasından hava verilmiştir. Bu sayede hızlı ve verimli bir ayırım sağlanmıştır.

Kolonun hazırlanması: Yeterli miktarda MeOH ile süspande edilen LiChroprep C₁₈ cam kolona aktarılmıştır. İzolasyona başlanacak çözücü sistemi ile kolon şartlanmıştır.

Numune tatbiki: Numuneler, az miktarda uygun çözücüler ile çözülmüş, yeterli miktarda LiChroprep C₁₈ ile kuru tatbik için hazırlanmıştır.

Açık Kolon Kromatografisi (AKK)

a) Reçine Kolon Kromatografisi (RKK)

Ana ekstrelerin farklı polaritede hazırlanan hareketli fazlar kullanılarak fraksiyonlanması, %80'lik EtOH maserasyonu yapılan ekstrede klorofil ve pigmentlerin uzaklaştırılması için reçine kolon kromatografisi kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Çalışmalarda kullanılan reçine kolon kromatografisi bilgileri

Dolgu materyali	-Reçine (SEPLITE D101 adsorbent resin, Sunresin)
Çözücü sistemi	-H ₂ O→MeOH (100→0) -H ₂ O→Aseton (25:75→0:100)

Kolonun hazırlanması: Uygun miktarda reçine tartılıp alt kısmına pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Kolon, izolasyona başlanacak çözücü sistemi ile şartlanmıştır.

Numune tatbiki: Numune uygun çözücüde çözülüp bir miktar reçine yardımıyla kuru tatbik için hazırlanmış ve kolona aktarılmıştır.

b) Poliamit Kolon Kromatografisi (PKK)

Fraksiyonlardan maddelerin saflaştırılması amacıyla poliamit kolon kromatografisi kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmalarda kullanılan poliamit kolon kromatografisi bilgileri

Dolgu materyali	-Poliamit (Polyamid 6, Supelco)
Çözücü sistemi	-H ₂ O→MeOH (100→0)

Kolonun hazırlanması: Uygun miktarda poliamit, yeterli miktarda başlangıç çözücüsü ile manyetik bir karıştırıcıda bir müddet karıştırılmış ve cam kolona aktarılmıştır. Kolonun şartlanması, izolasyona başlanacak çözücü sistemi ile yapılmıştır.

Numune tatbiki: Numune, izolasyona başlanacak çözücü sisteminde çözülüp kolona sıvı olarak tatbik edilmiştir. Bazı saflaştırma basamakları için numune az miktarda uygun çözücüde çözülüp bir miktar poliamit yardımıyla kuru tatbik için hazırlanmış ve kolona aktarılmıştır.

c) Silika jel Kolon Kromatografisi (SKK)

VSK, RKK ve Sefadeks KK'den alınan fraksiyonların, alt fraksiyonlarını oluşturma ve saflaştırma amacıyla silika jel kolon kromatografisi kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Çalışmalarda kullanılan silika jel kolon kromatografisi bilgileri

Dolgu materyali	-Silika jel (Flash silika, Silicycle) -Silika jel (Silica gel 60, 0,063-0,200 mm, Merck)
Çözücü sistemleri	-CHCl ₃ :MeOH (99:1, 98,2:1,8, 98:2, 97:3, 95:5, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12) -CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (90:10:2, 90:10:4, 85:15:0,5, 80:20:1, 80:20:2, 70:30:3) -EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:15:10, 100:15:5, 100:10:5) -Sikloheksan:EtOAc:MeOH (10:10:1, 10:10:1,5, 10:10:2, 10:10:2,5, 10:10:3, 10:10:4) - <i>n</i> -Hekzan:EtOAc:MeOH (10:10:2, 10:10:3,5, 10:10:4)

Kolonun hazırlanması: Yeterli miktarda silika jel, izolasyona başlanacak çözücü sisteminde süspende hale getirilmiş ve alt kısmına pamuk yerleştirilmiş kolona aktarılmıştır. Kolon, aynı çözücü sistemi ile şartlanmıştır.

Numune tatbiki: Numune, uygun çözücüde çözülüp bir miktar kolon dolgu materyali yardımıyla kuru tatbik için hazırlanmış ve kolona aktarılmıştır. Sıvı olarak tatbik edilecek numuneler ise izolasyona başlanacak çözücü sisteminde çözülüp kolona tatbik edilmiştir.

d) Sefadeks Kolon Kromatografisi (Jel Filtrasyon) (Sefadeks KK)

Saflaştırma işlemlerinde VSK, PKK ve SKK yanında Sefadeks KK de kullanılmıştır.

Tablo 3.5. Çalışmalarda kullanılan Sefadeks kolon kromatografisi bilgileri

Dolgu materyali	-Sefadeks (Sephadex LH-20, Merck)
Çözücü sistemi	-MeOH

Kolonun hazırlanması: Yeterli miktarda Sefadeks LH-20, izolasyona başlanacak çözücü sisteminde süspende hale getirilmiş ve manyetik bir karıştırıcıda şişmeye bırakılmıştır. Alt kısmına pamuk yerleştirilmiş kolona aktarılmıştır. Kolon aynı çözücü sistemi ile şartlanmıştır. Gerekli görüldüğünde, kolonun hızlandırılmasında, vakumdan ve hava akımından faydalanılmıştır.

Numune tatbiki: Saflaştırma basamağı için kurulan kolonda, numuneler metanolde çözülüp kolona sıvı olarak tatbik edilmiştir.

3.2.4 İzolasyon Çalışmaları

Bitkinin %80'lik etanol ekstresinde bulunan fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin ön ayırımının yapılması; ekstrede bulunan klorofil ve pigmentlerin uzaklaştırılması için reçine ile hazırlanmış kolon kromatografisi kullanılmıştır.

Bitkinin 46,52 g %80'lik etanol ekstresi yeterli miktarda reçine kullanılarak kuru tatbik için hazırlanmış ve reçine kolona (8 x 23 cm) tatbik edilmiştir (300 g). Kolon kromatografisinde hareketli faza %100 su ile başlanmış ve metanol oranı artırılarak izolasyona devam edilmiştir (100→0). Yeterli miktarda %100 metanol eklemesinden sonra hareketli faz olarak su:aseton (25:75) ile başlanmış ve %100 aseton kullanılarak kolon sonlandırılmıştır (25:75→0:100). İTK analizleri ile yapılan kontroller sonucunda 6 alt fraksiyon belirlenmiştir: MC-RC[3-5] (3,74 g), MC-RC[6-8] (17,34 g), MC-RC[9-22] (9,48 g), MC-RC[23] (450 mg), MC-RC[24-28] (1,89 g), MC-RC[29-30] (2,72 g). İTK analizleri sonucunda bu fraksiyonların flavonoit ve tanenlerce zengin olduğu gözlenmiştir.

MC-02, MC-04 ve MC-05 bileşiklerinin izolasyonu: Reçine kolondan alınan MC-RC[9-22] fraksiyonunun (9,48 g) İTK analizlerinde görülen flavonoitlerin izole edilebilmesi amacıyla öncelikle *n*-butanol ile sıvı-sıvı partisyona tabi tutulmuştur (3 x 330 mL *n*-butanol). Partisyondan elde edilmiş *n*-butanol fazı, %100 metanol ile şartlanmış vakum sıvı kromatografisine tatbik edilmiştir. 20:80 su:metanol ile elüsyona başlanan vakum sıvı kromatografisinde elde edilmiş Fr. 86-95 (116 mg), 80:20 su:metanol ile şartlanmış poliamit kolona tatbik edilmiştir (45 g). Poliamit kolondan elde edilmiş Fr. 35-36 (20,1 g), %100 metanol ile şartlanmış Sefadeks kolona tatbik edilmiştir. %100 metanol çözücüsü ile yapılmış elüsyon sonucunda **MC-02** (13,1 mg) bileşiği izole edilmiştir. VSK'dan elde edilmiş diğer fraksiyon, Fr. 107-114 (160,6 mg) %100 metanol ile şartlanmış Sefadeks kolona tatbik edilmiştir. %100 metanol ile yapılmış elüsyon sonucunda elde edilmiş Fr. (87-95) (50,3 mg), 85:15:0,5 kloroform: metanol:su çözücü sistemi ile şartlanmış silika jel kolona tatbik edilmiştir. 80:20:2 kloroform:metanol:su çözücü sistemi ile yapılmış elüsyon sonucunda **MC-04** (9,8 mg) bileşiği izole edilmiştir. %100 metanol çözücüsü ile yapılmış elüsyon sonucunda elde edilmiş Fr. 103-131 (23,2 mg) fraksiyonu da yine %100 metanol ile şartlanmış başka bir Sefadeks kolona tatbik edilmiştir. %100 metanol çözücüsü ile

yapılmış elüsyon sonucunda elde edilmiş Fr. 106-129 (8,5 mg), 100:10:2 etil asetat:metanol:su çözücü sistemi ile şartlanmış silika jel kolona tatbik edilmiştir. Bu kolonda yapılmış elüsyon sonucunda **MC-05** (3,0 mg) bileşiği izole edilmiştir.

MC-09, MC-11 ve MC-18 bileşiklerinin izolasyonu: Reçine kolondan alınan MC-RC[24-28] fraksiyonunun (1,89 g) İTK analizlerinde görülen terpenlerin izole edilebilmesi amacıyla öncelikle 90:10 kloroform:metanol çözücü sistemi ile şartlanmış silika jel kolona tatbik edilmiştir. 80:20:2 kloroform:metanol:su çözücü sistemi ile yapılan elüsyon sonucunda elde edilmiş Fr. (5) (166,3 mg) organik çözücü ile çöktürmeye tabi tutulmuştur. İTK analizi sonucunda çökeleğin **MC-09** (12,2 mg) bileşiği olduğu anlaşılmıştır. 80:20:2 kloroform:metanol:su çözücü sistemi ile yapılan elüsyon sonucunda elde edilmiş bir diğer fraksiyon, Fr. (10-11) (38,3 mg), %100 metanol ile şartlanmış Sefadeks kolona tatbik edilmiştir. %100 metanol ile yapılmış elüsyon sonucunda **MC-11** (7,5 mg) bileşiği izole edilmiştir. Fr. (16-18) (46,9 mg) ise 10:10:2 *n*-hekzan:etil asetat:metanol çözücü sistemi ile şartlanmış silika jel kolona tatbik edilmiştir. 10:10:4 *n*-hekzan:etil asetat:su çözücü sistemi ile yapılmış elüsyon sonucunda **MC-18** (17,7 mg) bileşiği izole edilmiştir.

Saf bileşiklerin yapı tayinleri 1D NMR (¹H- ve ¹³C-NMR) ve HR-ESI-MS yöntemleri kullanılarak yapılmıştır.

İlerleyen bölümlerdeki çalışmalara konu olan ekstre ve fraksiyonların takibini kolaylaştırmak amacıyla yapılmış kısaltmalar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.6. Ekstre ve fraksiyonlara ait kısaltmalar

Ekstre ve fraksiyon adı	Kısaltmalar
%80'lik Etanol ekstresi	MCE
İnfüzyon/Sulu ekstre	MCI
MC-RC[3-5]	MCE-Fr.A
MC-RC[6-8]	MCE-Fr.B
MC-RC[9-22]-LL- <i>n</i> -BuOH	MCE-Fr.C-BuOH
MC-RC[9-22]-LL-su	MCE-Fr.C-Su
MC-RC[23]	MCE-Fr.D
MC-RC[24-28]	MCE-Fr.E
MC-RC[29-30]	MCE-Fr.F

3.2.5 Metabolomik Çalışmalar

qTOF-LC-MS Çalışmaları

Numuneler, uçuş zamanlı kütle spektrometresi-sıvı kromatografisi (LC/MS Q-TOF) (Agilent Technologies, 6530, US) cihazıyla analiz edilmiştir. Kromatografi kolonu olarak C₁₈ (100 x 2.1 mm 2.5 µm) Waters corp., A.B.D. kullanılmıştır. Hareketli faz olarak A: %0,1'lik formik asit içeren su, B: %0,1'lik formik asit içeren asetonitril kullanılmıştır. Numuneler, elektrosprey iyonizasyon (Electrospray ionization-ESI) iyon kaynağı kullanılarak negatif iyon modunda 100-1700 m/z arası taranarak analiz edilmiştir. Analiz sonucu cihazdan ham veriler “.mzdata” uzantılı olarak alınmıştır. Her bir numune için kütle/yük (*m/z*) tespiti, MZmine 2.53 yazılımı kullanılarak (219) gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0,4 mL/dakika ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.7. qTOF-LC-MS analizlerinde kullanılan gradient elüsyon programı

Zaman	Hareketli Faz Oranı (B)*
Başlangıç	%5
2. dakika	%35
8. dakika	%95
10. dakika	%5
15.dakika	%5

* %0.1 formik asit içeren asetonitril

3.2.6 Toplam Madde Miktar Tayinleri

Toplam fenol ve flavonoit içerik analizleri Arıtuluk ve ark. (220) tarafından uygulanan metot kullanılarak yapılmıştır. Toplam proantosiyanidin (kondanse tanen) içerik analizi ise Broadhurst ve Jones (221) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır.

Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

M. communis'in MCE, MCI kodlu ekstrelerin ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarının toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak tayin edilmiştir. Fenolik maddelerin bazik ortamda Folin Ciocalteu (fosfomolibdat ve Fosfotungstat karışımı) ile reaksiyona girerek, mavi renkli bir kompleks oluşturması ve oluşan kromoforun spektrofotometrik ölçülmesi yöntemin esasını oluşturmaktadır (222).

Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi distile su ile seyreltilmiştir (1:10). 100 µL reaktif ile 20 µL ekstreler, fraksiyonlar (1000-125 µg/mL) ve standart maddenin (gallik asit, 50-6,25 µg/mL) farklı konsantrasyonları karıştırılmıştır. Karışım çalkalandıktan sonra üzerine 80 µL sodyum karbonat çözeltisi (%7,5'lik) eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübe edildikten sonra 765 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmış ve sonuçlar mg GAE/g ekstre/fraksiyon olarak ifade edilmiştir.

Toplam Flavonoit Miktar Tayini

M. communis'in MCE, MCI kodlu ekstreleri ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarının total flavonoit miktarı, alüminyum klorür kolorimetrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir (223). Yöntem, alüminyum klorürün flavon ve flavonoller ile reaksiyona girerek, 4. karbon atomuna bağlı keton grubunun, 3. ve 5. karbon atomuna bağlı hidroksil grubuyla aside dayanıklı kompleks oluşturması ve oluşan sarı renkli kompleksin spektrofotometrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

25 µL ekstreler, fraksiyonlar (1000-125 µg/mL) ve standart maddenin (kersetin, 800-25 µg/mL) farklı konsantrasyonları, 75 µL %95'lik etanol, 5 µL %10'luk alüminyum klorür, 5 µL 1M potasyum asetat ve 140 µL distile su ile

karıştırılmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 415 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Total flavonoit madde miktarı kersetin eşdeğeri (KE) olarak hesaplanmış ve sonuçlar mg KE/g numune olarak ifade edilmiştir.

Toplam Proantosiyanidin (Kondanse Tanen) Miktar Tayini

M. communis’in MCE, MCI kodlu ekstreleri ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarının kondanse tanen madde miktarı, vanilin/HCl kolorimetrik yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Yöntem flavanollerin asidik ortamda vanilin ile reaksiyonundan maksimum 500 nm’de absorbans veren renkli ürünlerin oluşması esasına dayanmaktadır (221).

Ekstreler, fraksiyonlar (1000-125 µg/mL) ve standardın [(+)-kateşin, 100-6,25 µg/mL] farklı konsantrasyonları 30 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropłaka içerisine alınmıştır. Vanilin reaktifinden 150 µL eklendikten 1 dakika sonra 150 µL %4’lük HCl çözeltisi eklenmiştir. 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 500 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Ekstre, fraksiyon ve standartların ortalama absorbanslarından hazırlanan kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak total proantosiyanidin madde miktarı (+)-kateşin eşdeğeri (KAE) olarak hesaplanmış ve sonuçlar mg KAE/g olarak ifade edilmiştir.

3.3. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.8. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka
Buzdolabı	Arçelik
Buz tankı	Scotsman AF-80
Çalkalayıcı	FinePCR, FMS2 Shaker
Derin dondurucu	BEKO
Distile su cihazı	Sartorius arium advance Nüve ND12
Etüv	Memmert JSR
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S AND GH-252
Hava pompası	BOYU Air Pump
Isı tabancası	Bosch
Kamera	Samsung Galaxy A72
Kompresör	KL Pro KLK 25S
Kromatografi tankı	(21x23,6x8 cm ³)
Kül fırını	Protherm Furnaces
Kurutma makinesi	Felix rinnamini Raks mona
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-2 LD Plus LABCONCO
Manyetik karıştırıcı	Isolab DLAB MS-H280-Pro Heidolph MR 3001
Membran görüntüleme cihazı	Kodak
NMR Spektrofotometresi (¹ H- ve ¹³ C-NMR)	Varian 400 MHz Bruker 400 MHz
pH metre	Mettler Toledo
Plak ısıtıcı	CAMAG TLC Plate Heater III
qToF-LC-MS	Agilent Technologies
Prob sonikatörü	Sonics Vibra-Cell™, VCX 750
Rotavapor	Heidolph G3 Isolab BUCHI Greatwall RE-1020CE
Santrifüj cihazı	Hitachi, Himac CT6E LabnetZ150A Nüve NF 800R Thermo Scientific MicroCL 21R
Speedvac	Thermo Scientific
Spektrofotometre	Biostar
Terazi	RADWAG WTC 2000
Transmisyon Elektron Mikroskobu	FEI Tecnai™ G2 Spirit BioTwin
Ultrasaf su	Sartorius arium pro
Ultrasonik banyo	Medisson Ultrasonic Cleaser Bandelin Sonorex
UV lamba	CAMAG Vilber Lourmat CN-15.LM
Vakum pompası	İLMVAC

3.4. *In Vitro* Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Biyolojik aktivite çalışmalarının tamamı *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite çalışmaları ve enzim aktivite çalışmaları olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır.

3.4.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikal Süpürücü Kapasite Tayini

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürücü kapasite tayini, ticari olarak üretilen, menekşe renginde ve kromojen bir radikal olan DPPH'nin antioksidan madde tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır (220, 221).

M. communis'in MCE, MCI ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarının farklı konsantrasyonları ve 1 mM DPPH çözeltisi etanolde hazırlanmıştır. Numunelerden 150 µL alınarak üzerine 50 µL 1 mM DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve sonrasında 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Kontrol olarak etanol, standart madde olarak kersetin kullanılmıştır. Radikal süpürücü kapasite % inhibisyon değeri olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100 \quad (3.2.)$$

Formülde A_{kontrol} , kontrolün absorbansını; $A_{\text{örnek}}$, test edilen örneğin absorbansını ifade etmektedir.

Ekstre ve fraksiyonların %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonları (IC_{50} değerleri), % inhibisyon grafiklerinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

ABTS Radikal Katyonu Süpürücü Aktivite Tayini

ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)) radikal katyonu süpürücü aktivite tayini Re ve ark. (224) tarafından geliştirilmiş ve ABTS radikal katyonunun ($ABTS^{\bullet+}$) bir antioksidan tarafından indirgenerek mavi-yeşil rengini kaybetmesi esasına dayanmaktadır. Antioksidan kapasite, sentetik bir antioksidan olan E vitamininin suda çözünen analogu troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman 2-karboksilik asit) eşdeğeri (TE) olarak ifade edilmektedir (225).

Çalışmada 7 mM ABTS ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltileri 1:0,5 oranında karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 12-16 saat bekletilmiştir. Meydana gelen ABTS⁺ çözeltisi 734 nm’de absorbanı 0,70 olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. Ekstre ve fraksiyonların etanol ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinden 20 µL alınarak 96 kuyucuklu mikropklara aktarılmış ve üzerine 200 µL ABTS⁺ çözeltisi ilave edilmiştir. Karanlıkta 6 dakika inkübe edildikten sonra 734 nm’de absorbanları ölçülmüştür. Kontrol olarak etanol, standart madde olarak troloks kullanılmıştır. İnhibisyon yüzdeleri referans madde kullanılarak oluşturulan grafiğin doğru denklemi kullanılarak troloks eşdeğeri olarak hesaplanmıştır ve antioksidan aktivite mg TE/g ekstre olarak ifade edilmiştir. Radikal süpürücü kapasite % inhibisyon değeri olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\%İnhibisyon = [(A_{Kontrol} - A_{Örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100 \quad (3.2.)$$

Nitrik Oksit (NO) Radikal Süpürücü Etki Tayini

Nitrik oksit radikal süpürücü etki tayini, ortamında sodyum nitroprussit ile oluşturulan nitrik oksitin antioksidan bir bileşik ile teması sonucu oluşan en stabil dönüşüm ürünü olan nitrit (NO₂⁻) konsantrasyonunun Griess reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (226, 227).

Distile suda seyreltilmiş 60 µL ekstre ve fraksiyonlara, 60 µL fosfat tamponu salin (PBS)’de çözülmüş 10 nM sodyum nitroprussit eklenerek oda sıcaklığında ve ışık altında 150 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak eşit hacimde Griess reaktifi eklenmiştir. Nitrit miktarı spektrofotometrik olarak 577 nm’de ölçülmüştür. Hesaplanan % inhibisyon değerlerinden yola çıkılarak %50 inhibisyona neden olan antioksidan konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hesaplanmıştır. Nitrik oksit süpürücü kapasite % inhibisyon değeri olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\%İnhibisyon = [(A_{Kontrol} - A_{Örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100 \quad (3.2.)$$

Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) tayini Apak ve ark. (228) tarafından geliştirilmiştir. Yöntemin esası, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'in bakır (II) ile oluşturduğu kromojenik bir oksidan olan bakır (II) neokuproin (Cu(II)-Nc) kompleksinin, antioksidan varlığında 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır (I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) şelatına indirgenmesine dayanmaktadır.

50 µL bakır(II)klorid çözeltisi, 50 µL neokuproin çözeltisi ve 50 µL amonyum asetat tampon çözeltisi (1M, pH 7.0) 96 kuyucuklu mikroplak içerisinde karıştırılmıştır. 25 µL farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ekstre ve fraksiyonlar ile 25 µL distile su eklenmiştir. 30 dakikalık karanlıkta inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Kontrol olarak etanol, referans madde olarak gallik asit kullanılmıştır. İnhibisyon yüzdeleri standart madde kullanılarak oluşturulan grafiğin doğru denklemi kullanılarak gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar mg GAE/g ekstre olarak ifade edilmiştir. Antioksidan kapasite % inhibisyon değeri olarak aşağıdaki formüle ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100 \quad (3.2.)$$

Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç tayini antioksidanın ortamda Fe⁺³ iyonlarını Fe⁺² iyonlarına indirgemesiyle oluşan Prusya mavisi kompleksinin absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (229). Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir.

Ekstre ve fraksiyonların farklı konsantrasyonlarda çözeltileri etanolde çözümlenerek hazırlanmıştır. 20 µL ekstre, 50 µL 0,2 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.6) ve %1'lik potasyum ferrisiyanür ile karıştırılmıştır. Karışım 50°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon karışımına 50 µL %10'luk trikloroasetik asit eklenerek reaksiyon karışımı asidik hale getirilmiştir. Karışım çalkalandıktan sonra 50 µL distile su ve 10 µL %0,1'lik demir (III) klorür, bu karışımın 50 µL'sinin üzerine eklenmiştir. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında 700 nm'de absorbanslar ölçülmüştür. Standart olarak kersetin kullanılmıştır. İnhibisyon yüzdeleri referans madde kullanılarak

oluşturulan grafiğin doğru denklemi kullanılarak kersetin eşdeğeri (KE) olarak hesaplanmış ve sonuçlar mg KE/g ekstre olarak ifade edilmiştir. Antioksidan güç % inhibisyon değeri olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Ömek}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100 \quad (3.2.)$$

3.4.2 Enzim İnhibisyon Testleri

Tirozinaz Enzim İnhibisyon Tayini

Tirozinaz enzim inhibisyonu Masamoto ve ark. (230) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmesiyle tayin edilmiştir. L-Dopa'nın substrat olarak kullanıldığı yöntemin esası, substratın enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan dopakromun absorbansının 475 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır

Tirozinaz enzim inhibisyon tayini için 0,1 mL mantar tirozinaz çözeltisi (1,375 U/mL), 0,9 mL 1/15 M fosfat tamponu (pH 6.8) ve 1 mL aynı tampon veya tampon olmadan ekstre veya fraksiyon ile karıştırılmıştır. 10 dakika süreyle 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. %0,03'lük L-Dopa çözeltisinden 1 mL eklenmiştir. 25°C'de 2 dakikalık ikinci bir inkübasyondan sonra 475 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Standart madde olarak kojik asit kullanılmıştır. Tirozinaz enzim inhibisyonu tayini % inhibisyon olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Kör}}) - (A_{\text{numune}} - A_{\text{Kör}}) / (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Kör}})] \times 100 \quad (3.3.)$$

Formülde, A_{Kontrol} kontrolün absorbansını; A_{numune} , test numunesinin absorbansını; $A_{\text{kör}}$, körün absorbansını ifade etmektedir.

Ekstre ve fraksiyonların konsantrasyonlara karşı inhibisyon değerleri, % inhibisyon olarak ve bu değerlerden yola çıkılarak IC_{50} değerleri olarak ifade edilmiştir.

Kolajenaz Enzim İnhibisyon Tayini

Kolajenaz enzim inhibisyonu, enzimin substrat olarak kullanılan maddeyi hidrolize etmesi sonucu açığa çıkan 2-furanakriloil grubunun 335 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin

edilmiştir. Enzim kaynağı olarak *Clostridium histolyticum* kolajenaz enzimi (Tip IA; EC 3.4.23.3) kullanılırken, substrat olarak N-(3-[2-furil]akrilolil)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) kullanılmıştır (231).

Clostridium histolyticum kollajenaz enzimi 50 mM trisin tamponu ile (10 mM CaCl₂ ve 0,4 mM NaCl, pH 7.5) içerisinde 0,8 ünite/ mL olacak şekilde çözülmüştür. Substrat olan FALGPA'nın aynı tamponda 2 mM olacak şekilde çözeltisi hazırlanmıştır. 25 µL tampon, 25 µL distile su ya da ekstre veya fraksiyon ve 25 µL enzim karışımı hazırlanmış ve 15 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 50 µL substrat eklenmiştir. Absorbansı 20 dakika süresince her beş dakikada bir olmak üzere 340 nm'de ölçülmüştür. Standart madde olarak epigallokateşin gallat kullanılmıştır. Kolajenaz enzim inhibisyonu tayini % inhibisyon olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Kör}}) - (A_{\text{numune}} - A_{\text{Kör}}) / (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Kör}})] \times 100 \quad (3.3.)$$

Formülde, A_{Kontrol} kontrolün absorbansını; A_{numune} , test numunesinin absorbansını; $A_{\text{Kör}}$, körün absorbansını ifade etmektedir.

Ekstre ve fraksiyonların konsantrasyonlara karşı inhibisyon değerleri, % inhibisyon olarak ve bu değerlerden yola çıkılarak IC₅₀ değerleri olarak ifade edilmiştir.

Elastaz Enzim İnhibisyon Tayini

Elastaz enzim inhibisyonu, enzimin substrat olarak kullanılan maddeyi hidrolize etmesi sonucu açığa çıkan *p*-nitroanilin bileşiğinin 410 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Enzim kaynağı olarak domuz pankreatik elastaz (Tip IV) enzimi (EC 3.4.21.36) kullanılırken, substrat olarak N-Suc-(Ala)₃-*p*-nitroanilit kullanılmıştır (232, 233).

Yönteme göre 0,2 M, pH'sı 8'e ayarlanmış Tris tampon çözeltisinde ekstre ve fraksiyonların farklı konsantrasyonları oluşturulmuştur. 100 µL elastaz enzimi ve 100 µL 0,8 mM N-Suc-(Ala)₃-*p*-nitroanilit ve 50 µL Tris-HCl tamponunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış bitki ekstresi veya fraksiyon içermektedir. Numuneler

enzimle 20 dakika ve 25°C’de inkübasyona bırakılmış ve sonrasında substrat ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Absorbans 420 nm’de UV spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Standart madde olarak oleanolik asit kullanılmıştır. Elastaz enzim inhibisyonu tayini % inhibisyon olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Kör}}) - (A_{\text{numune}} - A_{\text{Kör}}) / (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Kör}})] \times 100 \quad (3.3.)$$

Formülde, A_{Kontrol} kontrolün absorbansını; A_{numune} , test numunesinin absorbansını; $A_{\text{Kör}}$, körün absorbansını ifade etmektedir.

Ekstre ve fraksiyonların konsantrasyonlara karşı inhibisyon değerleri, % inhibisyon olarak ve bu değerlerden yola çıkılarak IC_{50} değerleri olarak ifade edilmiştir.

3.4.3 Hücre Canlılığı Tayini

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri, 25 cm²’lik steril hücre kültürü flasklarında, %10’luk fetal sığır serumu, %1’lik L-glutamin, %1’lik Penisilin/Streptomisin ve %1’lik non-esansiyel aminoasit içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; yüksek glukoz, 4 mM L-Glutamin, fenol kırmızısı) kültür ortamında %5 oranında CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler, flaskı %80 oranında kapladıklarında Tripsin/Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) ile kaldırılarak ihtiyaç duyulan grup sayısına göre pasajlanmış ve MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] deneyleri için 96 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuk yüzeyini kaplama oranı yaklaşık %80 olduğunda besiyerleri uzaklaştırılarak ekstre, fraksiyon ve saf bileşikler artan konsantrasyonlarda hücre içeren kuyucuklara uygulanmıştır. Hücreler numunelerin uygulanmasından sonra 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda besiyeri uzaklaştırılarak 5 mg/mL konsantrasyonda MTT çözeltisi (PBS içerisinde çözülmüş) kuyucuklara eklenmiştir. 4 saat inkübe edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Formazan kristalleri dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek çözülmüştür. 5 dakika boyunca çalkalanmıştır. 577/655 nm’de spektrofotomerik olarak absorpsiyonları ölçülmüştür. Hücre canlılığının kolorimetrik ölçümüne dayanan MTT deneyi ile ekstre, fraksiyon ve saf bileşiklerin çözücü kontrol grubuna göre % canlılık seviyesinde anlamlı azalmaya neden olduğu konsantrasyonlar belirlenmiştir.

Her numune için 3 farklı deneyin ortalaması hesaplanmıştır. Her deney kendi içerisinde 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Her numunenin % inhibisyon değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.2.)$$

M. communis'ten izole edilmiş kersitrinin (MC-05) miktarı yeterli olmadığından, hücre canlılığı tayinine dahil edilememiştir.

3.4.4. Western Blot Analizi

Western Blot, özgül protein miktarının saptanması için kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Konsantrasyonları bilinen proteinlerde Western Blot ile semikantitatif miktar tayini yapılır. Tez çalışması kapsamında ekstre ve fraksiyonların α -sinüklein protein miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Öncelikle; örneklerin yükleneceği ideal miktarın belirlenmesi için optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla tek bir örneğin artan miktarları jelle yüklenerek proteinin doygunluğa ulaştığı miktar saptanmıştır. Yapılan optimizasyon çalışması sonrasında her örnekten 360 μg yüklenmesine karar verilmiştir.

α -Sinüklein Fibril Proteinin Hazırlanması

Yabani-tip insan α -sinüklein fibrilleri Bilkent Üniversitesi, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi, Şeker Laboratuvarı'nda PBS içerisinde üretilmiştir. Fibrillerin hücre içine girebilmesi için fibrillerin kısa uzunluğa kırılmasını sağlayan sonikasyon işlemi de Şeker Laboratuvarı, hücre kültüründe, biyogüvenlik düzeyi-II kabin (BSL-II) altında gerçekleştirilmiştir.

Fibrillerin hücre içine girebilmesi ve seeding ile α -sinüklein patolojisini oluşturabilmesi için sonikasyon ile 50-200 nm uzunluğa kırılmalıdır. Sonikasyon deneyi, prob sonikatörü, mikro uçlu prob ve steril santrifüj tüpleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonikasyon oda sıcaklığında, 1 dakika boyunca 5 saniye açık (on)/ 5 saniye kapalı (off) darbe süresi uygulanarak 20 kere tekrar edilmiştir. Kırılan fibrillerin tekrar fibrilizasyonuna neden olan aşırı ısınmayı önlemek için her 1 dakikalık sonikasyon arasında 1 dakika beklenilmiştir. Sonikasyon sırasında santrifüj tüpü çeperine sıçrayan sıvıyı toplamak için 2000 rpm'de 1 saniye boyunca santrifüj

edilmiştir. Sonike fibriller steril endorf tüplere alikotlanarak -80°C’de saklanmıştır. Sonikasyon sonrası, BSL-II kabininin ve prob ucunun tüm yüzeyi önce % 1 sodyum dodesil sülfat ile ve ardından %70’lik etanol ile temizlenmiştir. Daha sonra ultraviyole ışık kullanılarak 15 dakika sterilize edilmiştir.

α -Sinüklein Fibril Proteinin Karakterizasyonu

Sonike edilen fibrillerin 50-200 nm uzunluğa kırıldığı transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak incelenmiştir. Formvar ve karbon kaplı, 200-mesh içeren bakır gridler (Ted Pella Inc., 1801) kullanılmıştır.

Temiz ve hidrofobik bir çalışma yüzeyi hazırlamak için banko parafilm ile kaplanmıştır. Parafilm üzerine 2 damla 200 µL steril filtrelenmiş distile su damlatılmıştır. İnce uçlu kilitlenebilir forseps ile tutulan grid, belirtilen distile su damlaları üzerinde ikişer dakika inkübe edilerek yüzeyi yıkanmıştır. Sonrasında grid sonike edilen fibril damlasının üzerinde 3 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Kontrast oluşturan negatif boyama için, gridler birer dakika boyunca iki farklı %1’lik uranil asetat damlası üzerinde karanlıkta inkübe edilmiştir. Uranil asetat kalıntısı filtre kağıdıyla gridin kenarından uzaklaştırılmıştır. Birer dakika olmak üzere grid yüzeyi iki kere distile su damlası üzerinde yıkanmıştır. Gridler, görüntüleme gerçekleştirilene kadar bir grid kutusunda (Ted Pella Inc.) oda sıcaklığında saklanmıştır. TEM görüntüleme, hizmet alımı yapılarak Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Gridin tüm yüzeyi taranarak farklı bölgelerinden fotoğraflar elde edilmiştir. Bu fotoğraflardaki fibrillerin uzunluğu Image J 1.53k programı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda uzunluğa karşılık frekans dağılımı grafiği ve ortalama uzunluk elde edilmiştir.

Deney Gruplarının Oluşturulması

İçerdiği bileşiklerin polaritesi nedeniyle MCE, MCI, MCE-Fr.A, MCE-Fr.B, MCE-Fr.C-BuOH fosfat tamponlu salinde (PBS) çözülürken MCE-Fr.E % 0,5’lik DMSO’da, MCE-Fr.F, MCE-Fr.C-Su ve MCE-Fr.D % 1’lik DMSO’da çözülmüştür. Çözücü kontrol grubu olarak PBS, % 0,5 ve % 1’lik DMSO kullanılmıştır. Uygulanan son konsantrasyonlarda DMSO oranı % 0,1’i geçmemiştir. MTT sonuçlarına göre

hücre canlılığında % 80'in altında kalan değerler sitotoksik kabul edilmiştir ve her bir maddenin sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyonu belirlenmiştir.

6 kuyulu steril petrilere ekilen hücelere α -sinüklein fibrilleri Gao ve ark. (234) tarafından yapılmış çalışmada belirtildiği gibi 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 4 gün boyunca uygulanmıştır. Belirtilen bitki fraksiyonları ise fibril inkübasyonunun 3. gününde uygulanmış ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda Western Blot ile toplam α -sinüklein protein düzeyinin incelenmesi için hücrelerin toplam protein lizatı elde edilmiştir.

Hücrelerden Toplam Protein Lizatlarının Elde Edilmesi ve Protein Tayini

α -Sinüklein fibril uygulaması ve bitki ekstre/fraksiyon tedavilerinin hemen bitiminde Western blot ile protein düzeyinde meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için hücrelerin morfolojik özellikleri faz-kontrast mikroskopunda kontrol edilmiştir. Soğuk proteaz inhibitörleri içeren 1X *Radioimmunoprecipitation Assay* lizis tamponu hazırlanmıştır. İlk olarak 6 kuyucuklu petrilere besiyeri aspire edilmiştir ve 1000 μL steril soğuk PBS eklenerek bir kez yıkama yapılmıştır. Kuyulara 120 μL lizis tamponu eklenerek hücre sıyırıcı yardımıyla hücreler yüzeyden toplanmış ve steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Toplanan hücreler buz üzerinde inkübe edilerek 30 dakika boyunca pipetaj yapılmıştır. Hem lizis tamponu aracılı hem de mekanik olarak hücre membranının parçalanması sağlanmıştır. Ependorf içindeki hücreler soğutmalı santrifüjde 14,000 g'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir ve süpernatantlar yeni ependorflara aktarılmıştır.

Süpernatantlarda, Western Blot öncesi konsantrasyonu belirlemek için protein tayini yapılmıştır. Protein konsantrasyon tayininde; *Bradford Protein Assay Kit* kullanılmıştır. Kitin protokolüne göre; belirli konsantrasyonlarda hazırlanan albüminin absorbans değerleri ölçülerek, denklemi bilinen bir doğru elde edilmiştir. Bu denklemde konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorbans değerleri formüldeki yerlerine konularak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır. Bradford yöntemi ile total protein miktarları hesaplanan lizatlar Western blot deneylerinde kullanılmak üzere -80°C ' de saklanmışlardır.

Bu aşamalardan sonra β -merkaptoetanol ile *Laemmli* tamponu 1:10 oranında karıştırılarak 4x örnek tamponu hazırlanmıştır. Hücre lizatlarının her birinden eşit

miktarda (360 µg) protein içeren örnekler alınmıştır ve 4x örnek tamponu ile ependorflar içinde karıştırılmıştır. Bütün kuyucuklarda eşit hacmi sağlamak için kalan miktar distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler 95°C'ye ayarlanmış kuru ısı bloğunda 5 dakika boyunca kaynatılmış ve 10 saniye kadar -20°C'de hızlıca soğutulmuştur. Örnekler laboratuvarında hazırlanan % 15'lik poliakrilamid jellerin kuyucuklarına yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa moleküler ağırlık belirteci yüklendikten sonra diğer kuyucuklara örnekler yüklenmiştir. Yürütme işlemi 100 V'da 120 dakika boyunca MES tamponunda gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin membrana transferleri için jel boyutuna uygun olarak polivinilidin florür membran kesilerek aktivasyon için soğuk metanolde 5 dakika bekletilmiştir. PVDF membran ve Wattmann kağıtları transfer tamponunda 20 dakika bekletilmiştir. Jeldeki proteinlerin membrana geçmesini sağlamak için Whatman kağıtları arasına membran alta ve jel üste yerleştirilmiştir. Tek membran için akım şiddeti 120 mA olacak şekilde 2 saat 45 dakika yarı-kuru (*semi-dry*) transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer aşamasının ardından, α -sinüklein proteinin membrana fiksasyonunu sağlamak için % 0,4'lük paraformaldehit ile membran oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir (235). Ardından, non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla membranlar, % 0,1'lik Tween-20 eklenmiş tris-tamponlu tuz çözeltisi (TBS-T) içindeki %5'lik süt tozu çözeltisinde, çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklanmışlardır. Bloklama aşaması tamamlandıktan sonra membranlar α -sinüklein antikoru % 5'lik süt tozu: TBS-T çözeltisi içerisinde 4°C'de gece boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Primer antikorla inkübasyondan sonra membranlar üç kez 10 dakika boyunca TBS-T çözeltisi ile yıkandıktan sonra, *horseradish peroxidase* konjüge *goat anti-mouse* sekonder antikorunu içeren %5'lik süt tozu: TBS-T çözeltisi içinde oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde membranlar üç kez 10 dakika boyunca TBS-T çözeltisi ile yıkılarak distile su içerisine bırakılmıştır. Protein bantları, kemiluminesans çözeltisi ile muamele edilerek membran görüntüleme cihazında görüntülenmişlerdir. İşlemin ardından membranlar üç kez 5 dakika boyunca TBS-T ile yıkılarak kemiluminesansın etkisi sonlandırılmıştır. Yükleme kontrolünün var olan bantlarla çakışmasını engellemek için kimyasal soyma (*stripping*) aşamasına geçilmiştir. Membranlar 10 dakika boyunca *Stripping* çözeltisi (pH= 2,2) ile muamele edilmiş, iki

kez 5 dakika boyunca PBS ve ardından TBS-T ile yıkanmışlardır. Yükleme kontrolü olarak %5'lik süt tozu:TBS-T çözeltisi içindeki β -tubulin-III antikoru ile membranlar oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membranlar, üç kez 5 dakika boyunca TBS-T ile yıkanmış ve HRP konjüğe *goat anti-rabbit* antikoru ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bantların optik dansitesi (O.D.) ImageJ 1.53k programı kullanılarak ölçülmüştür. α -sinüklein bantlarından elde edilen O.D. değerleri, her bandın kendi β -tubulin-III O.D. değerlerine oranlanarak normalize edilmiştir. Sonuçlar grafiklerde rölatif (göreceli) yoğunluk olarak ifade edilmiştir.

İstatiksel Analiz

Western Blot analizinde çoklu grupların istatistiksel karşılaştırılması GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Sadece istatistiksel olarak anlamlı bulunan farklar belirtilmiştir, $p < 0.05$ 'ten küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.5. *In Silico* Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Hedef proteinin hazırlanmasında α -sinüklein:3Q28 Zhao ve ark.'a (236) ait kristal yapı RCSB Protein Databank (237)'tan edinilmiştir. Proteinin analize hazırlanmasında Maesrto 13.0 programı kullanılmıştır. Bu aşamada tüm su atomları silinmiş ve polar hidrojen atomları eklenmiştir. Ayrıca tez çalışması dahilinde izole edilerek yapıları aydınlatılan 6 adet bileşiğin bağlanabilmesi için protein üzerindeki ligandın kodları silinmiştir. Yine ligandlarımızın bağlanabilmesi için gereken bağlanma bölgesine ait koordinatların belirlenmesinde Priya ve ark. (238) tarafından yapılan çalışma temel alınmıştır. Buna göre grid box 66 x 66 x 76 Å olarak; merkezi ise x, y, z ; -9.943, 7.116, -12,779 olarak belirlenmiştir. Ligandların hazırlanmasında ise analizde yer alacak tüm bileşiklerin 3 boyutlu yapılarının hazırlanması, stabilizasyonu ve PDB formatına getirilmesinde Avogadro ver.1.94.0 programı kullanılmıştır (239). Bileşiklerin geometri optimizasyonu ise MMFF94 kuvvet alanı ile oluşturulmuştur.

Moleküler kenetleme hesaplamalarının yapılabilmesi içinse temel yazılım Autodock4 ve program olarak AutodockTools-1.5.7rc1 kullanılmıştır (240).

Kenetleme çalışmalarında Lamarckian Genetik Algoritması seçilerek 50 çalıştırma (Run) ve 2.500.000 enerji hesaplaması (max number of evals) tercihleri ile hesaplamalar yapılmıştır. Çıktı olarak verilen Docking log (.dlg) dosyası en düşük bağlanma enerjisi ve küme sayısı ile ilgili bilgi sunmaktadır. Elde edilen sonuç dosyalarında en yüksek sayıda konformasyona sahip olan kümedeki en düşük bağlanma enerjisi sonuç olarak verilmiştir. Sonuçlara ait bağlanma enerjisi değerlerinin gözlenmesi ve en iyi bağlanmaya ait molekül-protein etkileşiminin görselleştirilmesi için BIOVIA Discovery Studio 2021 Client programı kullanılmıştır.

3.6. Farmakope Analizleri

Farmakope analizleri kapsamında makroskobik ve mikroskobik analizler ile birlikte Türk Farmakopesi'nde 2.8. Farmakognozik Yöntemler bölümünde yer alan hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini, toplam kül miktar tayini, yabancı madde tayini, stoma ve stoma indisi, şişme indisi, uçucu yağ miktar tayini ve kurutmada kayıp analizleri yapılmıştır.

Her bir farmakope analizi 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Bitkinin monografının bulunmaması nedeniyle farmakopede bulunan diğer yaprak droglarının monografıları referans alınmıştır ve yapılan analizler doğrultusunda *M. communis* yaprağının monografının ön çalışmasının oluşturulması hedeflenmiştir.

3.6.1 Makroskobik ve Mikroskobik Analiz

Makroskopik inceleme çıplak göz ve stereomikroskop ile yapılmıştır. Bitkisel droğun taşınması gereken özellikler olan şekil, boyut, renk gibi morfolojik özellikler incelenmiştir. Mikroskopik incelemesi ise Türk Farmakopesi 2017 “Analiz Yöntemleri” başlığı altında yer alan ‘Bitkisel Drogların Mikroskobik İncelenmesi’ (2.8.23.) yöntemi dikkate alınarak yapılmıştır. “Bitkisel Droglar” için 07/2017:1433 Genel Bölüm’de verilen parçalanma derecesi bilgilerine göre kurutulmuş bitkisel drog mikroskobik analizler için 1 g tartılmış ve kabaca toz edilmiştir. Toz haline getirilen numuneler reaktifle muamele edilip mikroskop altında incelenmiştir.

Stoma ve Stoma İndisi Tayini

Stoma ve stoma indisinde yaprak alt ve üst epidermisinde 10 adet örnek alınmış, stoma indisleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Stoma indisi} = \left[\frac{S}{S+E} \right] \times 100 \quad (3.1.)$$

Formüldeki S, yaprağın belirli alanındaki stoma sayısını; E, yaprağın aynı alanındaki (tüyleri de taşıyan) epiderma hücreleri sayısını ifade etmektedir.

3.6.2 Farmakope Sınır Testleri

Yabancı Madde Tayini

Droğun taşınması kabul edilebilecek yabancı madde miktarının maksimum değeri, Türk Farmakopesi 2017 “Analiz Yöntemleri” başlığı altında yer alan ‘Yabancı Madde’ (2.8.2.) yöntemi dikkate alınarak tayin edilmiştir. Buna göre, bitkisel droglar küf, böcek ve diğer hayvan artıklarını taşımamalıdır. Bitkisel droglarda iki tip yabancı madde tanımlanmıştır. Bunlardan ilki yabancı organlardır ve drog elde edilen bitkiden gelen ancak bitkisel drog olarak tanımlanmayan kısımlardır. İkincisi ise yabancı elementler olup drog elde edilen bitkiye ait olmayan ve bitkisel veya mineral kaynaklı maddelerdir.

Numuneden değerlendirme için öngörülen en düşük miktar alınarak ince bir tabaka halinde yayılır. Yabancı madde çıplak göz veya (6x) büyütmeli mercek ile incelenir. Yabancı maddeler ayrılır, tartılır ve yüzdesi hesaplanır. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılır.

$$\% \text{Yabancı madde miktarı} = \frac{a \times 100}{b} \quad (3.4.)$$

Yukarıdaki formülde yer alan a, drogta tespit edilen yabancı maddelerin toplam ağırlığını; b, incelemeye önceki droğun ağırlığını ifade etmektedir.

Kurutmada Kayıp

Droğun kurutmada kayıp tayini için maksimum değer sınırını belirlemek üzere Türk Farmakopesi 2017 “Analiz Yöntemleri” başlığı altında yer alan ‘Kurutmada Kayıp’ (2.2.32.) yöntemi dikkate alınarak analiz yapılmıştır.

Kurutmada kayıp için, toz edilmiş numuneden (355) (2.9.12) 1 g tartılarak etüvde ısıtılarak sabit ağırlığa getirilmiş ve darası alınmış cam kapaklı tartı kabının içine yerleştirilmiştir. Etüvde 105°C'de 120 dakika tutulmuştur. Daha sonra desikatöre alınarak soğutulmuş ve tartılmıştır. İşlemlere sabit vezne gelinceye kadar devam edilmiştir. Numunede % (ağırlık/ağırlık) cinsinden nem miktarı hesaplanmıştır. Analiz üç kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

Sonuçlar % değer olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{Kurutmada kayıp} = [(b-c) \times 100] / (b-a) \quad (3.5.)$$

Yukarıdaki formülde yer alan a, krozenin ağırlığını; b, drogla birlikte krozenin ağırlığını; c, kurutma sonrası drogla birlikte krozenin ağırlığını ifade etmektedir.

Toplam Kül Miktar Tayini

Droğun toplam kül miktarı için maksimum değer sınırını belirlemek üzere Türk Farmakopesi 2017 “Analiz Yöntemleri” başlığı altında yer alan ‘Toplam Kül’ (2.4.16.) analizi yapılmıştır.

Toplam kül miktar tayininde sabit ağırlığa getirilmiş krozelerin içine toz edilmiş numune (355) (2.9.12) 1 g olacak şekilde tartılmıştır. 600°C’lik fırında yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Fırından çıkartılıp desikatöre alınan numuneler soğumaya bırakılmış ve tartılmıştır. Sabit ağırlığa gelinceye kadar işleme devam edilmiştir. Numunede % (ağırlık/ağırlık) cinsinden kül miktarı hesaplanmıştır. Analiz üç kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

Değerin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\% \text{Toplam kül} = [(b-c) \times 100] / (b-a) \quad (3.6.)$$

Yukarıdaki formülde yer alan a, krozenin ağırlığını; b, drogla krozenin ağırlığını; c, yakma sonrası kül ile krozenin ağırlığını ifade etmektedir.

Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

Droğun hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı için maksimum değer sınırını belirlemek üzere Türk Farmakopesi 2017 “Analiz Yöntemleri” başlığı altında

yer alan ‘Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül’ (2.8.1.) yöntemi kullanılmıştır. Hidroklorik asitte çözünmeyen kül, sülfat külünün veya toplam külün hidroklorik asit ile ekstre edilmesiyle elde edilen artıklardır.

Toplam kül analizinden elde edilen artığı taşıyan krozeye 15 mL su ve 10 mL hidroklorik asit eklenmiştir. Üzerine saat camı kapatılmış ve hafif bir şekilde bek alevinde 10 dakika kaynatılmıştır. Karışım soğuduktan sonra kül bırakmayan süzgeç kağıdından süzümüştür. Süzgeç kağıdı üzerinde kalan artık sıcak su ile süzüntü nötr oluncaya kadar yıkanmıştır. Kurutulan kalıntı içeren süzgeç kağıdı sabit tartım sonrası darası alınmış kroze içerisinde 600°C kül fırınında yakılmıştır. Kroze, soğuması için desikatöre alınmış, soğuduktan sonra tartımı yapılmıştır. Sabit ağırlığa gelene kadar bu işlem yinelenmiştir. Sabit ağırlığa geldikten sonra kaydedilen değerlerin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\% \text{Toplam kül} = [(b-c) \times 100] / (b-a) \quad (3.6.)$$

Yukarıdaki formülde yer alan a, krozenin ağırlığını; b, drogla krozenin ağırlığını; c, yakma sonrası kül ile krozenin ağırlığını ifade etmektedir.

Şişme İndisi

Literatür taramaları sonucunda bitkinin müsilaj içermediği anlaşılmış, bu nedenle şişme indisi tayini yapılmamıştır.

Uçucu Yağ Miktar Tayini

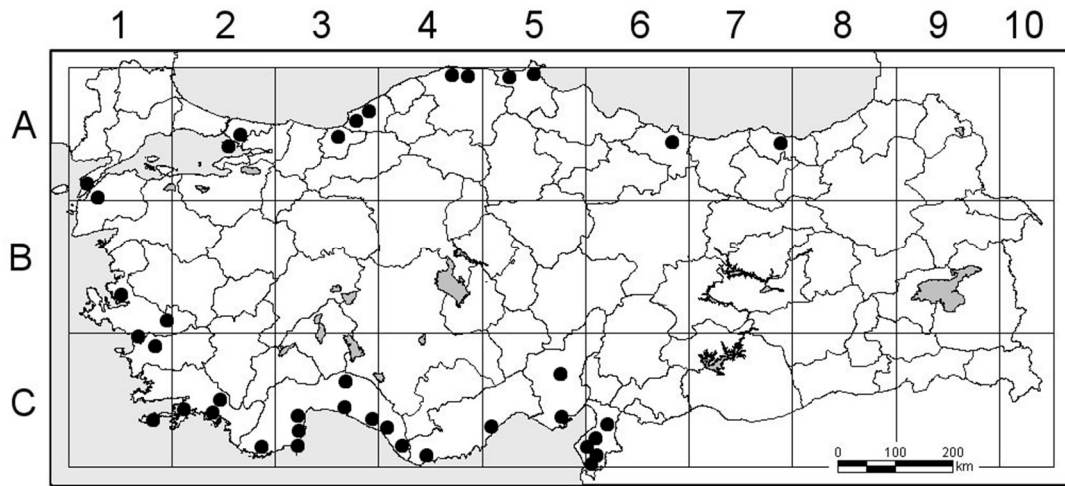
Uçucu yağ miktar tayininde toz edilmiş 30 g drog (355) (2.9.12) Clevenger cihazı kullanılarak 2 saat boyunca su distilasyonuna tabi tutulmuştur. Distilasyon süresi sonunda cihaz soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işleminden sonra dereceli kısımdan uçucu yağ miktarı ölçülmüştür. Miktar tayini yapıp sonuçlar % (hacim/ağırlık) cinsinden ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Çalışmalara ait Bulgular

Myrtus communis L. subsp. *communis*

Yayılış ve Habitat



Şekil 4.1. *M. communis* subsp. *communis*'in Türkiye'de yayılışı.

Herdem yeşil ağaç veya çalılardır. Yapraklar basit yapıda ve bütündür, nodlarda karşılıklı yer almaktadır. Lamina şekli yumurtamsı-mızraksı, laminanın boyu $2-5\pm 0,1$ cm, laminanın eni $1,21\pm 0,1$ cm lamina kenarı integer, lamina yüzeyi noktalı-glandüler, ezildiğinde aromatik kokuludur.

Çiçekler hermafrodit, tekli, 3 cm çapa kadar. Korolla 5 petal, kaliks 5 sepalden oluşur. Korolla, beyaz renkli, petallar ayrı, dairesel, 7-15 mm boyunda; kaliks yeşil renkli, sepaller ayrı, $0,14\pm 0,04$ cm boyunda. Çiçek sapları $1,5-2,5\pm 0,25$ cm. Stamen çok sayıda, anterlerin filamentlere bağlanma şekli adnat. Ginekeum sinkarp, alt durumlu ve 1 pistilli.

Çiçeklenme zamanı: Haziran-Ekim

Habitat: Kayalık yamaçlar, *Pinus brutia* ormanı, maki, kum tepeleri

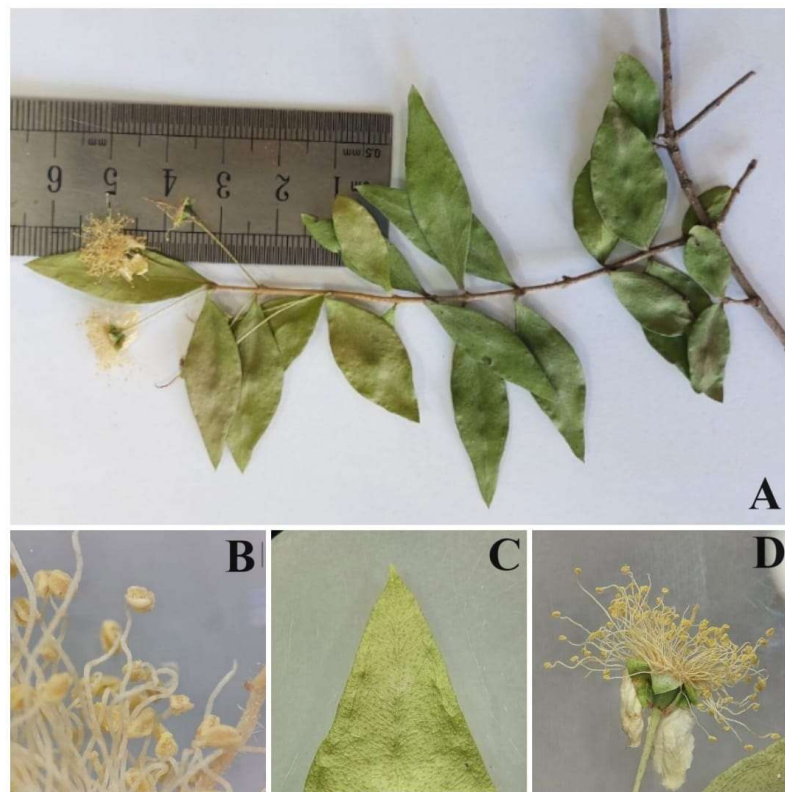
Yükseklik: 0-840 m

Yayılış: Akdeniz bölgesi. **A1** Çanakkale: Suvla, **A1** Çanakkale: Erenköy, **A2** İstanbul: Dolaiba'dan Pendik'e, İstanbul: Burgaz Ada, *Davis* (ANK 26211!), **A3** Zonguldak: Ereğli'nin 15 km güneyi, Alaplı, Zonguldak: GÖBÜ bölgesi, 100 m, 20.06.1984, *Demirörs* (ANK 1707!), Bolu: Akçakoca M.T.A. karşısı, deniz seviyesi, *Aydoğdu* 136 (ANK!), Bolu: Akçakoca, M.T.A. Karşısı, maki toplumu, deniz seviyesi, 28.07.1981, *Aydoğdu* (ANK 736!), Düzce: Akçakoca, Kale sırtları, denize bakan kısımlar, çalılık, kırlık, 15-20 m, 23.07.2002, *Doğru Koca* 1919 (GAZI!), **A4** Zonguldak: Zonguldak'ın 4-5 km Doğusu, Kastamonu: İnebolu,-Abana çıkışı, Maki top. Ana kaya: Marn, 20 m, 12.06.1990, *Yurdakulol* E4-5 (ANK 3210!), Kastamonu: Cide yolu, Kerempe Burnu, 100 m, 01.06.1978, *Ketenoğlu* (ANK 1360!), **A5** Sinop: İnce Burun, Sinop: Türkeli, Çatalzeytin'e 8. Km, 41°56'24''K, 34°15'43''D, 1 m, *Arbutus-Pinus nigra* çalılığı, killi yamaçlar, 21.10.2009, *Dönmez* 16380 (GAZI!), **A6** Ordu: Fatsa, Erinç, **A7** Trabzon: 'Çotsi', **B1** İzmir: İzmir: Dilek yarımadası, Samson Dağı, Milli Park, 200 m, 07.10.1970, *Akman* (ANK 7006!), **B2** İzmir: Birgi, Başoğlu, **C1** İzmir: Kuşadası, Muğla: Datça, çiftik yarımadası, 29.01.1993, *Tanker* (AEF 17438!), Muğla, Datça, 150 m, 18.07.1960, *Khan, Prance ve Rateliffe* (ANK 95!), Aydın: Germencik, Çamköy çevresi, yamaçlar, 200-400 m, *Cesur* (GAZI V4303!), **C2** Muğla: Köyceğiz, bahçe kenarı, 02.10.2008, *Akalın* (AEF 25231!), Muğla: Köyceğiz, Dalyan, İztuzu kumsalı, 1 m, kıyı kumsalı, 15.06.1991, *Vural, Duman, Dönmez, Şağban ve Güner* 9366 (HUB!), Muğla: Köyceğiz, Ekincik Köyü, zeytin alanı, beyaz meyve, 10 m, 02.11.1991, *Vural, Dönmez, Şağban ve Güner* 10310 (HUB 14796!), Muğla: Güllük yolu, 14.06.1969, *Tanker, Tanker ve Güley* (AEF 2879!), Muğla: Marmaris çevresi, 23.11.1974, *Tanker, Tanker ve Koyuncu* (AEF 4786!), Muğla: Marmaris'ten Datça'ya 20 km, orman yangın alanı, serpantin arazi, 100 m, 04.10.1982, *Güner, Ekim ve Koyuncu* AG 4568 (AEF 13382! HUB 14779!), Muğla: Marmaris, 10.07.1960, *Khan, Prance ve Rateliffe* (ANK 13!), Muğla: Sandraz Dağı, Ağla, *Davis* (ANK 13584!), Muğla: Köyceğiz, Hamitköy-Sultaniye Domuzdireği tepesi, 50 m, Frigana, siyah meyveli, 02.11.1991, *Vural, Duman, Dönmez ve Güner* 10302 (GAZI! HUB 14794!), Muğla: Marmaris, su deposu çevresi, *P. brutia* ormanı, 50 m, 25.07.1983, *Yıldırımılı* 5657 (HUB 14780!), *Antalya*: Kaş, 26.07.1960, *Khan, Prance ve Rateliffe* (ANK 202!), **C3** Antalya: Antalya, Antalya: Antalya-Akseki yolu, Murtiçi Köyü'ne girişte yol çevresi, 06.06.1981, *Tanker, Tanker, Şarer ve Filisulu*

(AEF 10835!), Antalya: Akseki, Mahmutlar Köyü, 700 m, 01.11.2012, *Küçükbayır* (AEF 26246!), Antalya: Akseki-Çukurköy mevki, maki, 700 m, 29.03.1996, Duran 3357 (GAZI!), Antalya: Perge harabeleri, 21.05.1971, *Karamanoğlu, Baykal, Sezik ve Koyuncu* (AEF 1656!), Antalya: Alanya, Alanya Kalesi, 100 m, 24.10.1992, *Coşkun ve Koyuncu 9555* (AEF 16857!), Antalya: Alanya, Güzelbağ-Payalar, 10.07.1984, *Ezer* (HUEF 690!), Antalya: Lara, 29.06.1938, *Grassner* (ANK 1170!), Antalya: Manavgat, Petrokent tatil köyü kumulu, 10 m, 31.07.1994, *Ekim 9409* (GAZI!), Antalya: Kemer, 20 m, 16.07.1986, Antalya: Kemer, 20 m, 16.07.1986, *Yıldırımli 9444* (HUB 14792!), Antalya: Manavgat, Manavgat Çağlayanı, ağaçlık, 10.09.1988, *Yıldırımli 11633* (HUB 14790!), Antalya: Kemer, Faselis Koyu ve çevresi, 0-150 m, 23.06.1978, *Yıldız, Kaplan ve Peşmen 4040* (HUB 14781!), Antalya: Kemer, Beycik Köyü üstü, masif kalker tabanlı G. yamaç, *Pinus brutia-Cupressus sempervirens* ormanı, 600 m, 05.10.1977, *Peşmen 3551* (HUB 14783!), Antalya: Sarısu, 10 m, 28.08.1979, *Turak ve Akkıran* (HUB 14787!), Antalya: Kumluca, Adrasan Köyü çevresi, 10 m, 08.06.1979, *Güner ve Peşmen 4428* (HUB 14786!), C4 İçel: Anamur, İçel: Anamur, Çarıklar Köyü bahçe kenarları (aşılı), 20 m, 17.10.1993, *Güneş ve Koyuncu 10702* (AEF 17819!), İçel: Anamur, Nasreddin Köyü yol kenarları, 100 m, 25.07.1979, (AEF 6730!), Antalya: Alanya, Dim Çayı Vadisi, Burçaklar Mahallesi, kalker, *Pinus brutia* açıklığı, 88 m, 27.06.2005, *Dönmez 12643* (HUB!), Antalya: Gazipaşa, Çamlıca Köyü aşağısı, 36° 20'27" K, 32°21'27" D, 147 m, bozuk makilik, 17.10.2006, *Ağar ve Dönmez 14166* (HUB!), Antalya: Alanya, Demirtaş, Çamlıca Köyü, Besleni Mahallesi, 36°27'46" K, 32°14'31" D, *Pinus brutia* açıklığı, 99 m, 14.06.2006, *Mutlu, Ağar ve Dönmez 13557* (HUB!), Antalya: Kemer, Phaselis ören çevresi, serpantin tabanlı karışık orman, 0-20 m, 07.10.1977, *Peşmen 3579* (HUB 14782!), C5 Adana: Karataş, Adana: Osmaniye: Nur Dağı, 800 m, 16.07.1984, *Coşkun Z45* (AEF 13278!), Adana: Adana-Mersin, 25.05.1958, *Çetik* (ANK 805!), İçel: Akkale, Koca Hasan, Erdemli, 26.09.1966, *Çelik* (ANK 804!), İçel: Silifke, 04.03.1939, Krause (ANK 5350!), İçel: Erdemli koruluğu, 22.04.1986, *Boran 1673* (HUB 14793!), Adana: Karsanlı, Eğner ırmak deposu, 840 m, 16.07.1972, *Yurdakul* (ANK 1730!), Mersin: Erdemli, 27.04.1986, *Şen 1008* (HUB 14784!) Adana: Silifke, cennet mevki, 20-120 m, 30.04.1988, *Gökçe* (HUB 14791!), Adana: Karataş, Yumurtalık Lagünü Tabiatı Koruma Alanı, çamlık dalyanı, kumul, 1 m, 04.06.1998,

Şağban 2481 (HUB 14789!), Hatay: Arsuz, Kurtbağı Köyü, Maki zonu, Amanos Dağı, 450 m, 02.11.1967, *Akman* (ANK 7912!), C6 Hatay: Dörtyol'dan İskenderun'a, Antakya: İskenderun, Belen'in üstü, kurumuş yamaçlar, 550 m, 29.08.1981, *Coşkun* 553 (AEF 7351!), Antakya-Bedirge: Tahtaköprü Köyü çevresi. (Amanos'ların Antakya tarafı), 200 m, 24.04.1971, *Baykal, Sezik ve Koyuncu* (AEF 1371!), Antakya: Samandağ, Çevlik, Vespasiyanus ve Titus Tüneli boyunca, Beşikli Mağarası, kayalık ve taşlık, maki, 10-150 m, 04.09.1990, *Yıldırımli* 13899 (HUB!), Hatay: Samandağı, Teknepınarı, Seldire Köyü yolu, Teknepınarı civarı, 11.07.1972, *Sezik ve Sezik* (HUEF 331!), Hatay: Dörtyol, maki zonu, Amanos Dağı, 20.09.1967, *Akman* (ANK 7911!), Hatay: Soğukoluk-İskenderun, Amanos Dağları, 24.05.1964, *Akman* (AEF 3312!), Hatay: Antakya; Harbiye, kayalıklar, 19.06.1993, *Aytaç* 5852 (GAZI!), Osmaniye: Gavur Dağı, 400 m ye kadar vadilerde, D.07.1942, *Kasaplıgil* (AEF 7609!), Osmaniye: 25.05.1935, *Krause* (ANK 4803!).

Kurutulmuş bitkinin genel görünüşü, yaprak ve çiçeklerinin morfolojik analizi yapılmıştır.



Şekil 4.2. *M. communis*'in morfolojik çalışmalarına ait bulgular.

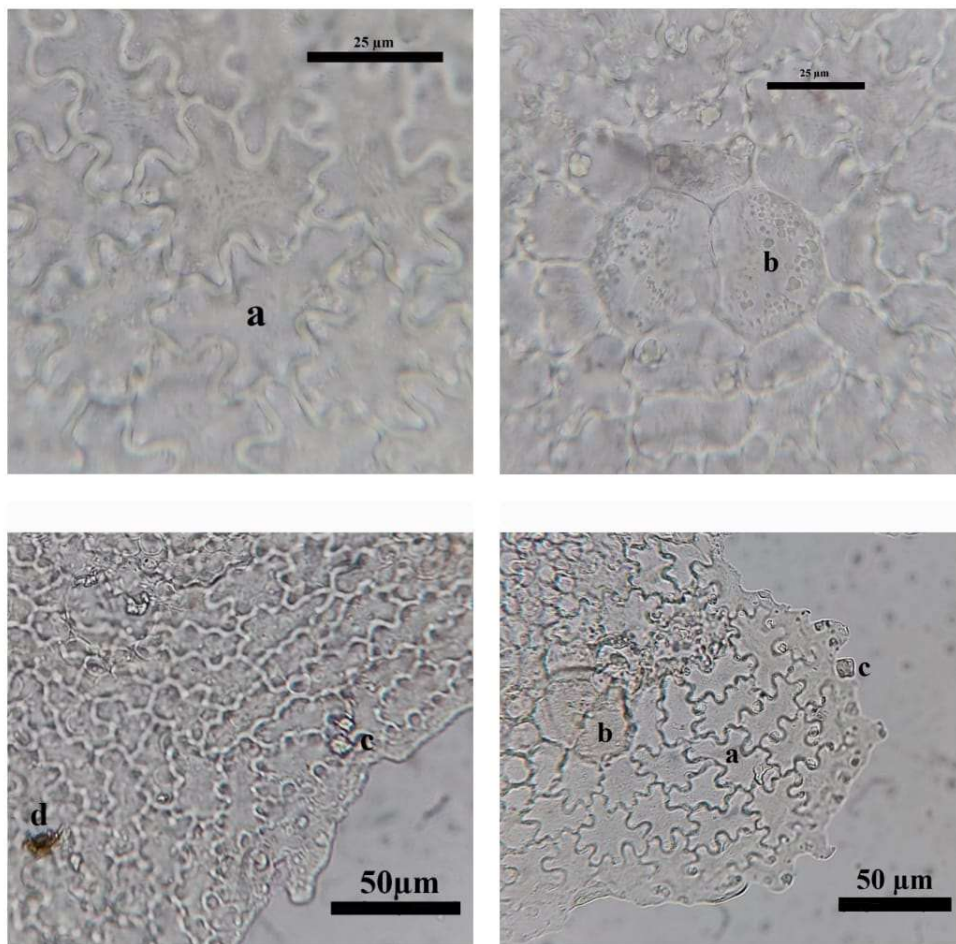
A:Bitkinin genel görünüşü, B:Erkek organ(Androkeum), C:Yaprak üst yüzeyi, D:Çiçeğin genel görünüşü.

4.2. Anatomik Çalışmalara ait Bulgular

4.2.1. Yaprak epidermisi

Yaprak üst epidermisinde düzensiz şekilli hücreler, uçucu yağ taşıyan salgı vezikülleri, tüyler, basit billurlar (kalsiyum okzalat kristalleri), yağ damlacıkları gözlenmiş fakat stoma gözlenmemiştir.

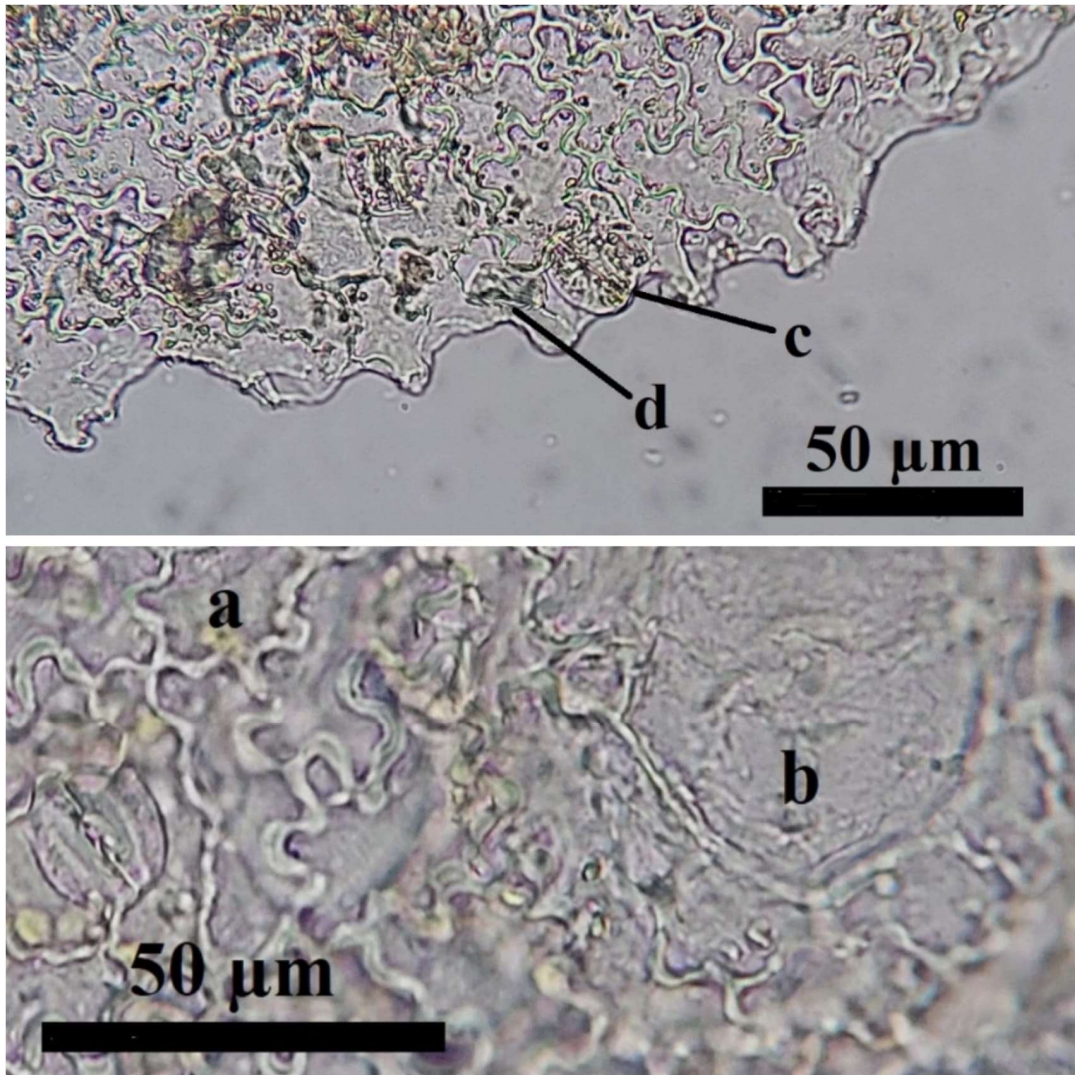
Işık mikroskobu kullanılarak elde edilen görüntüler üzerinden epidermis hücre boyutu ortalaması hesaplanmıştır. Ölçümler sonucunda üst epidermis hücrelerinin eni $61\pm 7 \mu\text{m}$ ve boyu $88\pm 10 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. *M. communis* yaprak üst epidermisin kloralhidrat reaktifi ile görüntüsü.

a: epidermis hücresi, b: salgı vezikülü, c: basit billur, d: yağ damlacığı

Yaprak alt epidermisinde düzensiz şekilli hücreler, uçucu yağ taşıyan salgı vezikülleri, tüyler, basit billurlar (kalsiyum okzalat kristalleri), druzlar, yağ damlacıkları ve stoma gözlenmiştir. Stoma ve yardımcı hücrelerin düzenlenişi esas alındığında stoma tipi anomositik tip ve stoma duvarları sinuat olarak belirlenmiştir. Işık mikroskobu kullanılarak elde edilen görüntüler üzerinden epidermis hücre boyutu ortalaması hesaplanmış, alt epidermis hücrelerinin eni $19\pm 3\ \mu\text{m}$, boyu $34\pm 5\ \mu\text{m}$ ve stoma hücrelerinin eni $18\pm 2\ \mu\text{m}$, boyu $21\pm 2\ \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. *M. communis* yaprak alt epidermisinin kloralhidrat reaktifi ile görüntüsü.

a:Epidermis hücresi, b: salgı vezikülü, c: stoma hücresi, d: basit billur.

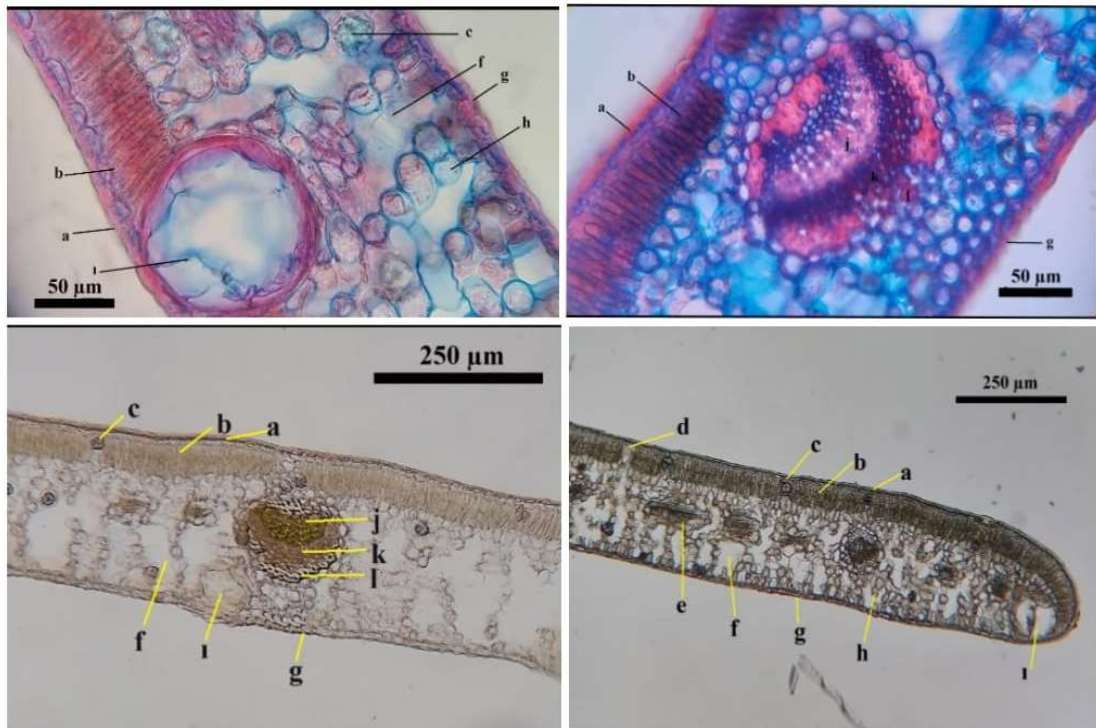
4.2.2. Yaprak enine kesiti

Yaprak enine kesitinde en dışta tek sıralı epidermis dokusu altında, iki sıralı palizat parankiması gözlenmiştir.

Uçucu yağ taşıyan salgı vezikülleri, epidermisin altında ve palizat parankiması hücrelerinin arasında yer almaktadır.

İç kısımda bir katman veya sıra halinde boşluklu sünger parankiması bulunmaktadır. İletim demetleri ksilem, floem ve alt tarafta birkaç katmandan oluşan sklerenkima hücrelerinden oluşmaktadır.

Yağ damlacıkları gözlenmiştir. Druzlar salgı veziküllerinin içinde ve palizat parankimasında gözlenmiştir. Yaprakın bifasyal (iki yüzlü) olduğu tespit edilmiştir.

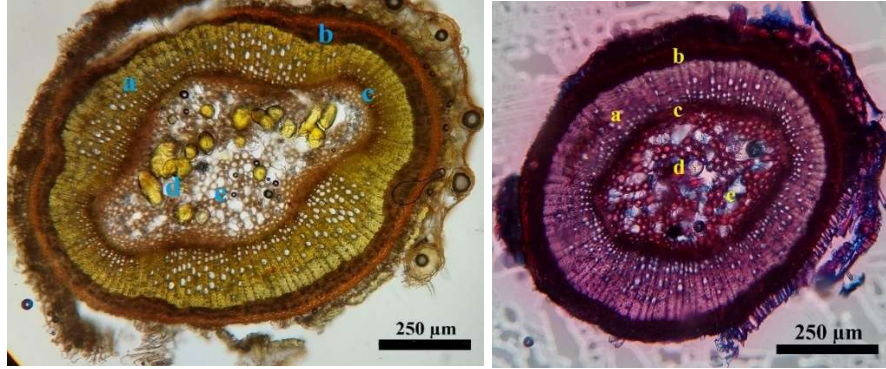


şekil 4.5. *M. communis* yaprak enine kesitinin görüntüleri.

a:üst epidermis tabakası, b:palizat parankiması, c:druz, d:stoma hücresi e:sklerenkima, f:sünger parankiması boşlukları, g:alt epidermis tabakası, h:sünger parankiması, i:salgı vezikülü j:ksilem k:floem l: sklerenkima hücresi.

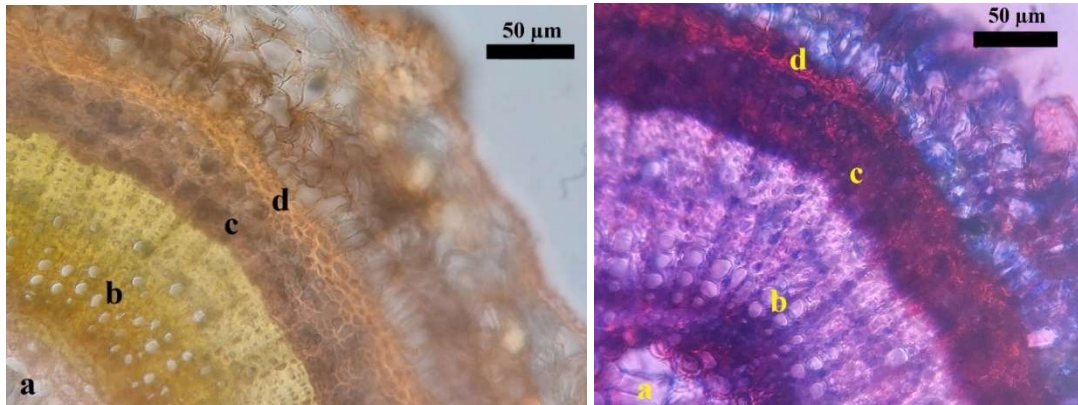
4.2.3. Dal enine kesiti

Dal enine kesitinde öz bölgesi, yırtılmış öz dokusu, ksilem, floem ve epidermis kalıntısı gözlenmiştir.



Şekil 4.6. *M. communis* dal enine kesitinin sartur reaktifi (sol) ve ikili boyama (sağ) görüntüsü

b: Floem. a:Ksilem, c:floem, d:yırtılmış öz dokusu, e:öz bölgesi.



Şekil 4.7. *M. communis* dal enine kesitinin sartur reaktifi (sol) ve ikili boyama yöntemi ile (sağ) görüntüsü.

d:epidermis kalıntısı, c:floem , b:ksilem, a:öz bölgesi

4.2. Fitokimyasal Çalışmalara ait Bulgular

4.2.1. Genel Teşhis Reaksiyonlarına ait Bulgular

M. communis'te bulunan sekonder metabolitlerin teşhisi için yapılan bu analizler Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози III Laboratuvarı dersi kapsamındaki deney yönergelerine göre yapılmıştır.

Sulu ekstre: Sulu ekstre kullanılarak saponozitlerin, antrasen türevi glikozitlerin, flavonoidlerin, tanenlerin, antosiyanin glikozitlerinin, ozların, nişasta ve kumarin gruplarının teşhis reaksiyonları yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Tablo 4.1. Sulu ekstre üzerinde yapılmış teşhis reaksiyonları ve sonuçları

Bileşik grubu	Reaksiyon sonucu	Sonuç
Saponozit	15 dakika sonunda 1 cm köpük	(+)
Steroid sapogenol	Renk değişimi gözlenmemiştir	(-)
Triterpenik sapogenol	Reaktiflerin eksikliği nedeniyle triterpenik yapıda sapogenollerin teşhisi yapılamamıştır.	
Antrasen türevi glikozit	Renk değişimi gözlenmemiştir.	(-)
Flavonoidler	Kiraz kırmızısı-mor renk renk	Flavonon ve flavonol grupları (+)
Tanen	Krem rengi çökelti	(+)
Gallik tanen	Mavi-siyah renk	(+)
Antosiyanin glikoziti	Renk değişimi gözlenmemiştir.	(-)
	Kırmızı renk	(+)
	Renk değişimi gözlenmemiştir	(-)
	Amil alkol tabakasında kırmızı renk	(+)
Oz	Kırmızı renk çökelti	(+)
Nişasta	Renk değişimi gözlenmemiştir.	(-)
Kumarin	UV ₃₆₆ 'da görülen yeşil floresan renk	(+)

Tabloda görülen (+) işareti, test sonucunun pozitif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunduğunu göstermektedir. (-) işareti test sonucunun negatif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunmadığını göstermektedir.

Bulgular sonucunda sulu ekstrede saponozit, flavonoit, gallik tanen, antosiyanin glikoziti, kumarin ve oz gruplarının bulunduğu; saponozit bileşiklerinin aglikonunun steroidal yapıda olmadığı; antrasen türevi glikozitleri ve nişasta gruplarının bulunmadığı kanıtlanmıştır.

Etanol ekstresi: Bu ekstrede kardiyoaaktif glikozit aranmıştır. Sonuçlar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir:

Tablo 4.2. Etanol ekstresinde yapılmış teşhis reaksiyonunun sonucu

Bileşik grubu	Reaksiyon sonucu	Sonuç
Kardiyoaaktif glikozit	Tabakalarda renk değişimi gözlenmemiştir.	(-)

Tabloda görülen (+) işareti, test sonucunun pozitif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunduğunu göstermektedir. (-) işareti test sonucunun negatif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunmadığını göstermektedir.

Bulgular sonucunda etanol ekstresinde kardiyoaaktif glikozit bulunmadığı kanıtlanmıştır.

Alkaloit ekstresi: Bu ekstrede alkaloit aranmasında kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir:

Tablo 4.3. Alkaloit ekstresinde yapılmış teşhis reaksiyonlarının sonuçları

Bileşik grubu	Reaksiyon sonucu	Sonuç
Alkaloit	Ekstrenin damlatıldığı yerde renk açılmıştır.	(+)
Tropan türevi alkaloitler	Renk değişimi görülmemiştir.	(-)
İzokinolein türevi alkaloitler	Renk değişimi gözlenmemiştir.	(-)
İndol türevi alkaloitler	Renk değişimi gözlenmemiştir.	(-)
Kafein	Renk değişimi gözlenmemiştir.	(-)

Tabloda görülen (+) işareti, test sonucunun pozitif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunduğunu göstermektedir. (-) işareti test sonucunun negatif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunmadığını göstermektedir.

Bulgular sonucunda, Dragendorf reaktifi ile doyurulmuş süzgeç kağıdına 2-3 damla alkaloit ekstresi damlatıldığında renk değişimi gözlenmiş ancak farklı yapıdaki alkaloit türevleri için yapılan teşhis reaksiyonları negatif sonuç verdiği için ekstrede diğer alkaloit gruplarına rastlanabileceği gibi proteik yapıdaki maddelerin de pozitif sonuç verebileceği görüşüne varılmıştır.

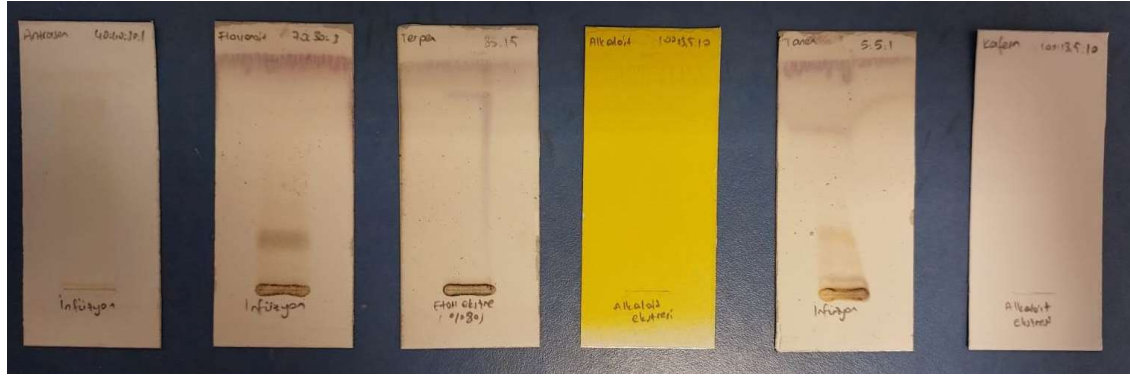
İnce Tabaka Kromatografisine ait Bulgular

3.2.1 Genel Teşhis Reaksiyonları başlığı altındaki İnce Tabaka Kromatografisi deney sonuçları aşağıdaki tabloda yer almaktadır:

Tablo 4.4. İTK analiz sonuçları

Bileşik grubu	Çözücü sistemi	Püskürtme reaktifi	Görüntüleme	Sonuç
Terpenik maddeler	Petrol eteri: EtOAc 85:15	%1'lik vanilin/H ₂ SO ₄	Görünür ışıktaki mor leke, UV ₃₆₆ 'da kırmızı-turuncu floresan leke	(+)
Antrasen türevi glikozitler	<i>n</i> -Propanol:EtOAc: gl. asetik asit: H ₂ O 40:40:30:1	%20'lik HNO ₃	Görünür ışıktaki kahverengi leke	(+)
Flavonoitler	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O 70:30:3	%1'lik vanilin/H ₂ SO ₄	Görünür ışıktaki sarı/kahverengi leke, UV ₃₆₆ 'da yeşil floresan leke	(+)
Kondanse tanenler	Toluen:aseton:formik asit 5:5:1	%1'lik vanilin/H ₂ SO ₄	Görünür ışıktaki kırmızı leke	(-)
Alkaloitler	EtOAc:MeOH:H ₂ O 100:13,5:10	Seyreltik Dragendorf	Görünür ışıktaki kahverengi/turuncu leke	(-)
Kafein	EtOAc:MeOH:H ₂ O 100:13,5:10	-	UV ₂₅₄ 'te floresanı engelleyen leke	(-)

Tabloda görülen (+) işareti, test sonucunun pozitif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunduğunu göstermektedir. (-) işareti test sonucunun negatif olduğunu ve teşhisi yapılan sekonder metabolit grubunun ekstrede bulunmadığını göstermektedir.



Şekil 4.8. İTK analizi görüntüsü

Plakların sol üst köşesindeki yazı bileşik grubunun adını, sağ üst köşesindeki yazı çözücü sistemindeki çözücülerin oranlarını, alt taraftaki yazı ekstre adını belirtmektedir.

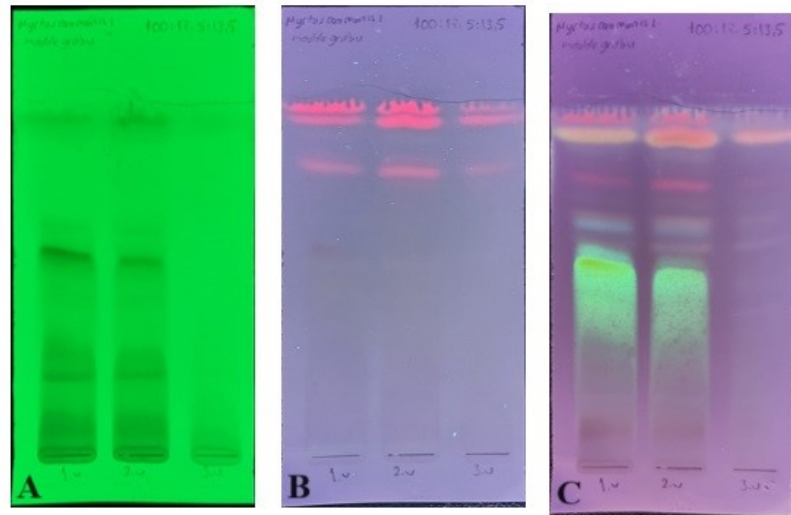
4.2.2. Ekstraksiyonlara ait Bulgular

Bitki materyali ile hazırlanmış ekstrelerden elde edilen ekstre miktarları ve verimleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.5. Ekstraksiyon sonucu madde miktarları ve ekstraksiyon verimleri

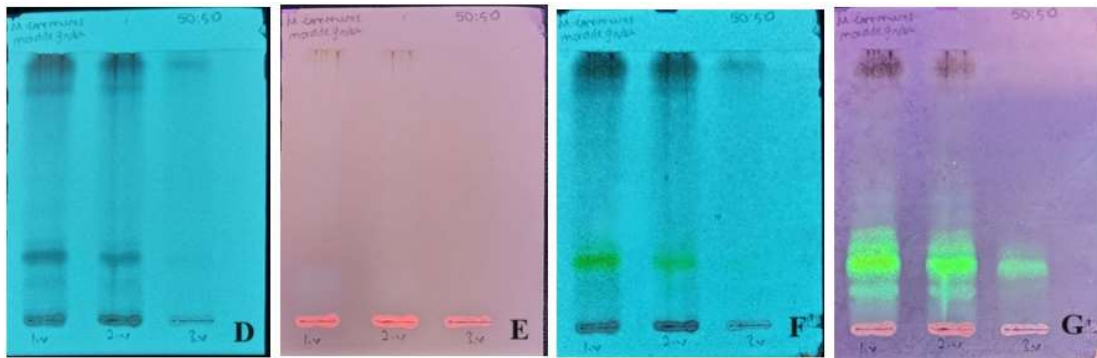
Ekstre	Miktarı (g)	Verim (%)
MCE 1. ekstraksiyon	39,27	19,63
MCE 2. ekstraksiyon	14,29	7,15
MCE 3. ekstraksiyon	8,46	4,23
MCI	4,44	14,23

Ekstrelerin içerdiği madde gruplarının ve bunların nitel olarak yoğunluklarının anlaşılabilmesi amacıyla her süzütünün uygun derişimdeki çözeltisinin uygulandığı İTK görüntüleri aşağıda verilmiştir.



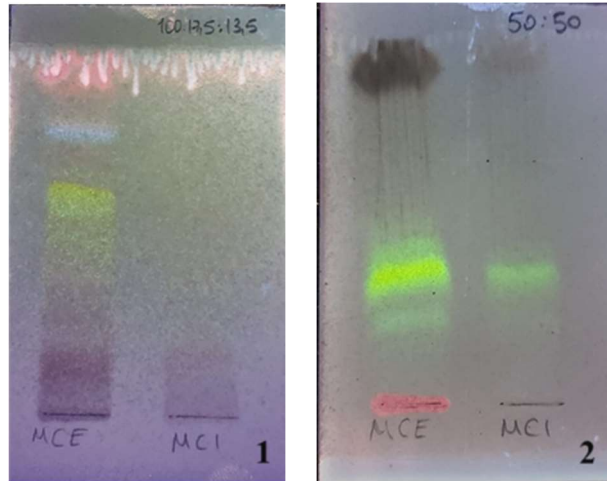
Şekil 4.9. Maserasyonlara ait Silika jel 60 F₂₅₄ kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analizinin görüntüsü.

A:Reaktif püskürtülmeden önce UV₂₅₄ görüntüsü, B: Reaktif püskürtülmeden önce UV₃₆₆ görüntüsü, C: Reaktif püskürtüldükten sonra UV₃₆₆ görüntüsü. Numuneler; 1: MCE1, 2: MCE2, 3: MCE3. Çözücü sistemi: EtOAc:MeOH:H₂O (100:17,5:13,5). 1.v:1. ekstraksiyon, 2.v:2. ekstraksiyon, 3.v:3. ekstraksiyon.



Şekil 4.10. Maserasyonlara ait Silika jel RP-18 F_{254s} kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analizinin görüntüsü.

D:Reaktif püskürtülmeden önce UV₂₅₄ görüntüsü, E:Reaktif püskürtülmeden önce UV₃₆₆ görüntüsü F:Reaktif püskürtüldükten sonra UV₂₅₄ görüntüsü G:Reaktif püskürtüldükten sonra UV₃₆₆ görüntüsü. Numuneler; 1: MCE1, 2: MCE2, 3: MCE3. Çözücü sistemi: MeOH:H₂O (50:50). 1.v:1. ekstraksiyon, 2.v:2. ekstraksiyon, 3.v:3. ekstraksiyon.

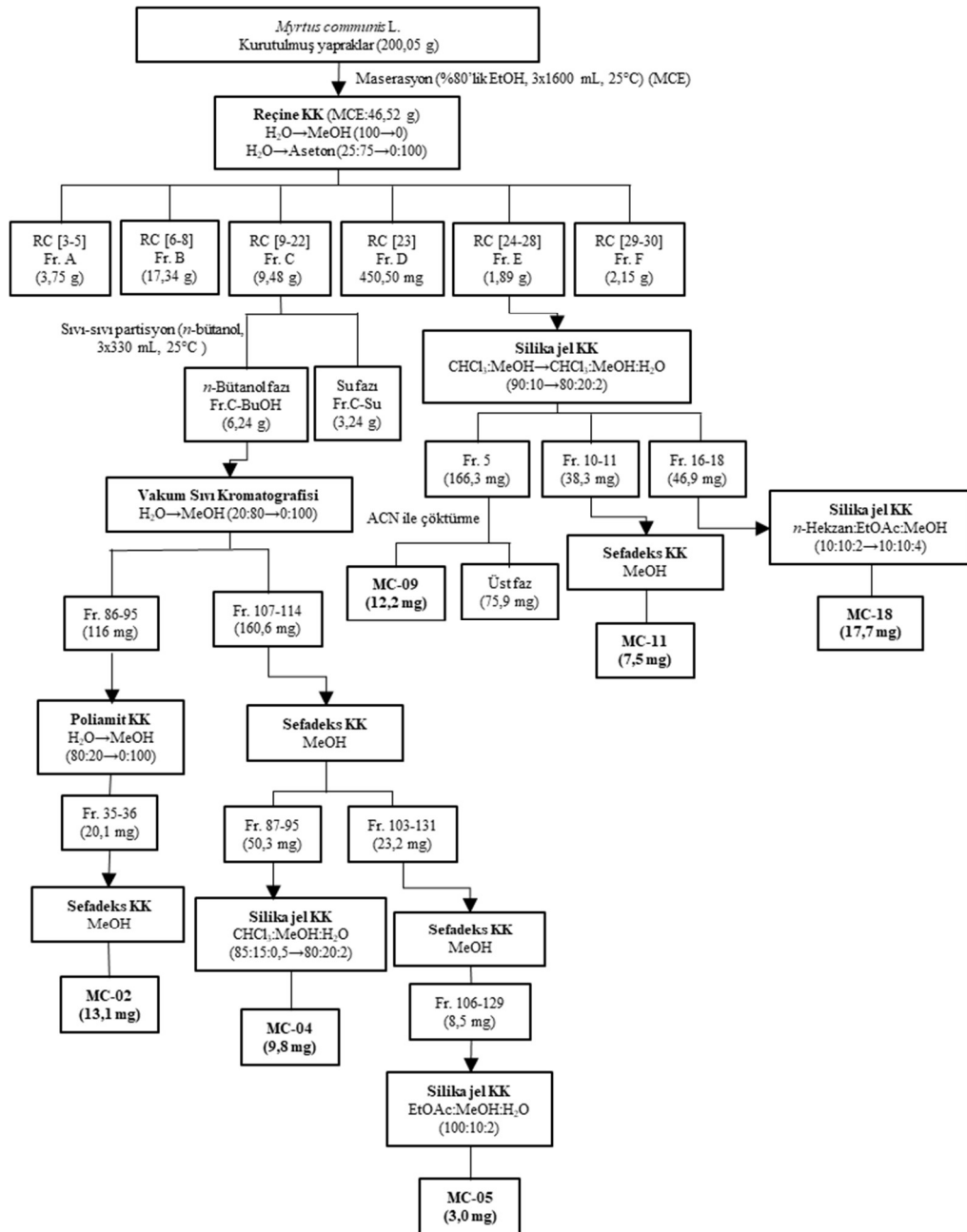


Şekil 4.11. %80 EtOH (MCE) ve su ekstresinin (MCI) karşılaştırmalı İTK analizinin görüntüsü

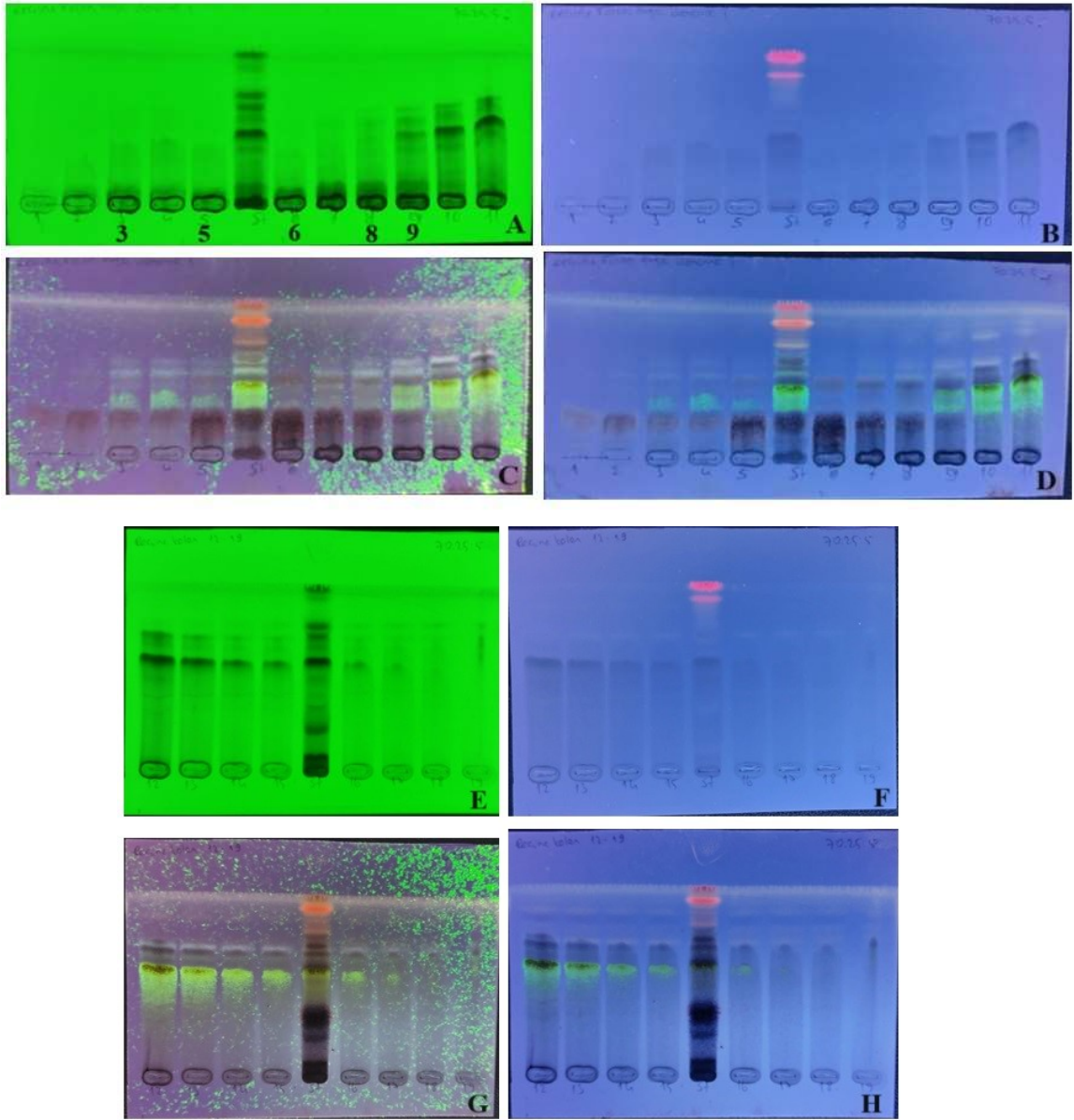
1 ve 2: Reaktif püskürtüldükten sonra UV₃₆₆ görüntüleri. 1: Silika jel 60 F254 kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analizinin görüntüsü; 2: Silika jel RP-18 F254s kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analizinin görüntüsü. Çözücü sistemi 1: EtOAc:MeOH:H₂O (100:17,5:13,5), çözücü sistemi 2: MeOH:H₂O (50:50)

İnce Tabaka Kromatografisi analizlerinde %80'lik EtOH ekstresi ve infüzyondan elde edilen sulu ekstrenin içerdiği madde gruplarının ve nitel olarak yoğunluklarının karşılaştırılması sonucunda, benzer lekeleri sulu ekstrenin de içeriyor olması, buna karşın %80'lik EtOH ekstresinin madde gruplarınca daha yoğun olması nedeniyle izolasyon çalışmalarına %80'lik EtOH ekstresi ile devam edilmiştir.

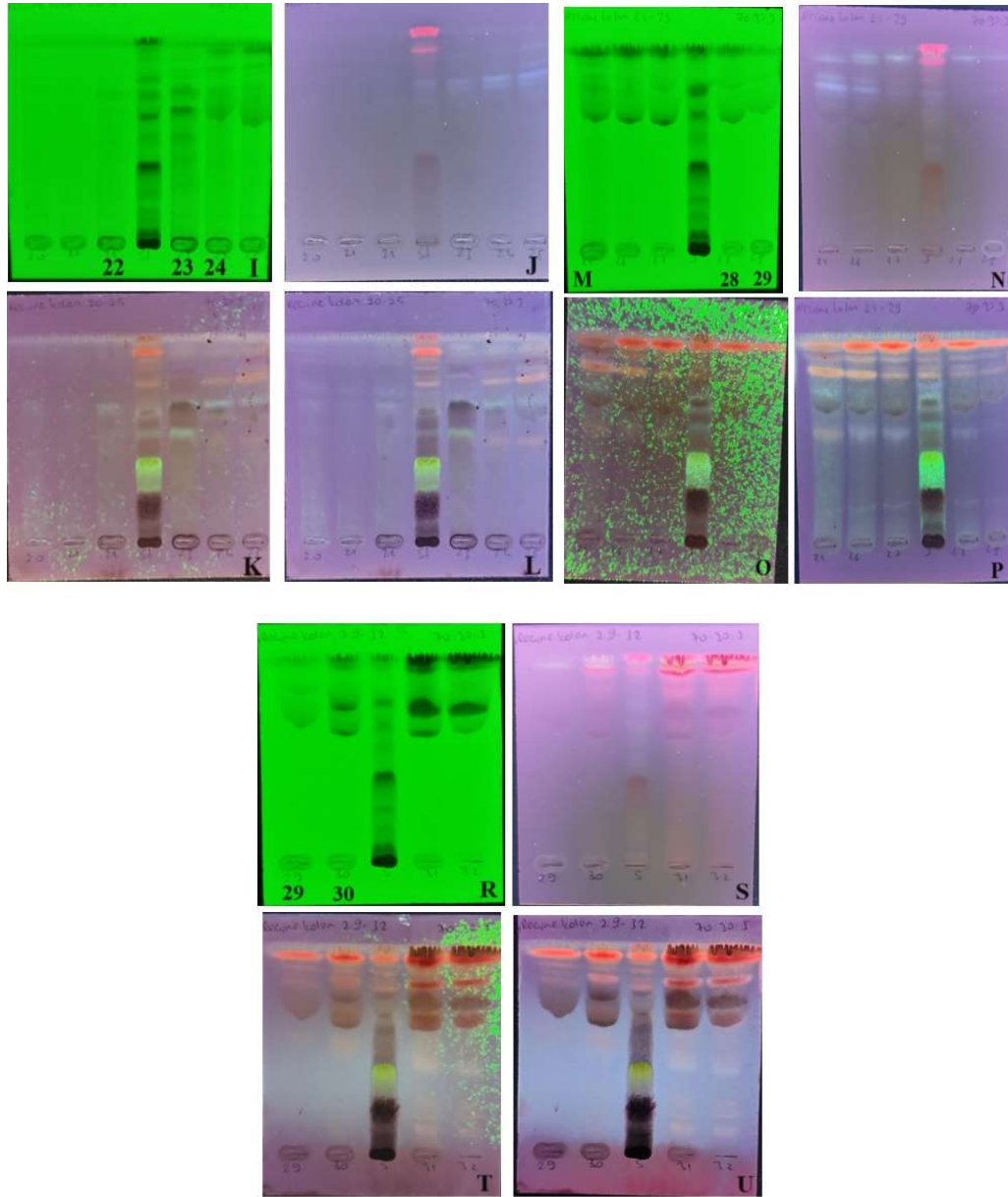
4.2.3. İzolasyon Çalışmalarına ait Bulgular



Şekil 4.12. *M. communis* yaprakları izolasyon şeması



Şekil 4.13. %80'lik EtOH ekstresinin reçine kolon kromatografisinden elde edilmiş fraksiyonların Silika jel 60 F₂₅₄ kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analiz görüntüleri



Şekil 4.13. %80'lik EtOH ekstresinin reçine kolon kromatografisinden elde edilmiş fraksiyonların Silika jel 60 F₂₅₄ kaplı hazır plak kullanılarak yapılmış İTK analiz görüntüleri (devam).

A, E, I, M, R:Reaktif püskürtülmeden önce UV₂₅₄ görüntüsü; B, F, J, N, S: Reaktif püskürtülmeden önce UV₃₆₆ görüntüsü; C, G, K, O, T: Reaktif püskürtüldükten sonra UV₂₅₄ görüntüsü; D, H, L, P, U: Reaktif püskürtüldükten sonra UV₃₆₆ görüntüsü. Çözücü sistemi: CHCl₃:MeOH:H₂O (70:25:5, 70:30:3)

İzolasyon çalışmalarına başlanılan %80'lik EtOH ekstresinden elde edilmiş fraksiyonların İTK analizleri sonucunda ana ekstrenin fenolik ve terpenik bileşiklerce zengin olduğu gözlenmiş ve ilgili madde grupları birleştirilerek izolasyona bu madde gruplarının elde edilmesi üzerine devam edilmiştir (Birleştirilmiş fraksiyonların İTK görüntüleri net olmadığı için teze ilave edilmemiştir). Elde edilen 6 ana fraksiyon ve

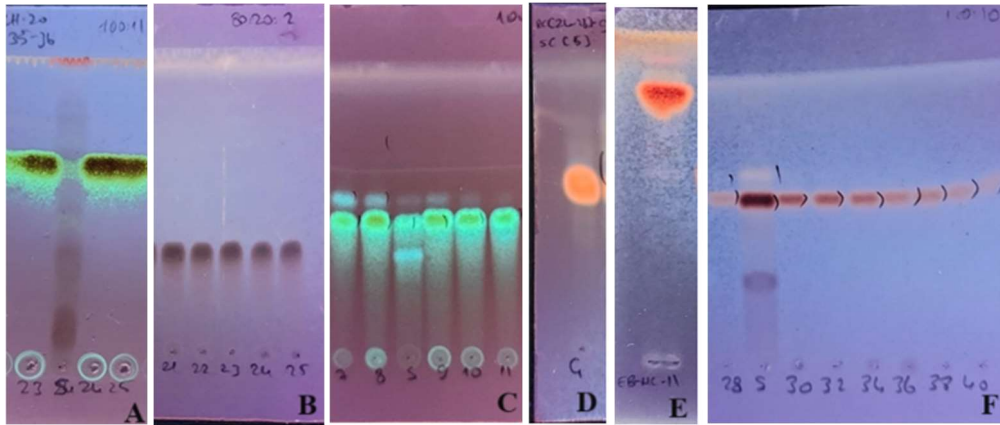
MCE-Fr. C'nin 2 alt fraksiyonundan (bkz. Şekil 4.12.) yüzde içerik analizleri için metabolomik çalışmalarda kullanılmak üzere ayrılmıştır. Bununla birlikte halk ilacı çalışmalarında gözlenen bitkisel droğun kullanım alanlarına yönelik biyolojik aktivite çalışmaları için de 6 ana ve 2 alt fraksiyonlardan bir miktar (%10'u) ayrılmıştır.

M. communis'ten İzole Edilen Bileşikler

M. communis bitkisinin yapraklarının %80'lik EtOH ekstresinden kromatografik yöntemler kullanılarak 2 adet flavonol 3-*O* glikoziti (**MC-02**, **MC-05**), 3 adet triterpen (**MC-09**, **MC-11**, **MC-18**) ve 1 adet floroglusinol türevi bileşik (**MC-04**) izole edilmiş ve yapıları spektroskopik yöntemler (1D NMR ve HR-ESI-MS) kullanılarak aydınlatılmıştır.

Tablo 4.6. Elde edilen bileşiklerin kodları ve isimleri

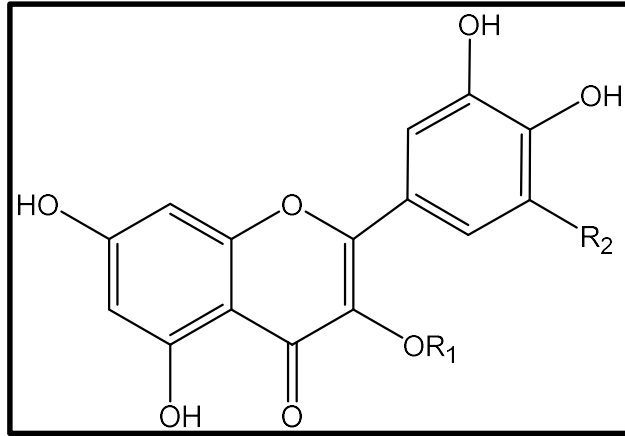
Bileşik kodu	Adı
MC-02	Mirisetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit
MC-04	Gallomirtukommulon C
MC-05	Kersetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit
MC-09	Ursolik asit
MC-11	Korosolik asit
MC-18	Asiatik asit



Şekil 4.14. İzole edilmiş saf bileşiklerin İTK analizinin görüntüleri

A: MC-02, çözücü sistemi: 100:11:11:27 (EtOAc:gl. asetik asit:formik asit:H₂O); **B:** MC-04, çözücü sistemi: 80:20:2 (CHCl₃:MeOH: H₂O); **C:** MC-05, çözücü sistemi: 100:10:5 (EtOAc:MeOH:H₂O); **D:** MC-09, çözücü sistemi:94:6 (CHCl₃:MeOH); **E:** MC-11, çözücü sistemi:10:10:3 (Sikloheksan:EtOAc:MeOH); **F:** MC-18, çözücü sistemi: 10:10:4 (Sikloheksan:EtOAc:MeOH).

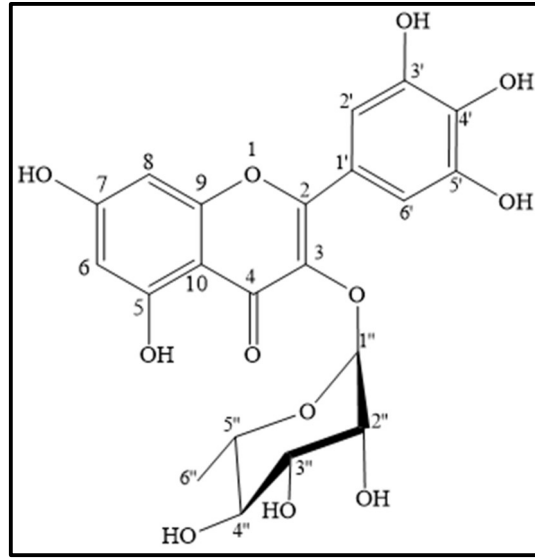
Flavonol-3-*O* glikozitleri



Tablo 4.7. *M. communis*'ten izole edilen flavonol-3-*O* glikozitleri

Bileşik	Bileşik kodu	R ₁	R ₂
Mirisetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit	MC-02	-ramnopiranozil	-OH
Kersetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozit	MC-05	-ramnopiranozil	-H

MİRİSETİN-3-O- α -L-RAMNOPIRANOZİT (MC-02)



C₂₁H₂₀O₁₂ (Mol. Ağ. 464 g/mol)

¹H-NMR	Tablo 4.8. Şekil 4.14.
¹³C-NMR	Tablo 4.8. Şekil 4.15.
HR-ESI-MS	Şekil 4.16.

%80'lik EtOH ekstresi, çeşitli kromatografik yöntemlerle ayırma ve saflaştırma basamaklarına tabi tutulmuş, MCE-Fr.C-BuOH fazından VSK ve AKK yöntemleriyle sarı renkli **MC-02** maddesi elde edilmiştir.

İTK analizinde reaktif kullanmadan önce UV₂₅₄ nm'de koyu mor, UV₃₆₆ nm'de açık sarı ve %20'lik sülfürik asit reaktifi püskürtüldükten ve ısıtıldıktan sonra gün ışığında sarı ve UV₃₆₆ nm'de sarı-yeşil floresan renk elde edilen maddenin flavonoit yapısında olabileceğini düşündürmüştür.

¹³C-NMR spektrumu (DMSO-*d*₆) incelendiğinde 21 C atomu tespit edilmiştir. ¹H-NMR spektrumunda da δ_H 5,17 (1H d, $J=2,0$ Hz)'de gözlenen anomerik proton sinyali, δ_H 0,82 (d, $J=6,0$ Hz)'de gözlenen sekonder metil sinyali ve 3,14-3,95 ppm arasında rezonansa gelen düşük alan sinyalleri bir oz ünitesi varlığına işaret etmiştir. Anomerik protonun kenetlenme sabiti değerinden ($J=2,0$ Hz) ozun α konfigürasyonda

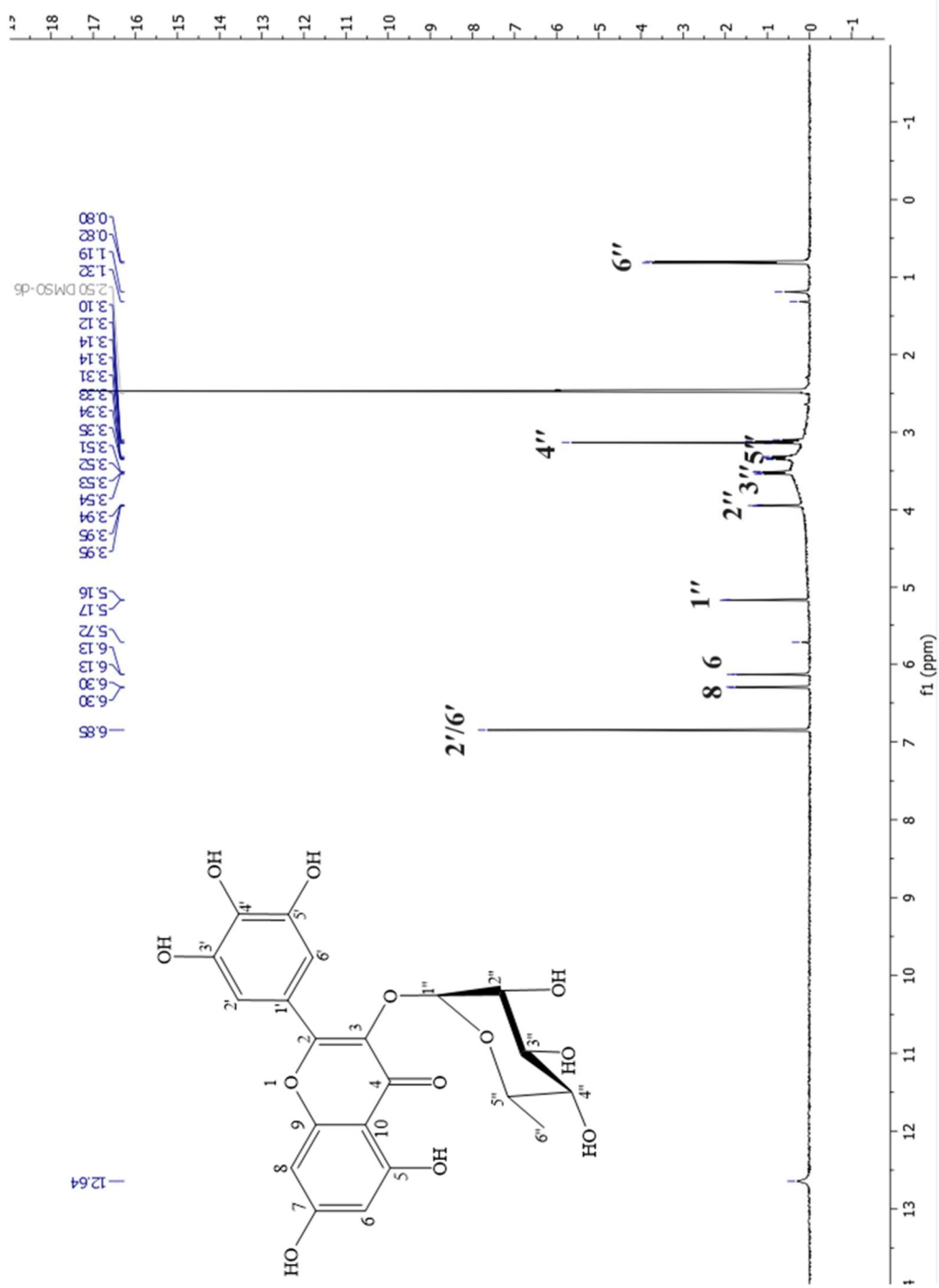
olduğu anlaşılmıştır. Oza ait proton ve karbon sinyalleri literatür ile karşılaştırıldığında oz ünitesinin α -ramnoz olduğu belirlenmiştir.

^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde 6 karbon sinyalinin oz ünitesine ait olduğu, geri kalan 15 karbon sinyalinin ise bir flavonoit aglikonuna ait olabileceği düşünölmüştür. Spektrumda bileşiğin 10 kuarterner karbon (C) ve 5 metin karbonu (CH) taşıdığı saptanmıştır. ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde, δ_{H} 6,85 (2H, s) (H-2' ve H-6')'de gözlenen özdeş aromatik protonların varlığı 3',4',5' trisüstitüe B halkasının varlığını doğrulamıştır. A halkasına ait karakteristik H-6 ve H-8 sinyalleri de sırasıyla δ_{H} 6,13 (1H, s) ve 6,30 (1H, s)'da gözlenmiştir. ^1H - ve ^{13}C -NMR spektrumlarında, **MC-02** bileşiğinin aglikon kısmına ait rezonanslar literatür ile karşılaştırıldığında aglikonun mirisetin olduğu tespit edilmiştir (241, 242).

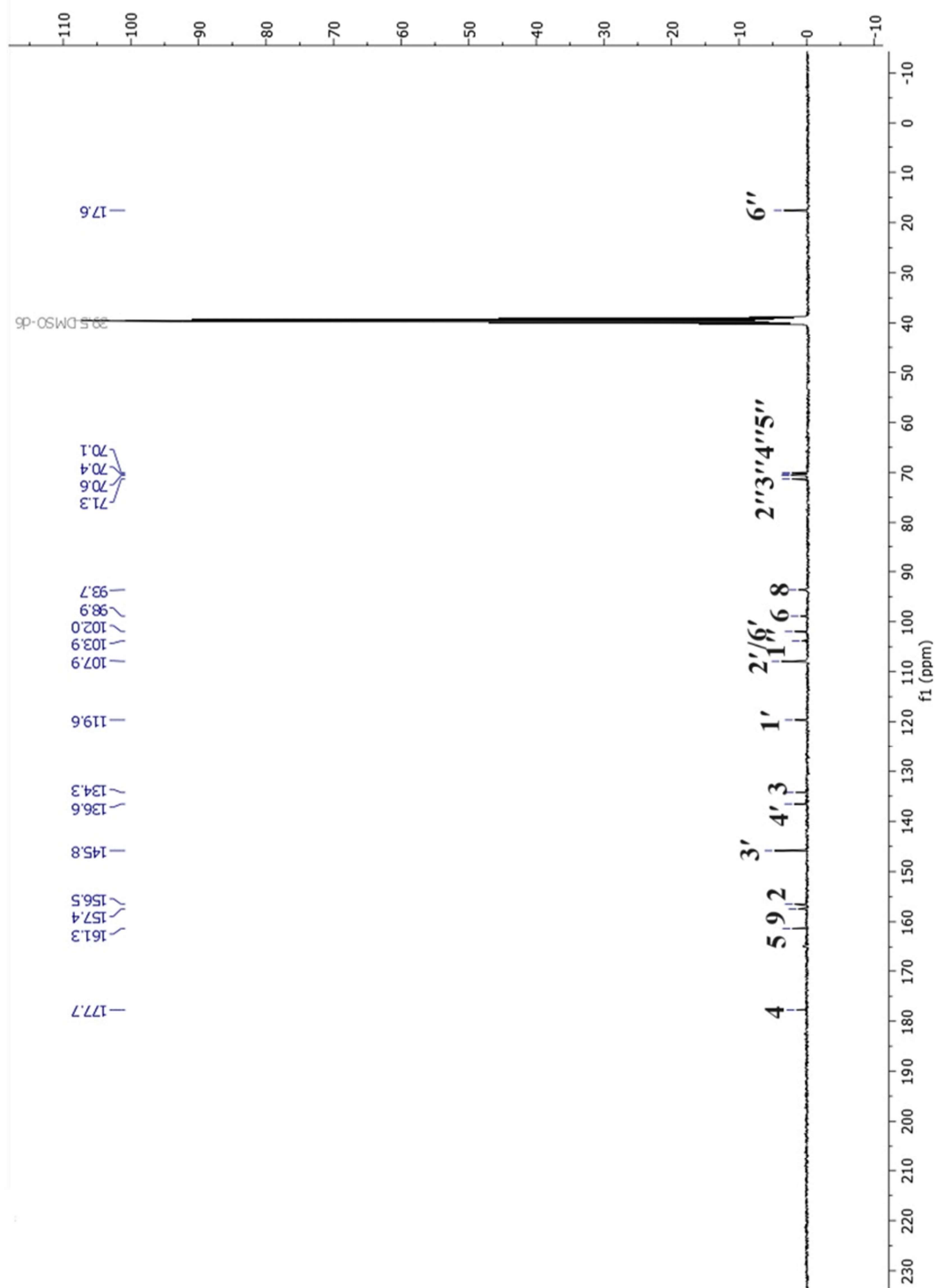
HR-ESI-MS'de gözlenen $[\text{M}-\text{H}]^-$ iyon piki ($m/z= 463,0887$), *Myrtus* cinsinden elde edilen glikozitlerdeki ramnoz ünitelerinin biyogenetik olarak L konfigürasyonunda gözlenmesi ve bununla birlikte literatür değerleri **MC-02** kodlu bileşiğin yapısının **mirisetin-3-O- α -L-ramnopiranozit** olduğunu göstermiştir (241, 242).

Tablo 4.8. Mirisetin-3-*O*- α -L-ramnopiranozit (**MC-02**)'e ait ^{13}C - ve ^1H -NMR spektroskopik değerleri (DMSO-*d*₆; ^{13}C : 100 MHz, ^1H : 400 MHz)

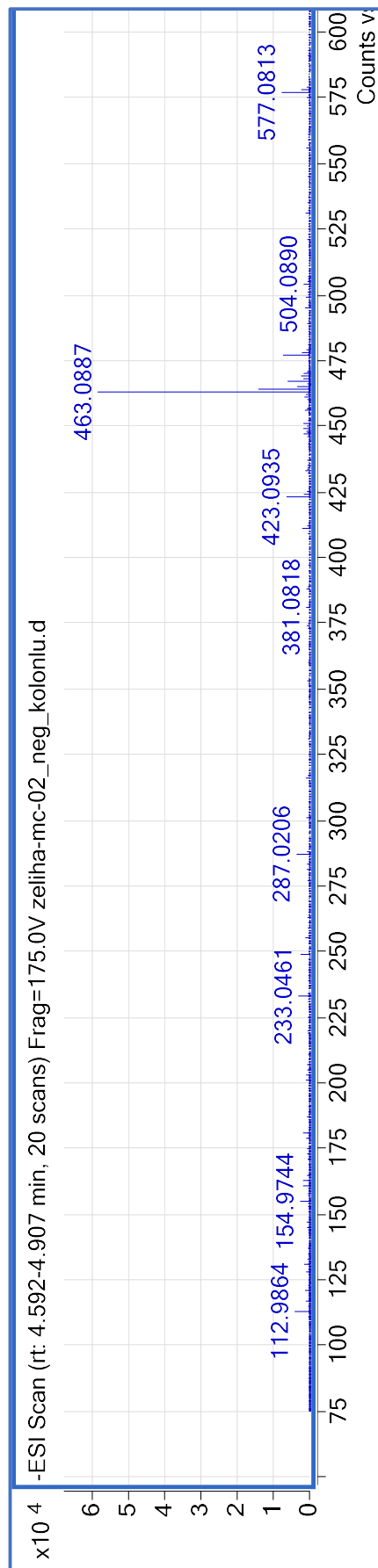
MC-02		
C/H	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) , <i>J</i> (Hz)
1	-	-
2	156,5	-
3	134,3	-
4	177,7	-
5	161,3	-
6	98,9	6,13 (1H, s)
7	-	-
8	93,7	6,30 (1H, s)
9	157,4	-
10	104,2	-
1'	119,6	-
2'	107,9	6,85 (2H, s)
3'	145,8	-
4'	136,6	-
5'	145,8	-
6'	107,9	6,85 (2H, s)
1''	103,9	5,17 (1H, d, <i>J</i> =2,0)
2''	71,3	3,95 (1H, d, <i>J</i> =2,8)
3''	70,8	3,54 (2H, dd, <i>J</i> =9,0/3,0)
4''	70,4	3,14 (1H, m)
5''	70,1	3,35 (1H, m)
6''	17,6	0,82 (2H, d, <i>J</i> =6,0)



Şekil 4.15. Mirisetin-3-O- α -L-ramnopyranozit (MC-02)'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)



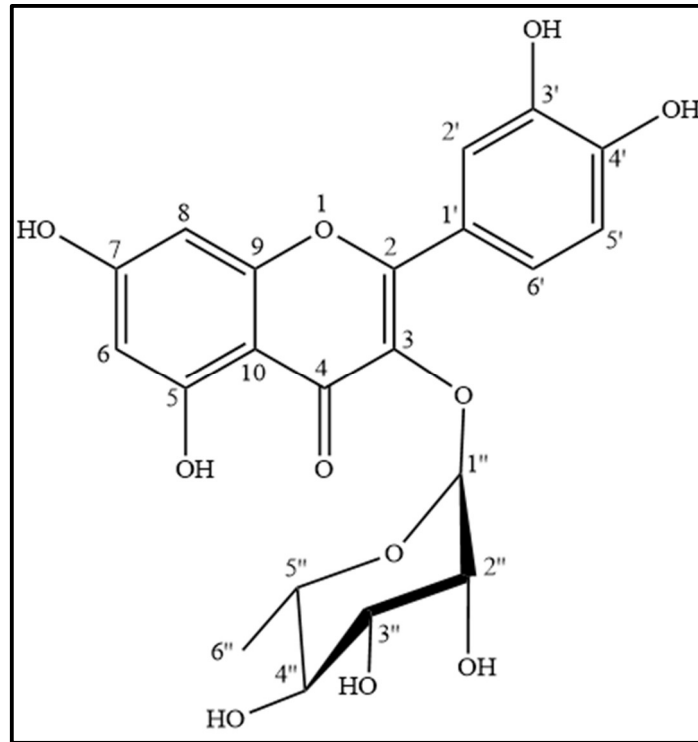
Şekil 4.16. Mirisetin-3-O- α -L-ramnopyranozit (**MC-02**)'in ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6 , 100 MHz)



Şekil 4.17. Mirisetin-3-O- α -L-rhamnopyranozit (**MC-02**)'in HR-ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS (negatif iyon modu) [M-H]⁻: m/z 463,0887 (C₂₁H₁₉O₁₂, hesaplanan 464,3790.)

KERSETİN-3-O- α -L-RAMNOPIRANOZİT (MC-05)



C₂₁H₂₀O₁₁ (Mol. Ağ. 448 g/mol)

¹H-NMR	Tablo 4.9. Şekil 4.17.
HR-ESI-MS	Şekil 4.18.

%80'lik EtOH ekstresi, çeşitli kromatografik yöntemlerle ayırma ve saflaştırma basamaklarına tabi tutulmuş, MCE-Fr.C-BuOH fazından VSK ve AKK yöntemleriyle sarı renkli **MC-05** maddesi elde edilmiştir.

İTK analizinde reaktif kullanmadan önce UV₂₅₄ nm'de koyu mor, UV₃₆₆ nm'de açık sarı ve %20'lik sülfürik asit reaktifi püskürtüldükten ve ısıtıldıktan sonra gün ışığında sarı ve UV₃₆₆ nm'de sarı-yeşil floresan renk elde edilen maddenin flavonoit yapısında olabileceğini düşündürmüştür.

¹H-NMR spektrumunda (DMSO-*d*₆) δ_H 5,21 (1H d, $J=2,0$ Hz)'de gözlenen anomerik proton sinyali, δ_H 0,78 (d, $J=6,0$ Hz)'de gözlenen sekonder metil sinyali ve 3,94-4,02 ppm arasında rezonansa gelen düşük alan sinyalleri bir oz ünitesi varlığına işaret etmiştir. Anomerik protonun kenetlenme sabiti değerinden ($J=2,0$ Hz) ozun α

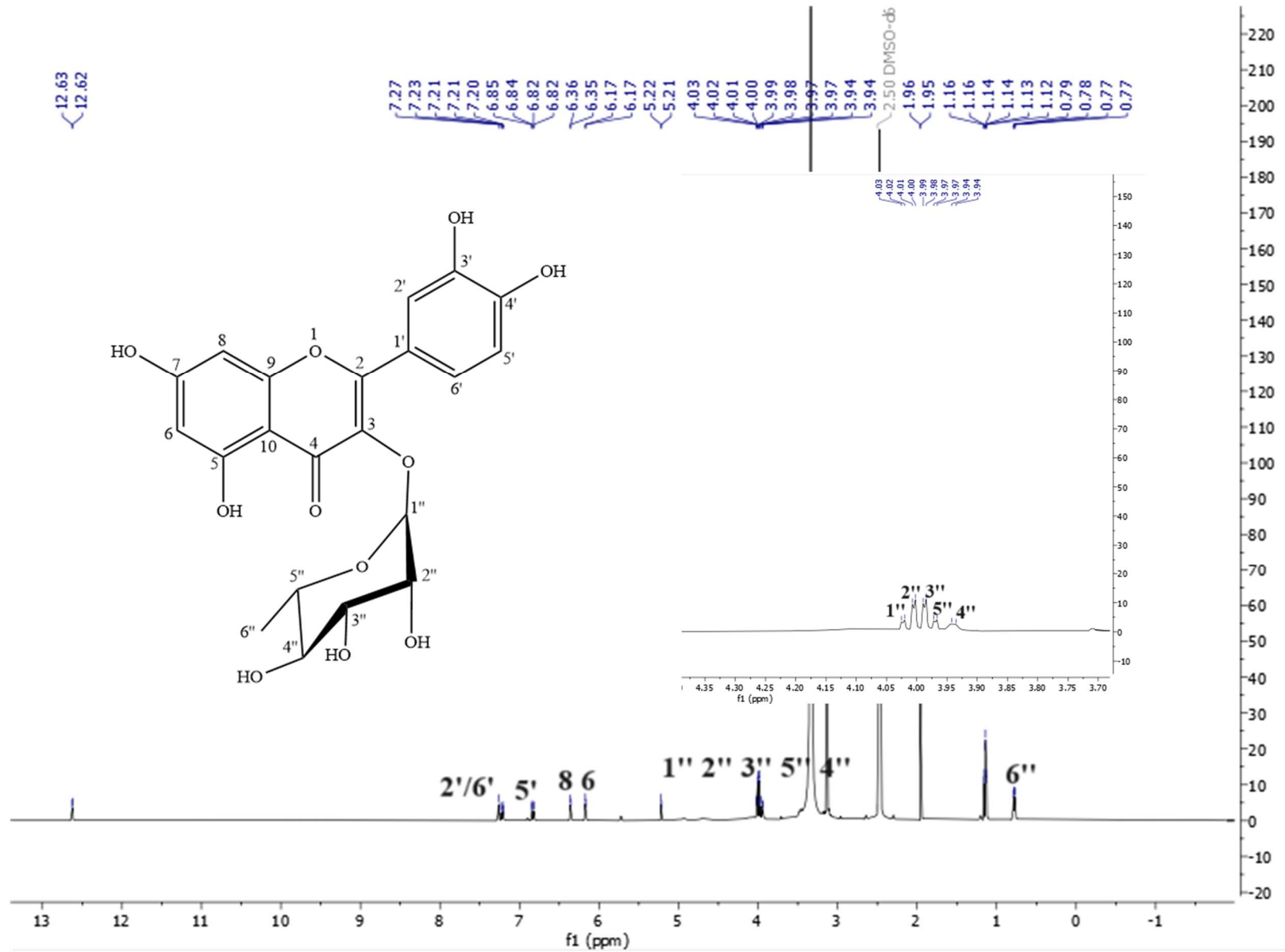
konfigürasyonda olduğu anlaşılmıştır. Oza ait proton ve karbon sinyalleri literatür ile karşılaştırıldığında oz ünitesinin α -ramnoz olduğu belirlenmiştir.

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde, δ_{H} 7,27 (1H, d, $J=2,0$ Hz), 7,21 (1H, dd, $J=8,0/2,0$ Hz) ve 6,84 (1H, d, $J=8,0$ Hz) (sırasıyla H-2', H-6', H-5')'de gözlenen aromatik protonların varlığı 3',4' disüstitüe B halkasının (ABX sistemi) varlığını doğrulamıştır. A halkasına ait karakteristik H-6 ve H-8 sinyalleri de sırasıyla δ_{H} 6,17 (1H, s) ve 6,35 (1H, s)'te gözlenmiştir. $^1\text{H-}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumlarında, **MC-05** bileşiğinin aglikon kısmına ait rezonanslar literatür ile karşılaştırıldığında aglikonun kersetin olduğu tespit edilmiştir (243-247).

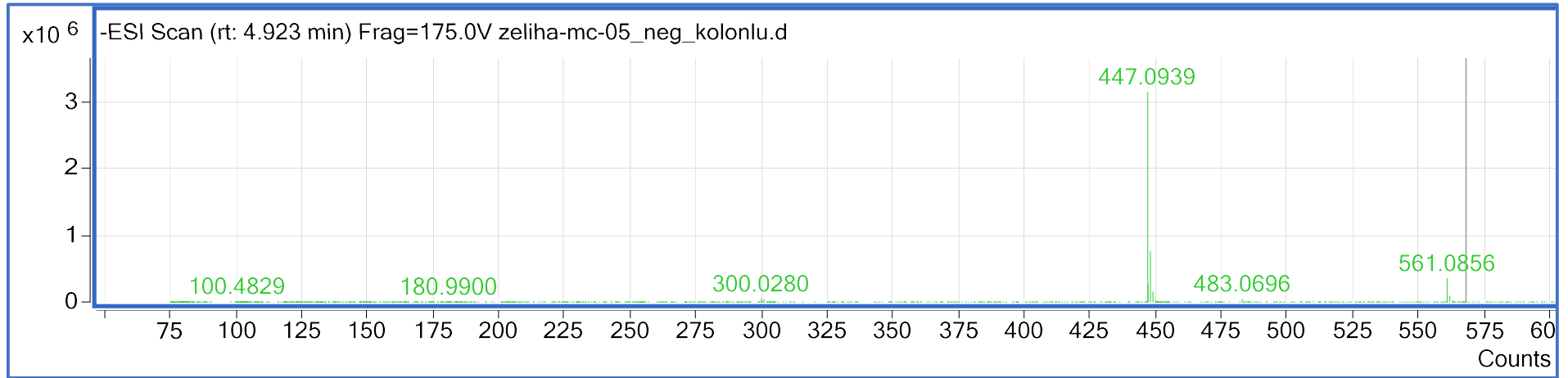
HR-ESI-MS'de gözlenen $[\text{M-H}]^-$ iyon piki ($m/z=447,0960$), *Myrtus* cinsinden elde edilen glikozitlerdeki ramnoz ünitelerinin biyogenetik olarak L konfigürasyonunda gözlenmesi ve bununla birlikte literatür değerleri **MC-05** kodlu bileşiğin yapısının **kersetin-3-O- α -L-ramnopiranozit** olduğunu göstermiştir (243-247).

Tablo 4.9. Kersetin-3-*O*- α -L-ramnopiranozit (**MC-05**)'in ait $^1\text{H-NMR}$ spektroskopik değerleri (DMSO- d_6 , $^1\text{H-NMR}$: 400 MHz)

MC-05	
C/H	δ_{H} (ppm), J (Hz)
1	-
2	-
3	-
4	-
5	-
6	6,17 (1H s)
7	-
8	6,35 (1H s)
9	-
10	-
1'	-
2'	7,2 (1H d, $J=2,0$)
3'	-
4'	-
5'	6,84 (1H d, $J=8,0$)
6'	7,2 (1H dd, $J=8,0/2,0$)
1''	5,21 (1H d, $J=2,0$)
2''	4,02 (1H d, $J=2,0$)
3''	4,00 (1H d, $J=2,0$)
4''	3,94 (1H d, $J=2,8$)
5''	3,97 (1H, d, $J=2,0$)
6''	0,78 (1H d, $J=6,0$)



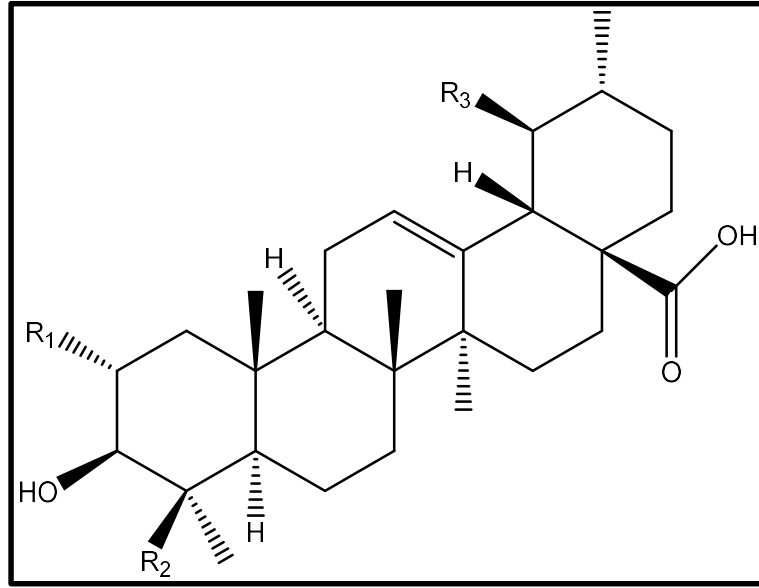
Şekil 4.18. Kersetin-3-O- α -L-ramnopyranozit (MC-05)'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)



Şekil 4.19. Kersetin-3-*O*- α -L-ramnopyranozit (**MC-05**)'in HR-ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS (negatif iyon modu) [M-H]: m/z 447,0939 ($C_{21}H_{19}O_{11}$, hesaplanan 448,3800)

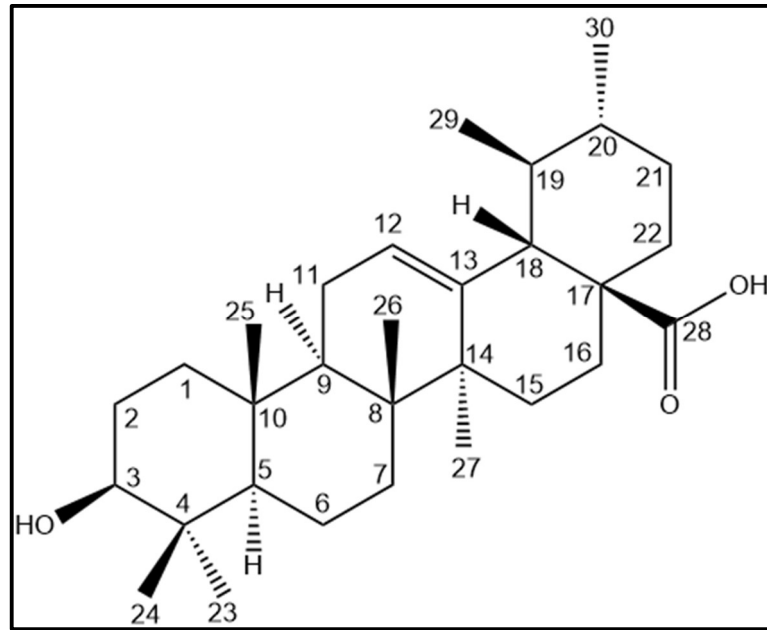
Triterpenler



Tablo 4.10. *M. communis*'ten izole edilen triterpenler

Bileşik adı	Bileşik kodu	R ₁	R ₂	R ₃
Ursolik asit	MC-09	-H	-CH ₃	-CH ₃
Korosolik asit	MC-11	-OH	-CH ₃	-CH ₃
Asiatik asit	MC-18	-OH	-CH ₂ OH	-CH ₃

URSOLİK ASİT (MC-09)



C₃₀H₄₈O₃ (Mol. Ağ. 456 g/mol)

¹H-NMR	Tablo 4.11. Şekil 4.19.
¹³C-NMR	Tablo 4.11. Şekil 4.20.
HR-ESI-MS	Şekil 4.21.

%80'lik EtOH ekstresi, çeşitli kromatografik yöntemlerle ayırma ve saflaştırma basamaklarına tabi tutulmuş, MCE-Fr.E fraksiyonundan AKK yöntemiyle beyaz renkli amorf yapılu **MC-09** maddesi elde edilmiştir.

İTK'de UV aktif özellik göstermeyen, %20'lik sülfürik asit püskürtüldükten ve ısıtıldıktan sonra gün ışığında pembe-mor renk ve UV₃₆₆ nm'de ise kızılımsı renk veren **MC-09** kodlu bileşiğin terpen yapısında bir bileşik olabileceği düşünülmüştür.

Bileşiğin proton ve karbon NMR spektral değerlerinin 1D NMR spektrumları (piridin-*d*₅) yardımıyla yorumlanması sonucunda, ¹H-NMR spektrumunda yüksek alanda yoğun olarak görülen metil sinyalleri (7 metil sinyali) ve ¹³C-NMR spektrumunda 30 C atomuna ait sinyalin gözlenmesi bileşiğin triterpen yapısında olabileceğini göstermiştir.

MC-09'un $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde, δ_{H} 3,44'te (1H, dd, $J=10,1/6,2$, H-3) gözlenen proton sinyali bir hidroksil komşuluğuna ($^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda C-3: δ_{C} 77,9, CH), δ_{H} 5,47'de (1H, brs, H-12) görülen proton sinyali ise olefinik proton varlığına işaret etmiştir. Bunların yanında δ_{H} 0,92-1,22 arasında, 3H değerinde, 5'i singlet, 2'si dublet şeklinde çıkan sinyaller, yapıda 7 metil grubu olduğunu göstermiştir.

$^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda düşük alanda gözlenen, δ_{C} 125,4 (C-12, metin-CH) ve δ_{C} 139,0 (C-13, katerner) sinyalleri ile $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda δ_{H} 0,98 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-29) ve δ_{H} 0,92'de (3H, d, $J=6,3$ Hz, H-30) dublet olarak gözlenen 2 metil sinyali literatür verileri ile karşılaştırıldığında; C-12/C-13 çifte bağ ve 2 tane dublet metil sinyali ile birlikte 5 singlet metil sinyali ursan tipi triterpenler için karakteristik olup bileşiğin de ursan yapısında bir triterpen olabileceğini göstermiştir. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda, δ_{C} 179,7 (C-28)'de bir katerner karbon sinyalinin gözlenmesi, karboksilik asit varlığına işaret etmiştir (246, 247).

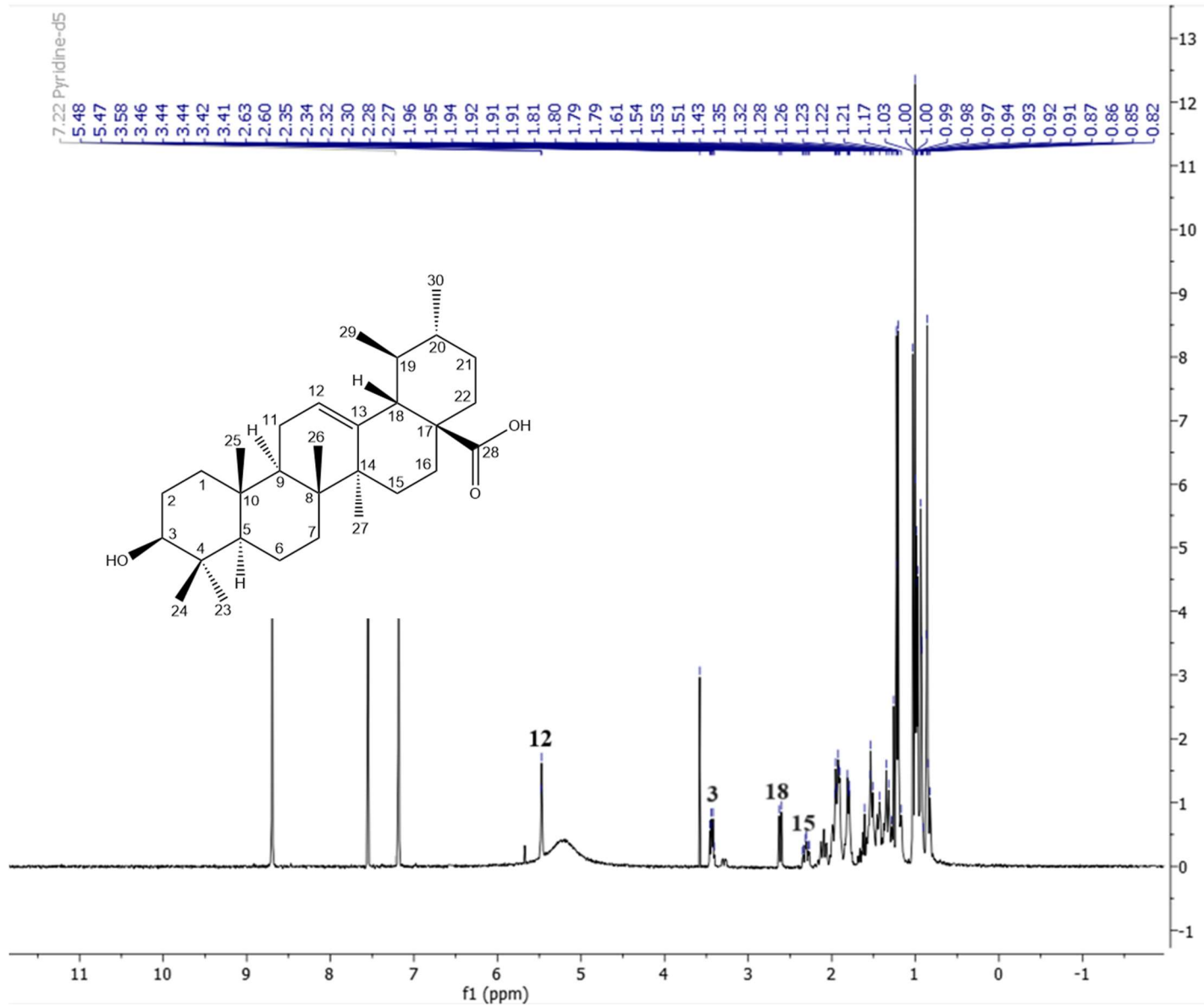
1D NMR spektral değerlerinin literatürde bulunan bilgilerle karşılaştırılması sonucunda ve HR-ESI-MS'de gözlenen $[\text{M-H}]^-$ iyon piki ($m/z=455,3538$) ile **MC-09** kodlu bileşiğin yapısının **ursolik asit** olduğu tespit edilmiştir (246, 247).

Tablo 4.11. Ursolik asit (MC-09)'in ^{13}C - ve ^1H -NMR spektral değerleri (piridin-*d*₅; ^{13}C : 100 MHz, ^1H : 400 MHz)

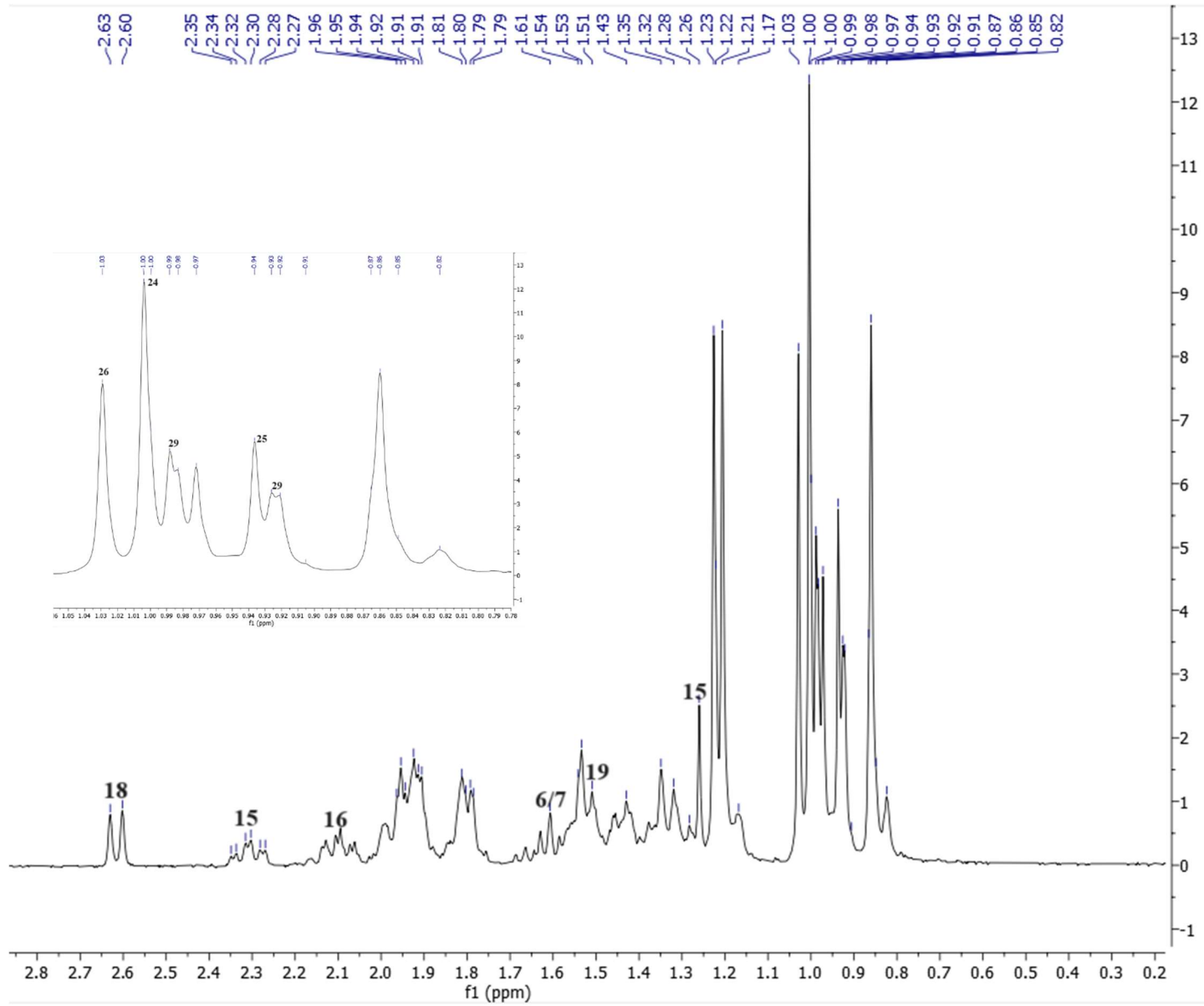
MC-09		
C/H	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)
1	39,7	-
2	28,4	1,81*
3	77,9	3,44 (1H, dd, <i>J</i> =10,1/6,2)
4	38,8	-
5	55,6	-
6	18,1	1,61*
7	33,3	1,61*
8	41,9	-
9	47,9	-
10	37,2	-
11	23,5	-
12	125,4	5,47 (1H, brs)
13	139,0	-
14	42,3	-
15	27,9	1,25** 2,33 (1H, dd(t), <i>J</i> = 13,6/4,8)
16	23,6	2,11 (1H, dd(t), <i>J</i> = 13,2/4,4) 2,06**
17	47,8	-
18	53,3	2,62 (1H, d, <i>J</i> =11,3)
19	39,2	1,51*
20	39,2	-
21	30,1	-
22	37,0	-
23	28,6	1,21 (3H s, CH ₃)
24	16,4	1,00 (3H s, CH ₃)
25	15,4	0,93 (3H s, CH ₃)
26	17,3	1,03 (3H s, CH ₃)
27	23,4	1,22 (3H s, CH ₃)
28	179,7	-
29	17,2	0,98 (d, <i>J</i> =6,5)
30	21,2	0,92 (d, <i>J</i> =6,3)

*Girişim nedeniyle bazı sinyallerin kenetlenme sabitleri (J) hesaplanamamıştır.

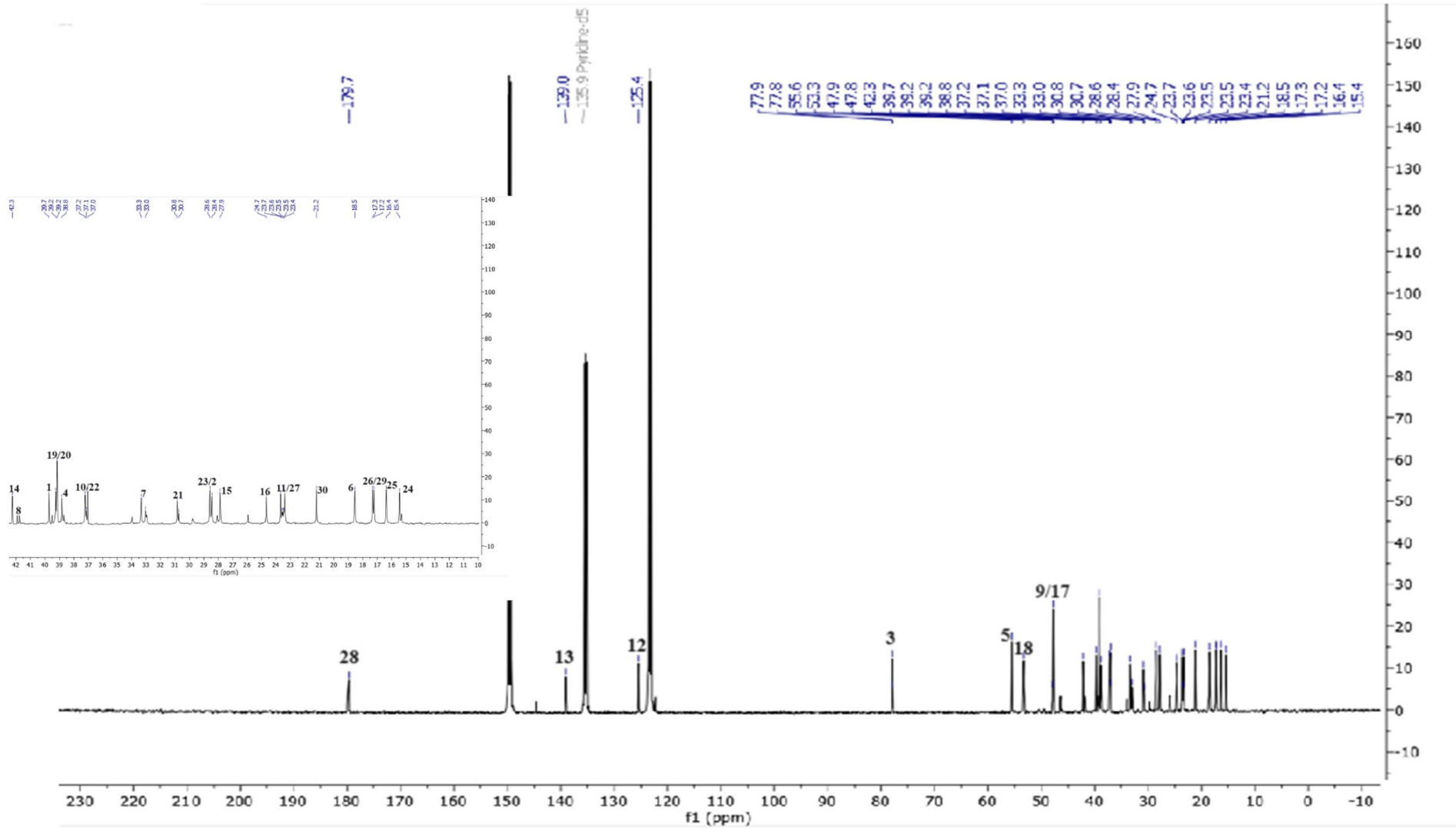
**Bileşiğin izomer yapıda olduğu tespit edilmiştir.



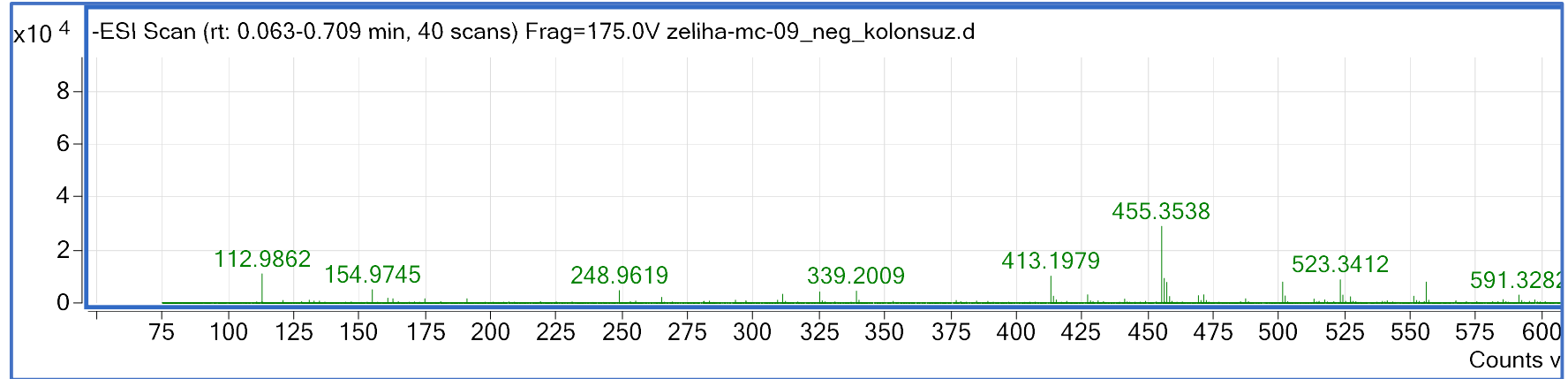
Şekil 4.20. Ursolik asit (MC-09)'in ^1H -NMR spektrumu (piridin- d_5 , 400 MHz)



Şekil 4.20. Ursolik asit (MC-09)'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($\text{pyridin-}d_5$, 400 MHz) (devam)



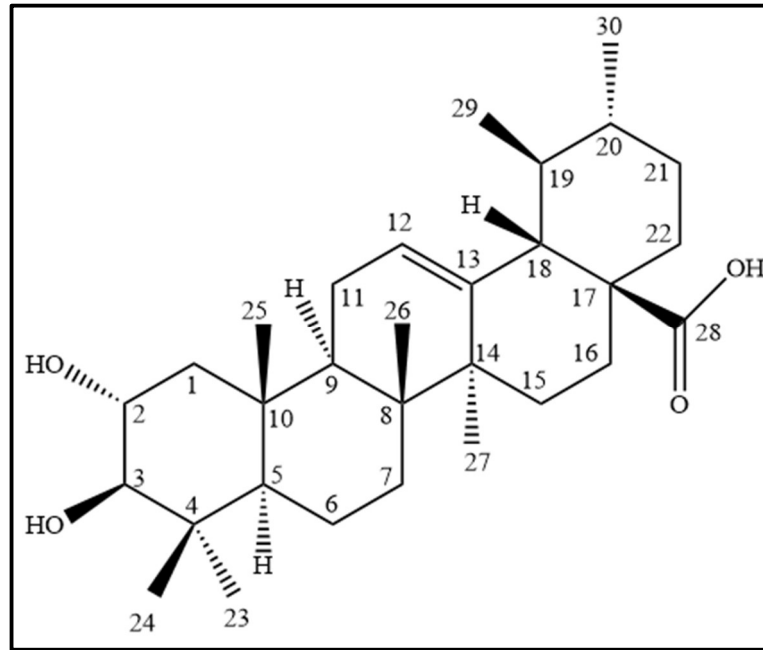
Şekil 4.21. Ursolik asit (MC-09)'in ^{13}C -NMR spektrumu (piridin- d_5 , 100 MHz)



Şekil 4.22. Ursolik asit (MC-09)'in HR-ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS (negatif iyon modu) [M-H]⁻: m/z 455,3538 ($C_{30}H_{47}O_3$, hesaplanan 456,7110)

KOROSOLİK ASİT (MC-11)



$C_{30}H_{48}O_4$ (Mol. Ağ. 472 g/mol)

1H-NMR	Tablo 4.12. Şekil 4.22.
HR-ESI-MS	Şekil 4.23.

%80'lik EtOH ekstresi, çeşitli kromatografik yöntemlerle ayırma ve saflaştırma basamaklarına tabi tutulmuş, MCE-Fr.E fraksiyonundan AKK yöntemiyle beyaz renkli amorf yapılı **MC-11** maddesi elde edilmiştir.

İTK'de UV aktif özellik göstermeyen, %20'lik sülfürik asit püskürtüldükten ve ısıtıldıktan sonra gün ışığında pembe-mor renk ve UV₃₆₆ nm'de ise kızılımsı renk veren **MC-11** kodlu bileşiğin terpen yapısında bir bileşik olabileceği düşünülmüştür.

Bileşiğin 1H -NMR spektral değerlerinin (piridin- d_5) yorumlanması sonucunda, yüksek alanda yoğun olarak görülen metil sinyalleri (7 metil sinyali) ve **MC-09** bileşiği ile benzer spektruma sahip olması bileşiğin triterpen yapısında olabileceğini göstermiştir.

MC-11'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde, δ_{H} 3,71'de (1H, d, $J=10,4$ Hz, H-3) gözlenen proton sinyali bir hidroksil komşuluğuna, δ_{H} 5,68'de (1H, H-12) görülen proton sinyali ise olefinik proton varlığına; δ_{H} 0,96 (3H, d, $J=6,3$ Hz, H-29) ve δ_{H} 0,92'de (3H, d, $J=5,8$ Hz, H-30) dublet olarak gözlenen 2 metil sinyali ile birlikte δ_{H} 0,96-1,25 arasında, 3H değerinde 5 singlet metil sinyali ursan tipi triterpenler için karakteristik olup bileşiğin de ursan yapısında bir triterpen olabileceğini göstermiştir.

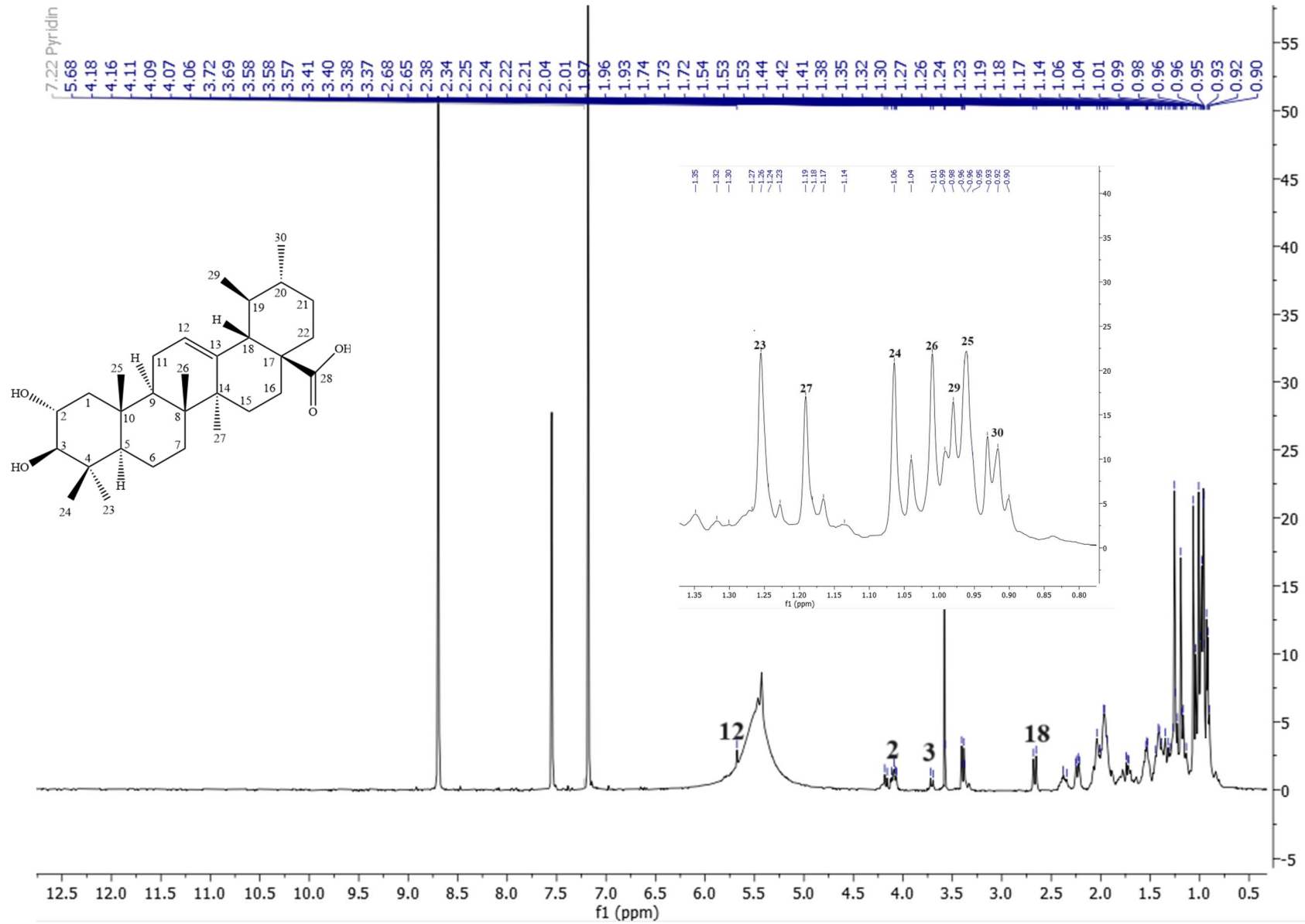
MC-09 bileşiği ile karşılaştırıldığında $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda, 3,39 ppm'de $J=9,3$ Hz yarıma değeri ile orto (*o*) etkileşim gösteren dublet sinyalinin 3 numaralı protona ait rezonans olduğunu, yarımanın da komşuluğundaki 2 numaralı karbondaki yer alan bir protondan kaynaklandığını göstermektedir. Bununla birlikte, δ_{H} 4,09 (1H, dd(t), $J=11,0/4,0$ Hz)'da düşük alanda gözlenen proton sinyalinin bir hidroksil grubuna komşuluğu olduğu ve 2 numaralı karbona bir hidroksil grubunun bağlanmış olabileceğini göstermektedir (248, 249).

$^1\text{H-NMR}$ spektral değerlerinin literatürde bulunan bilgilerle karşılaştırılması sonucunda ve HR-ESI-MS'de gözlenen $[\text{M-H}]^-$ iyon piki ($m/z=471,3488$) ile **MC 11** kodlu bileşiğin yapısının **korosolik asit** olduğu tespit edilmiştir (248, 249).

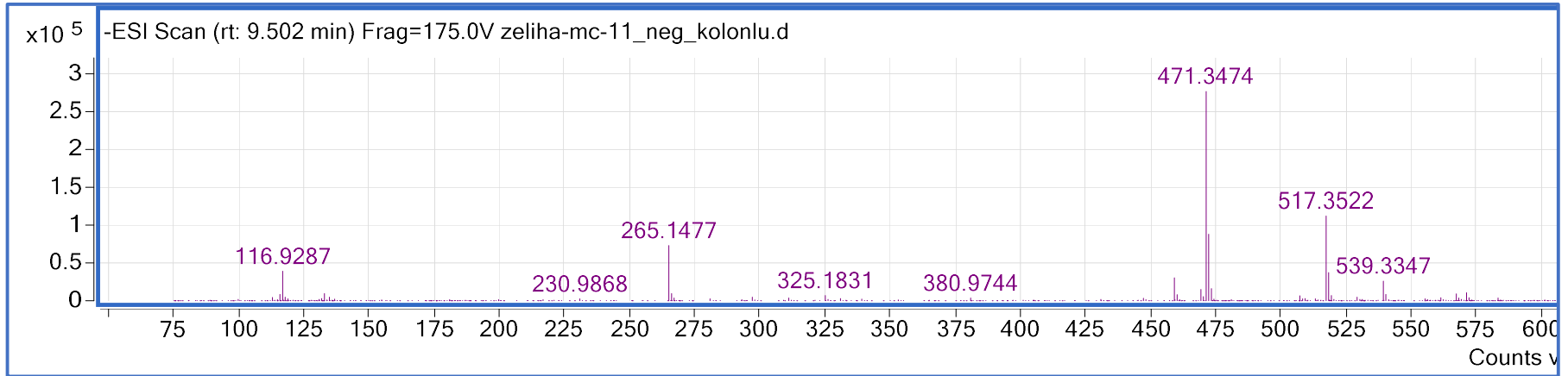
Tablo 4.12. Korosolik asit (MC-11)'in ^1H -NMR spektroskopik değerleri (piridin- d_5 , ^1H : 400 MHz)

MC-11	
C/H	δ_{H} (ppm), J (Hz)
1	-
2	4,09 (1H, dd(t), $J=11,0/4,0$)
3	3,71 (1H, d, $J=10,4$)
4	-
5	-
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-
11	-
12	5,68 (1H)*
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	2,66 (1H, d, $J=11,3$)
19	-
20	-
21	-
22	-
23	1,25 (3H s)
24	1,06 (3H s)
25	0,96 (3H s)
26	1,01 (3H s)
27	1,19 (3H s)
28	-
29	0,96 (3H d, $J=6,3$)
30	0,92 (3H d, $J=5,8$)

*Girişim nedeniyle bazı sinyallerin kenetlenme sabitleri (J) hesaplanamamıştır



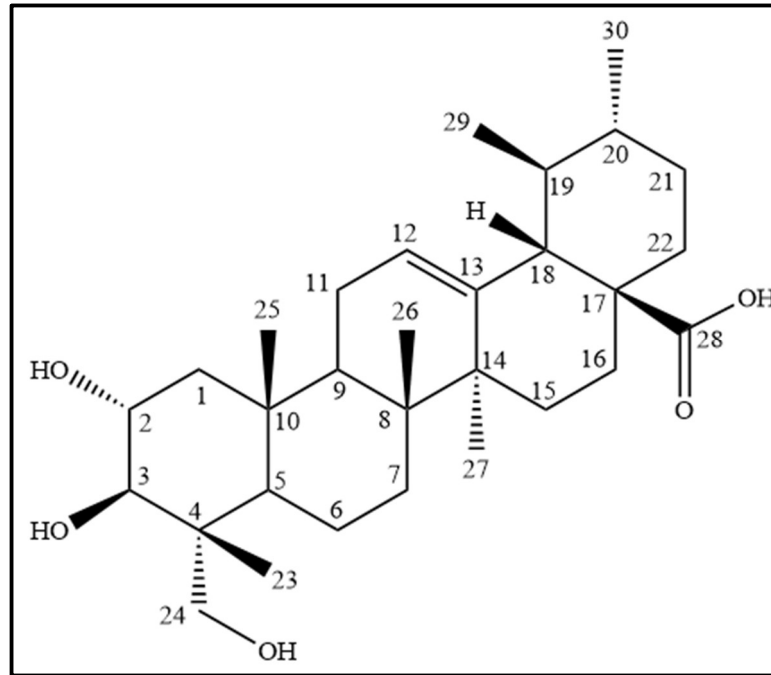
Şekil 4.23. Korosolik asit (MC-11)'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (piridin- d_5 , 400 MHz)



Şekil 4.24. Korosolik asit (**MC-11**)'in HR-ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS (negatif iyon modu) [M-H]⁻: m/z 471,3474 (C₃₀H₄₇O₄, hesaplanan 472,7100)

ASİATİK ASİT (MC-18)



$C_{30}H_{48}O_5$ (Mol. Ağ. 488 g/mol)

1H-NMR	Tablo 4.13. Şekil 4.24.
^{13}C-NMR	Tablo 4.13. Şekil 4.25.
HR-ESI-MS	Şekil 4.26.

%80'lik EtOH ekstresi, çeşitli kromatografik yöntemlerle ayırma ve saflaştırma basamaklarına tabi tutulmuş, MCE-Fr.E fraksiyonundan AKK yöntemiyle beyaz renkli amorf yapıli **MC-18** maddesi elde edilmiştir.

İTK'de UV aktif özellik göstermeyen, %20'lik sülfürik asit püskürtüldükten ve ısıtıldıktan sonra gün ışığında pembe-mor renk ve UV₃₆₆ nm'de ise kızılımsı renk veren **MC-18** kodlu bileşiğin terpen yapısında bir bileşik olabileceği düşünülmüştür.

Bileşiğin proton ve karbon NMR spektral değerlerinin 1D NMR spektrumları (piridin-*d*₅) yardımıyla yorumlanması sonucunda, 1H -NMR spektrumunda yüksek

alandanda yoğun olarak görülen metil sinyalleri ve ^{13}C -NMR spektrumunda 30 C atomuna ait sinyalin gözlenmesi bileşiğin triterpen yapısında olabileceğini göstermiştir.

MC-18'in ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde, δ_{H} 4,22'de (1H, H-3), gözlenen proton sinyali bir hidroksil komşuluğuna (^{13}C -NMR spektrumunda C-3: δ_{C} 78,3 CH), δ_{H} 5,46'da (1H, brt, $J=3,1$ Hz, H-12) görülen proton sinyali ise olefinik proton varlığına işaret etmiştir. Bunların yanında δ_{H} 0,93-1,14 arasında, 3H değerinde, 4'ü singlet, 2'si dublet şeklinde çıkan sinyaller, yapıda 6 metil grubu olduğunu göstermiştir.

^{13}C -NMR spektrumunda düşük alanda gözlenen, δ_{C} 125,6 (C-12, metin-CH) ve δ_{C} 139,4 (C-13, katerner) sinyalleri ile ^1H -NMR spektrumunda δ_{H} 0,96 (3H, d, $J=6,4$ Hz, H-29) ve δ_{H} 0,93'te (3H, d, $J=6,3$ Hz, H-30) dublet olarak gözlenen 2 metil sinyali literatür verileri ile karşılaştırıldığında; C-12/C-13 çifte bağ ve 2 tane dublet metil sinyali ursan tipi triterpenler için karakteristik olup bu bileşiğin de ursan yapısında bir triterpen olabileceğini göstermiştir. ^{13}C -NMR spektrumunda, δ_{C} 180,0'de (C-28) bir katerner karbon sinyalinin gözlenmesi, karboksilik asit varlığına işaret etmiştir.

^1H -NMR spektrumunda, δ_{H} 4,22 (1H, dd, $J=9,2/4,0$ Hz)'de düşük alanda gözlenen proton sinyali, **MC-09** bileşiği ile karşılaştırıldığında bu sinyalin 2,4 ppm düşük alana kayması (δ_{H} 1,81, H-2, **MC-09**; δ_{H} 4,22, H-2, **MC-18**) ve ^{13}C -NMR spektrumunda düşük alanda gözlenen, δ_{C} 69,0 rezonansı 2 numaralı karbona bir hidroksil grubunun bağlanmış olabileceğini göstermektedir. Bu değerler ile yapının **MC-11** bileşiğine benzer olduğu anlaşılmaktadır.

MC-09 ve **MC-11** bileşikleriyle karşılaştırıldığında ^1H -NMR spektrumunda δ_{H} 4,22 (1H, d, $J=10,2$ Hz, H-23 α) ve δ_{H} 3,72 (1H, d, $J=10,5$ Hz, H-23 β)'de düşük alanda gözlenen proton sinyalleri ile ^{13}C -NMR spektrumunda düşük alanda gözlenen δ_{C} 66,6 (C-23) sinyali yapıda bir primer alkol varlığını göstermektedir. **MC-09** bileşiği ile karşılaştırıldığında ^{13}C -NMR spektrumunda, yapıda bir metil sinyalinin eksik olduğu ve δ_{C} 66,6'da gözlenen bu metilen karbon (CH_2) sinyalinin C-23'e atfedilerek 4 numaralı konumda bir primer alkol grubunun varlığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, 4 numaralı karbon rezonansının 4,9 ppm düşük alana (δ_{C} 38,8, C-4, **MC-09**; δ_{C} 43,7, C-4, **MC-18**) ve 24 numaralı karbon rezonansının da 1,9 ppm yüksek alana (δ_{C} 16,4,

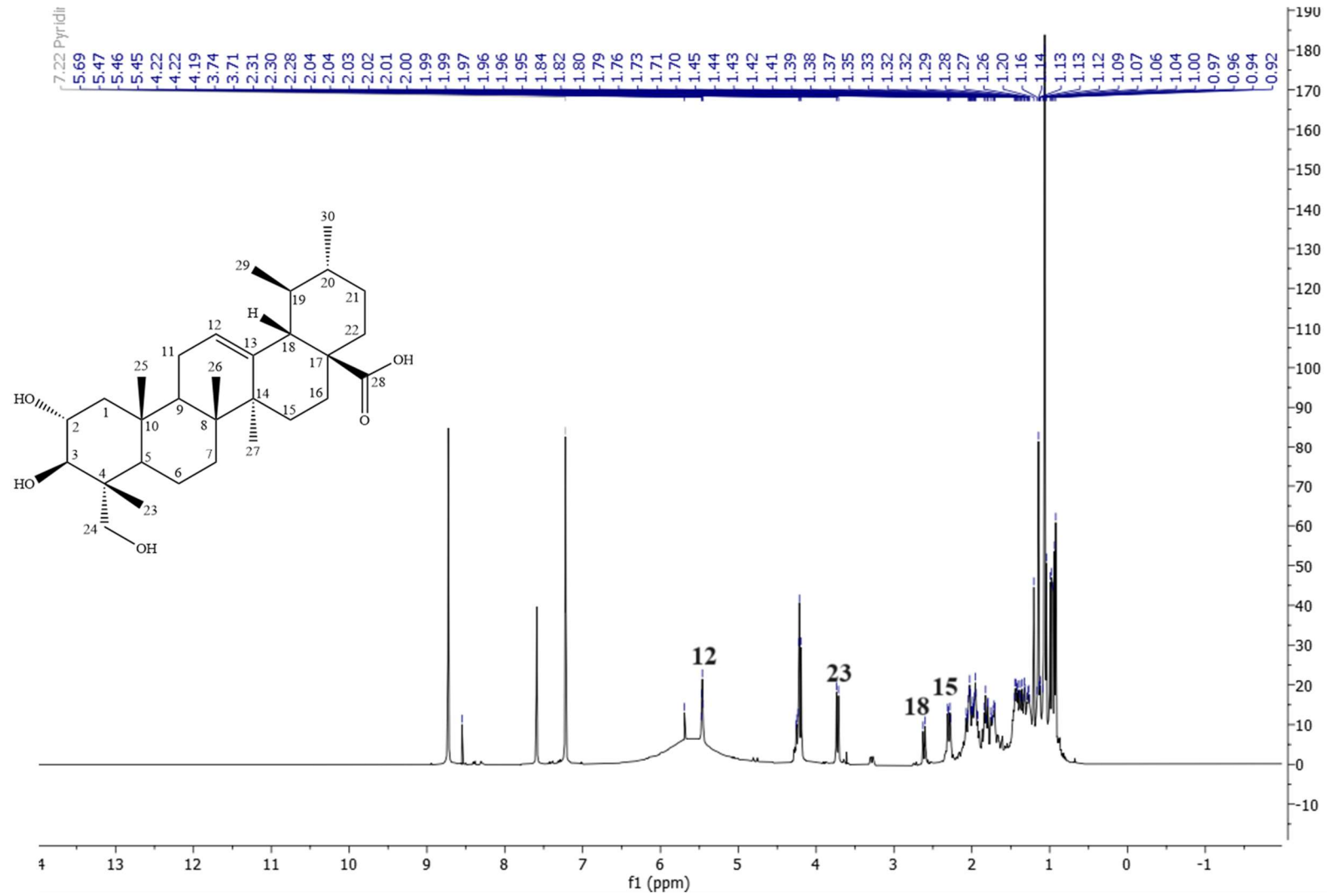
C-24, **MC-09**; δ_C 14,5, C-24, **MC-18**) kaymış olması yapıdaki primer alkol grubunun 4 numaralı karbon atomundan bağlanmış olduğunu göstermiştir.

1D NMR spektral değerlerinin literatürde bulunan bilgilerle karşılaştırılması sonucunda ve HR-ESI-MS'de gözlenen $[M-H]^-$ iyon piki ($m/z=487,3427$) ile **MC-18** kodlu bileşiğin yapısının **asiatik asit** olduğu tespit edilmiştir (250).

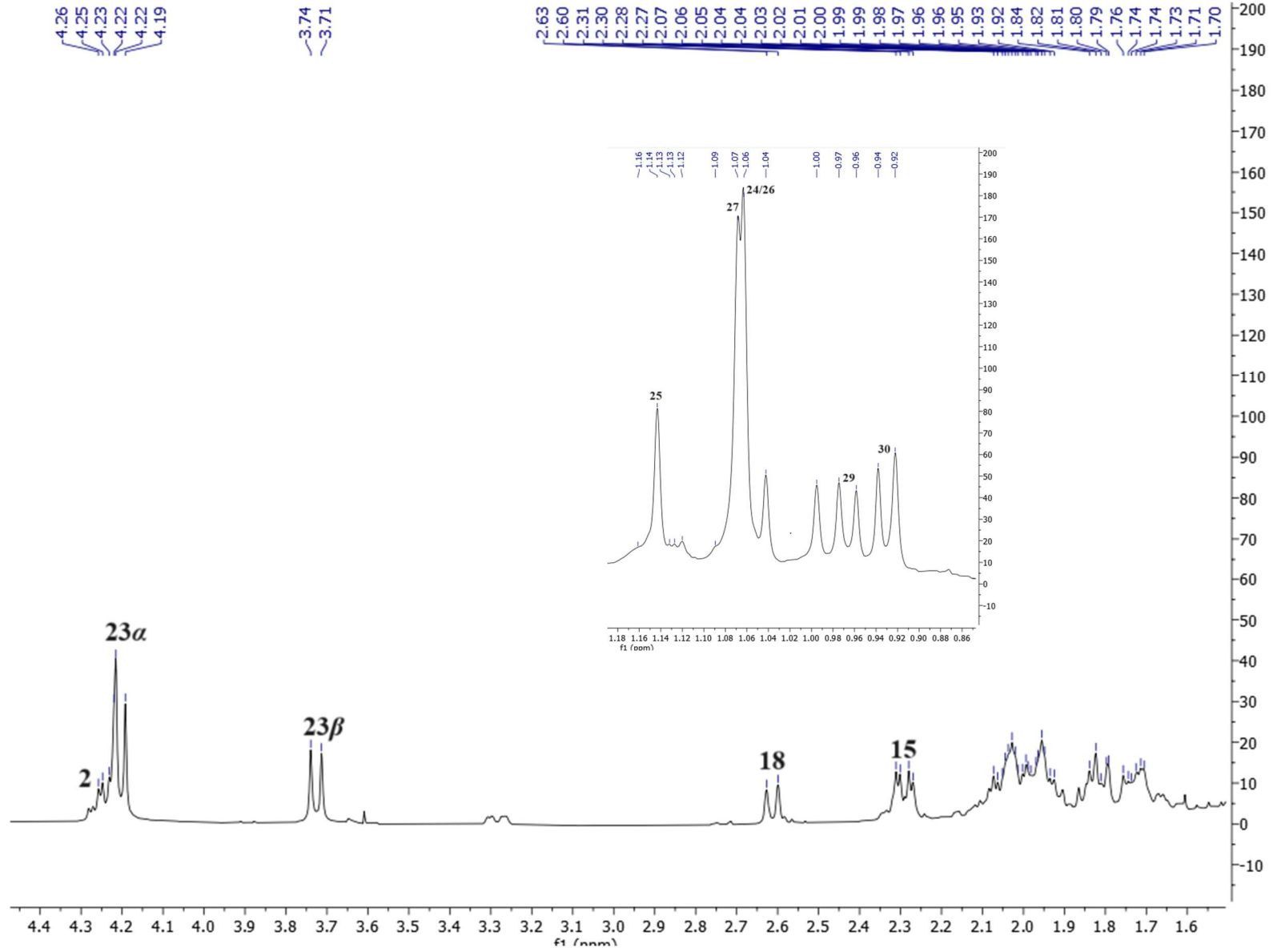
Tablo 4.13. MC-18'e ait ^{13}C - ve 1H -NMR spektroskopik değerleri (piridin- d_5 ; ^{13}C :100 MHz, 1H : 400 MHz)

MC-18		
C/H	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), J (Hz)
1	47,8	-
2	69,0	4,22 (1H, dd, $J=9,2/4,0$)
3	78,3	4,22 (1H)*
4	43,7	-
5	48,0	-
6	18,6	-
7	33,3	-
8	40,1	-
9	48,1	-
10	38,4	-
11	23,8	-
12	125,6	5,46 (1H, brt, $J=3,1$)
13	139,4	-
14	42,6	-
15	28,7	2,29 (1H, dd, $J=12,4/4,4$)
16	25,0	-
17	48,2	-
18	53,6	2,61 (1H, d $J=11,2$)
19	39,5	-
20	39,4	-
21	31,0	-
22	37,5	-
23	66,6	α 4,22 (1H, d, $J=10,2$) β 3,72 (1H, d, $J=10,5$)
24	14,5	1,06 (3H, s)
25	17,5	1,14 (3H, s)
26	17,6	1,06 (3H, s)
27	24,0	1,07 (3H, s)
28	180,0	-
29	17,5	0,96 (3H, d $J=6,4$)
30	21,5	0,93 (3H, d $J=6,3$)

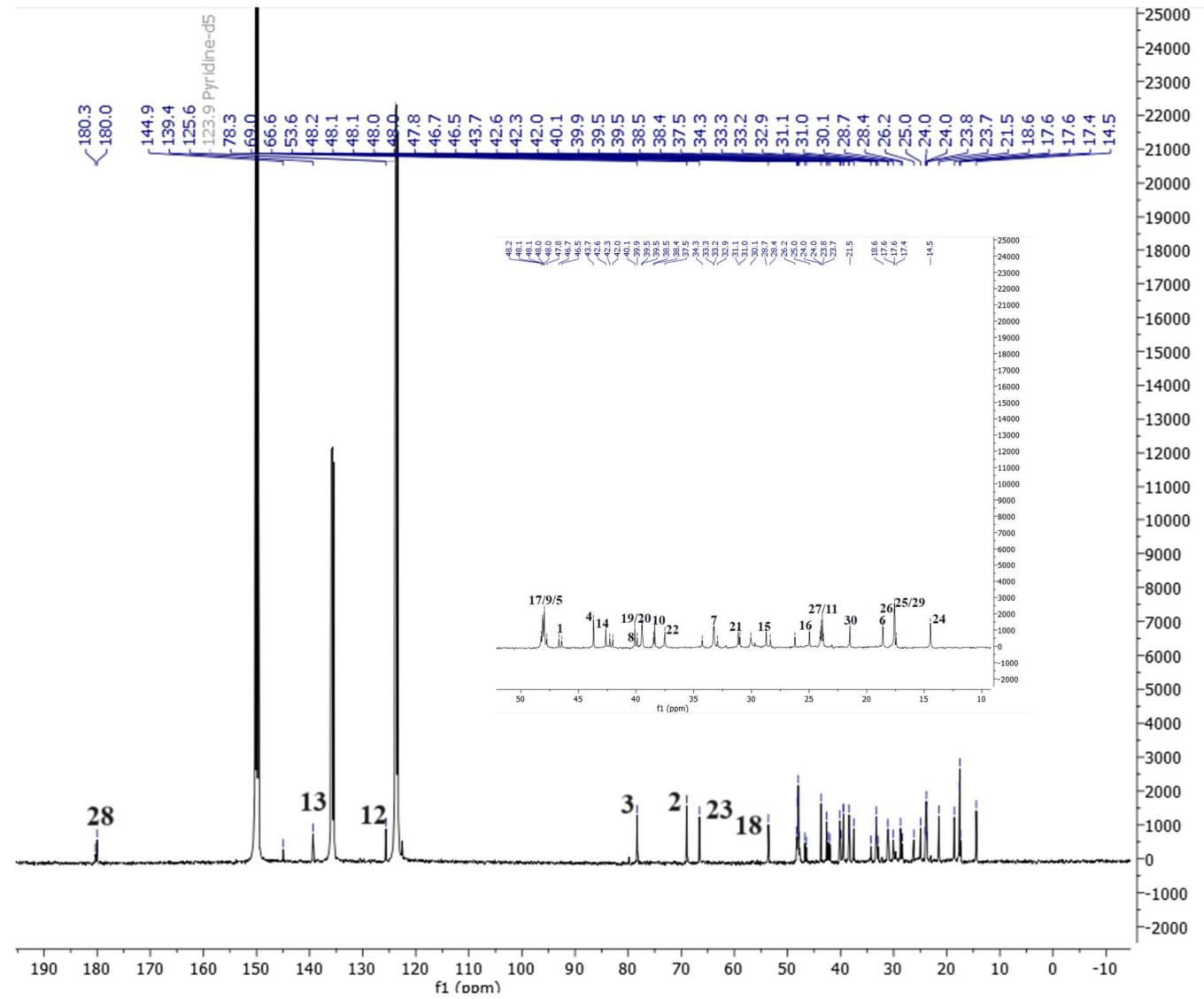
*Girişim nedeniyle bazı sinyallerin kenetlenme sabitleri (J) hesaplanamamıştır



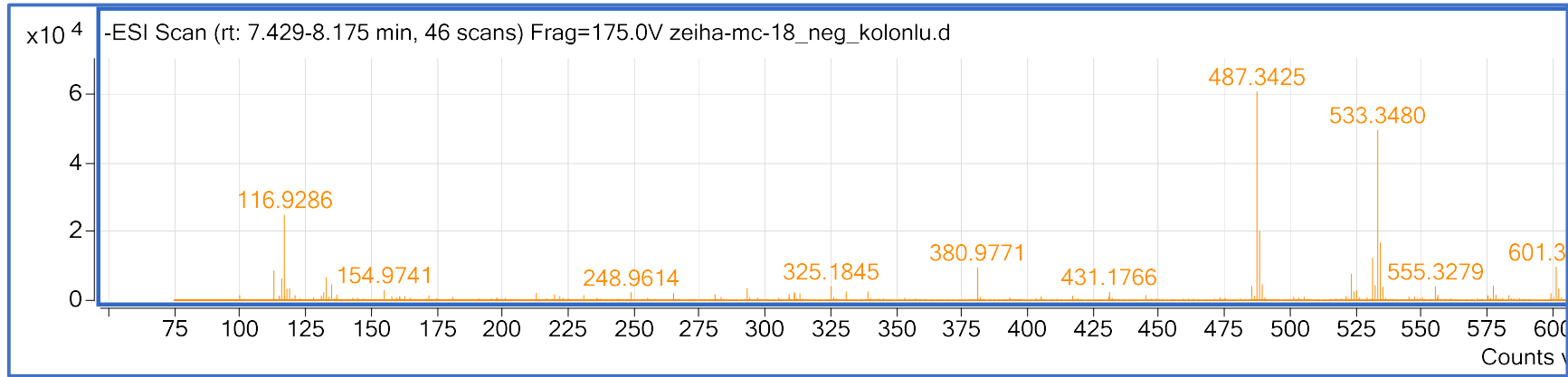
Şekil 4.25. Asiatic asit (MC-18)'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (piridin- d_5 , 400 MHz)



Şekil 4.25. Asiatik asit (MC-18)'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (piridin- d_5 , 400 MHz) (devam)



Şekil 4.26. Asiatik asit (MC-18)'in ^{13}C -NMR spektrumu($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz)

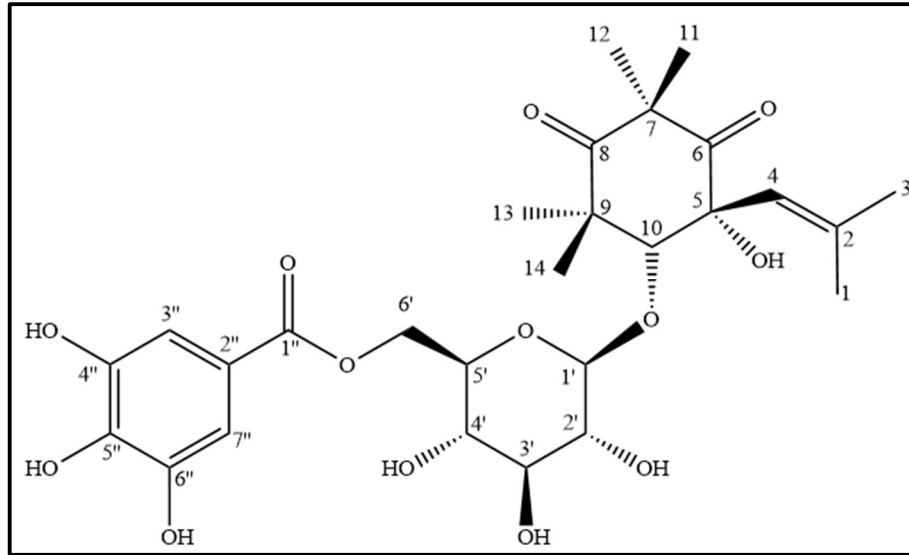


Şekil 4.27. Asiatik asit (**MC-18**)'in HR-ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS (negatif iyon modu) [M-H]⁻: m/z 487,3425 ($C_{30}H_{47}O_5$, hesaplanan 488,7090)

Floroglusinol türevleri

GALLOMİRTUKOMMULON C (MC-04)



$C_{27}H_{36}O_{13}$ (Mol. Ağ. 568 g/mol)

¹H-NMR	Tablo 4.14. Şekil 4.27.
¹³C-NMR	Tablo 4.14. Şekil 4.28.
HR-ESI-MS	Şekil 4.29.

%80'lik EtOH ekstresi, çeşitli kromatografik yöntemlerle ayırma ve saflaştırma basamaklarına tabi tutulmuş, MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonundan VSK ve AKK yöntemleriyle sarımsı-kahverengi renkli **MC-04** maddesi elde edilmiştir.

İTK analizinde reaktif kullanmadan önce UV₂₅₄ nm'de koyu kahverengi, UV₃₆₆ nm'de renksiz, %20'lik sülfürik asit reaktifi püskürtüldükten ve ısıtıldıktan sonra gün ışığında koyu kahverengi ve UV₃₆₆ nm'de gözlenen kahverengi renk, elde edilen maddenin *Myrtus* türlerinde yaygın olarak bulunan floroglusinol grubuna ait bir madde olabileceğini düşündürmüştür.

MC-04 kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda 27 adet karbona karşılık gelen 25 sinyal görülmüştür. Bu rezonanslardan 11'i katerner (C) (3'ü karbonil), 9'u metin (CH), 1'i metilen (CH_2) ve 6'sı metil (CH_3) grubuna aittir.

^1H -NMR spektrumunda düşük (aromatik) alanda δ_{H} 6,94 (H-3''/H-7'')'te görülen 2 proton değerindeki singlet sinyal ile ^{13}C -NMR spektrumunda δ_{C} 165,7'de gözlenen bir karbonil ve δ_{C} 108,7-145,6 arasında gözlenen karbon rezonansları trihidroksisüstitüe aromatik bir yapının varlığını ve bunun da bir galloil ünitesi olduğunu göstermiştir.

^1H -NMR spektrumunda δ_{H} 5,94 (1H, brs, H-4)'te gözlenen olefinik proton, δ_{H} 3,89 (1H, s, H-10)'da gözlenen bir oksimetin sinyali, δ_{H} 1,73 (3H, s, H-1/3)'te gözlenen iki allilik metil ile birlikte δ_{H} 1,00-1,16 (3H, s, H-11/12/13/14) arasında gözlenen dört metil sinyali; bunun yanı sıra, ^{13}C -NMR spektrumunda da, δ_{C} 214,3 (C-8) ve 207,9 (C-6)'da gözlenen iki keton karboniline, δ_{C} 54,0 (C-7) ve 48,7 (C-9)'da gözlenen iki katerner karbon ile δ_{C} 82,7 (C-10)'de gözlenen oksitlenmiş metin karbonuna ait sinyaller bileşiğin floroglusinol yapısında olabileceğini göstermiştir.

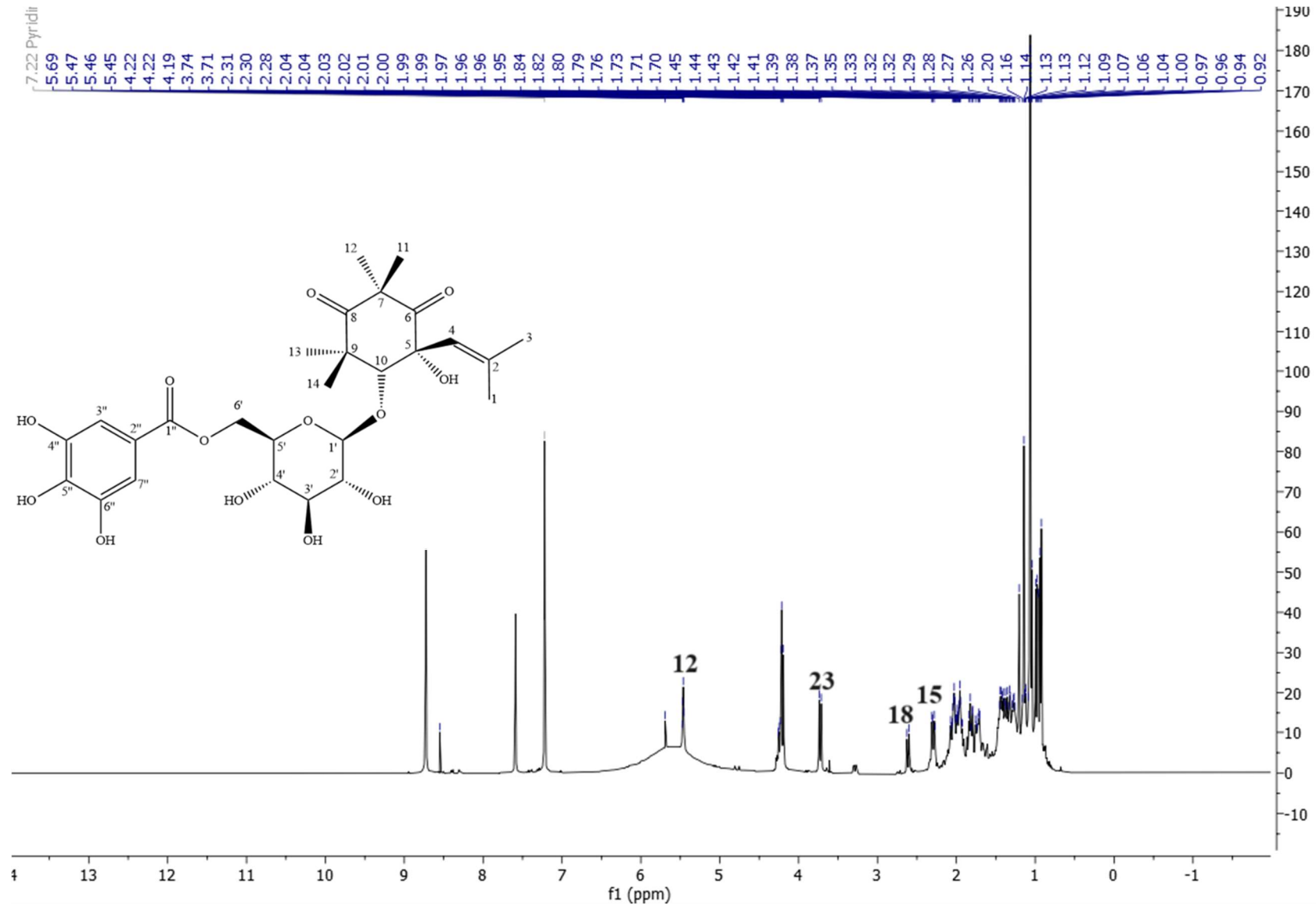
^1H -NMR spektrumunda, δ_{H} 4,48 (1H, d, $J=10,8$ Hz, H-6'a) ve 4,26 (1H, dd $J=11,7/6,8$ Hz, H-6'b) ile δ_{H} 4,17 (1H, d, $J=7,8$ Hz, H-1') ve 2,91-3,16 (H-2', H-3', H-4') arasında gözlenen rezonanslar ile ^{13}C -NMR spektrumunda δ_{C} 63,3-103,1 arasındaki karbon rezonansları [δ_{C} 103,1 (C-1'), 73,7 (C-2'), 76,7 (C-3'), 70,3 (C-4'), 74,1 (C-5'), 63,3 (C-6'a ve C-6'b)] da oz ünitesine ait olup 6 numaralı hidroksil grubundan açillenmiş glukozil ünitesine işaret etmiştir.

1D NMR spektral değerleri yorumlandığında ve literatür ile karşılaştırıldığında, bileşiğin açilfloroglusinol yapısında mirtukommulon türevi olduğu tespit edilmiştir. HR-ESI-MS'de gözlenen $[\text{M}-\text{H}]^-$ iyon piki ($m/z=567,2117$) ile de **MC-04** kodlu bileşiğin yapısının **gallomirtukommulon C** olduğu belirlenmiştir (77).

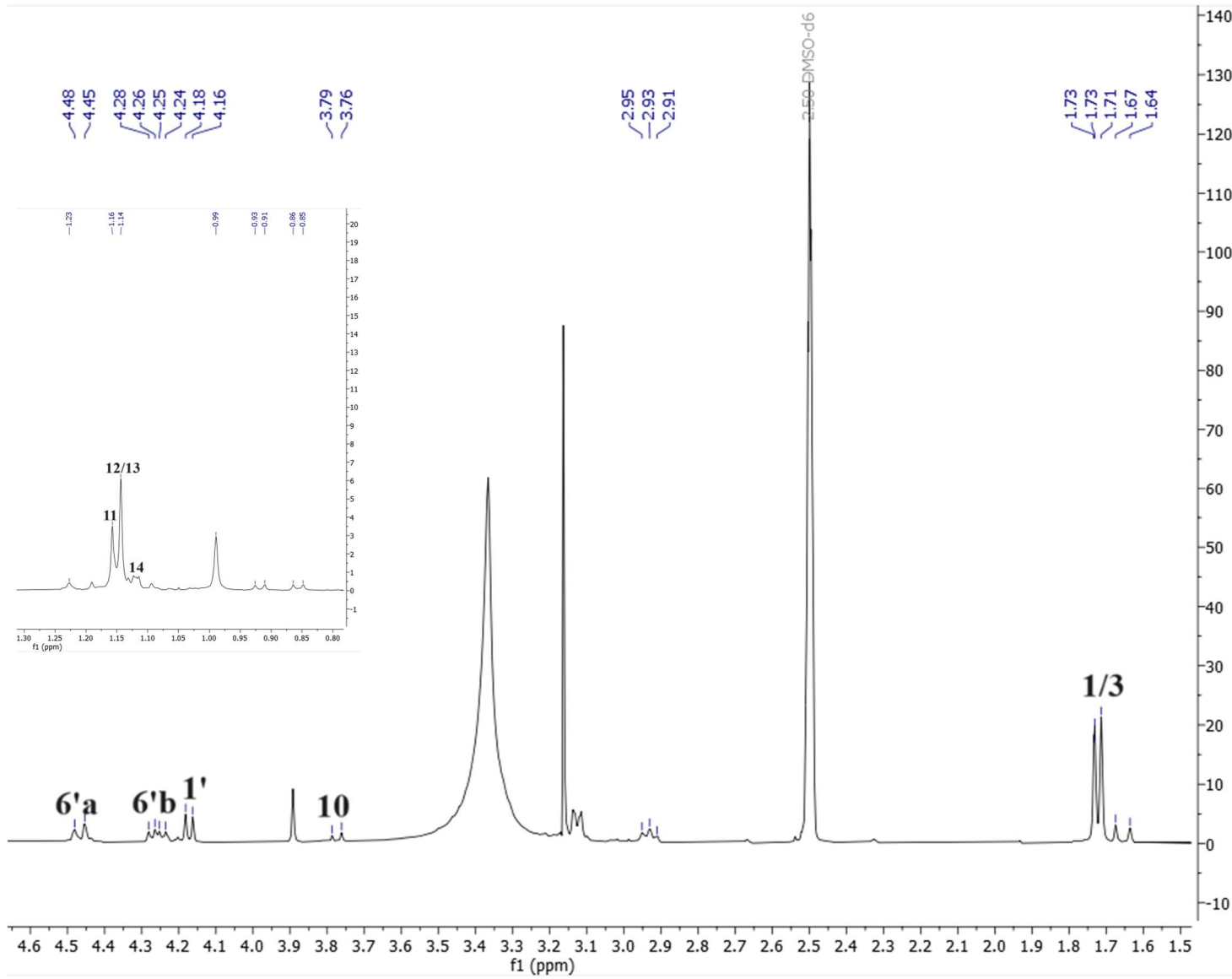
Tablo 4.14. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin ^{13}C - ve ^1H - NMR spektroskopik değerleri (DMSO- d_6 ; ^{13}C :100 MHz, ^1H : 400 MHz,)

MC-04		
C/H	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)
1	26,8	1,73 (3H, s)
2	138,4	-
3	19,2	1,73 (3H, s)
4	119,5	5,94 (1H, brs)
5	77,0	-
6	207,9	-
7	54,0	-
8	214,3	-
9	48,7	-
10	82,7	3,89 (1H, s)
11	25,4	1,16 (3H, s)
12	25,1	1,14 (3H, s)
13	27,7	1,14 (3H, s)
14	24,8	1,00 (3H, s)
1'	103,1	4,17 (1H, d, $J=7,8$ Hz)
2'	73,7	2,91-3,16*
3'	76,7	2,91-3,16*
4'	70,3	2,91-3,16*
5'	74,1	-
6'a	63,3	4,48 (1H, d, $J=10,8$ Hz)
6'b		4,26 (1H, dd $J=11,7/6,8$ Hz)
1''	165,7	-
2''	121,9	-
3''/7''	108,7	6,94 (2H, s)
4''	145,6	-
5''	138,3	-
6''	145,6	-

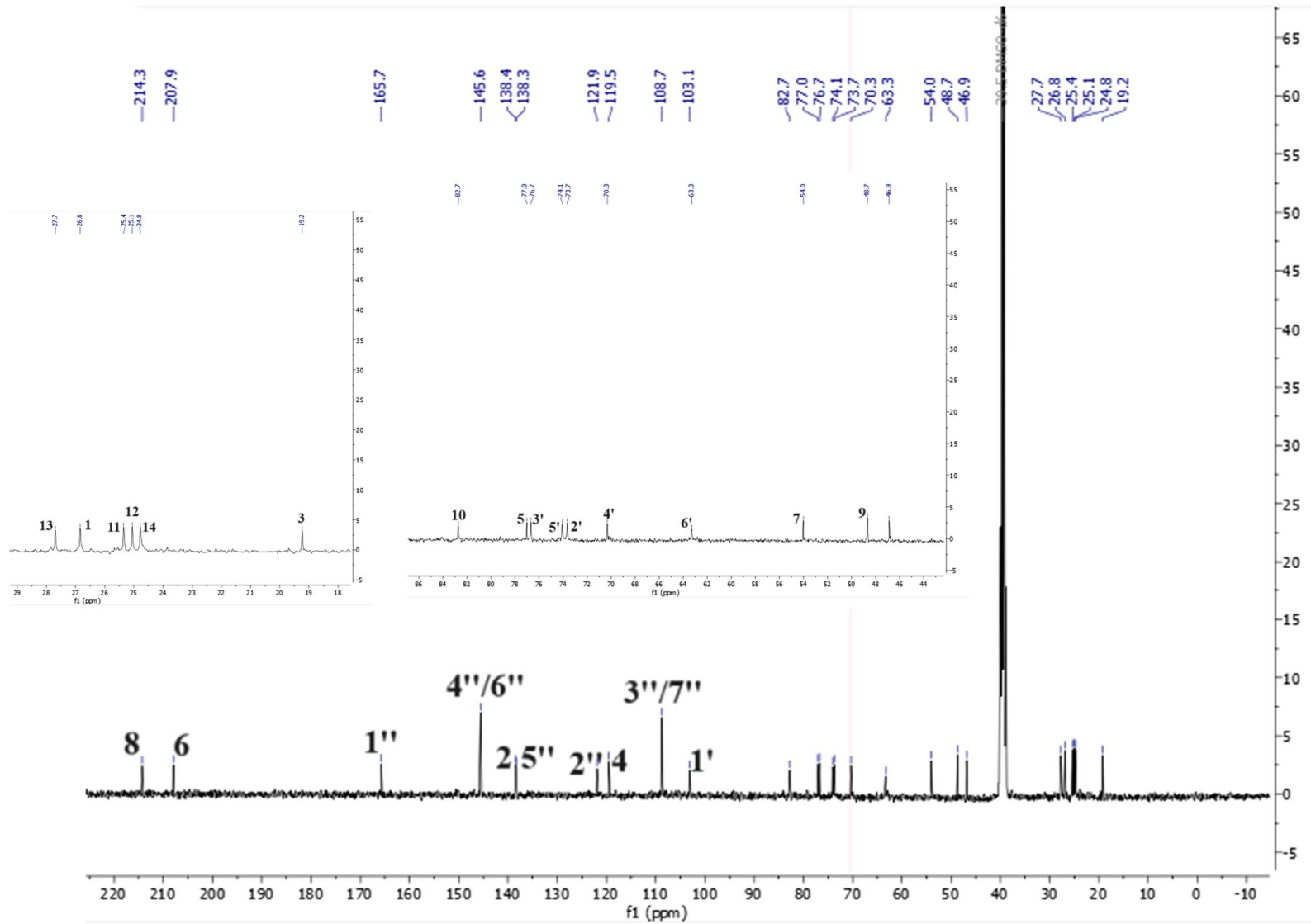
*Girişim nedeniyle bazı sinyallerin kenetlenme sabitleri (J) hesaplanamamıştır



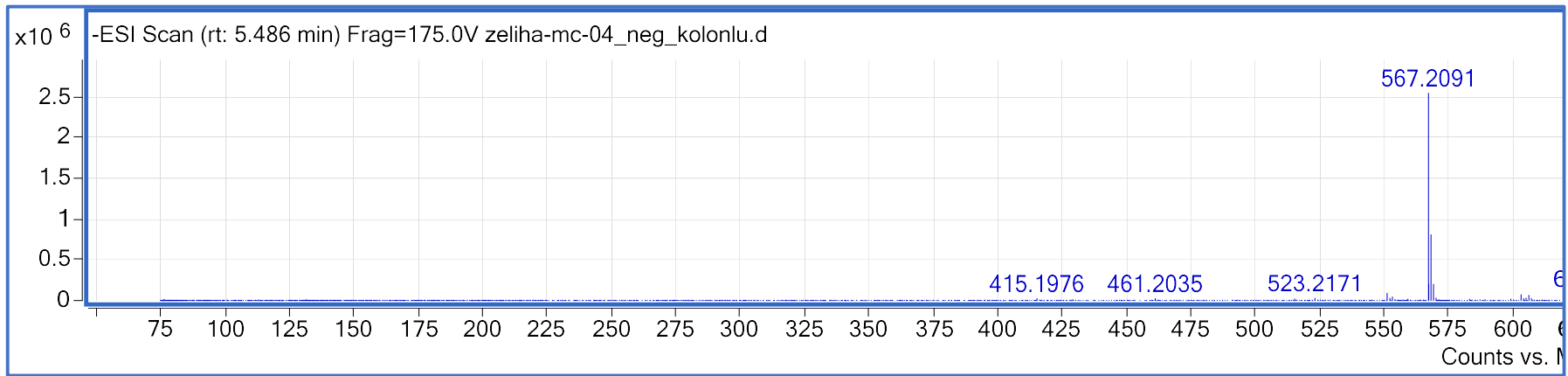
Şekil 4.28. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)



Şekil 4.28. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) (devam)



Şekil 4.29. Gallomirtukommulon C (MC-04)'nin ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6 , 100 MHz)



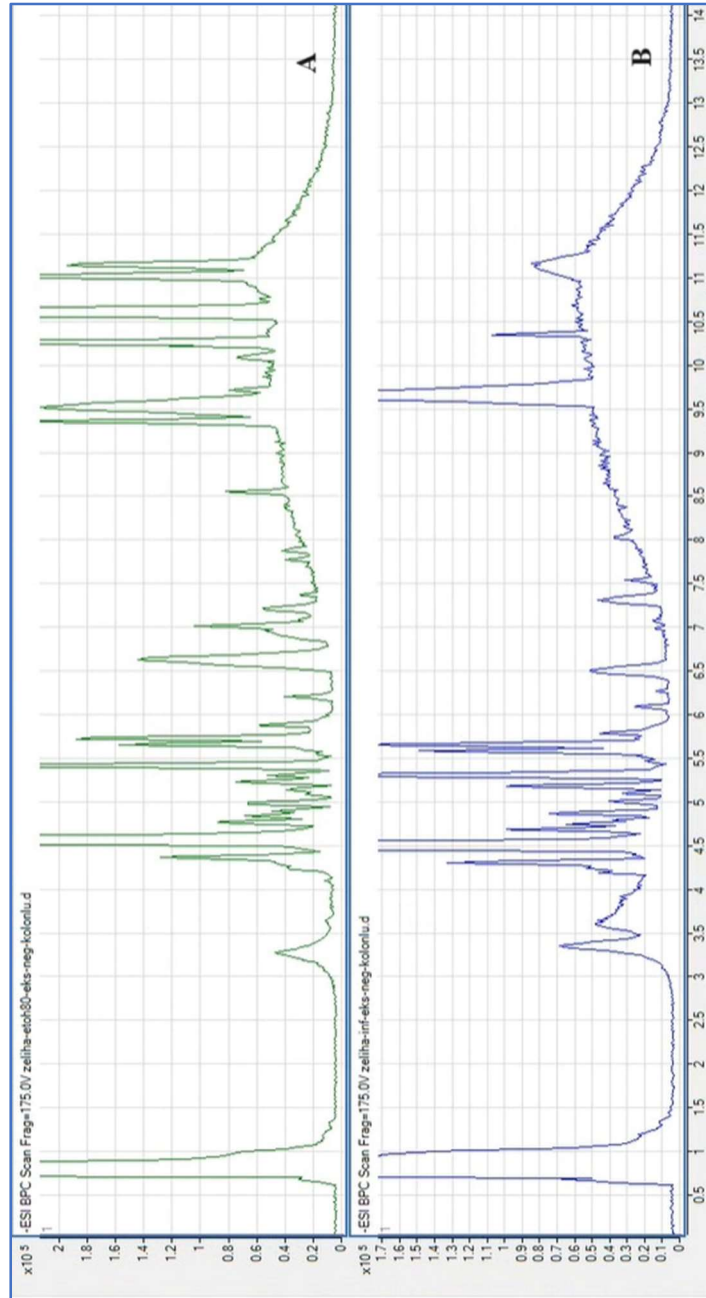
Şekil 4.30. Gallomirtukommulon C (**MC-04**)'nin HR-ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS (negatif iyon modu) [M-H]⁻: m/z 567,2091 ($C_{27}H_{35}O_{13}$, hesaplanan 568,5720)

4.2.2 Metabolomiks Çalışmalarına ait Bulgular

qTOF-LC-MS Çalışmalarına ait Bulgular

MCE ve MCI kodlu %80'lik EtOH ve su ekstraktlarına ait kromatogramlar incelenerek ekstraktların içeriğinde yer alan bileşiklerin alıkonma zamanlarına ve polaritelerine göre karşılaştırması yapılmıştır.



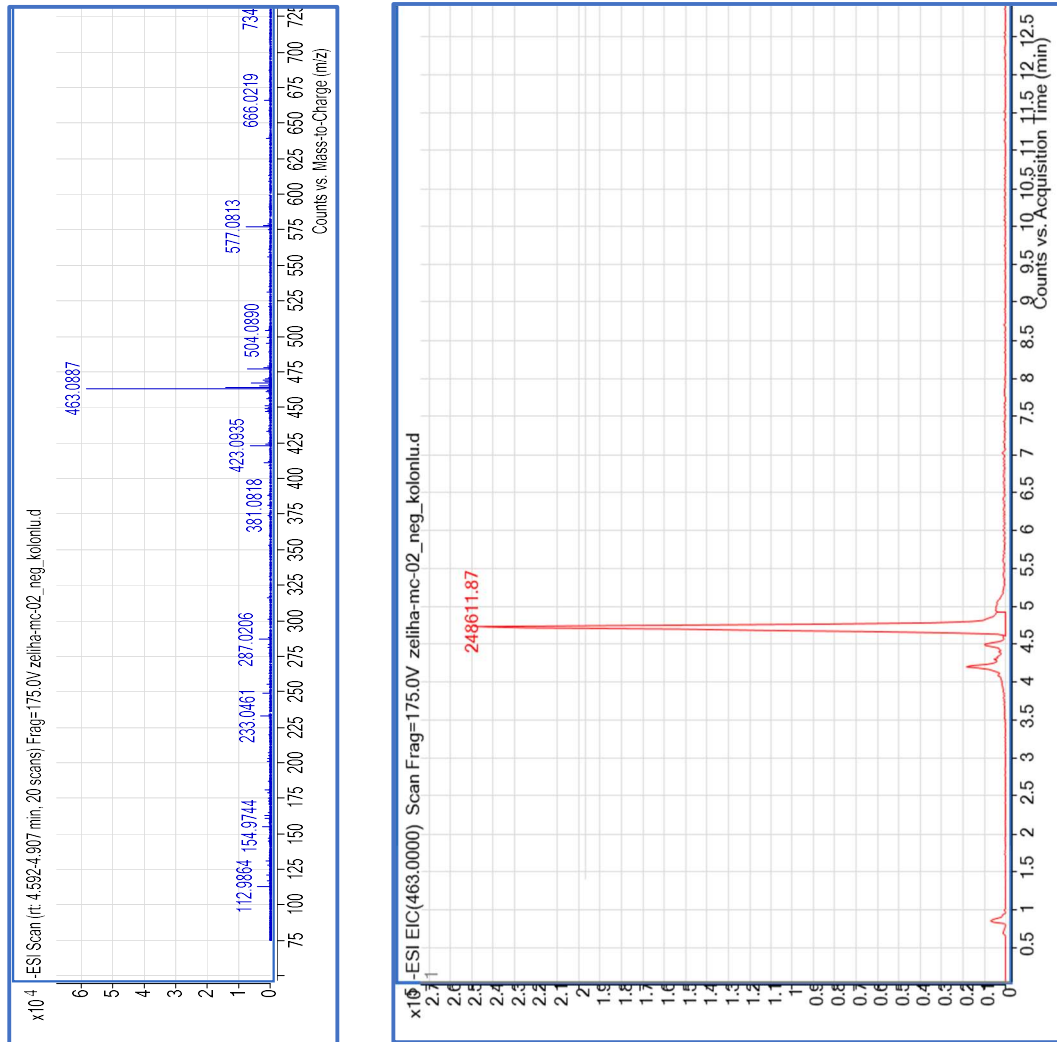
Şekil 4.31. Ekstrelelere ait temel pik kromatogramları.

A: MCE'ye ait kromatogram. B: MCI'ya ait kromatogram

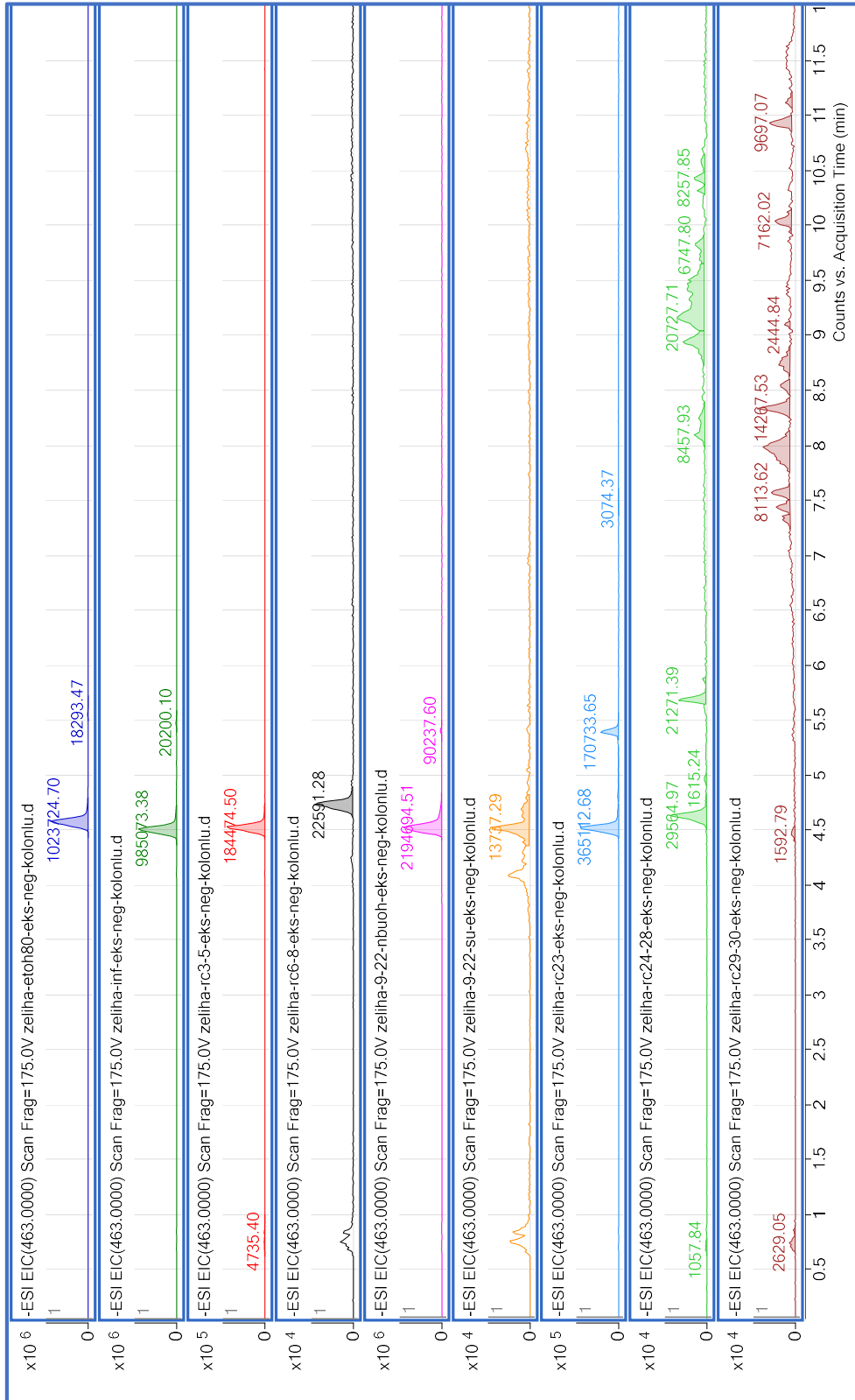
MCE ve MCI'nın kromatogramları karşılaştırıldığında 1-7. dakikalar arasındaki pikler benzerlik gösterirken 7. dakikadan sonra farklılık gösteren piklerden, MCE'nin apolar özellikteki pek çok bileşiğe sahip olduğu, MCI'nın ise bu polaritede daha az bileşiğe sahip olduğu anlaşılmaktadır.

İzolasyon çalışmaları sonucunda elde edilmiş MC kodlu saf bileşiklerin, MCE, MCI kodlu ekstrelerde ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlardaki % miktarları, saf bileşiklerin molekül ağırlığı ve pik yüksekliği parametreleri kullanılarak hesaplanmıştır.

MC-02

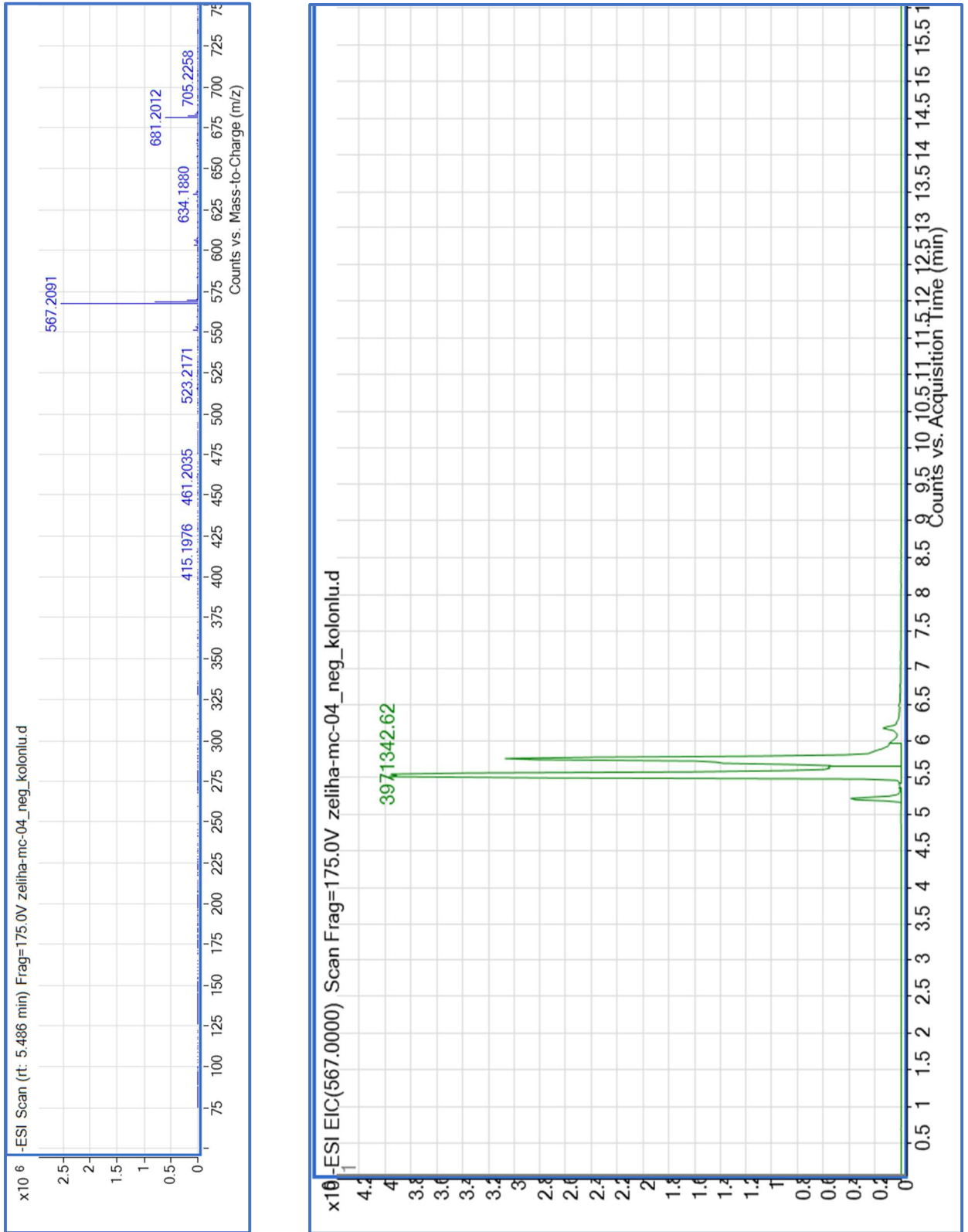


Şekil 4.32. MC-02'ye ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-02'ye ait ayrılmış iyon kromatogramı.

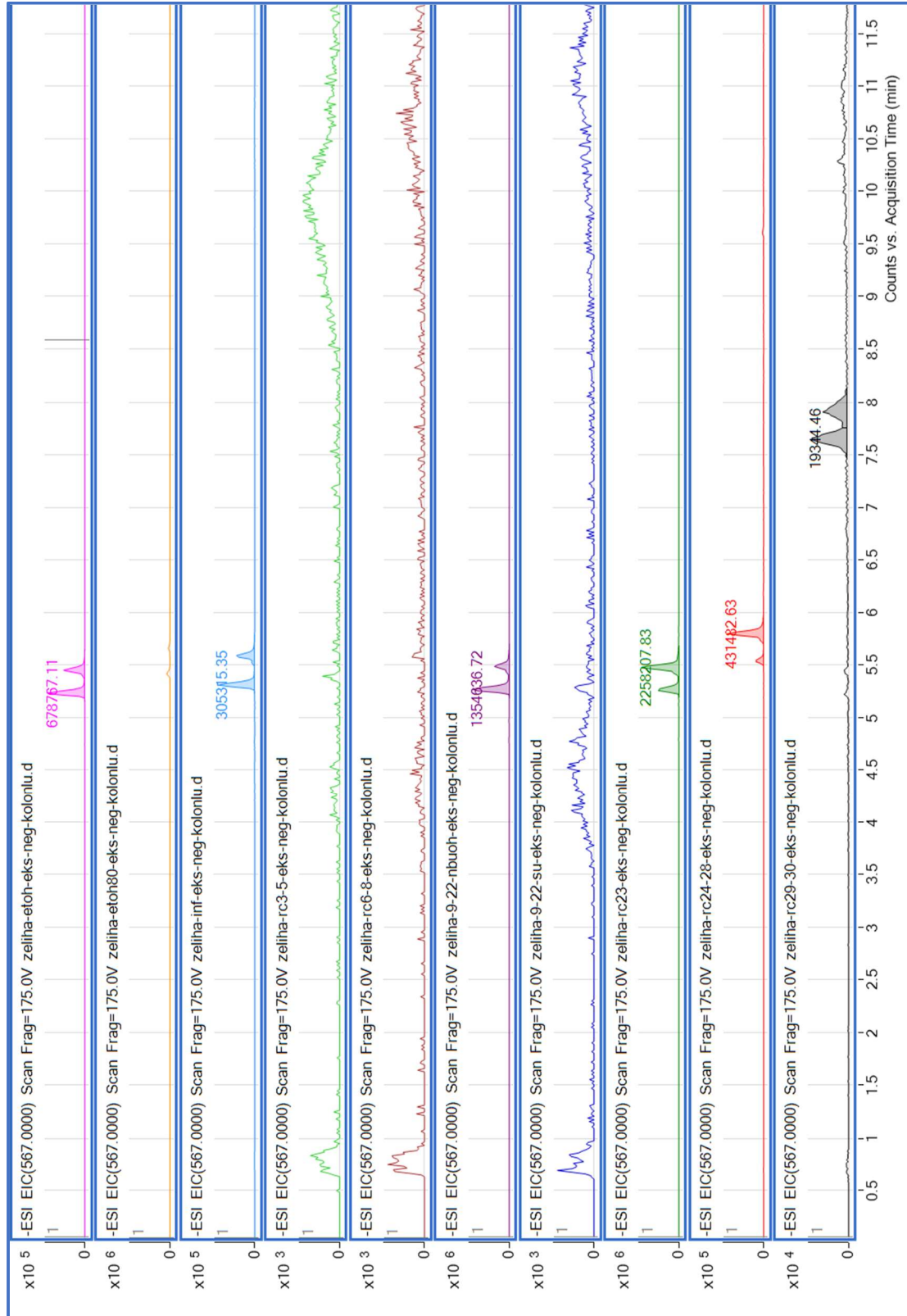


Şekil 4.33. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-02 bileşiğinin iyon kromatogramları.

MC-04

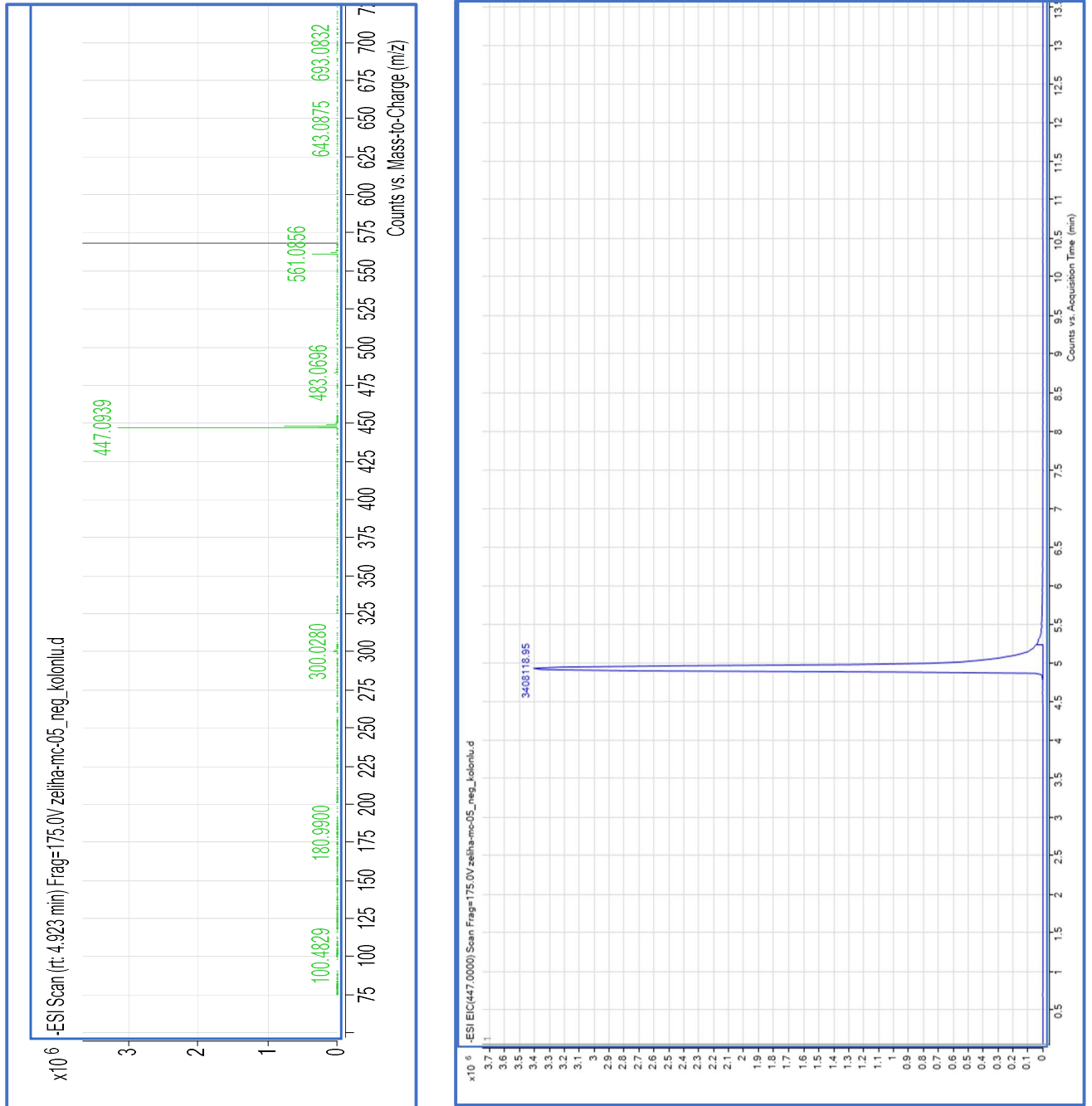


Şekil 4.34. MC-04'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-04'e ait ayrılmış iyon kromatogramı.

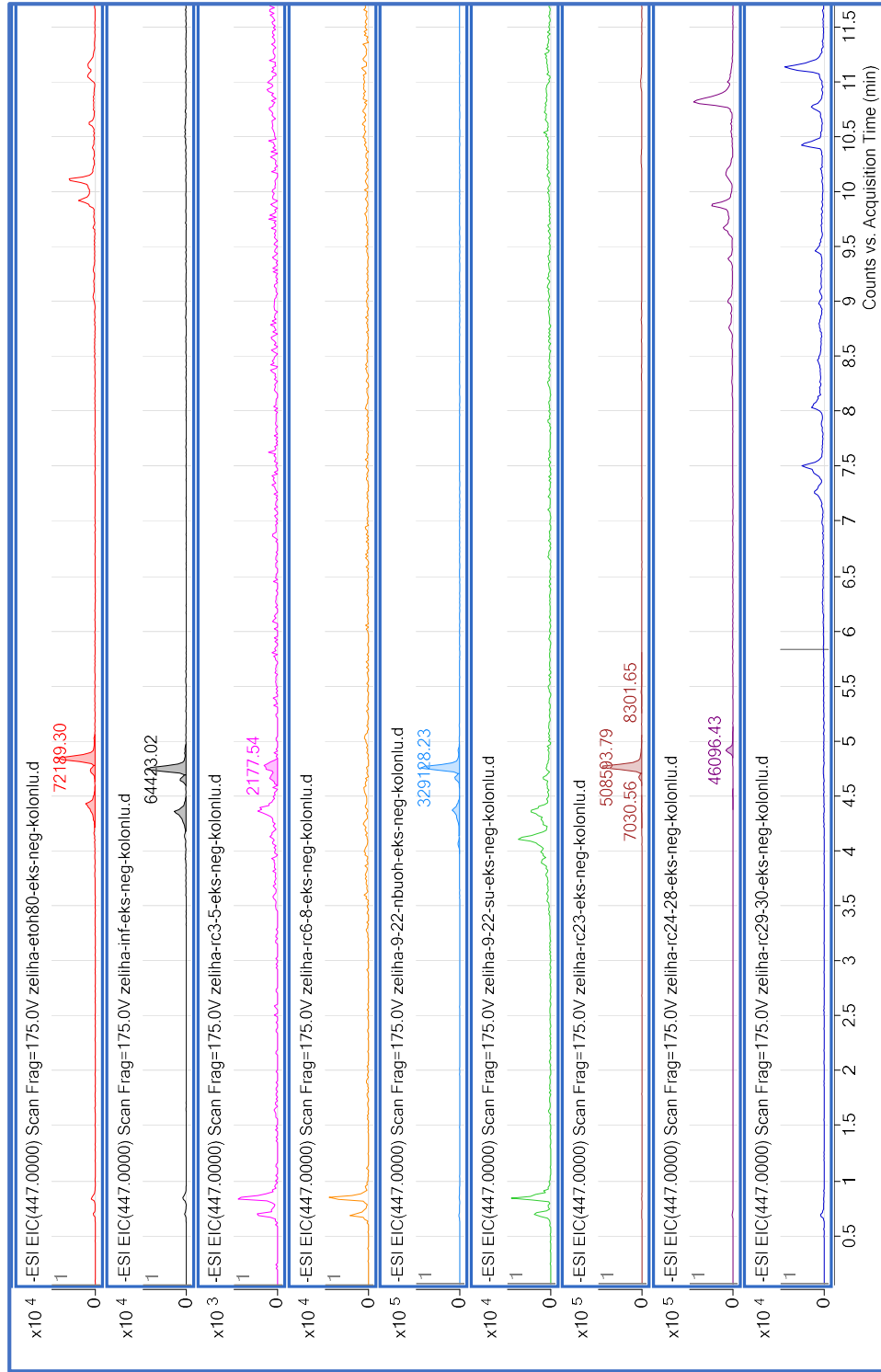


Şekil 4.35. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-04 bileşiminin iyon kromatogramları.

MC-05

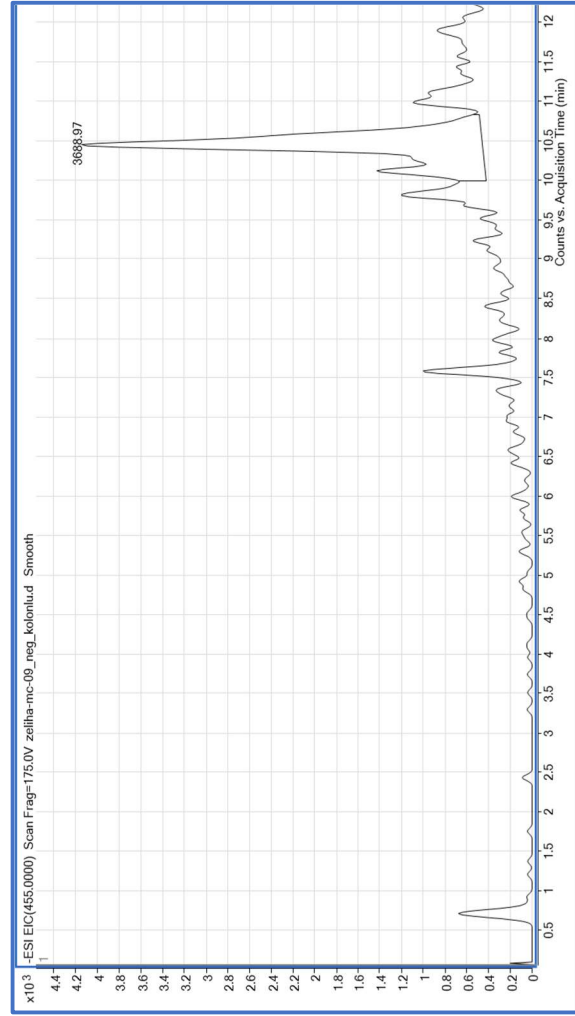
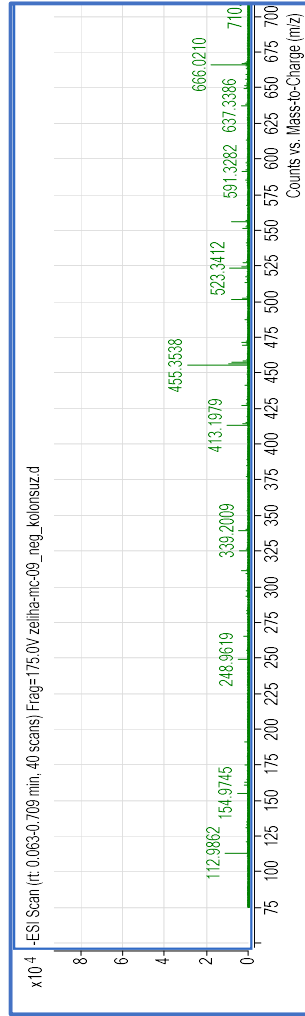


Şekil 4.36. MC-05'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-05'e ait ayrılmış iyon kromatogramı.

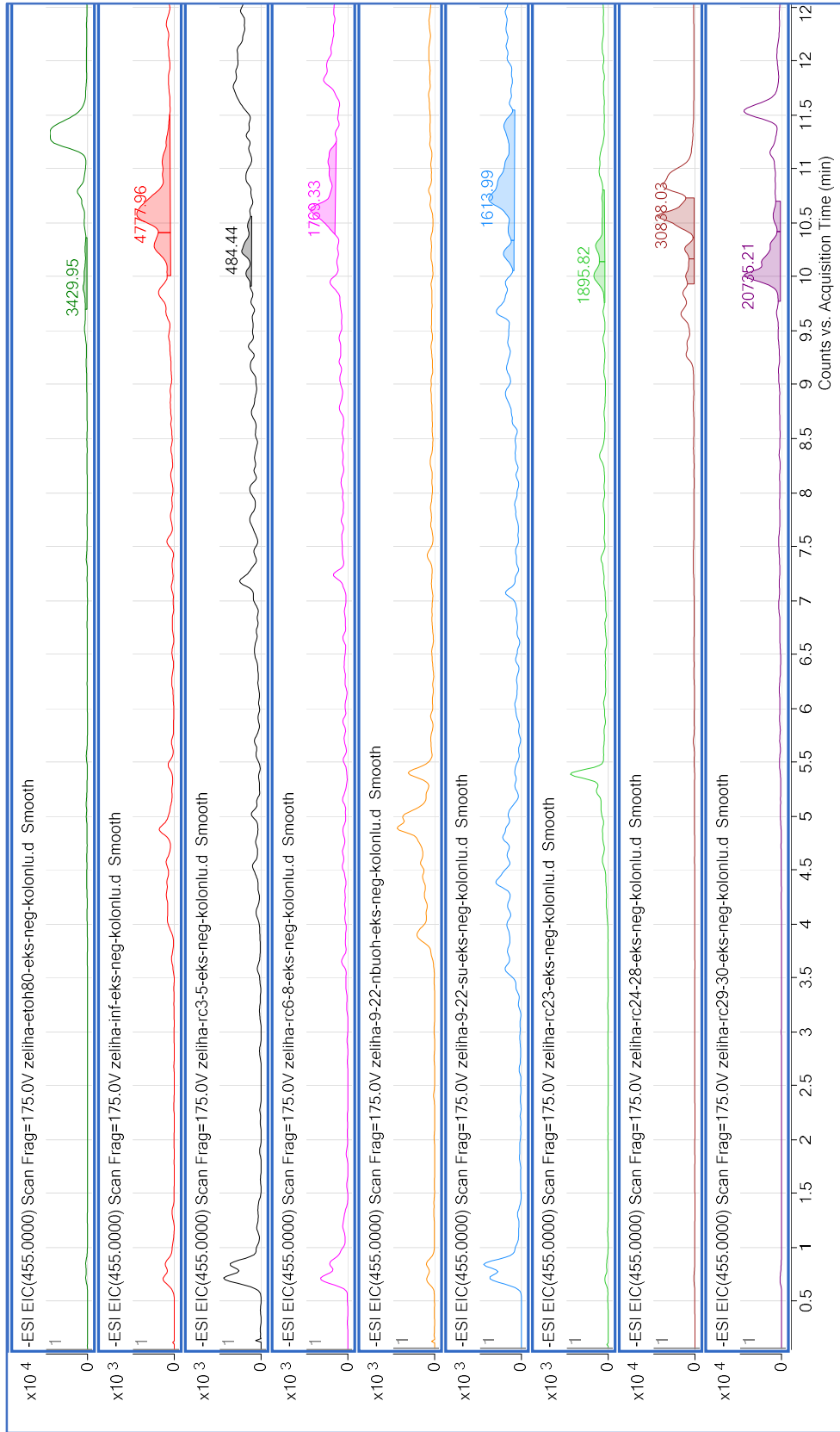


Şekil 4.37. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-05 bileşiminin iyon kromatogramları.

MC-09

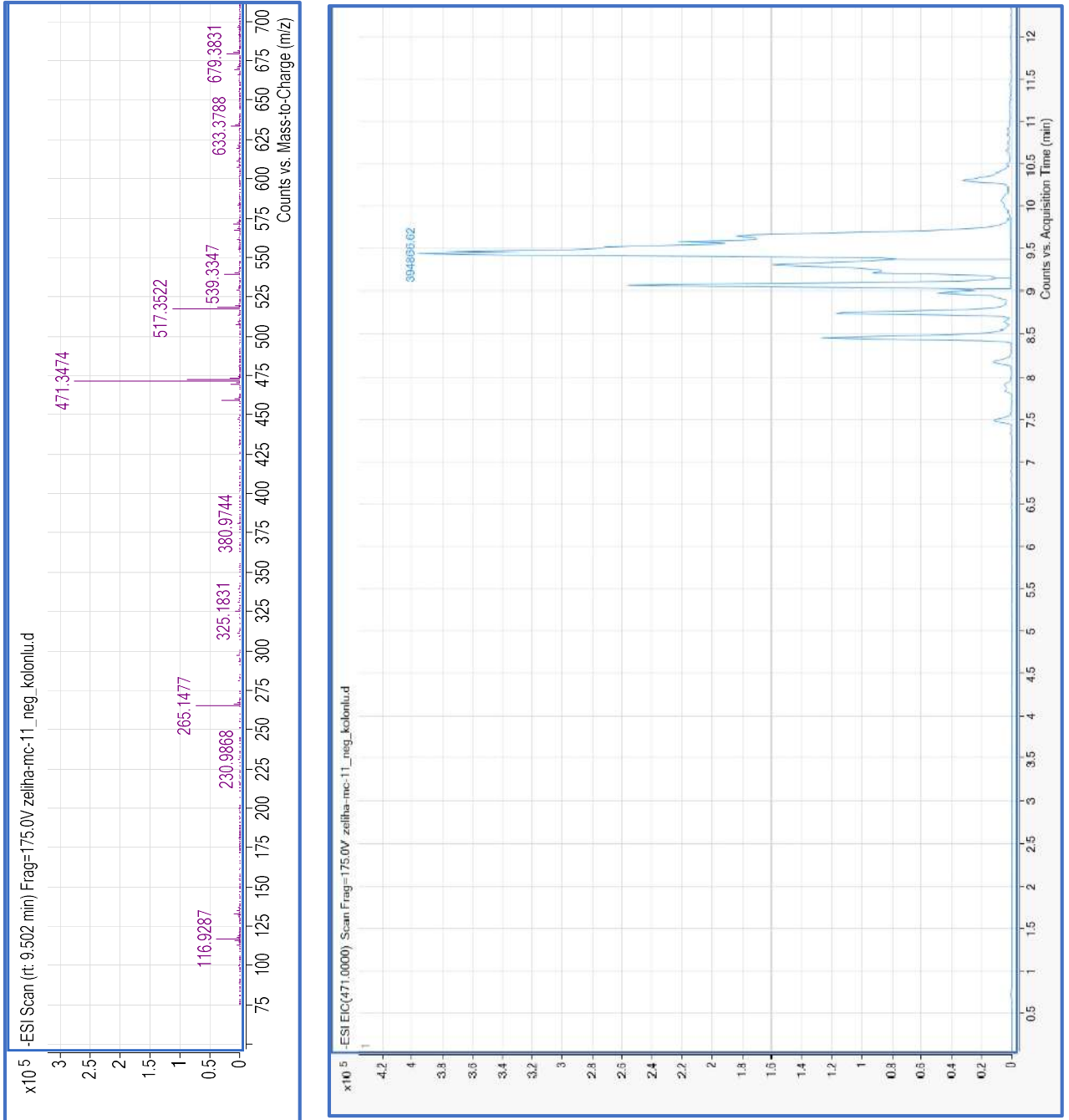


Şekil 4.38. MC-09'a ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-09'a ait ayrılmış iyon kromatogramı

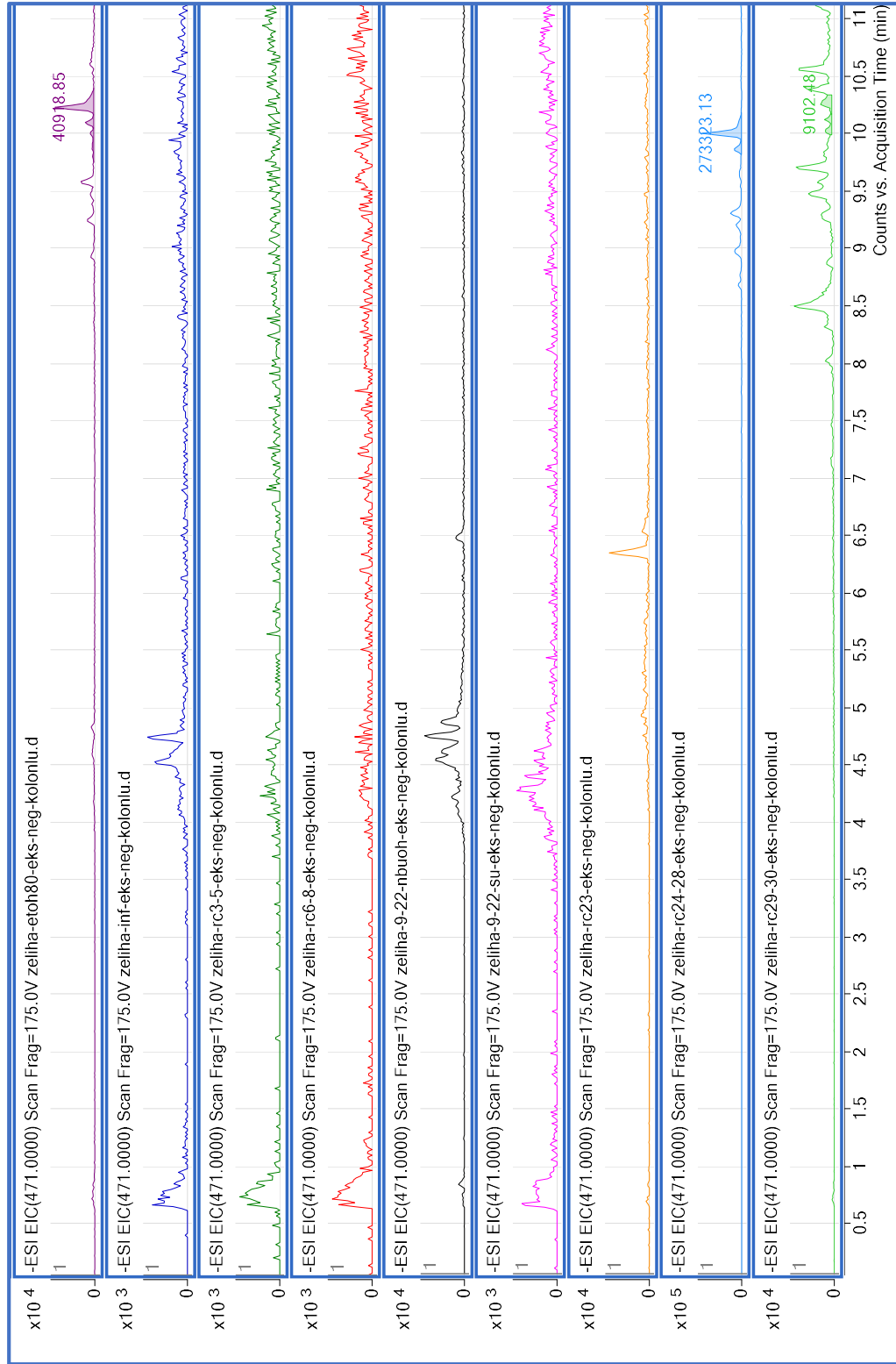


Şekil 4.39. MCE, MCI kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-09 bileşiğinin iyon kromatogramları

MC-11

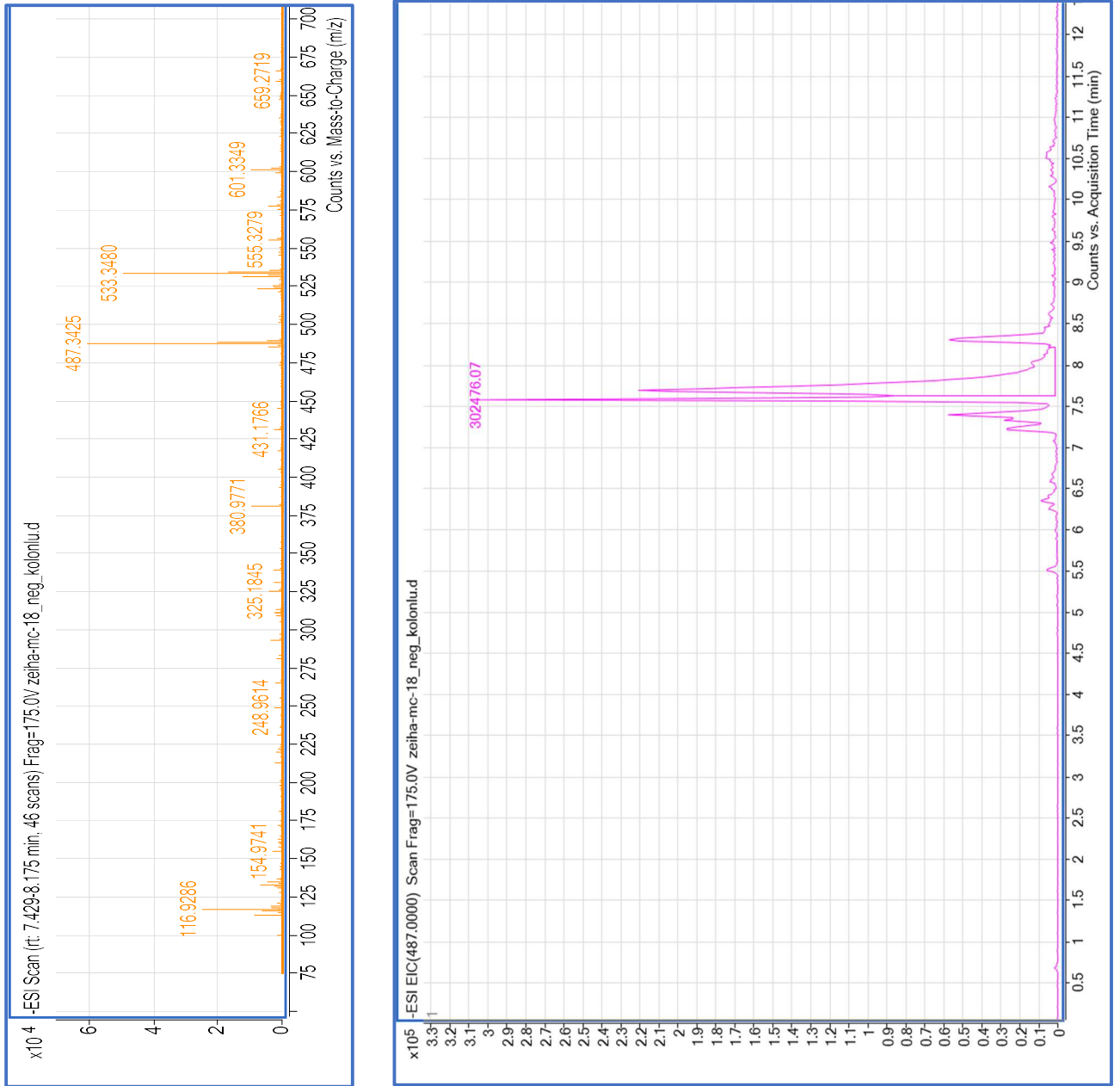


Şekil 4.40. MC-11'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-11'e ait ayrılmış iyon kromatogramı.

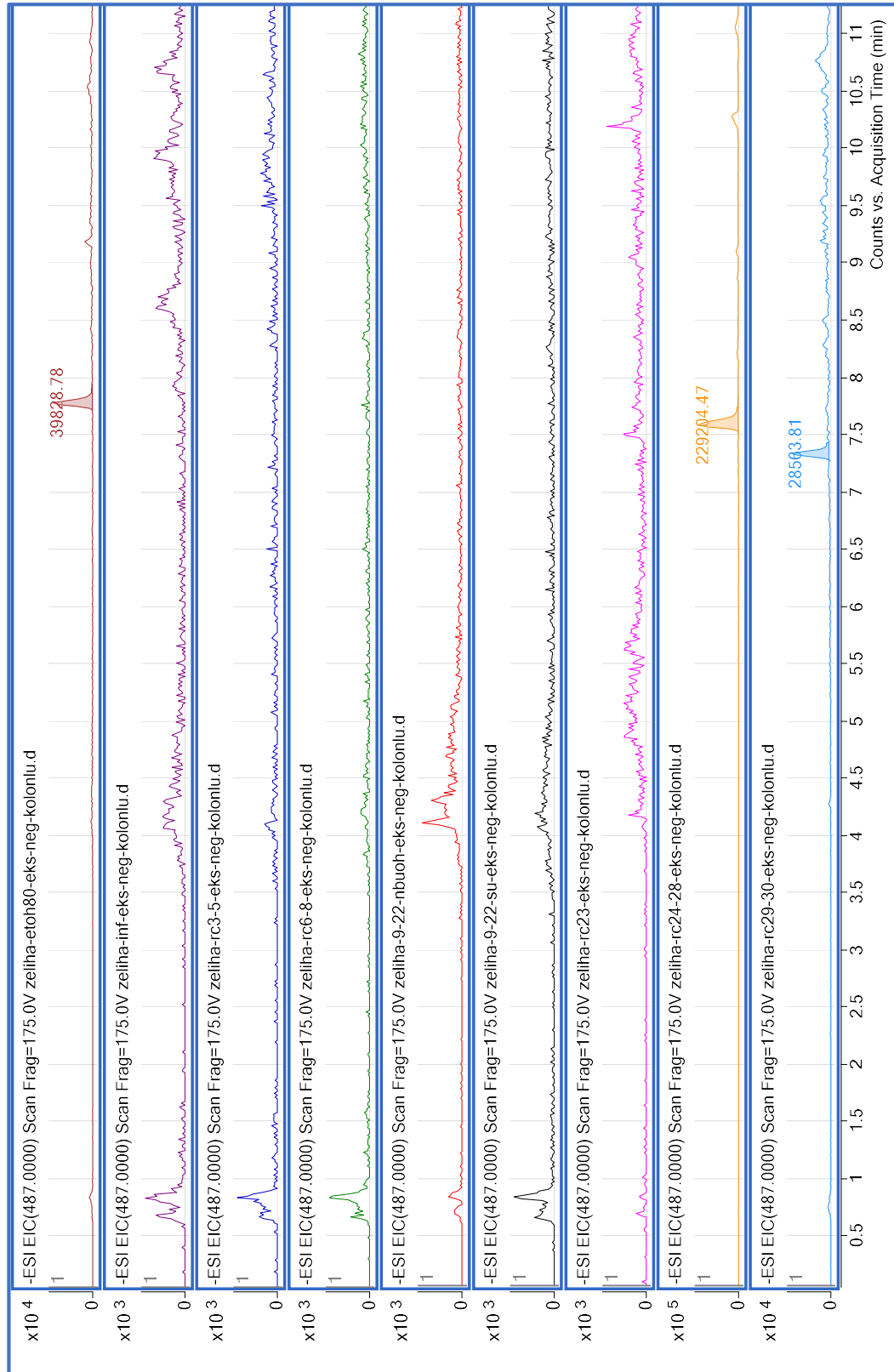


Şekil 4.41. MCE, MCI kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-11 bileşiğinin iyon kromatogramları.

MC-18



Şekil 4.42. MC-18'e ait HR-ESI-MS spektrumu, MC-18'e ait ayrılmış iyon kromatogramı.



Şekil 4.43. MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonlarda bulunan MC-18 bileşiminin iyon kromatogramları.

Tablo 4.15. Saf bileşiklerin ekstre ve fraksiyonlardaki % içerik miktarları

Ekstre ve fraksiyonlar	Miktar (%)					
	MC-02	MC-04	MC-05	MC-09	MC-11	MC-18
MCI	396,2	7,6	1,8	129,5	0	0
MCE	411,8	0	2,1	92,9	10,3	13,1
MCE-Fr.A	74,2	0	0,6	13,1	0	0
MCE-Fr.B	9,1	0	0	47,9	0	0
MCE-Fr.C-BuOH	882,8	34,1	9,6	0	0	0
MCE-Fr.C-Su	5,5	0	0	43,7	0	0
MCE-Fr.D	146,9	56,8	14,9	51,3	0	0
MCE-Fr.E	11,8	10,8	1,3	835,9	69,2	75,7
MCE-Fr.F	640,7	0	0	562	2,3	9,4
Alıkonma zamanı	4,7	5,6	5	10,4	9,5	7,6

M. communis yaprakları izolasyon şemasına bakıldığında (bkz. Şekil 4.12.) **MC-02**, **MC-04** ve **MC-05** kodlu bileşiklerin MCE kodlu %80'lik EtOH ekstresi ve ardından MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonundan başlayarak devam eden kromatografik çalışmalar sonucunda saflaştırıldığı görülmektedir. Yüzde içerik miktarları tablosunda yer alan değerlerden de anlaşıldığı üzere her bir bileşik için ekstreten başlayan izolasyon aşamalarında % içeriğin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde **MC-09**, **MC-11** ve **MC-18** kodlu bileşikler de MCE kodlu ekstre ve MCE-Fr.E kodlu fraksiyondan izole edilmiş olup her bir bileşik için ekstreten başlayan izolasyon aşamalarında % içeriğin doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir.

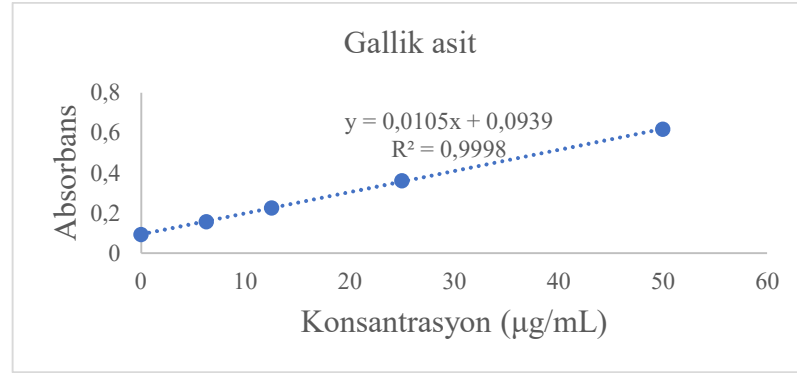
4.2.3 Toplam Madde Miktar Tayinlerine ait Bulgular

Bitkinin fitokimyasal içeriği hakkında nicel verilerin elde edilmesi ve aktivitelerden sorumlu bileşiklerin öngörülmesi amacıyla MCE, MCI kodlu ekstrelerin ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonların toplam madde miktar tayinleri yapılmıştır. Bahsi geçen ekstre ve fraksiyonların sekonder metabolit içeriklerinin İTK analizi de yapılarak sonuçlar karşılaştırılmış ve 5. Tartışma bölümünde değerlendirilmiştir.

Toplam Fenolik Madde Miktar Tayinine ait Bulgular

MCE, MCI kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonların toplam fenolik madde miktar tayinlerine ait bulgular aşağıdaki tablo ve şekilde gösterilmiştir (Tablo 4.16. ve Şekil 4.45.).

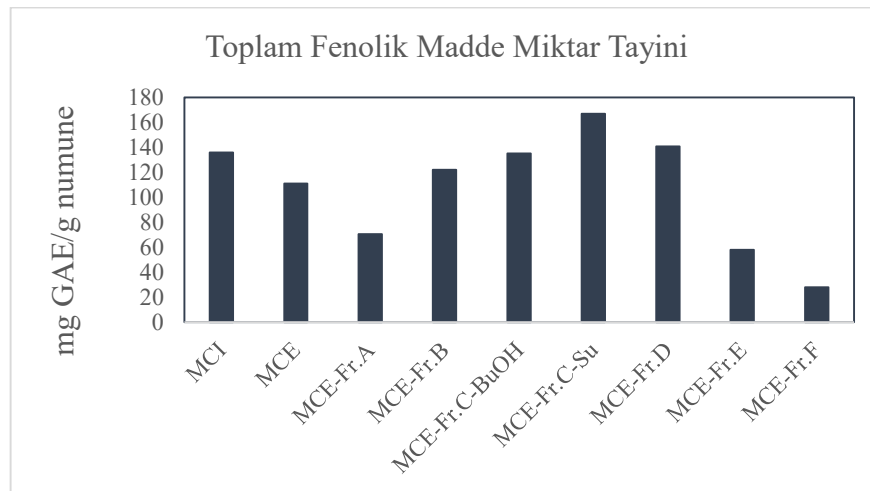
Standart olarak kullanılan gallik asidin 50-6,25 µg/mL konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerlerine göre çizilen standart grafiği ve doğru denklemi aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.44.).



Şekil 4.44. Gallik asit standart grafiği ve doğru denklemi

Tablo 4.16. Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçları

Ekstre/Fraksiyon adı	Gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g numune)
MCI	135,85
MCE	110,90
MCE-Fr.A	70,32
MCE-Fr.B	122,04
MCE-Fr.C-BuOH	135,15
MCE-Fr.C-Su	166,93
MCE-Fr.D	140,74
MCE-Fr.E	57,85
MCE-Fr.F	27,72



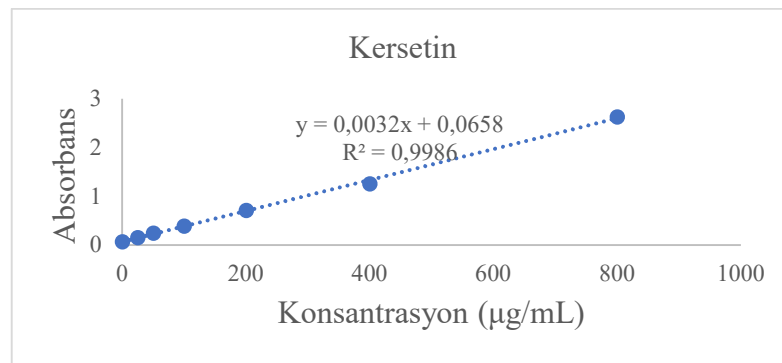
Şekil 4.45. Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçları

Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçlarına bakıldığında MCI (135,85 mg GAE/g numune)'nin MCE'ye (110,90 mg GAE/g numune) göre daha fazla fenolik yapıda madde içerdiği, en yüksek fenolik madde içeriğine MCE-Fr.C-Su fraksiyonunun (166,93 mg GAE/ g numune) sahip olduğu görülmüştür.

Toplam Flavonoit Madde Miktar Tayinine ait Bulgular

MCE, MCI kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonların toplam flavonoit madde miktar tayinine ait bulgular aşağıdaki tablo ve şekilde gösterilmiştir (Tablo 4.17. ve Şekil 4.47.).

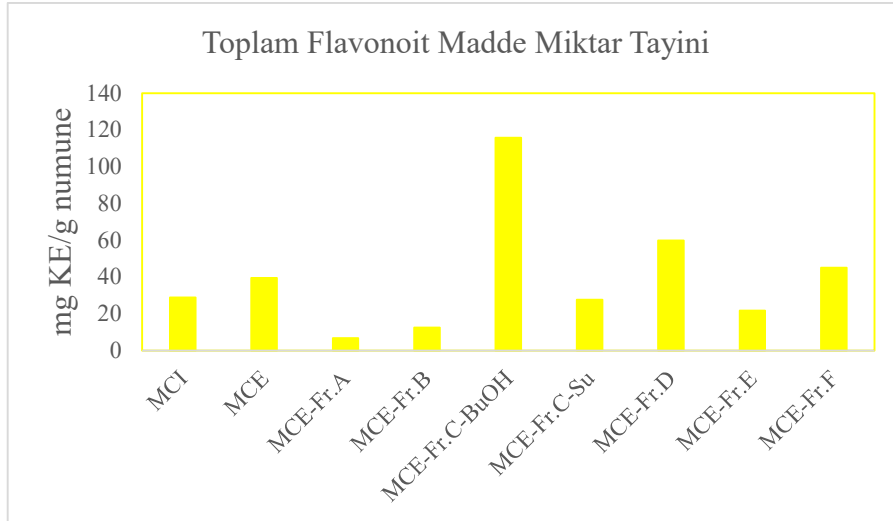
Standart olarak kullanılan kersetinin 800-25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerlerine göre çizilen standart grafiği ve doğru denklemi aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.46.).



Şekil 4.46. Kersetin standart grafiği ve doğru denklemi

Tablo 4.17. Toplam flavonoit madde miktar tayini sonuçları

Ekstre/Fraksiyon adı	Kersetin eşdeğeri (mg KE/g numune)
MCI	28,81
MCE	39,44
MCE-Fr.A	6,62
MCE-Fr.B	12,46
MCE-Fr.C-BuOH	115,69
MCE-Fr.C-Su	27,56
MCE-Fr.D	59,85
MCE-Fr.E	21,73
MCE-Fr.F	45,06



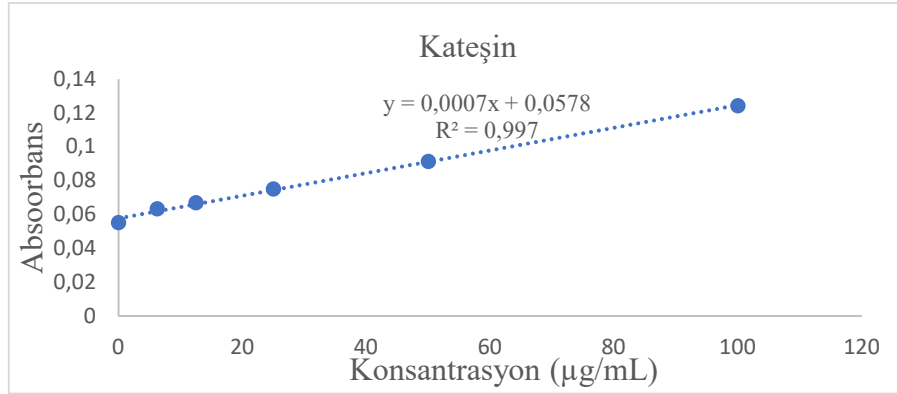
Şekil 4.47. Toplam flavonoit madde miktar tayini sonuçları

Toplam flavonoit madde miktar tayini sonuçlarına bakıldığında MCE'nin (39,44 mg KE/ g numune) MCI'ya (28,81 mg KE/g numune) göre daha fazla flavonoit yapısında bileşik içerdiği, en yüksek flavonoit içeriğine MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonunun (115,69 mg KE/ g numune) sahip olduğu görülmüştür.

Toplam Proantosiyanidin (Kondanse Tanen) Madde Miktar Tayinine ait Bulgular

MCE, MCI kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonların toplam proantosiyanidin madde miktar tayinine ait bulgular aşağıdaki tablo ve şekilde gösterilmiştir (Tablo 4.18. ve Şekil 4.49).

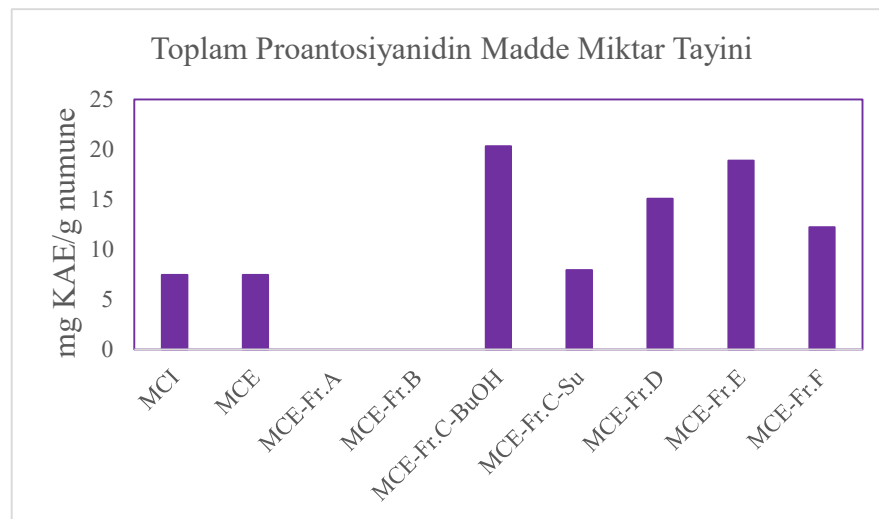
Standart olarak kullanılan kateşinin 100-6,25 µg/mL konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre çizilen standart grafiği ve doğru denklemi aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. Kateşin standart grafiği ve doğru denklemi

Tablo 4.18. Toplam proantosiyanidin madde miktar tayini sonuçları

Ekstre/Fraksiyon adı	Kateşin Eşdeğeri (mg KAE/g numune)
MCI	7,44
MCE	7,44
MCE-Fr.A	0
MCE-Fr.B	0
MCE-Fr.C-BuOH	20,29
MCE-Fr.C-Su	7,91
MCE-Fr.D	15,06
MCE-Fr.E	18,87
MCE-Fr.F	12,20



Şekil 4.49. Toplam proantosiyanidin madde miktar tayini sonuçları

Toplam proantosiyanidin madde miktar tayini sonuçlarına bakıldığında MCE ve MCI'nın toplam proantosiyanidin madde miktarının aynı olduğu sonucuna

ulaşmıştır (7,44 mg KAE/g numune). En yüksek proantosiyanidin içeriği MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonunda (20,30 mg KAE/g numune) görülmüştür.

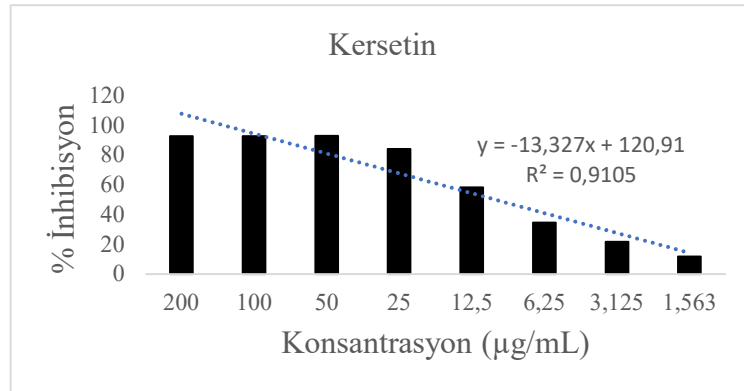
4.3. *In Vitro* Biyolojik Aktivite Çalışmalarına ait Bulgular

4.3.1. *In Vitro* Antioksidan Aktivite Tayin Testlerine ait Bulgular

Ekstrelerin ve fitokimyasal çalışmalar sonucunda kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonların antioksidan aktivitelerini belirlemek için beş farklı yöntem kullanılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

DPPH Radikal Süpürücü Kapasite Tayini

M. communis'ten elde edilen ekstreler ve fraksiyonlar 800-12,5 µg/mL konsantrasyonlarda; standart madde olarak kersetin 200-1,56 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Ölçülen absorbansa karşılık gelen konsantrasyon değerleri kullanılarak %inhibisyon değeri hesaplanmış ve konsantrasyona bağlı % inhibisyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.50.).

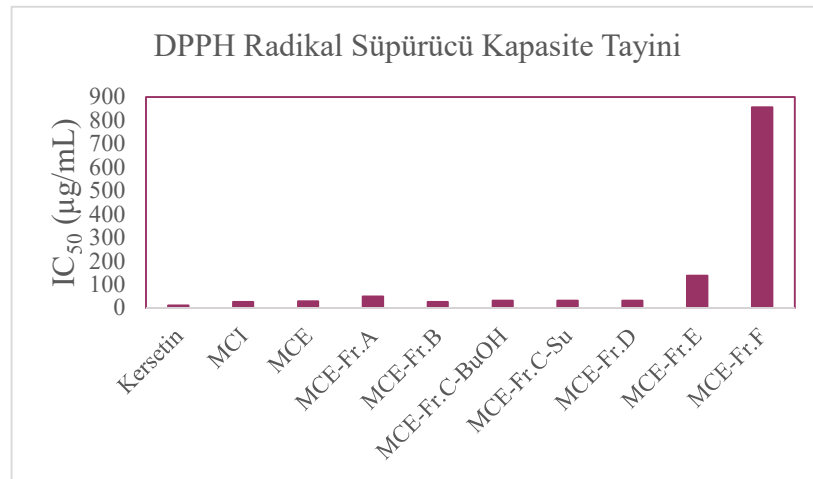


Şekil 4.50. Kersetin standardına ait DPPH radikal süpürücü kapasitesinin % inhibisyon değerleri

Numuneler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aşağıdaki tabloda ve şekilde ifade edilmiştir (Tablo 4.19. ve Şekil 4.51.).

Tablo 4.19. Numunelerin DPPH radikaline karşı IC₅₀ değerleri

Ekstre/fraksiyon adı	IC ₅₀ değeri (µg/mL)
MCI	25,37
MCE	27,89
MCE-Fr.A	49,05
MCE-Fr.B	25,68
MCE-Fr.C-BuOH	31,31
MCE-Fr.C-Su	31,66
MCE-Fr.D	31,22
MCE-Fr.E	137,48
MCE-Fr.F	855,21
Kersetin	10,22

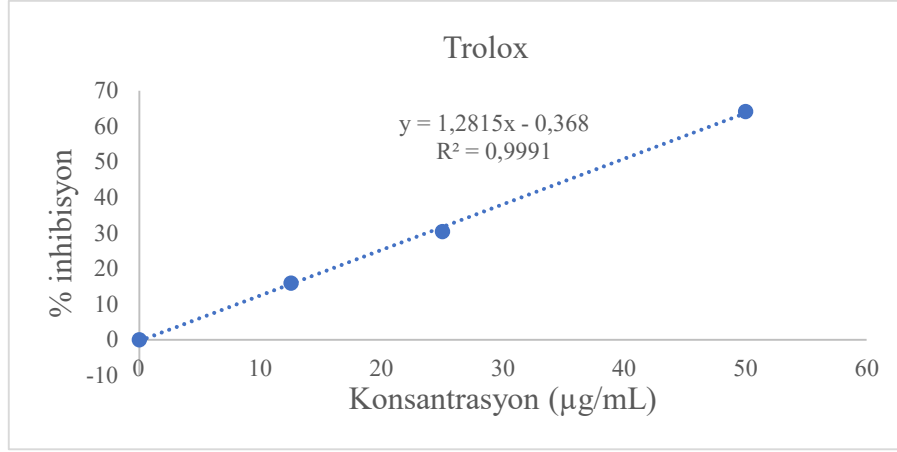
**Şekil 4.51.** Numunelerin DPPH Radikal Süpürücü Kapasite Tayininde IC₅₀ değerleri

DPPH radikal süpürücü kapasite tayininde, elde edilen sonuçlar standart madde (Kersetin: 10,23 µg/mL) ile karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin MCI kodlu ekstrede (25,37 µg/mL) olduğu görülmüştür. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite azalmış, en düşük aktivite MCE-Fr.F (855,21 µg/mL) fraksiyonunda gözlenirken en yüksek aktivite MCE-Fr.B (25,69 µg/mL) ve MCE-Fr.C-BuOH (31,31 µg/mL) kodlu fraksiyonlarda gözlenmiştir.

ABTS Radikal Katyonu Süpürücü Aktivite Tayini

M. communis'ten elde edilmiş MCE, MCI ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonların 1000-31,25 µg/mL konsantrasyonlarının ABTS radikal katyonu süpürücü aktiviteleri test edilmiştir.

Standart olarak kullanılan troloks 50-12,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında çalışılmış ve ölçülen absorbansa karşılık gelen konsantrasyon değerleri kullanılarak standart grafiği çizilmiştir (Şekil 4.52.).

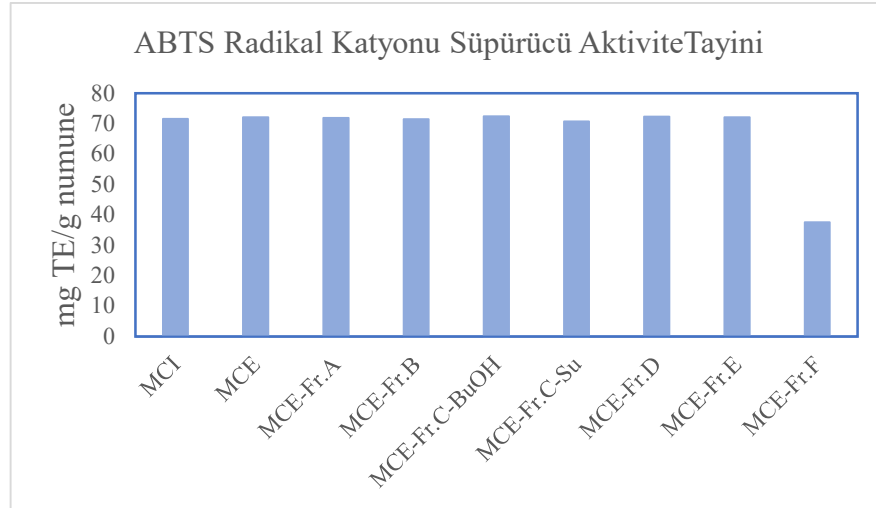


Şekil 4.52. Trolox standart grafiği ve doğru denklemi

Sonuçlar gram ekstrede troloks eşdeğeri olarak (mg TE/g ekstre) aşağıdaki tablo ve şekilde verilmiştir (Tablo 4.20. ve Şekil 4.53.).

Tablo 4.20. ABTS radikal katyonu süpürücü aktivite tayini sonuçları

Ekstre/fraksiyon adı	Trolox eşdeğeri (mg TE/g ekstre)
MCI	71,54
MCE	72,00
MCE-Fr.A	71,83
MCE-Fr.B	71,37
MCE-Fr.C-BuOH	72,33
MCE-Fr.C-Su	70,68
MCE-Fr.D	72,24
MCE-Fr.E	72,07
MCE-Fr.F	37,49

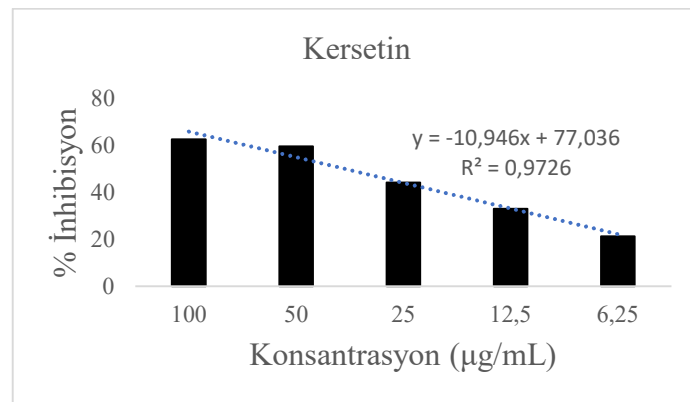


Şekil 4.53. Numunelerin ABTS radikal katyonu süpürücü aktivite tayininde mg TE/g numune değerleri

ABTS radikal katyonu süpürücü aktivite tayininde, sonuçlar mg TE/g numune olarak verilip karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin MCE kodlu ekstrede (72,00 mg TE/g numune) olduğu görülmüştür. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite sonuçlarının değişmediği, MCE-Fr.C-BuOH (72,33 mg TE/g numune) fraksiyonunda arttığı gözlenmiştir.

NO Radikal Süpürücü Etki Tayini

Bu yöntemde ekstre ve fraksiyonlar 800-12,5 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmış olup standart madde olarak kersetin kullanılmıştır. Standart madde için konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerlerine göre çizilen standart grafiği ve doğru denklemi aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.54.).

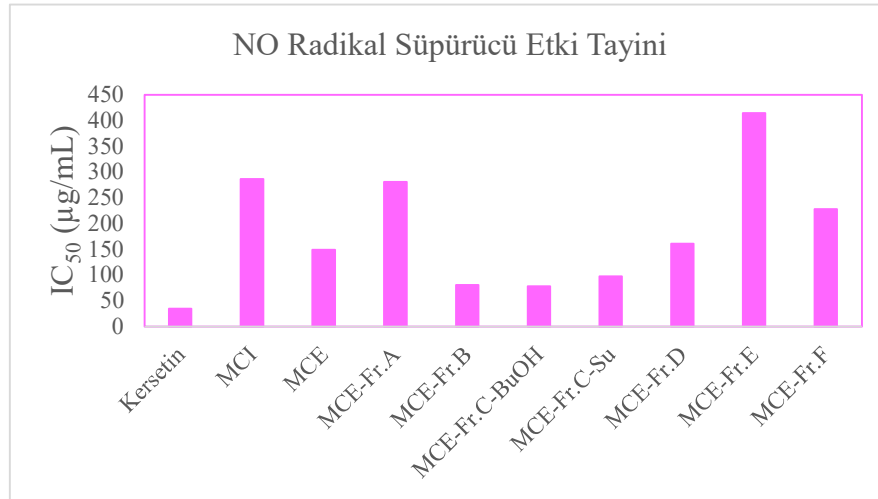


Şekil 4.54. Kersetin standardına ait NO radikal süpürücü etkinliğinin % inhibisyon değerleri

Numuneler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aşağıdaki tablo ve şekilde ifade edilmiştir (Tablo 4.21. ve Şekil 4.55).

Tablo 4.21. Numunelerin NO radikaline karşı IC₅₀ değerleri

Ekstre/fraksiyon adı	IC ₅₀ değeri (µg/mL)
MCI	286,26
MCE	148,67
MCE-Fr.A	280,49
MCE-Fr.B	80,32
MCE-Fr.C-BuOH	77,78
MCE-Fr.C-Su	97,02
MCE-Fr.D	160,49
MCE-Fr.E	414,51
MCE-Fr.F	227,70
Kersetin	34,45



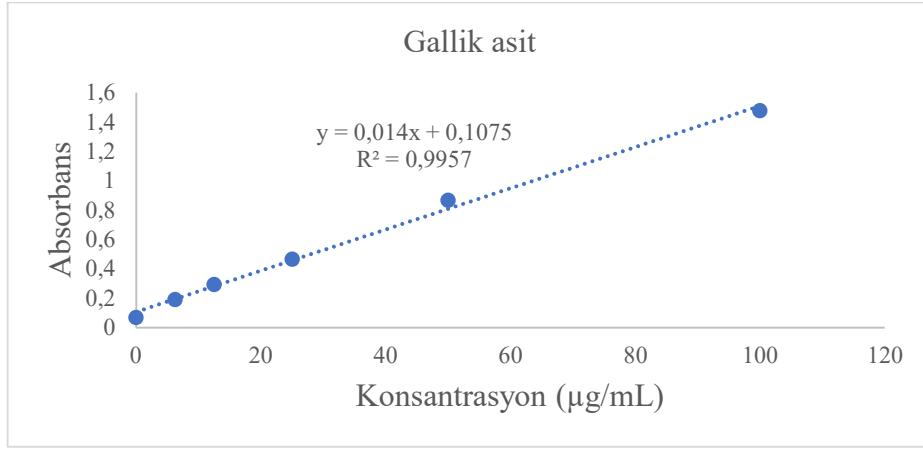
Şekil 4.55. Numunelerin NO radikal süpürücü etki tayininde IC₅₀ değerleri

NO radikal süpürücü etki tayininde, elde edilen sonuçlar standart madde (Kersetin: 34,45 µg/mL) ile karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin MCE kodlu ekstrede (148,68 µg/mL) olduğu görülmüştür. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite artmış, en yüksek aktivite MCE-Fr.C-BuOH (77,78 µg/mL) fraksiyonunda gözlenmiştir.

Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

CUPRAC analizinde ekstreler ve fraksiyonlar 1000-62,5 µg/mL, standart madde olarak gallik asit ise 100-12,5 µg/mL konsantrasyonu aralığında çalışılmıştır.

Ölçülen absorbansa karşılık gelen konsantrasyon değerleri kullanılarak standart grafiği ve doğru denklemi oluşturulmuştur (Şekil 4.56.).

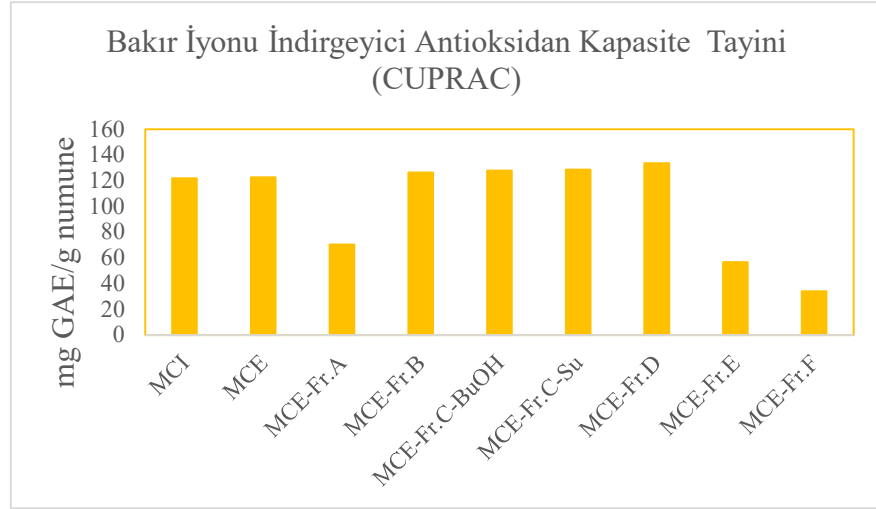


Şekil 4.56. Gallik asit standart grafiği ve doğru denklemi

Sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak (mg GAE/g numune) aşağıdaki tablo ve şekilde gösterilmiştir (Tablo 4.22. ve Şekil 4.57.).

Tablo 4.22. Numunelerin bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi

Ekstre/fraksiyon adı	Gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g numune)
MCI	121,72
MCE	122,39
MCE-Fr.A	70,20
MCE-Fr.B	126,32
MCE-Fr.C-BuOH	127,63
MCE-Fr.C-Su	128,61
MCE-Fr.D	133,34
MCE-Fr.E	56,56
MCE-Fr.F	33,87

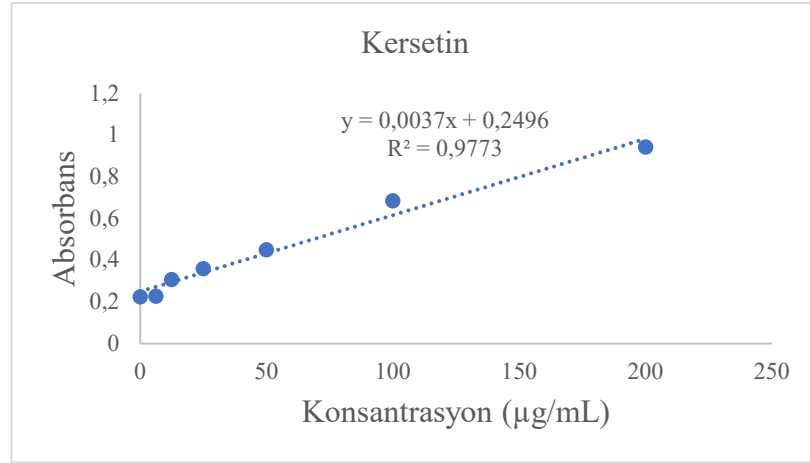


Şekil 4.57. Numunelerin bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi tayininde mg GAE/g numune değerleri

Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayininde, sonuçlar mg GAE/g numune olarak verilip karşılaştırıldığında, MCE (122,39 mg GAE/g numune) ve MCI (121,73 mg GAE/g numune) kodlu ekstrelerin birbirine yakın değerlerde bakır iyonu indirgeyici kapasite gösterdiği saptanmıştır. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite sonuçlarının değişmediği, MCE-Fr.C-Su (128,61 mg GAE/g numune) ve MCE-Fr.C-BuOH (127,63 mg GAE/g numune) fraksiyonlarının en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir.

Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Bu yöntemde ekstreler ve fraksiyonlar 800-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmış olup standart madde olarak kersetin kullanılmıştır. Standart madde için konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerlerine göre çizilen standart grafiği ve doğru denklemi aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.58.).

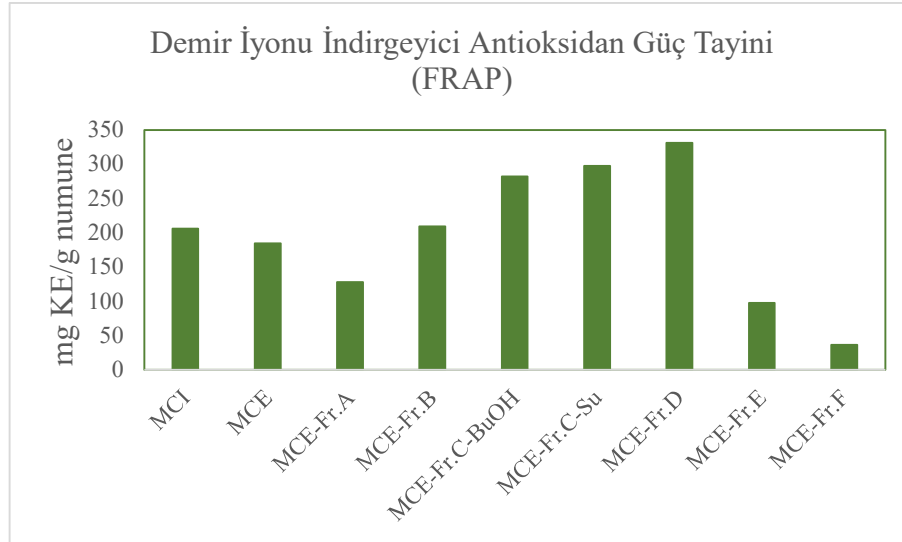


Şekil 4.58. Kersetin standart grafiği ve doğru denklemi

Ekstre ve fraksiyonlardan elde edilen sonuçlar bu grafikten yararlanılarak aşağıdaki tablo ve şekilde kersetin eşdeğeri (mg KE/g ekstre) olarak verilmiştir (Tablo 4.23. ve Şekil 4.59.)

Tablo 4.23. Numunelerin demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü

Ekstre/fraksiyon adı	Kersetin eşdeğeri (mg KE/g numune)
MCI	205,87
MCE	184,25
MCE-Fr.A	127,76
MCE-Fr.B	209,12
MCE-Fr.C-BuOH	282,18
MCE-Fr.C-Su	297,22
MCE-Fr.D	331,01
MCE-Fr.E	97,22
MCE-Fr.F	36,14



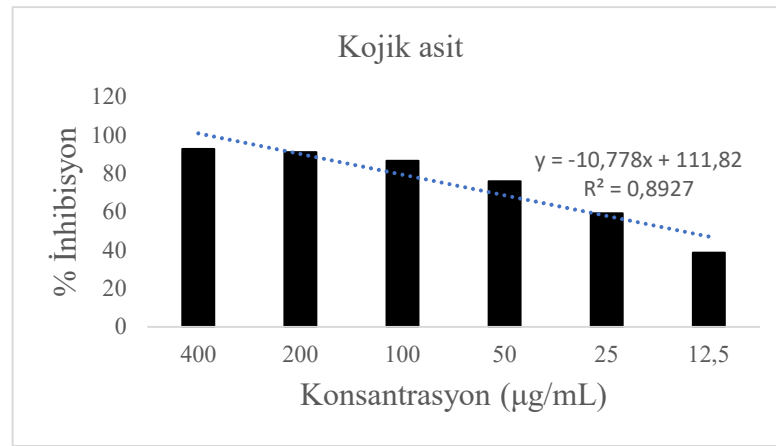
Şekil 4.59. Numunelerin demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü tayininde mg KE/g ekstre değerleri

Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç tayininde, sonuçlar mg KE/g numune olarak verilip karşılaştırıldığında, MCI kodlu ekstrenin (205,87 mg KE/g numune), MCE (184,25 mg KE/g numune) kodlu ekstreten daha yüksek demir iyonu antioksidan güç gösterdiği tespit edilmiştir. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite sonuçları artmış ve en yüksek aktivite MCE-Fr.D (331,0 mg KE/g numune), MCE-Fr.C-Su (297,23 mg KE/g numune) ve MCE-Fr.C-BuOH (282,18 mg KE/g numune) fraksiyonlarında gözlenmiştir.

4.3.2. *In vitro* Enzim İnhibisyon Çalışmalarına ait Bulgular

Tirozinaz Enzim İnhibisyon Testi

Tirozinaz enzim inhibisyon testi *M. communis*'ten MCE, MCI ve kromatografik yöntemlerle elde edilen fraksiyonların 800-12,5 µg/mL aralığındaki 7 farklı konsantrasyonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Standart madde olan kojik asidin 400-12,5 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmış ve bu aralıktaki konsantrasyonların % inhibisyon değerlerine ait veriler aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.60.).

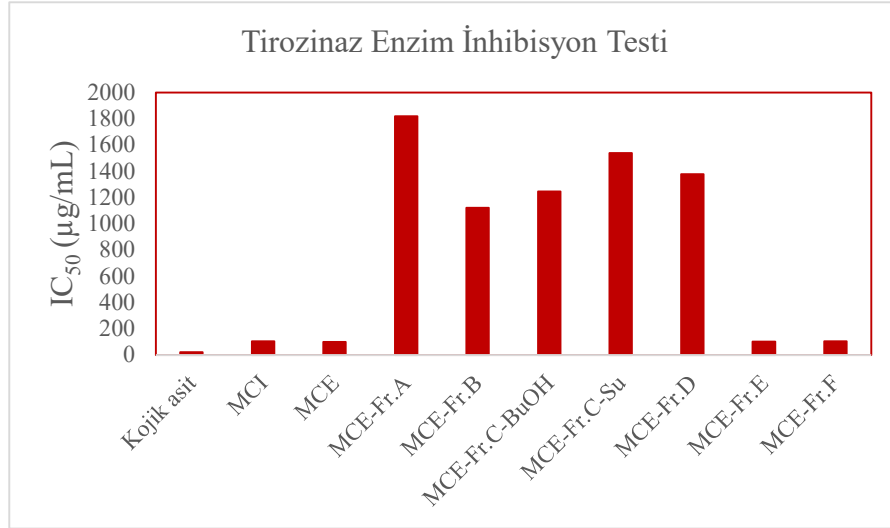


Şekil 4.60. Kojik asit standardına ait tirozinaz enziminin % inhibisyon değerleri

Numuneler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aşağıdaki tablo ve grafikte ifade edilmiştir (Tablo 4.24. ve Şekil 4.61.).

Tablo 4.24. Numunelerin tirozinaz enzim inhibisyonuna karşı IC₅₀ değerleri

Ekstre/fraksiyon adı	IC ₅₀ (µg/mL)
MCI	103,77
MCE	99,38
MCE-Fr.A	1818,52
MCE-Fr.B	1119,72
MCE-Fr.C-BuOH	1243,57
MCE-Fr.C-Su	1537,34
MCE-Fr.D	1375,39
MCE-Fr.E	102,1
MCE-Fr.F	102,48
Kojik asit	20,74



Şekil 4.61. Numunelerin tirozinaz enzim inhibisyonuna karşı IC₅₀ değerleri

Elastaz Enzim İnhibisyon Testi

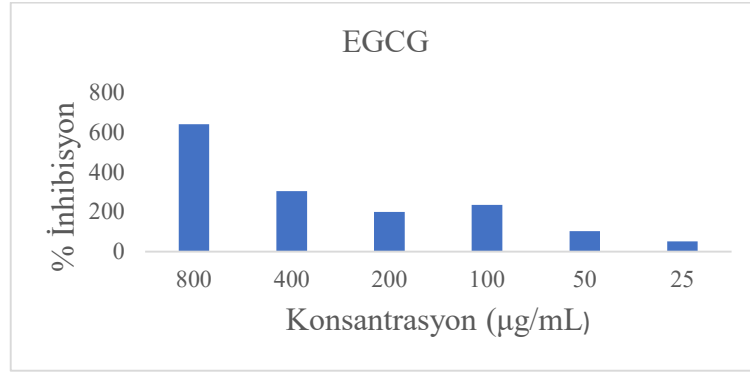
M. communis'in MCE, MCI ve kolon kromatografisinden elde edilmiş fraksiyonlarının 800-12,5 µg/mL konsantrasyon aralığında elastaz enzim inhibisyonu testi çalışılmıştır. Standart madde olan oleanolik asidin 800-6,25 µg/mL konsantrasyon aralığında numuneleri hazırlanmış ve konsantrasyona karşı % inhibisyon grafiği oluşturulmuştur. Test edilen numunelerin IC₅₀ değerleri negatif çıkmıştır. Bu nedenle numunelerin elastaz enzim inhibisyonu yapmadığı, enzim ekspresyonunu artırdığı söylenebilir. Elde edilen IC₅₀ değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.25.).

Tablo 4.25. Numunelerin elastaz enzim inhibisyonuna karşı IC₅₀ değerleri

Ekstre/fraksiyon adı	IC ₅₀ (µg/mL)
MCI	-35,20
MCE	-529,27
MCE-Fr.A	-82,67
MCE-Fr.B	-298,92
MCE-Fr.C-BuOH	-24,34
MCE-Fr.C-Su	-65,74
MCE-Fr.D	-191,34
MCE-Fr.E	-184,88
MCE-Fr.F	-75,23
Oleanolik asit	120,64

Kolajenaz Enzim İnhibisyon Testi

Kolajenaz enzim inhibisyon testi numunelerin 800-12,5 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki 7 farklı konsantrasyonu üzerinde yapılmıştır. Standart madde olan epigallokateşin gallat (EGCG) için 800-25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığındaki % inhibisyon değerlerine ait veriler aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.62.).

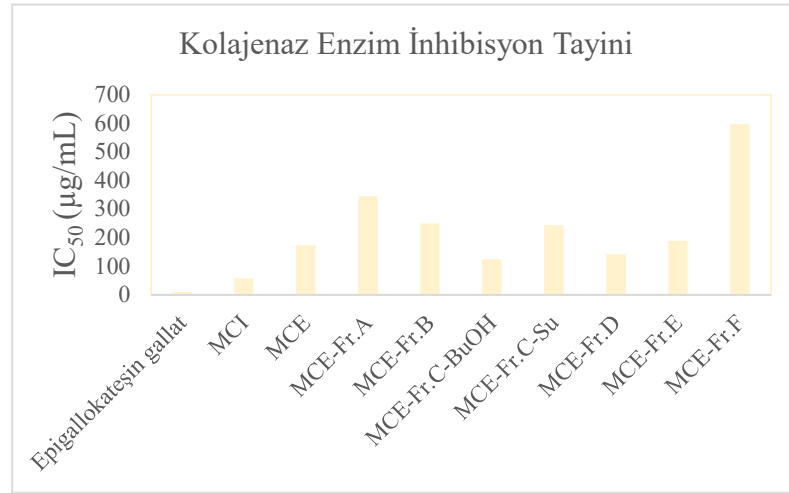


Şekil 4.62. Epigallokateşin gallatın % kolajenaz enzim inhibisyonu

Numuneler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aşağıdaki tablo ve şekilde ifade edilmiştir (Tablo 4.26. ve Şekil 4.63.).

Tablo 4.26. Numunelerin kolajenaz enzim inhibisyonuna karşı IC_{50} değerleri

Ekstre/fraksiyon adı	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
MCI	57,20
MCE	172,72
MCE-Fr.A	344,32
MCE-Fr.B	249,05
MCE-Fr.C-BuOH	123,66
MCE-Fr.C-Su	243,20
MCE-Fr.D	142,88
MCE-Fr.E	188,07
MCE-Fr.F	596,06
Epigallokateşin gallat	9,18



Şekil 4.63. Numunelerin kolajenaz enzim inhibisyonuna karşı IC₅₀ değerleri

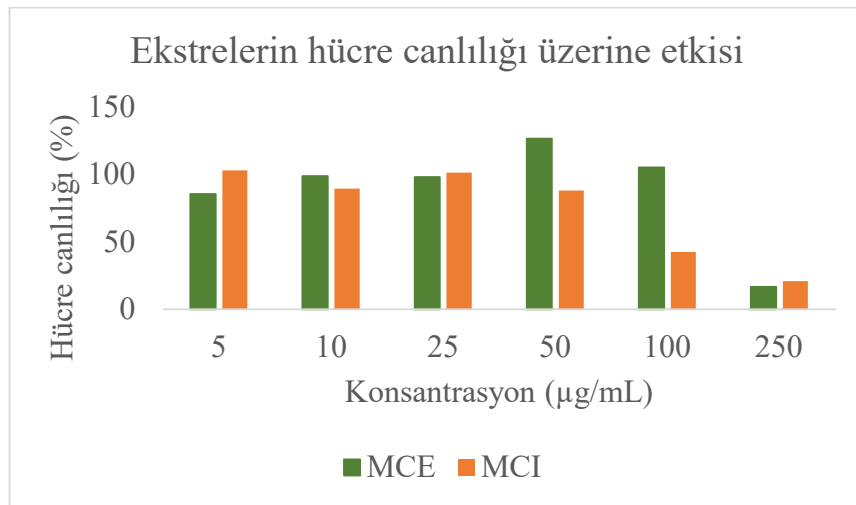
4.3.3. *In Vitro* Hücre Canlılığı Tayinine ait Bulgular

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde ekstrelerin 5-250 $\mu\text{g/mL}$, MCE'den elde edilmiş fraksiyonların 5-1000 $\mu\text{g/mL}$ ve saf bileşiklerin 1-50 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki konsantrasyonları MTT yöntemi ile tayin edilmiştir.

MCE, hücre canlılığını artıran konsantrasyonlarda doğrusal olarak azaltmış ve hücre canlılığı 250 $\mu\text{g/mL}$ 'de %16'ya kadar inmiştir. Ekstrenin, 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hücre canlılığını etkilemediği görülmüştür. Ekstrenin IC_{50} değeri 191,547 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. MCI'nın hücre canlılığı üzerine etkisi yüksek konsantrasyonlara doğru daha keskin bir azalış göstermiştir ve hücre canlılığı 250 $\mu\text{g/mL}$ 'de %21'e ulaşmıştır. Ekstrenin IC_{50} değeri 92,0941 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Ekstrelerin hücre canlılığı üzerine etkisi aşağıdaki tablo ve şekilde ifade edilmiştir (Tablo 4.27. ve Şekil 4.64).

Tablo 4.27. MCE ve MCI'nın hücre canlılığı üzerine etkisi

Konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$)	Hücre canlılığı (%)	
	MCE	MCI
5	85,14	102,75
10	98,58	89,27
25	97,80	101,19
50	126,24	87,84
100	104,85	42,30
250	16,42	20,86
IC_{50}	191,55	92,09



Şekil 4.64. *M. communis* ekstrelerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

MCE'den elde edilmiş MCE-Fr. kodlu fraksiyonların hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde MCE-Fr.A'nın 250 µg/mL'de hücre canlılığı üzerine etkisi olmadığı ve hücre canlılığının 1000 µg/mL'ye doğru düşüş gösterdiği gözlenmiştir.

MCE-Fr.B'nin 50 µg/mL'de hücre canlılığı üzerine bir etkisi olmadığı ve 250 µg/mL'de dahi hücrelerin %50'sinden fazlasının canlı kalabildiği gözlenmiştir.

MCE-Fr.C-BuOH'un 100 µg/mL'de hücre canlılığı üzerinde etkisi olmadığı anlaşılmış ve MCE-Fr.B'ye benzer şekilde 250 µg/mL'de dahi hücrelerin %50'sinden fazlasının canlı kalabildiği gözlenmiştir.

MCE-Fr.C-Su fraksiyonunun 10 µg/mL'den itibaren hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmüştür. 100 µg/mL'de ise hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür.

MCE-Fr.D'nin hücre canlılığı üzerine etkisine bakıldığında MCE-Fr.B'ye benzer şekilde 50 µg/mL'de hücre canlılığı üzerine bir etkisi olmadığı anlaşılmış ve 250 µg/mL'de dahi hücrelerin %50'sinden fazlasının canlı kalabildiği gözlenmiştir.

MCE-Fr.E'nin deney metodundaki en düşük konsantrasyon olan 5 µg/mL'den başlayarak hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda keskin bir şekilde hücrelerin ölümüne sebep olduğu ve 250 µg/mL konsantrasyonda %4 oranında canlı hücre bıraktığı gözlenmiştir.

MCE-Fr.F'nin 5 µg/mL'den başlayarak hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Bu azalma doğrusal olmakla birlikte 100 µg/mL'de hücre canlılığının %53 olduğu anlaşılmıştır.

Fraksiyonların hücre canlılığı üzerine etkisinin tayin edilmesi sonucunda elde edilmiş IC₅₀ değerleri aşağıdaki tabloda yer almıştır(Tablo 4.28.).

Tablo 4.28. Fraksiyonlara ait IC₅₀ değerleri

Fraksiyon kodu	IC₅₀(µg/mL)
MCE-Fr.A	>500
MCE-Fr.B	263,38
MCE-Fr.C-BuOH	283,57
MCE-Fr.C-Su	85,70
MCE-Fr.D	287,80
MCE-Fr.E	103,11
MCE-Fr.F	209,10

MC-02 uygulanmış hücrelerin canlılığı yüksek konsantrasyonlara çıkıldıkça azalış göstermiş ve 50 µg/mL'de hücre canlılığı %71 değerine inmiştir. MC-02'nin IC₅₀ değeri 78,8617 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

MC-04 uygulanmış hücrelerin canlılığı 1-25 µg/mL konsantrasyonları arasında sabit kalmıştır. 50 µg/mL'ye doğru çıkıldıkça hücre canlılığı azalış göstermiş ve 50 µg/mL'de hücre canlılığı %93 değerine inmiştir. MC-04'ün IC₅₀ değeri 405,498 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

MC-09 uygulanmış hücrelerin canlılığı 1-10 µg/mL aralığında azalış göstermiştir. Hücrelerin canlılığı 10-25 µg/mL konsantrasyonları arasında, 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığına göre daha yavaş bir azalış göstermiştir. 50 µg/mL'ye doğru çıkıldıkça hücrelerin canlılığı 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığındaki azalışa benzer bir azalış göstermiş ve 50 µg/mL'de %58 değerine inmiştir. MC-09'un IC₅₀ değeri 70,7383 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

MC-11 uygulanmış hücrelerin canlılığı doğrusal bir azalış göstermiş ve 50 µg/mL'de hücre canlılığı %1 değerine inmiştir. MC-11'in IC₅₀ değeri 27,0891 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

MC-18 uygulanmış hücrelerin canlılığı 1-25 µg/mL konsantrasyon aralığında yavaş bir azalış göstermiştir. 25 µg/mL'den 50 µg/mL konsantrasyona doğru çıkıldıkça hücrelerin canlılığı 1-25 µg/mL konsantrasyon aralığına göre daha keskin bir azalış göstermiş ve 50 µg/mL'de hücre canlılığı %2 değerine inmiştir. 1 µg/mL konsantrasyonda maddenin hücrelerin ölümü üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. MC-18'in IC₅₀ değeri 31,8 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Bitkiden izole edilmiş saf bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkileri aşağıdaki tabloda ifade edilmiştir (Tablo 4.29.).

Tablo 4.29. *M. communis*'ten izole edilen saf bileşiklere ait IC₅₀ değerleri

Saf bileşikler	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µM)
MC-02	78,86	170,33
MC-04	>250	>250
MC-09	70,74	140,31
MC-11	27,09	41,54
MC-18	31,80	64,80

4.3.4 Western Blot Analizine ait Bulgular

MTT yöntemiyle ölçülen hücre canlılık verileri doğrultusunda ekstre ve fraksiyonların Western Blot analizinde kullanılacak konsantrasyonları belirlenmiştir. Ekstre ve fraksiyonların belirlenen konsantrasyonlarına ait tablo aşağıda verilmiştir.

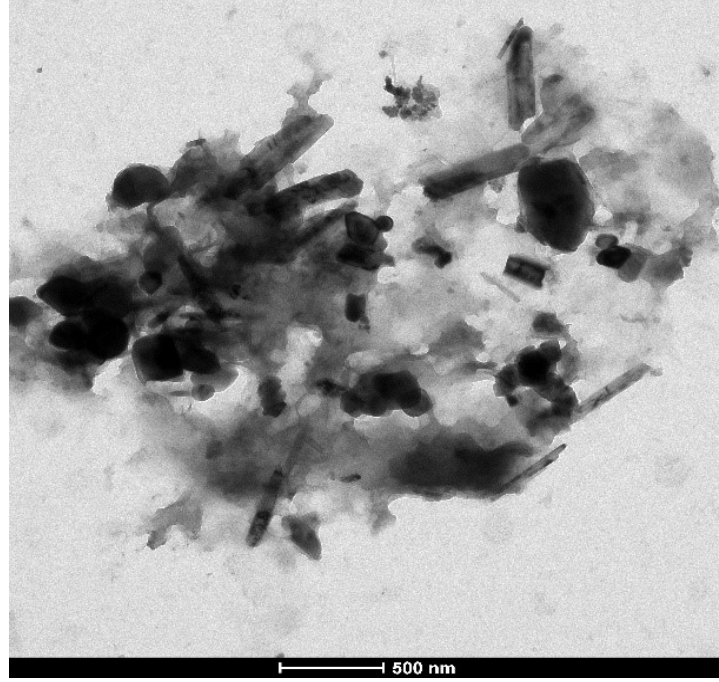
Tablo 4.30. Ekstre ve fraksiyonların Western Blot analizinde kullanılan konsantrasyonları

Ekstre/Fraksiyon adı	Analiz için seçilen konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$
MCE	50
MCI	50
MCE-Fr.A	100
MCE-Fr.B	100
MCE-Fr.C-BuOH	100
MCE-Fr.C-Su	10
MCE-Fr.D	100
MCE-Fr.E	10
MCE-Fr.F	10

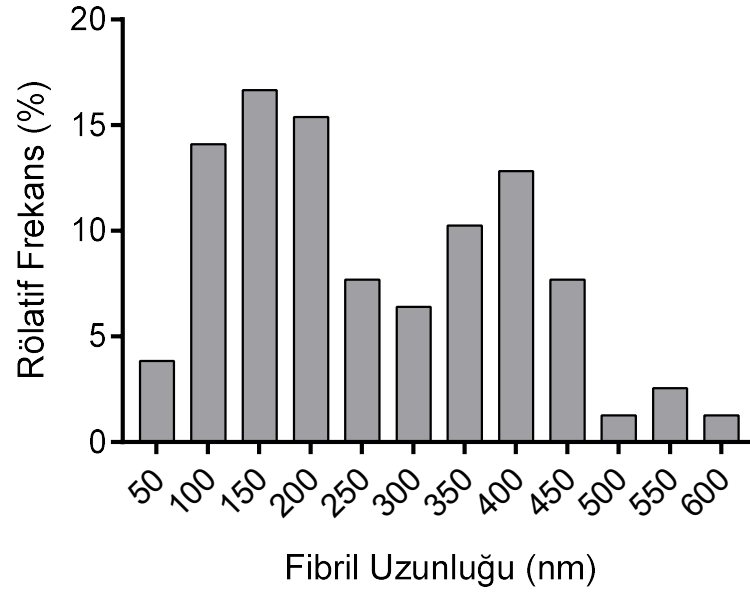
α -Sinüklein Fibril Proteinin Karakterizasyonuna ait Bulgular

Prob sonikasyon ile α -sinüklein fibrilleri ~ 50 - 200 nm'lik uzunluğa kırılmıştır. Fibrillerin sonikasyonu kritik bir adım olmakla birlikte olgun fibrillerin ~ 50 - 200 nm'lik bir boyut uzunluğuna sahip kısa uzunluğa yeterli şekilde kırılmasını sağlamaktadır ve bu sayede fibriller hücre içine girebilmektedir. Sonike edilen fibrillerin ~ 50 - 200 nm uzunluğa kırıldığı transmisyon elektron mikroskobu görüntülemesinden sonra değerlendirilmiştir.

Prob sonikasyon ile 1 dakika boyunca 5 saniye açık (*on*)/ 5 saniye kapalı (*off*) darbe uygulaması ve bu uygulamanın 20 tekrarı sonucunda fibriller farklı uzunluklarda olmak üzere kırılmıştır. TEM görüntüleme sonrası gridin farklı bölgelerinden alınan resimlerdeki fibrillerin uzunlukları ölçülmüştür (Şekil 4.65). Ortalama fibril uzunluğu $260,01$ nm olarak hesaplanmıştır. Ölçüm sonucunda uzunluğa (nm) karşı göreceli frekans yüzdeleri incelenmiştir (Şekil 4.66.). Fibrillerin ~ 50 - 200 nm uzunluğa kırıldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.65. Sonikasyon sonrası α -sinüklein fibrillerinin TEM görüntüsü

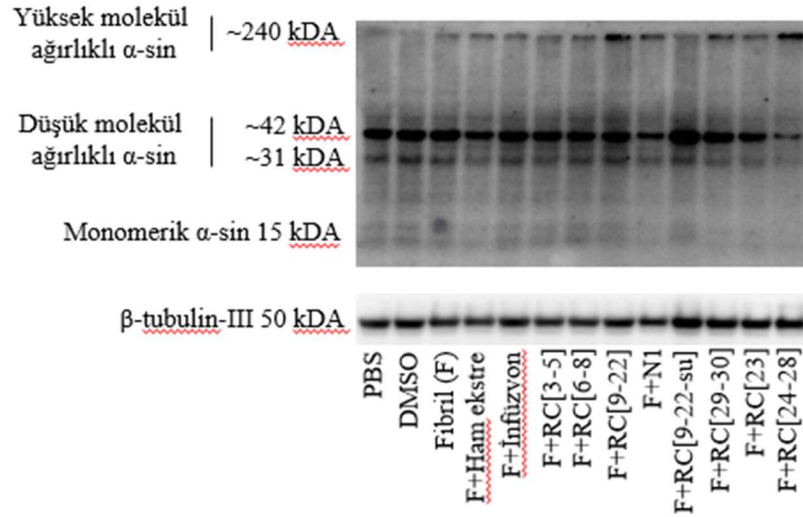


Şekil 4.66. α -Sinüklein fibrillerinin uzunluğa karşı göreceli frekans yüzdelerine ait grafik

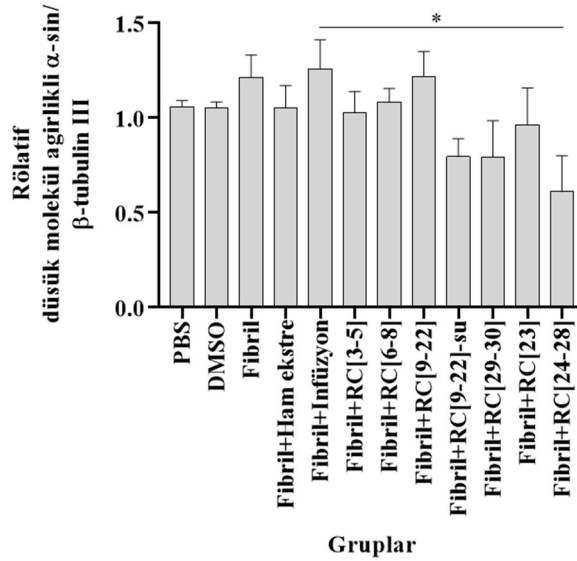
Hücrelerden Total Protein Lizatlarının Elde Edilmesi ve Protein Tayinine ait Bulgular

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 4 gün boyunca α -sinüklein fibrilleri uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde (234), 24 saatlik farklı fraksiyon tedavilerinin α -sinüklein üzerine etkisi Western blot ile anti- α -sinüklein antikorunu kullanılarak değerlendirilmiştir.

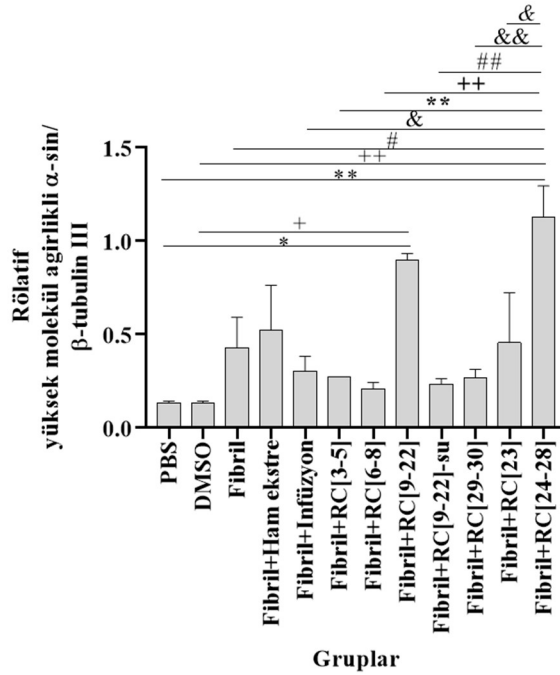
Monomerik α -sinüklein (15 kDA), düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein (~31 ve ~42 kDA) ve yüksek moleküler ağırlıklı α -sinükleine (~240 kDA) ait bantlar gözlenmiştir. Hastalık patolojisindeki rollerinden dolayı deneylerde düşük molekül ağırlıklı ve yüksek molekül ağırlıklı α -sinüklein bantlarının analizi gerçekleştirilmiştir (251-253). Analiz sonucunda elde edilmiş veriler aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.67., Şekil 4.68. ve Şekil 4.69.).



Şekil 4.67. Ekstre ve fraksiyonların düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein protein yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.68. Ekstre ve fraksiyonların düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein protein yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.69. Ekstre ve fraksiyonların yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein protein yoğunluğu üzerine etkileri

PBS ve DMSO çözücü gruplarında, fibril uygulaması olmamasına rağmen Chumarina ve ark. ve Rostami ve ark.'ın (251, 253) yaptığı çalışmalarda görüldüğü gibi düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı α -sinükleine ait bantlar gözlenmiştir (251). Bu durumun hüresel yaşlanma nedeniyle olabileceği öngörülmektedir (254). 5 μ g/mL konsantrasyonda α -sinüklein fibrilleri uygulanan fibril grubunda ($1,32 \pm 0,14$), düşük molekül ağırlıklı α -sinüklein düzeyinde görülen artış, PBS ($1,11 \pm 0,01$) ve DMSO ($1,1 \pm 0,017$) çözücü gruplarına kıyasla anlamlılığa ulaşmamıştır.

Tüm tedaviler sonucunda, fibril grubuna göre ($1,32 \pm 0,14$) sadece MCE-Fr.E tedavisi sonucunda düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olmuştur ($0,36 \pm 0,10$, ** $p=0,0023$).

MCE-Fr.E tedavisi sonucunda ($0,36 \pm 0,10$), MCE-Fr.C-BuOH ($1,13 \pm 0,11$) tedavi gruplarına kıyasla düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein miktarında istatistiksel olarak anlamlı azalma olmuştur ($\#p=0,02$). MCE-Fr.E tedavisi uygulanan grupta düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein miktarının en az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.67.).

Yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein düzeylerine bakıldığında da fibril grubunda ($0,42 \pm 0,17$), α -sinüklein düzeyinde görülen artış, PBS ($0,13 \pm 0,01$) ve DMSO ($0,13 \pm$

0,01) çözücü gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır. Tedavilerin etkinlikleri karşılaştırıldığında da benzer şekilde fibril grubuna göre MCI, MCE-Fr.A, MCE-Fr.B, MCE-Fr.C-Su, MCE-Fr.D ve MCE-Fr.F tedavileri ile α -sinüklein düzeyinde azalma olsa da istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır. MCE-Fr.E uygulamasının fibril grubuna göre kıyasla α -sinüklein düzeyinde azalma yerine artışa neden olduğu görülmüştür ($\#p:0,036$; MCE-Fr.E $1,13\pm0,17$ vs. fibril $0,42\pm0,16$; Benzer şekilde PBS ve DMSO gruplarına kıyasla da α -sinüklein düzeyinde artışa neden olmuştur (** $p:0,002$ vs. PBS $0,13\pm0,01$; ++ $p:0,002$ vs. DMSO $0,13\pm0,01$). Beklenenin aksine MCE-Fr.C-BuOH ($0,89\pm0,03$) de PBS ve DMSO gruplarına kıyasla yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein düzeyinde artışa neden olmuştur ($*p:0,037$ vs. PBS $0,13\pm0,01$; + $p:0,037$ vs. DMSO $0,13\pm0,01$). Tedavi grupları karşılaştırıldığında MCE-Fr.E grubunda yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein miktarının en yüksek olduğu gözlenmiştir.

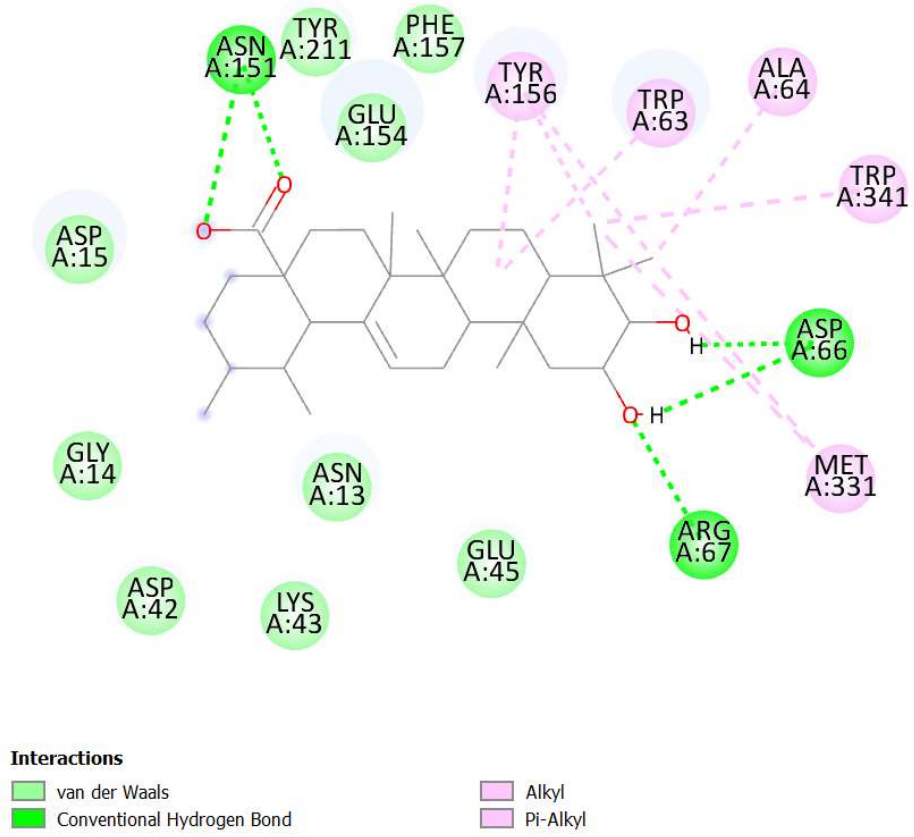
4.4. Moleküler Kenetleme Çalışmalarına ait Bulgular

Moleküler kenetleme çalışmalarında bitkiden izole edilerek tanımlanmış altı molekülün Parkinson hastalığının tedavisinde önemli olan α -sinüklein proteini ile etkileşimi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda protein ve molekül arasındaki etkileşim için bağlanma enerjisi değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.32.). Buna göre α -sinüklein proteini ile en düşük bağlanma enerjisine sahip ilk 3 molekül sırasıyla korosolik asit (-10,04 kcal/mol), ursolik asit (-10,00 kcal/mol) ve asiatic asit (-9,85 kcal/mol) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.31. α -Sinüklein proteini ile 6 bileşik arasındaki moleküler kenetleme çalışmasından elde edilen sonuçlar

Bileşik Adı	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
Asiatic asit	-9,85
Korosolik asit	-10,04
Ursolik asit	-10,00
Kersetin-3- <i>O</i> - α -ramnopiranozit	-9,22
Mirisetin-3- <i>O</i> - α -ramnopiranozit	-8,53
Gallomirtukommulon C	-8,70

Ayrıca en düşük bağlanma enerjisine sahip molekül ve proteinin etkileşimleri ise 2D olarak aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.69.). En düşük bağlanma enerjisine sahip molekül olan korosolik asidin α -sinüklein proteini ile konformasyonu incelendiğinde molekülün yerleştiği aktif bölgedeki aminoasitler ile van der Waals (Asn151, Arg67, Asp66), konvansiyonel hidrojen bağı (Asn13, Asp15, Asp42, Glu45, Glu154, Gly14, Lys43, Phe157, Tyr211), alkil ve pi-alkil (Ala64, Met331, Trp63, Trp341, Tyr156) özelliklerine göre etkileşim göstermiştir.



Şekil 4.70. α -Sinüklein proteinine en güçlü bağlanan korosolik asit molekülünün iki boyutlu konformasyon modeli

4.5. Farmakope Analizlerine ait Bulgular

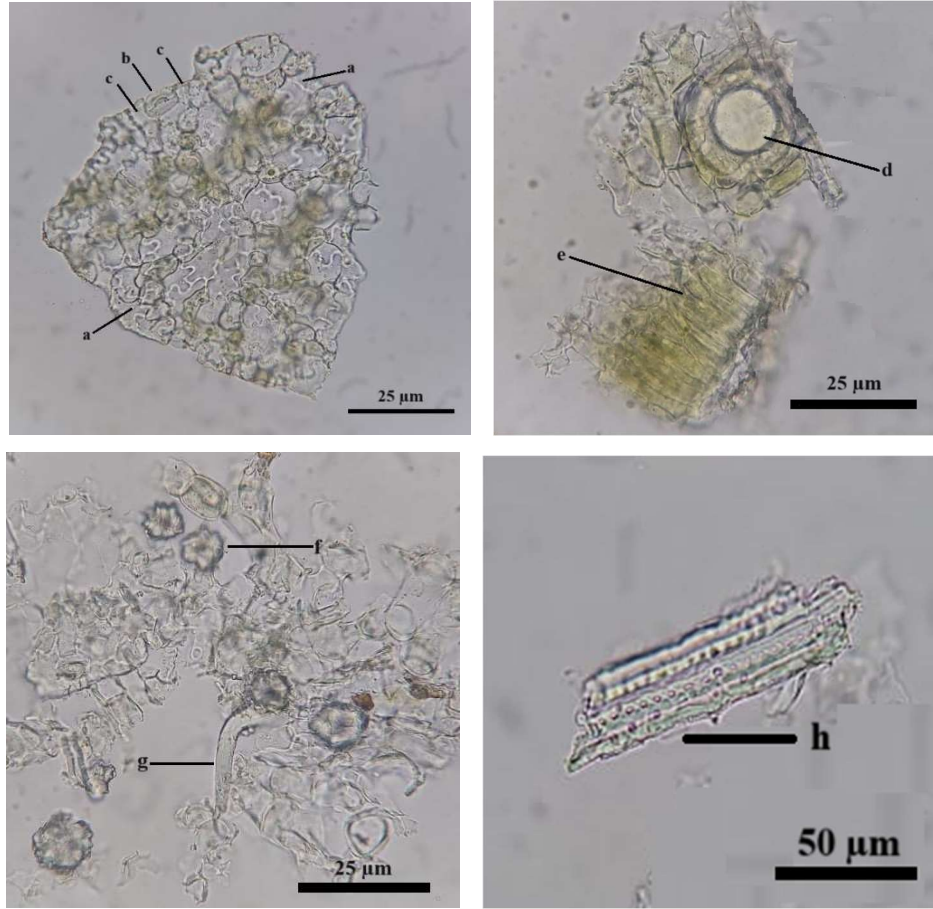
M. communis'in Avrupa ve Türk Farmakopesi'nde monografi bulunmadığından makroskopik, mikroskopik analizler ve farmakope sınır testleri yapılarak bitkisel drog monografinin ön çalışması hazırlanmıştır.

4.5.1 Makroskopik ve Mikroskopik Analizlere ait Bulgular

M. communis üzerinde yapılan makroskopik analiz sonuçları 4.1. Morfolojik Çalışmalara ait Bulgular başlığı altında, mikroskopik incelemelere ait bulgular ise aşağıda sunulmuştur. Avrupa Farmakopesi'nde "Bitkisel Droglar" için 07/2017:1433 Genel Bölüm'de verilen bilgilere göre kurutulmuş ve kabaca toz edilmiş yapraklar kloralhidrat reaktifi kullanılarak ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

Mikroskopik Analizler

Toz edilmiş bitkisel drog (355) (2.9.12): Toz edilmiş bitkisel drog açık yeşil renkli olup karakteristik bir kokuya sahiptir. Mikroskopik incelemeler için ışık mikroskobu altında kloral hidrat reaktifi ile incelenmiştir. Epidermis parçalarında stomalar, az sayıda tek hücreli örtü tüyleri tespit edilmiştir. Stoma anomositiktir ve stoma duvarları sinuattır. Epidermisin altında ve parankima hücrelerinin yanında salgı cepleri ve druzlar bulunmaktadır. Ayrıca sünger, palizat parankimaları ve iletim demetlerinin kalıntıları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.71. *M. communis* yapraklarının toz drog anatomisi.

a:epidermis hücresi, b: stoma hücresi, c:stoma komşu hücreleri, d:salgı vezikülü, e:parankima dokusu, f:druze, g:tek hücreli örtü tüyü, h:odunlaşmış sklerenkima lifleri

Stoma ve Stoma İndisi Tayini

Stoma indisi, birim alandaki stoma sayısının oranını % olarak ifade etmektedir. Bitki yaprağının üst epidermisinde stoma gözlenmemiştir. Işık mikroskobu kullanılarak alt epidermisin stoma indisi $15,05 \pm 3,53$ olarak hesaplanmıştır.

4.5.2 Farmakope Sınır Testlerine ait Bulgular

Yabancı Madde Tayini

30,19 gram kuru drog tartılıp beyaz zemin üzerine ince tabaka halinde yayıldıktan sonra yabancı maddeler çıplak gözle analiz edilmiştir. Bitkisel drogtan 0,0439 gram yabancı madde ayrılmıştır. Bunlar bitkiye ait olmayan aken tipi meyveler, taşlar ve tanımlanamayan cisimlerdir. Sonuç olarak, kurutulmuş drogta %0,145

oranında yabancı madde tespit edilmiştir. Yabancı madde analizi yapılmış bitkisel drog aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.71.).



Şekil 4.72. Yabancı madde analizi

Kurutmada Kayıp

Ortalama 1 g tartılan toz edilmiş numuneler 105°C'lik etüvde 2 saat tutulduktan sonra ve 3 tekrarlı yapılan analiz sonucunda *M. communis*'in kurutulmuş ve kabaca toz edilmiş yaprak droğunda kurutmada kaybın %6'yı geçmediği gözlenmiştir. Kurutmada kayıp testine ait bulgular aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.33.) .

Tablo 4.32. Kurutmada kayıp analizinin sonuçları

	Kroze darası(g)	Drog miktarı(g)	Kurutma öncesi kütle	Kurutma sonrası kütle	% Kurutma kayıp
1	29,9528	1,0134	30,9662	30,9144	5,1110
2	25,9770	1,0073	26,9843	26,9511	3,2950
3	29,9532	1,0056	29,9532	30,9270	3,1620
Ortalama					3,856 ± 0,8990

Toplam Kül Miktar Tayini

Farmakope sınır testlerinden biri olan toplam kül miktar tayini, *M. communis*'in kurutulmuş ve kabaca toz edilmiş yaprak droğunda 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Numunelere ait toplam kül miktarı sırasıyla %13,7145, %12,2600 ve %16,3901 olarak bulunmuş ve ortalama değer %14,1215±1,7105 olarak

hesaplanmıştır. Toplam kül miktar tayinine ait bulgular aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.34.).

Tablo 4.33. Toplam kül miktar tayini sonuçları

	Kroze darası(g)	Drog miktarı(g)	Yakma öncesi kütle	Yakma sonrası kütle	% Toplam Kül
1	42,3730	1,0055	43,3785	42,5109	13,7145
2	39,1399	1,0088	40,1487	39,2625	12,2600
3	40,3690	1,0067	41,3757	40,5340	16,3901
Ortalama					14,1215 ± 1,7105

Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

Hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini, *M. communis*'in kurutulmuş ve kabaca toz edilmiş yaprak droğunda üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Numunelerde toplam hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı sırasıyla %2,6887, %3,4756 ve %4,5621 olarak bulunmuş ve ortalama değer %3,5754±0,7680 olarak hesaplanmıştır. Hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayinine ait bulgular aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.35.).

Tablo 4.34. Hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları

	Kroze darası(g)	Toplam Kül Kütlesi(g)	Yakma Sonrası Kütle	Kül Kütle(g)	% Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül
1	42,2818	0,1748	42,2865	0,1701	2,6887
2	39,1432	0,164	39,1728	0,1583	3,4756
3	40,3074	0,1907	40,3161	0,182	4,5621
Ortalama					3,5754 ± 0,7680

Şişme İndisi

Literatür verilerine göre *M. communis*'in yaprakları müsilaj taşımadığından bu deney yapılmamıştır.

Uçucu Yağ Miktar Tayini

Uçucu yağ volumetrik miktar tayini için, 30,1461 g kurutulmuş ve toz edilmiş *M. communis* yaprak droğu Clevenger düzeneğine yerleştirilmiş ve distilasyona tabi tutulmuştur. Distilasyon, bitkisel droğdan uçucu yağların su buharı ile sürüklenmesi esasına dayanmaktadır. 2 saatlik distilasyonun sonunda cihazda toplanan sudan hafif uçucu yağ alınmıştır. 30,1461 g droğdan 0,3 mL uçucu yağ elde edilmiştir. Analiz sonucuna göre bitkisel droğun uçucu yağ oranı %0,9951'dir. Clevenger düzeneğinde toplanmış uçucu yağın görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 4.72.).



Şekil 4.73. Clevenger düzeneği ve toplanan uçucu yağın görüntüsü

5. TARTIŞMA

Türkiye’de doğal olarak yetişen ve halk ilacı olarak kullanılan *M. communis*’in morfolojik olarak yaprakları, dalları ve çiçekleri, anatomik olarak da yaprak ve dalları incelenmiştir. Bitkinin morfolojik ve anatomik karakterlerinin analizi ve Ankara’da bulunan herbaryumlardaki örneklerin de değerlendirilmesi ile bitkinin teşhisi yapılmıştır. Bitki, uygun tayin anahtarı kullanılarak taksonomik olarak sınıflandırılmıştır.

Yaprakların basit yapıda ve bütün olması, nodlarda karşılıklı yer alması ve şeffaf salgı veziküllerini taşıması; çiçeklerin hermafrodit, beyaz renkli 5 petalli, yeşil renkli 5 sepalli, çok sayıda stamenli ve ginekeumun bir pistilli olması türün aromatik özellikteki Myrtaceae familyasına ait özelliklerle uyumlu olduğunu göstermiştir (15).

Anatomik çalışmalar kapsamında yaprak ve dallardan kesitler alınmıştır. Kesitler ışık mikroskobu altında incelendikten sonra anatomik karakterler tespit edilmiştir. Yaprak üst epidermisinde kloralhidrat reaktifi ile gözlenen düzensiz şekilli hücrelerin, basit tek hücreli örtü tüylerinin, basit billurların (kalsiyum oksalat kristalleri) ve SARTUR reaktifi ile turuncu renk almış uçucu yağ taşıyan salgı veziküllerinin ve yağ damlacıklarının gözlenmesi literatür ile uyumlu bulunmuştur (215, 217). Yaprak alt epidermisinde ise kloralhidrat reaktifi ile düzensiz şekilli hücreler, basit tek hücreli örtü tüyleri, druzlar, stomalar; SARTUR reaktifi ile turuncu renk almış uçucu yağ taşıyan salgı vezikülleri ve yağ damlacıkları gözlenmiştir. Stomalar yalnızca alt epidermiste bulunmaktadır. Stoma ve yardımcı hücrelerin düzenlenişi esas alındığında anomositik tip stomaya sahip olduğu belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde, yaprağın alt ve üst epidermisinde stomaların mevcut olduğu ancak çalışmamız sonucunda elde edilen veriler ile uyumlu olmadığı gözlenmiştir. Bu durum bitkinin sıcak veya kurak iklimlerde yetişmesinden dolayı su kaybını azaltmaya adaptasyonu için stoma yoğunluğunun azalması ile açıklanabilir. Ayrıca literatür ile karşılaştırıldığında anatomik çalışmalarda aynı dokular tespit edilmiş, ancak stomaların boyutu ile ilgili nitel karakterler varyasyon göstermiştir. Bunun sebebi ise bitkinin ekolojik faktörlerden etkilenmesi ile açıklanabilir. Sonuç olarak bitki üzerinde yapılan morfolojik ve anatomik incelemeler türün Myrtaceae familyasının *Myrtus*

cinsine ait olduğunu kanıtlamıştır (215-218). Bitkinin fitokimyasal içeriğinin kalitatif olarak analiz edilebilmesi için kurutulmuş ve kabaca toz edilmiş yaprak droğu kullanılarak su, etanol ve alkaloit ekstreleri hazırlanmıştır. Sulu ekstresi üzerinden saponozitler, antrasen türevi glikozitler, flavonoidler, tanenler, antosiyanin glikozitleri, ozlar, nişasta ve kumarin gruplarına ait teşhis reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonuçlarına göre ekstrede saponozitler, flavonoidler, tanenler, ozlar ve kumarinlerin varlığı gözlenmiş, antrasen türevi glikozitler, antosiyanin glikozitleri ve nişastaya rastlanmamıştır. Etanol ekstresi üzerinden kardiyooktif glikozitlerin teşhis reaksiyonu gerçekleştirilmiş, reaksiyon sonucunda ekstre içeriğinde kardiyooktif glikozitlerin bulunmadığı tespit edilmiştir. Genel teşhis reaksiyonları kapsamında üçüncü ekstre olan alkaloit ekstresi üzerinden tropan, izokinolein ve indol türevi alkaloitler ile kafeinin teşhis reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bulgular sonucunda, Dragendorf reaktifi ile doyurulmuş süzgeç kağıdına alkaloit ekstresi damlatıldığında renk değişimi gözlenmiş ancak farklı yapıdaki alkaloit türevleri (tropan, izokinolein, indol) için yapılan teşhis reaksiyonları negatif sonuç verdiğiinden ekstrede diğer alkaloit gruplarına rastlanabileceği gibi proteik yapıdaki maddelerin de pozitif sonuç verebileceği görüşüne varılmıştır. Elde edilen veriler, genel teşhis reaksiyonlarını takiben yapılmış İTK analizi ile doğrulanmış (bkz. Şekil 4.9.), literatür verileri ile de uyumlu bulunmuştur (bkz. 2.2.2. Fitokimyasal çalışmalar).

İzolasyon çalışmaları kapsamında, 2 adet flavonol-3-*O* glikoziti, 1 adet floroglusinol türevi ve 3 adet triterpenik bileşik olmak üzere toplam 6 adet bileşik izole edilmiştir. 4.2.3. İzolasyon Çalışmalarına ait Bulgular başlığı altında bileşiklerin ¹H- ve ¹³C-NMR spektrumları yorumlanarak yapı tayinleri yapılmış, bileşiklerin hesaplanan molekül ağırlıkları, HR-ESI-MS spektrumları ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, **MC-02** kodlu bileşiğin yapısı mirsitrin, **MC-05** kodlu bileşiğin yapısı kersitrin, **MC-04** kodlu bileşiğin yapısı gallomirtukommulon C, **MC-09** kodlu bileşiğin yapısı ursolik asit, **MC-11** kodlu bileşiğin yapısı korosolik asit ve **MC-18** kodlu bileşiğin yapısı asiyatik asit olarak tayin edilmiştir. Literatürde *Myrtus communis* üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları incelendiğinde, reçine kolon kromatografisinin ilk defa bu tez çalışmasında kullanılmış olduğu tespit edilmiş olup bitkinin total ekstresinden klorofil ve pigmentlerin kolayca ayrılmasının yanı sıra sıvı-sıvı partiyon

yapmayı gerektirmeksizin içerdiği bileşiklerin polaritelerine göre kabaca ayrılmaları ve buna göre alt fraksiyonların oluşturulması sağlanmıştır.

İzolasyon çalışmaları sonrasında, qTOF-LC-MS analizi ile bileşiklerin polaritelerine bağlı olarak ekstre ve fraksiyonlardaki içeriklerinin nitel ve oran olarak (%) belirlenmesi hedeflenmiştir. Bileşiklerin ekstre ve fraksiyonlardaki % miktarları, molekül ağırlığı ve pik yüksekliği parametreleri kullanılarak % cinsinden hesaplanmıştır. MCE ve MCI'nın kromatogramları karşılaştırıldığında, 1-7. dakikalar arasındaki piklerin benzerlik gösterdiği; 7. dakikadan sonra MCE'nin apolar özellikteki pek çok bileşiği içerdiği, MCI'nın ise apolar bileşiklerinin daha az sayıda olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin polaritelerine bağlı olarak ekstrelerdeki % içeriklerinin, ekstrelerin su ve etanol çözücüleri ile hazırlanmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. qTOF-LC-MS analizinde 1-7. dakikalar arasında polar özellikte bileşiklerin, 7. dakikadan sonra ise apolar özellikteki bileşiklerin piklerinin gözlenmesi beklenmektedir. **MC-02**, **MC-04**, **MC-05** kodlu bileşiklerin alıkonma zamanlarına bakıldığında sırasıyla R_t : 4,7, 5,6 ve 5,0. dakikalar; **MC-09**, **MC-11** ve **MC-18** kodlu bileşiklerin alıkonma zamanlarına bakıldığında ise sırasıyla R_t : 10,4, 9,5 ve 7,6. dakikalar olduğu görülmüş, değerler yorumlandığında **MC-02**, **MC-04**, **MC-05** kodlu bileşiklerin polar, **MC-09**, **MC-11** ve **MC-18** kodlu bileşiklerin ise apolar özellikte olduğu doğrulanmıştır.

M. communis yaprakları izolasyon şemasına bakıldığında (bkz. Şekil 4.11.) **MC-02**, **MC-04** ve **MC-05** kodlu bileşiklerin MCE kodlu %80'lik EtOH ekstresi ve ardından MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonundan başlayarak devam eden kromatografik çalışmalar sonucunda saflaştırıldığı görülmektedir. Yüzde içerik miktarları tablosunda yer alan % değerlerden de anlaşıldığı üzere her bir bileşik için ekstreten başlayan izolasyon aşamalarında % içeriğin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde **MC-09**, **MC-11** ve **MC-18** kodlu bileşikler de MCE kodlu ekstre ve MCE-Fr.E kodlu fraksiyondan izole edilmiş olup her bir bileşik için ekstreten başlayan izolasyon aşamalarında % içeriğin doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bileşiklerin izolasyonunda en verimli ekstre ve fraksiyonların seçildiğini göstermiştir. Devam eden çalışmalarımızda, hedeflenmiş yöntemler geliştirilerek bileşiklerin ekstre ve/veya fraksiyonlarda birbirlerine göre oranlarının tespit edilmesi,

yapısı tayin edilmeyen diğer bileşiklerin de ekstreler ve/veya fraksiyonlarda % içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, farklı yapıdaki bileşiklerin izole edilerek veya standart bileşikler temin edilerek her bir ekstre ve fraksiyondaki % miktarlarının belirlenmesi ile standardizasyon çalışmalarında bitkisel drogta en yüksek oranda bulunan bileşiğin tespit edilerek standardize ekstrede belirteç bileşik olarak kullanılması hedeflenmiştir. qTOF-LC-MS analizi daha önce *Myrtus communis* meyveleri üzerinde yapılmış olsa da yaprak ekstreleri üzerinde ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir (255).

MCE, MCI kodlu ekstreler ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonların toplam fenolik, flavonoit ve proantosiyanidin madde miktar tayinleri yapılmıştır. Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçlarına bakıldığında MCI (135,85 mg GAE/g numune)'nin MCE'ye (110,90 mg GAE/g numune) göre daha fazla fenolik yapıda madde içerdiği, en yüksek fenolik madde içeriğine MCE-Fr.C-Su fraksiyonunun (166,93 mg GAE/ g numune) sahip olduğu görülmüştür. İzole edilen bileşiklerin alındığı fraksiyonlara bakıldığında, fenolik yapıdaki bileşiklerin (**MC-02**, **MC-04**, **MC-05**) yüksek fenol içeriğine sahip MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonundan (135,15 mg GAE/ g numune) elde edildiği, terpenik yapıdaki bileşiklerin (**MC-09**, **MC-11**, **MC-18**) ise fenolik madde içeriği düşük MCE-Fr.E fraksiyonundan (57,85 mg GAE/ g numune) elde edildiği tespit edilmiştir. Toplam flavonoit madde miktar tayini sonuçlarına bakıldığında MCE'nin (39,44 mg KE/g numune) MCI'ya (28,81 mg KE/g numune) göre daha fazla flavonoit yapısında bileşik içerdiği, en yüksek flavonoit içeriğine MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonunun (115,69 mg KE/g numune) sahip olduğu görülmüştür. İzole edilen bileşiklerin alındığı fraksiyonlara bakıldığında, flavonoit yapısındaki bileşiklerin (**MC-02**, **MC-05**) yüksek flavonoit içeriğine sahip MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonundan elde edildiği tespit edilmiştir. İTK analizi sonucunda da, MCE-Fr.A, MCE-Fr.B, MCE-Fr.C-BuOH, MCE-Fr.C-Su ve MCE-Fr.D'de fenolik yapıdaki bileşiklere ait olduğu düşünülen lekeler, MCE-Fr.E ve MCE-Fr.F'de ise yoğun olarak terpen yapısındaki bileşiklere ait olduğu düşünülen lekelerin gözlenmesi yukarıda verilen sonuçları desteklemiştir (bkz. Şekil 4.12.). Toplam proantosiyanidin madde miktar tayini sonuçlarına bakıldığında MCE ve MCI'nın toplam proantosiyanidin madde miktarının aynı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (7,44 mg KAE/g numune). En yüksek

proantosiyanidin içeriği MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonunda (20,30 mg KAE/g numune) görülmüştür.

Literatür incelendiğinde, *M. communis* yapraklarının farklı çözücülerle ekstre edilmesi sonucu toplam fenolik, flavonoit ve proantosiyanidin madde miktarının değiştiği tespit edilmiştir (149, 151, 256-258). Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri birbirlerine yakın olmakla birlikte en yüksek fenolik madde miktarının sırasıyla metanol, etanol ve sulu ekstrelerinde olduğu görülmüştür (149, 256). %80'lik EtOH ekstresi üzerinde toplam fenolik, flavonoit ve proantosiyanidin madde miktarı tayini yapılmış çalışma ile karşılaştırıldığında, fenolik madde miktarının (110,9 mg GAE/g numune) literatürdeki fenolik madde miktarından ($64,18 \pm 0,05$ mg GAE/g numune) yaklaşık iki kat daha fazla olduğu; toplam flavonoit madde miktarının (literatür verisi: 16,2 mg KE/g numune, MCE: 39,44 mg KE/g numune) ve proantosiyanidin madde miktarının yüksek (literatür verisi: 5,20 mg KAE/g numune, MCE: 7,44 mg KAE/g numune) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen farklı sonuçlar, *M. communis*'in toplandığı yer, zaman; ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve kullanılan kimyasalların kalitesi ile açıklanabilir (257).

Oksidatif stres, oksidatif hasarın artması ve serbest radikallerin organizmada aşırı üretimi ile karakterize bir durumdur. Oksidatif stresin, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser ve osteoporoz gibi pek çok hastalığın etiyopatogenezinde rolü olduğu bilinmektedir (230). Reaktif oksijen ve nitrojen türevleri, reaktif yapıları nedeniyle başta lipitler, nükleik asitler ve proteinler olmak üzere tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve zarar verme potansiyeline sahiptir. Enflamatuvar süreçlerde de hücre hasara ve hücre işlev bozukluğuna sebep olabilecek sitokinlerin üretiminin artmasına yol açabilirler (258). Hücre bileşiklerinin oksitlenmesini önlemek için radikallerle veya diğer reaktif türlerle doğrudan reaksiyona giren antioksidanlar oksidatif hasarın önlenmesini sağlamaktadır. Bitkilerde fenolik yapıdaki bileşiklerin antioksidan etkili oldukları ve pek çok biyolojik aktivite çalışmalarının temelini oluşturduğu bilinmektedir (144, 150, 256). Bu amaçla ekstre ve fraksiyonlar üzerinde antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır.

DPPH radikal süpürücü kapasite tayininde, elde edilen sonuçlar standart madde (Kersetin: 10,23 $\mu\text{g/mL}$) ile karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin MCI kodlu

ekstrede (25,37 µg/mL) olduğu görülmüştür. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite azalmış, en düşük aktivite MCE-Fr.F (855,21 µg/mL) fraksiyonunda gözlenirken en yüksek aktivite MCE-Fr.B (25,69 µg/mL) ve MCE-Fr.C-BuOH (31,31 µg/mL) kodlu fraksiyonlarda gözlenmiştir. Sonuçlar, ekstre ve fraksiyonlardaki fenolik yapıdaki madde içeriği ile doğru orantılıdır. Literatür ile karşılaştırıldığında, bitkinin yapraklarının farklı çözücülerle hazırlanmış ekstreler ve fraksiyonlarının DPPH radikal süpürücü kapasite tayinine ait sonuçların doza bağımlı olarak değiştiği tespit edilmiştir (70, 86, 145, 148-150)

ABTS radikal katyonu süpürücü aktivite tayininde, sonuçlar mg TE/g numune olarak verilip karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin MCE kodlu ekstrede (72,00 mg TE/g numune) olduğu görülmüştür. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite sonuçlarının değişmediği, MCE-Fr.C-BuOH (72,33 mg TE/g numune) fraksiyonunda arttığı gözlenmiştir. Sonuçlar, ekstre ve fraksiyonlardaki fenolik yapıdaki madde içeriği ile doğru orantılıdır.

NO radikal süpürücü etki tayininde, elde edilen sonuçlar standart madde (Kersetin: 34,45 µg/mL) ile karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin MCE kodlu ekstrede (148,68 µg/mL) olduğu görülmüştür. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite artmış, en yüksek aktivite MCE-Fr.C-BuOH (77,78 µg/mL) fraksiyonunda gözlenmiştir. Sonuçlar, ekstre ve fraksiyonlardaki fenolik yapıdaki madde içeriği ile doğru orantılıdır. Literatür ile karşılaştırıldığında, %80'lik etanol ekstresinin NO radikal süpürücü etkisinin (173,3 µg/mL) MCE'den daha düşük olduğu saptanmıştır (150).

Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayininde, sonuçlar mg GAE/g numune olarak verilip karşılaştırıldığında, MCE (122,39 mg GAE/g numune) ve MCI (121,73 mg GAE/g numune) kodlu ekstrelerin birbirine yakın değerlerde bakır iyonu indirgeyici kapasite gösterdiği saptanmıştır. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite sonuçlarının değişmediği, MCE-Fr.C-Su (128,61 mg GAE/g numune) ve MCE-Fr.C-BuOH (127,63 mg GAE/g numune) fraksiyonlarının en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar, ekstre ve fraksiyonlardaki fenolik yapıdaki madde içeriği ile doğru orantılıdır. Literatürde *M. communis* yapraklarının ekstre ve fraksiyonları üzerinde yapılmış bakır iyonu indirgeyici kapasite tayini çalışması bulunmamaktadır. Bu analize ait veriler ilk defa bu tez çalışması kapsamında verilmiştir.

Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç tayininde, sonuçlar mg KE/g numune olarak verilip karşılaştırıldığında, MCI kodlu ekstrenin (205,87 mg KE/g numune), MCE (184,25 mg KE/g numune) kodlu ekstreden daha yüksek demir iyonu antioksidan güç gösterdiği tespit edilmiştir. Fraksiyonlama işlemi ile aktivite sonuçları artmış ve en yüksek aktivite MCE-Fr.D (331,0 mg KE/g numune), MCE-Fr.C-Su (297,23 mg KE/g numune) ve MCE-Fr.C-BuOH (282,18 mg KE/g numune) fraksiyonlarında gözlenmiştir. Sonuçlar, ekstre ve fraksiyonlardaki fenolik yapıdaki madde içeriği ile doğru orantılıdır Literatürde *M. communis* yapraklarının %80'lik etanol ekstresi üzerinde yapılmış demir iyonu indirgeyici antioksidan güç tayini çalışması bulunmamaktadır. Bu analize ait veriler ilk defa bu tez çalışması kapsamında verilmiştir.

Tüm antioksidan aktivite tayinlerinde, MCE-Fr.C-BuOH kodlu fraksiyonun diğer fraksiyonlara göre en yüksek aktiviteyi göstermesi flavonoit içeriğinin en yüksek olmasına atfedilebilir. Nitekim **MC-02** ve **MC-05** kodlu flavonoit yapılarının bu fraksiyondan elde edilmesi de bu sonucu doğrulamaktadır. Aktivitelerin düşük olduğu MCE-Fr.E ve MCE-Fr.F kodlu fraksiyonların da fenolik bileşiklerin aksine yoğun olarak terpenik yapıdaki bileşikleri içermesi ve **MC-09**, **MC-11**, **MC-18** kodlu triterpenik yapıdaki bileşiklerin MCE-Fr.E'den elde edilmesi çalışma sonuçlarının uyumlu olduğunu göstermektedir.

Flavonoit yapısındaki **MC-02** ve **MC-05** kodlu bileşiklerin yapı-aktivite ilişkileri değerlendirildiğinde, B halkasında serbest *orto*-hidroksi grubu, C halkasında C-2 ile C-3 arasındaki çifte bağ ile 4 numaralı konumdaki okso grubunun bulunması antioksidan aktivite açısından önem taşımaktadır (259). Flavon glikozitlerinde, A halkasında C-7 OH'nin serbest olması antioksidan aktivitenin gözlenmesinde önemli bir faktördür (260).

Tirozinaz, polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, katekolaz veya fenolaz, oksijen oksidoredüktaz olarak adlandırılan multifonksiyonel bir enzimdir. Tirozin; dopamin, norepinefrin, epinefrin, melanin ve tiroksinin prekürsörü olup fenilalaninden sentezlenir. Tirozinaz, melanin oluşumunda görevli olup saç ve derinin pigmentasyonunda rol oynayan bir enzimdir. Tirozinaz enziminin anormal şekilde artışı veya aktifleşmesi vitiligo, albinizm ve Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiştir

(261). Parkinson hastalığı dopaminerjik nöronların hasarından kaynaklanan ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığında tirozinaz enziminin seviyesi önemli bir faktördür. Tirozinaz enziminin fazla ekspresyonu, tirozini L-DOPA'ya ve L-DOPA'yı da dopakinona dönüştürmektedir. L-DOPA bileşiği dopaminin prekürsörüdür ve bu bileşiğin dopakrom yapısına dönmesinin Parkinson hastalığında düşük seviyede olan dopaminin daha da azalmasına yol açabileceği öngörülmüştür. Öte yandan tirozinaz enziminin yeterli seviyede olmamasından dolayı, tirozin L-DOPA'ya dönüştürülemeyeceğinden farklı enzimler aracılığıyla nöromelanin oluşumunu da engelleyebileceği tespit edilmiştir. Nöromelanin ise insan beyninde doğal olarak bulunan ve oksidatif stresin artışını engelleyerek nöroprotektif etki gösteren bir bileşiktir. Parkinson hastalığında, substantia nigra da nöromelanin seviyesinin düşük olduğu bildirilmiştir (262). Bununla birlikte, Parkinson hastalığında ölen nöronların sitoplazmada ve hücre dışı boşlukta nöromelanin salgıladığı ve bunun da nöromelaninin nöroprotektif etkisinin kaybolmasına yol açtığı gözlemlenmiştir (263).

Tirozinaz enzim inhibisyonu testinde, kojik asit ($IC_{50}=20,74 \mu\text{g/mL}$) standardına göre tirozinaz enzim inhibisyonu etkinliği en yüksek ekstre MCE ($IC_{50}=99,38 \mu\text{g/mL}$) olarak gözlenmiştir. MCE-Fr.E ($IC_{50}=102,10 \mu\text{g/mL}$) ve MCE-Fr.F ($IC_{50}=102,48 \mu\text{g/mL}$) de en yüksek inhibisyonu yapan fraksiyonlar olarak bulunmuştur. Literatürde yapılmış çalışmalarda tirozinaz enzim inhibisyonları % olarak veya kojik asit eşdeğeri/g ekstre/fraksiyon olarak verildiğinden karşılaştırma yapılamasa da (163), MCE-Fr.E ve MCE-Fr.F fraksiyonlarından izole edilen terpenik bileşiklerin nörodejenerasyon üzerindeki etkileri açıklanmıştır. Terpenik bileşiklerin nörodejeneratif hastalıklar üzerinde olası etkilerinin araştırıldığı pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma mevcuttur. Parkinson hastalığı üzerinde yapılmış çalışmalar da yer almakla birlikte daha çok diterpen ve triterpen yapısındaki bileşiklerin aktiviteleri üzerine yoğunlaşmıştır. Triterpenlerin aktivitelerinin, genellikle enflamasyonda rol oynayan TNF- α , IL gibi sitokinler, NF- κ B transkripsiyon faktörü; beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF), dopamin seviyesi ve antioksidan etki (NO radikale karşı) mekanizmaları üzerinden değerlendirildiği tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin oksidatif stresin artışını ve mitokondriyal disfonksiyonu önlediği, ayrıca dopaminerjik nöron hasarını yavaşlatabileceği sonucuna ulaşılmıştır (264-268).

Elastaz enzimi, protein bağlarını parçalayarak aminoasitlere yıkılmalarını sağlayan proteolitik bir enzimdir. Serbest radikallerin oluşumunda önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili elastaz enzimini içerirler. Bu enzimler, bulunduğu dokularda oksidan ve enflamatuvar doku hasarının önemli mediyatörleridir (269). Hücrenin normal fizyolojik gelişimi ve başkalaşımı, doku düzenlenmesi ve gelişim sürecinden sorumlu oldukları için çeşitli hastalık süreçlerinde kritik rol oynarlar (270).

Elastaz enzim inhibisyonu testinde, test edilen numunelerin IC₅₀ değerleri negatif çıkmıştır. Numunelerin elastaz enzim inhibisyonu yapmadığı, enzim ekspresyonunu artırdığı düşünülmüştür. Bu nedenle, literatürde bitki ekstreleri üzerinde yapılmış elastaz enzim inhibisyonu testinin sonuçları ile uyumlu bulunmamıştır. Devam eden çalışmalarda testin tekrar yapılması planlanmaktadır (163, 164).

Ekstraselüler matriks, derinin dermis tabakasında bulunan, hücreleri birbirine bağlayan ve destekleyen, derinin büyümesinden ve esnekliğinden sorumlu başlıca yapısal bileşenidir. Ekstraselüler matriksin yapısında proteoglikanlar ve matriks metalloproteinleri bulunur. Kolajen ve elastin bu yapısal matriks proteinlerindedir. Ekstraselüler matrikste en çok bulunan protein kolajendir ve toplam memeli protein kütesinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Kolajen; hücre adhezyonunun düzenlenmesinden, derinin gerilim kuvvetinden ve dokuların gelişiminin yönetiminden sorumludur. Bağ dokusu bileşenlerinin (kolajen, elastin) yıkımı cilt yaşlanması, yara iyileşmesinin gecikmesi gibi durumlara neden olur ve bu maddelerin yıkımından sorumlu enzimler sırasıyla kolajenaz, elastaz ve hyalüronidazdır. Kolajenaz bir matriks metalloproteinaz enzimidir. Normal şartlarda esasen dokuların sağlıklı ve dengeli kalmasını sağlamakla görevli bu enzimler, bu dengenin enzimlerden yana bozulması durumunda ekstraselüler matriks bileşenlerinin kontrolsüzce yıkımına ve bu durum da deri yaşlanmasının yanında yaşlanmaya bağlı birçok hastalığa neden olur (271, 272).

Kolajenaz enzim inhibisyon testinin sonuçları standart madde ile karşılaştırıldığında (EGCG: IC₅₀=9,18 µg/mL), MCI (IC₅₀=57,2 µg/mL) kodlu ekstre, MCE-Fr.C-BuOH (IC₅₀=123,66 µg/mL) ve MCE-Fr.E (IC₅₀=188,08 µg/mL)

fraksiyonlarının en yüksek kolajenaz enzim inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Fraksiyonlardan elde edilen maddeler göz önüne alındığında, etkinin, hem fenolik ve hem de triterpen yapısındaki bileşiklerden ileri geldiği; ekstreden fraksiyonlara geçildiğinde aktivitenin azalmasının da ekstrede bulunan bileşiklerin sinerjistik etkisine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Literatürde, *M. communis* üzerinde yapılmış kolajenaz enzim inhibisyon testine rastlanmadığından, elde edilen veriler tarafımızca literatüre ilk kez kazandırılmıştır.

SH-SY5Y (insan nöroblastoma hücreleri), nörodejeneratif hastalıkların temelindeki biyokimyasal yolların analizi ve aynı zamanda hücre canlılığı/sitotoksisite analizlerinde kullanımı uygun bulunmuş ve üzerinde pek çok çalışma yapılmış bir hücre hattı olarak bilinmektedir (273-275)

Hücre canlılığı tayini, ilaç ve standardize ekstre geliştirme aşamalarından biri olan klinik çalışmalarda doz belirleme açısından önem arz etmektedir. SH-SY5Y (insan nöroblastoma hücreleri) nörodejeneratif hastalıkların temelindeki biyokimyasal yolların analizi ve aynı zamanda hücre canlılığı/sitotoksisite analizlerinde kullanımı uygun bulunmuş ve üzerinde pek çok çalışma yapılmış bir hücre hattı olarak bilinmektedir (273-275). Hücre canlılığı tayini, ilaç ve standardize ekstre geliştirme aşamalarından biri olan prelinik çalışmalarda toksik doz belirleme sürecinde önem arz etmektedir.

Çoğaltılmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde MTT ile yapılan hücre canlılığı tayininde, farklı konsantrasyondaki ekstre/fraksiyon ve saf bileşiklerin % canlılık seviyeleri ölçüldüğünde, konsantrasyona bağlı olarak ekstrelerin hücre ölümünü doğrusal olarak artırdığı görülmüştür. İki ekstre arasında % hücre canlılığı bakımından belirgin bir fark görülmüş, IC₅₀ değerleri hesaplandığında (MCE: 191,55 µg/mL, MCI: 92,1 µg/mL), MCI'nın sağlıklı hücrelere daha toksik olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde *M. communis* ekstrelerinin sağlıklı SH-SY5Y hücreleri üzerinde MTT yöntemi ile hücre canlılığı tayin çalışması bulunmamaktadır. Sağlıklı SH-SY5Y hücreleri üzerinde yapılmış bu deney, *M. communis*'in %80'lik etanol ve sulu ekstrelerinden hareketle ilk kez yapılmıştır. Literatürde farklı hücre hatları üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Köngül Şafak ve ark. (276) tarafından yapılmış

çalışmada bitkinin %70'lik metanol ekstresi kullanılmış, 7.81-1000 µg/L konsantrasyon aralığında HeLa ve Colo (sırasıyla IC₅₀: 78,31 ve 38,92 µM) kanser hücre hatlarında ekstrenin sitotoksik etkili bulunduğu gözlenmiştir. Bu ekstrenin farklı çözücülerle partisyonu sonucunda alt fraksiyonları oluşturulmuş ve bu alt fraksiyonlarda bulunan sekonder metabolitler arasındaki farklılıkların sitotoksisiteyi etkilediği görülmüştür. Diklorometan fraksiyonunun içerdiği terpenlerden dolayı sitotoksik etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buradan hareketle, MCE ve MCI ekstrelerinin yanında fraksiyonların da çalışılması gerektiği ve fraksiyonların farklı içeriğinin hücre canlılığını etkileyebileceği düşünülmüştür.

MCE'den elde edilmiş MCE-Fr. kodlu fraksiyonların hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, MCE-Fr.A'nın 250 µg/mL'de hücre canlılığı üzerine etkisi olmadığı ve hücre canlılığının 1000 µg/mL'ye doğru düşüş gösterdiği; MCE-Fr.B'nin 50 µg/mL'de hücre canlılığı üzerine bir etkisi olmadığı ve 250 µg/mL'de dahi hücrelerin %50'sinden fazlasının canlı kalabildiği; MCE-Fr.C-BuOH'un 100 µg/mL'de hücre canlılığı üzerinde etkisi olmadığı ve MCE-Fr.B'ye benzer şekilde 250 µg/mL'de dahi hücrelerin %50'sinden fazlasının canlı kalabildiği; MCE-Fr.C-Su fraksiyonunun 10 µg/mL'den itibaren hücre canlılığında azalmaya neden olduğu ve 100 µg/mL'de ise hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü; MCE-Fr.D'nin, MCE-Fr.B'ye benzer şekilde 50 µg/mL'de hücre canlılığı üzerine bir etkisi olmadığı ve 250 µg/mL'de dahi hücrelerin %50'sinden fazlasının canlı kalabildiği gözlenmiştir. MCE-Fr.E'nin deney metodundaki en düşük konsantrasyon olan 5 µg/mL'den başlayarak hücre canlılığını azalttığı, artan konsantrasyonlarda keskin bir şekilde hücrelerin ölümüne sebep olduğu ve 250 µg/mL konsantrasyonda %4 oranında canlı hücre bıraktığı; MCE-Fr.F'nin ise 5 µg/mL'den başlayarak hücre canlılığını azalttığı ve bu azalmanın doğrusal olmakla birlikte 100 µg/mL'de hücre canlılığının %53 olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler incelendiğinde MCE-Fr.E ve MCE-Fr.F fraksiyonlarında en düşük konsantrasyondan itibaren hücre canlılığında azalma olduğu ve bu sonucun da içerdikleri triterpenik yapıdaki bileşiklere atfedilebileceği düşünülmüştür. Bu noktada bileşiklerin her ne kadar sağlıklı hücrelerde azalmaya neden olsa da selektif bir şekilde kanser hücreleri üzerinde yapılacak sitotoksisite çalışmalarında etkin rol oynayabileceği öngörülmüştür.

Cottiglia ve ark. (80) tarafından yapılmış bir çalışmada da bitkinin yapraklarının diklorometan ekstresinin ve biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yöntemiyle alt fraksiyonlarının ve saf bileşiklerinin MT-4, HepG2, DU145 ve normal insan doku hücre hatlarında sitotoksitesi çalışılmıştır. Konsantrasyona bağlı olarak, ekstrenin MT-4 hücreleri, fraksiyonların ise HepG2, DU145 ve normal insan doku hücre hatlarında sitotoksitesi tespit edilmiştir. Elde edilen floroglusinol türevleri üzerinde yapılan çalışmada ise, mirtukommulon J ve A'nın potent sitotoksik aktiviteye sahip olduğu, diğer bileşiklerin ise (mirtukommulon K ve L) sitotoksik olmadığı görülmüştür. Yapı aktivite ilişkisi değerlendirildiğinde aromatik floroglusinol çekirdeğinin aktivitede oldukça önemli olduğu kanısına varılmıştır.

MCE'den elde edilmiş MCE-Fr. kodlu fraksiyonlardan izole edilmiş bileşiklerin (1-50 µg/mL konsantrasyon aralığında) IC₅₀ değerlerine bakıldığında, hücrelerin %50'sinin ölümüne sebep olan konsantrasyonun en düşük olduğu bileşiğin **MC-11** (korosolik asit) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.29.). Bunu takiben IC₅₀ değerlerinin, sırasıyla **MC-18** (asiatik asit), **MC-09** (ursolik asit), **MC-02** (mirisetin-3-) ve **MC-04** (gallomirtukommulon C) kodlu bileşiklerde arttığı gözlenmiştir. IC₅₀ değeri en yüksek olan **MC-04** (gallomirtukommulon C)'ün en az sayıda hücre ölümüne neden olduğu anlaşılmıştır. Bu veriler yorumlandığında, fenolik yapıdaki bileşiklerin hücre canlılığını koruyucu, terpenik yapıdaki bileşiklerin ise sitotoksik etkili olabileceği görülmüştür.

Wang ve ark. (277) tarafından yapılmış bir çalışmada, SH-SY5Y hücreleri üzerinde mirsitinin (**MC-02**) (2,2-108 µM) hücre ölümüne neden olmadığı ve denenen konsantrasyon aralığında her bir konsantrasyonda hücre canlılığı üzerine etkinin değişmediği görülmüştür. Literatür ile karşılaştırıldığında verilerin uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

MC-04 üzerinde MTT yöntemi ile hücre canlılığı tayini çalışmasına ait referans bir yayın bulunmadığından maddenin literatür ile karşılaştırılması yapılamamıştır. **MC-04**'ün belirlenmiş konsantrasyon aralığında hücre ölümüne belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiş, bu sonuçlar SH-SY5Y hücre hattında gallomirtukommulon C'nin hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olarak tezde yer almıştır.

Shao ve ark. (278) tarafından yapılmış çalışmada ursolik asidin (**MC-9**) SH-SY5Y hücrelerine uygulanması sonrası elde edilmiş IC_{50} değeri ($54,62 \pm 3,87 \mu M$), tez çalışmasında elde edilen değer ($140,31 \mu M$) ile uyum göstermemiştir. Aynı zamanda Yuan ve ark. (138) tarafından korosolik asit (**MC-11**) üzerinde yapılmış çalışma sonuçları da elde edilen değerler ile uyum göstermemektedir.

Asiatik asidin (**MC-18**), MTT yöntemiyle hücre canlılığının analiz edildiği pek çok çalışmada yer aldığı, ancak bu çalışmalarda sağlıklı hücrelerin kullanılmadığı gözlenmiştir. Ternchoocheep ve ark. (279) tarafından yapılmış bir çalışmada hücrelere kolesterol uygulaması yapılarak sitotoksikite oluşturulmuş ve asiatik asidin etkisi araştırılmıştır. Hasarlı nöronlar 1 mmol/L asiatik asit ile 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve asiatik asidin hasarlı nöronların üzerinde olumlu etkisi olduğu anlaşılmıştır.

MCE ekstresi ve MCE-Fr.C-BuOH fraksiyonu karşılaştırıldığında, fraksiyonun IC_{50} değerinin ekstreden daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Fraksiyonun içerik analizinde görüldüğü gibi flavonoit bileşikleri açısından zengin olduğundan dolayı daha az toksik etkili olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, **MC-02**'nin IC_{50} değerinin fraksiyondan daha düşük olduğu görülmüş ve bunun sebebi olarak da izole edilmiş bu bileşiğin tek başına hücre canlılığını koruyamadığı gösterilmiştir. **MC-04**'ün IC_{50} değerine bakıldığında ise fraksiyondan daha yüksek olduğu görülmüş ve **MC-02**'nin aksine tek başına hücre canlılığını daha iyi koruduğu tespit edilmiştir.

MC-09, **MC-11** ve **MC-18**'in elde edildiği MCE ekstresi ve MCE-Fr.E fraksiyonu karşılaştırıldığında, ekstreden saf bileşiklere doğru giden fraksiyonlamada IC_{50} değerlerinin azaldığı görülmüştür. Bu sonuç terpenik bileşiklerin bu fraksiyonda yoğunlaşmasına atfedilmiştir. Ayrıca izole edilmiş bileşiklerin IC_{50} değerleri değerlendirildiğinde, bileşiklerin hücre canlılığını korumak yerine sitotoksik etki gösterdiği anlaşılmıştır. Chudzik ve ark. (280)'ın triterpenlerin potansiyel olarak sitotoksik etkilerinin olduğundan bahsettiği çalışma ile elde edilen sonuçlar uyumlu bulunmuştur.

Patolojik koşullarda düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein oligomerleri; dimer (28-35 kDa), trimer (42-51 kDa) ve tetramer (56-68 kDa) içerebilmekte ve süreç içerisinde bu oligomerler sodyum dodesil sülfat ile çözülmeye dirençli yüksek moleküler ağırlıklı pre-fibriler oligomerleri (281-283); sonrasında pre-fibriler

oligomerler, beta-yaprak yapısına sahip çözünmeye dirençli fibrilleri oluşturabilmektedirler (284). Bu yüksek moleküler ağırlıklı pre-fibriler oligomerlerin, hücre membran hasarı ve hücre ölümünü indükleyerek düşük moleküler ağırlıklı α -sinükleinden daha sitotoksik olduğu bulunmuştur (285). *M. communis*'ten elde edilmiş ekstre veya fraksiyonların α -sinüklein proteini üzerine olası etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamakla birlikte Morshedi ve ark. (286) tarafından yapılmış çalışmada, *M. communis* uçucu yağının α -sinükleinin fibrilasyonunu doza bağımlı olarak artırdığı gözlenmiştir. Buna karşılık tez kapsamında MCE kodlu ekstre ve MCE-Fr. kodlu fraksiyonların düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein proteininin yoğunluğu üzerindeki etkilerinin tespiti amacıyla yapılmış western blot analizi sonucunda, MCE-Fr.E dışındaki numunelerin düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein miktarında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olmadığı anlaşılmıştır. Elde edilen bu sonuca göre, agregasyon sürecinin oligomerik aşamada değerlendirilmesinin öneminin vurgulandığı Lashuel HA. (287) tarafından yapılmış çalışmada belirtildiği gibi, MCE-Fr.E'nin çözünmeye dirençli α -sinüklein oluşumunun erken basamaklarında rol oynayan oligomerlerin oluşumunu azaltması açısından avantajlı olduğunu göstermiştir. Buna karşın MCE-Fr.E kodlu numune düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein düzeyini azaltırken daha sitotoksik ve çözünmeye dirençli yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein miktarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur.

3'ü fenolik 3'ü de triterpenik yapıdaki 6 bileşiğin, α -sinüklein proteini ile etkileşimleri üzerine yapılan moleküler kenetleme çalışması sonuçları değerlendirildiğinde, protein ile bileşikler arasında hesaplanan bağlanma enerjilerine göre en güçlü bağlanma gösteren ilk üç bileşik belirlenmiştir. Bu bileşikler sırasıyla korosolik asit (MC-11), ursolik asit (MC-09) ve asiatik asittir (MC-18). Bu üç bileşik de triterpen yapısındadır. Etkileşimler incelendiğinde bu bileşiklerin α -sinüklein birikimine bağlı Parkinson hastalığının tedavi sürecinde olumlu etkilerinin olabileceği düşünülmüştür.

α -Sinüklein proteininin agregasyonunun, Parkinson hastalığının patolojisinde önemli bir belirteç olduğu bilinmektedir. Tez kapsamında izole edilmiş triterpenlerin α -sinükleinin mitokondriye taşınması ve agregasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, ursolik asidin (MC-09) α -sinükleinin aşırı ekspresyonunu azaltarak,

asiatik asidin (**MC-18**) ise α -sinükleinin mitokondriye taşınmasını engelleyerek Parkinson hastalığını engellediği tespit edilmiştir (107, 131).

Literatürde *M. communis*'in yapraklarından elde edilen uçucu yağının farmakope analizleri ve monograf taslağı mevcuttur (288). Tez çalışması kapsamında *M. communis* yaprakları üzerinde ilk kez farmakope analizi yapılarak monograf hazırlanması için ön bilgiler oluşturulmuştur. Bununla birlikte, bitki yapraklarının farmakopelere kayıtlı monografi bulunmadığından herhangi bir referans ile karşılaştırması yapılamasa da Türk Farmakopesi Avrupa Adaptasyonu 2016'da bulunan yaprak monografları incelenmiş ve farmakope sınır testleri sonucunda elde edilmiş değerler aşağıdaki tabloda karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. (Tablo 4.36.) *M. communis*'in kurutulmuş yaprakları üzerinde yapılmış farmakope sınır testlerinden elde edilmiş değerler ile farmakopede bulunan yaprak droglarındaki sınır değerler karşılaştırıldığında tez kapsamında elde edilmiş değerlerin farmakope monograflarındaki sınır değerleri aşmadığı ve bu değerlerle uyum gösterdiği anlaşılmıştır.

Tablo 5.1. Yaprak droglarının monograflarında bulunan sınır testlerinin değerleri

Drog adı	Farmakope Sınır Testleri				
	Yabancı madde	Kurutmada kayıp	Toplam Kül	Hidroklorik asitte çözünmeyen kül	Uçucu yağ
Altheae folium	En fazla %4	En fazla %10,0	En fazla %18	En fazla %2	-
Belladonnae folium	En fazla %3	-	En fazla %16	En fazla %4	-
Betulae folium	En fazla %4	En fazla %10	En fazla %6	-	-
Boldo folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %13	-	En fazla %4
Cynarae folium	-	En fazla %12	En fazla %20	-	-
Digitalis purpureae folium	-	En fazla %10	En fazla %12	En fazla %5	-
Eucalyptii folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %6	-	Bütün drog en az %2 Parçalanmış drog en az %1,5
Fraxini folium	-	En fazla %10	En fazla %12	-	-
Hamamelidis folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %7	En fazla %2	-
Hedera folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %10	-	-
Malvae folium	En fazla %2	En fazla %12	En fazla %17	En fazla %3	-
Melissa folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %12	-	-
Menthae piperitae folium	En fazla %2	En fazla %11	En fazla %15	En fazla %1,5	Bütün drog en az %1,2 Parçalanmış drog en az %0,9
Oleae folium	-	En fazla %10	En fazla %9	-	-
Orthosiphonis folium	En fazla %2	En fazla %11	En fazla %12,5	-	-
Plantaginis lanceolata folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %14	-	-
Rosmarini folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %9	-	En az %1,2
Salvia officinalis folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %10	-	Bütün drogta en az %1,2 Parçalanmış drogta en az %1
Salvia trilobae folium	En fazla %2	En fazla %10	En fazla %10	-	Bütün drogta en az %1,8 Parçalanmış drogta en az %1,2
Stramonii folium	En fazla %3	-	En fazla %20	En fazla %4	-
Urtica folium	En fazla %5	En fazla %12	En fazla %20	En fazla %4	-
Uva ursi folium	En fazla %3	En fazla %5	En fazla %5	-	-
Verbenae citriodorate folium	-	En fazla %10	En fazla %13	En fazla %3,5	Bütün drogta en az %0,3 Parçalanmış drogta en az %0,2
Myrtii folium	%0,145	%3,856±0,8990	%14,1215±1,7105	%3,5754±0,7680	Toz edilmiş drogta %0,9951

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Türkiye’de mersin, murt veya hambeles olarak bilinen ve halk arasında kullanılan *M. communis*’in yaprakları ekskürsion çalışması ile toplanmıştır. Bitkinin morfolojik ve anatomik olarak incelenmesi sonucunda, tıbbi bitkilerin kullanımında ilk ve en önemli basamak olan bitkinin teşhisi gerçekleştirilmiştir. Bitkinin halk arasında kullanımına istinaden referans niteliği taşıyan *M. communis* yapraklarının monografinin oluşturulması amaçlanmış ve bitkisel drog üzerinde farmakope analizleri gerçekleştirilmiştir. Anatomik ve morfolojik çalışmaların dahil olduğu farmakope analizleri, bitkinin teşhisinin doğru yapılabilmesi ve karakterizasyonunda önemli rol oynamıştır.

M. communis yaprakları üzerinde planlanan fitokimyasal çalışmalar için bitkinin farklı ekstreleri hazırlanmış ve sekonder metabolit gruplarının belirlenmesi için genel teşhis reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Literatür verileri ile de bitkide bulunan sekonder metabolit gruplarının varlığı desteklenmiştir. Kalitatif olarak yapılmış genel teşhis reaksiyonlarını takiben bitkinin içeriğinde bulunan toplam fenolik, toplam flavonoit ve toplam proantosiyanidin (kondanse tanen) miktarı spektrofotometrik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Bitkinin flavonoitler başta olmak üzere fenolik yapıdaki bileşiklerce zengin olduğu anlaşılmıştır. Fenolik bileşiklerin biyolojik etkinlerine yönelik olarak antioksidan aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş, konsantrasyona bağlı olarak serbest radikalleri süpürücü ve metal iyonu indirgeyici kapasiteleri belirlenmiştir.

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Parkinson hastalığı üzerinde bitkinin etkinliğinin tespiti için, α -sinüklein agregasyon inhibisyonu ile birlikte hastalığın patogenezinde rol oynayan tirozinaz enzimi ile enflamasyon patolojisinde ve doku hasarında rol oynayan elastaz ve kolajenaz enzim inhibisyonu testleri yapılmıştır. Tirozinaz ve kolajenaz enzim inhibisyon testleri sonuçlarına göre bitkinin yaprak ekstrelerinin fraksiyonlarına göre daha aktif bulunduğu tespit edilirken, elastaz enzim inhibisyonu testi sonucunda örneklerin enzimi inhibe etmediği deneyin tekrar edilmesi gerekliliği anlaşılmıştır. Ekstrelerin fraksiyonlardan daha etkili olması içerdikleri bileşiklerin sinerjik etki göstermesine atfedilse de devam eden çalışmalarda izole

edilmiş bileşikler üzerinde bu aktivite tayinlerinin yapılması ve etkinliklerinin tespit edilmesi gerekliliği belirtilmiştir. Aynı zamanda Parkinson hastalığının patolojisinde rol oynayan diğer parametrelerin de laboratuvar ortamında test edilebilir hale getirilmesi ve hastalığa sebep olan biyokimyasal yollar üzerinde bitkilerin etkinliğinin ölçülebileceği testlerin sayısının artırılması önerilmektedir.

Fitokimyasal çalışmalar ile fraksiyonlardan, literatürde var olan, 2 adet flavonoit, 1 adet floroglusinol türevi ve 3 adet triterpen olmak üzere toplam 6 adet bileşik izole edilmiştir. Yapıları 1D NMR teknikleri ve HR-ESI-MS kullanılarak tayin edilmiş; bileşikler, mirsitrin (**MC-02**), kersitrin (**MC-05**), gallomirtukommulon C (**MC-04**), ursolik asit (**MC-09**), korosolik asit (**MC-11**) ve asiatic asit (**MC-18**) olarak belirlenmiştir.

SH-SY5Y sağlıklı hücreler üzerinde yapılan hücre canlılığı testlerinin sonucunda, MCI kodlu ekstrenin MCE kodlu ekstreye göre daha toksik, fraksiyonlardan ise MCE-Fr.C-BuOH'un ($IC_{50}=283,57 \mu\text{g/mL}$) oldukça güvenilir olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre MCE-Fr.C-BuOH'un hücreler üzerinde düşük düzeyde toksik etki göstermesi fenolik yapılara atfedilmiştir. Hücre canlılığı bakımından MCE-Fr.C-Su kodlu fraksiyon ve triterpen içeriğe sahip olan MCE-Fr.E, MCE-Fr.F kodlu fraksiyonlar dışındaki fraksiyonlar ekstrelerden daha güvenli görülürken **MC-04** kodlu saf bileşik dışındaki saf bileşikler aynı konsantrasyonlardaki ekstrelerden daha fazla hücre ölümüne neden olmuştur.

Ekstre, fraksiyon ve saf bileşiklerin hücre canlılığı üzerinde etkilerinin MTT yöntemiyle araştırılması sonucunda elde edilen verilerin de kullanılmasıyla birlikte, western blot yöntemiyle ekstre ve fraksiyonların düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein fibrilleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Triterpen içeriğe sahip olan MCE-Fr.E kodlu fraksiyonun, düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein fibrillerinin yoğunluğunu azaltmada en etkili numune olduğu tespit edilmiştir. Ancak MCE-Fr.E düşük moleküler ağırlıklı α -sinüklein düzeyini azaltırken daha sitotoksik ve çözünmeye dirençli yüksek moleküler ağırlıklı α -sinüklein düzeyini artırmıştır. Bu nedenle numunelerin sadece α -sinüklein düzeyine etkilerinin yanı sıra etki mekanizmalarının da değerlendirilmesi Parkinson hastalığının tedavisinde etkinliğinin tespiti açısından önem arz etmektedir. Ek olarak, Aulic ve ark. (254) tarafından yapılan

çalışmada görüldüğü gibi dördüncü pasajlamadan sonra hücre popülasyonunun morfolojik ve fonksiyonel olarak değişmesi nedeniyle α -sinüklein uygulaması yapılmamasına rağmen α -sinüklein düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, ekzojen α -sinüklein fibrillerinin uygulanması ile oluşturulacak Parkinson hastalığı modelinde düşük pasajlı genç SH-SY5Y hücrelerinin kullanımı ve deneylerde biyolojik tekrar sayısının artırılması *M. communis*'in etkinliğinin değerlendirilmesine fayda sağlayacaktır.

In vitro ve *in vivo* ortamda gerçekleştirilmesi planlanan deneylerden önce, bileşiklerin *in silico* yöntemlerle hedefe yönelik olarak taranması, araştırmacılara ön bilgi sağlayarak zaman ve sarf malzeme kullanımı açısından avantaj sağlamaktadır. Bu durum gözetilerek izolasyon çalışmaları sonucunda izole edilmiş 6 adet saf bileşiğin, Parkinson hastalığı patolojisinde önemli bir yeri olan α -sinüklein proteinine hedeflenerek moleküler kenetlenmesi incelenmiştir. En etkili bileşiğin **MC-11** (korosolik asit) olduğu anlaşılmıştır. *In vitro* yöntemlere geçildiğinde bu sonuçla bağlantılı olarak CUPRAC testinde en yüksek indirgeyici etkinin **MC-11** tarafından sağlandığı ve FRAP testinde de antioksidan etkinliğinin yüksek olduğu bulunmuştur. Farklı aktivite metotlarının bir arada kullanılması da etkinin desteklenmesi açısından önemlidir.

Bitki içeriğinin modern yöntemlerle taranması, bitki içeriğindeki fitokimyasalların polarite bakımından yorumlanması ve izolasyon basamaklarında da en verimli yolun tercih edilmesinde yardımcı olmaktadır. İzolasyon çalışmaları sonrasında, qTOF-LC-MS analizi ile bileşiklerin polaritelerine bağlı olarak ekstre ve fraksiyonlardaki içeriklerinin nitel ve oran olarak (%) belirlenmesi hedeflenmiştir. Bileşiklerin ekstre ve fraksiyonlardaki % miktarları, molekül ağırlığı ve pik yüksekliği parametreleri kullanılarak % cinsinden hesaplanmıştır. Her bir bileşik için ekstreden başlayan izolasyon aşamalarında % içeriğin doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bileşiklerin izolasyonunda en verimli ekstre ve fraksiyonların seçildiğini göstermiştir. Devam eden çalışmalarımızda, hedeflenmiş yöntemler geliştirilerek bileşiklerin ekstre ve/veya fraksiyonlarda birbirlerine göre oranlarının tespit edilmesi, yapısı tayin edilmeyen diğer bileşiklerin de ekstreler ve/veya fraksiyonlarda % içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, farklı yapıdaki bileşiklerin izole edilerek veya standart bileşikler temin edilerek her bir ekstre ve

fraksiyondaki % miktarlarının belirlenmesi ile standardizasyon çalışmalarında bitkisel drogta en yüksek oranda bulunan bileşiğin tespit edilerek standardize ekstrede belirteç bileşik olarak kullanılması hedeflenmiştir. Bileşiklerin polaritelerine bağlı olarak ekstrelerdeki % içeriklerinin, ekstrelerin su ve etanol çözücüleri ile hazırlanmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bileşiklerin alıkonma zamanlarına bakıldığında, **MC-02**, **MC-04**, **MC-05** kodlu bileşiklerin polar, **MC-09**, **MC-11** ve **MC-18** kodlu bileşiklerin ise apolar özellikte olduğu doğrulanmıştır.

M. communis'in Türkiye'de bulunan preparatları araştırıldığında çoğunlukla uçucu yağ içeren ürünler ve tıbbi çay olarak satılan yaprakları görülmektedir. Bunlar internet üzerinden veya aktarlar aracılığı ile satışa sunulmaktadır. Ayrıca; soğuk algınlığı ve grip semptomlarını rahatlatıcı etkili, uçucu yağ kombinasyonları halinde, kapsül formunda takviye edici gıda olarak bitkisel ürün pazarında yer alan tek bir ürün bulunmaktadır. Bu preparat da internet ve eczaneler aracılığı ile satılmaktadır. ABD'de kayıtlı preparatların içeriğinde uçucu yağı, tentür ve sıvı ekstreleri mevcuttur. Uçucu yağların saç ve cilt bakımında kullanıldığı bildirilmiştir.

Tıbbi amaçla kullanılacak ürünlerin kalite, etkililik ve güvenilirlik unsurlarını bünyesinde taşıması gerekir. Bir ürün ancak bu unsurları tamamladıktan sonra "tıbbi" olabilme özelliğini kazanabilir. Dolayısıyla, etkin bir tedavi uygulaması için gerekli olan dozun sürekli olarak sağlanması gerekmektedir. Bir maddenin tedavi edici ve öldürücü etkisi arasındaki en önemli fark "miktarıdır". Öyleyse bitkisel ürünlerde doz çok önemlidir. Tıbbi bitkilerin içindeki etken madde miktarının her bir farmasötik formda eşit olarak sağlanabilmesi ve ilacın etkinliğinin sürdürülebilirliği için muhakkak standardize edilmesi ve standardize bitki ekstrelerinin oluşturulması, ayrıca, elde edilen ürünün stabilitesinin belirlenmiş olması, farmakolojik ve klinik bulguların yanı sıra toksikolojik verilerin de saptanmış olması gerekmektedir. Bu amaçla T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 6 Ekim 2010 / 3 Şubat 2023 tarihlerinde yayımlanan "Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürünler Yönetmeliği" ile insan sağlığını koruyucu, tedavi edici etkileri olan ve geleneksel kullanıma sahip tıbbi bitkilerden hazırlanan bitkisel tıbbi ürünlerin ruhsatlandırılması mümkün olmuştur. Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürün, bileşiminde yer alan tıbbi bitkilerin başvuru tarihinden önce Türkiye'de veya Avrupa Birliği üye ülkelerinde en az 15 yıldır, diğer ülkelerde ise 30 yıldır kullanılıyor olduğu bibliyografik olarak kanıtlanmış; terkip ve kullanım amaçları

itibarıyla, hekimin teşhis için denetimi ya da reçetesi ya da tedavi takibi olmaksızın kullanılması tasarlanmış ve amaçlanmış olan, geleneksel tıbbi ürünlere uygun özel endikasyonları bulunan, sadece spesifik olarak belirlenmiş doz ve pozolojiye uygun özel uygulamaları olan, oral, haricen uygulanan veya inhalasyon yoluyla kullanılan müstahzarlardır. Bu tanımdan yola çıkarak geleneksel bitkisel tıbbi ürünler için etkin madde olarak standardize bitkisel preparatların elde edilmesi, ülkemizde ve global olarak çok önemli olduğundan yükselen bitkisel ürün pazarında yer almak üzere tezimizde *Myrtus communis* bitkisinin yaprakları kullanılmış ve etnobotanik çalışmalardan ileri gelen etkileri nedeniyle üzerinde bilimsel araştırmalar yapılmıştır.

Hastalıkların tedavisinde ilaç adayı moleküllerin keşfi veya bitkisel tıbbi ürünleri oluşturmaya yönelik çalışmalarda klinik öncesi verilerin birbiri ile desteklenebilir ve uyumlu olması son derece önemlidir. Çalışma sonucunda elde edilmiş veriler ışığında, Parkinson hastalığı üzerinde etkili olabilecek *M. communis*'ten hazırlanan ekstre, fraksiyon ve/veya saf bileşiklerin daha farklı testlere tabi tutularak gelecekte çalışılması planlanan *in vivo* çalışmalar için verilerin artırılması önerilmektedir. *In silico* moleküler kenetleme çalışmaları sonucunda **MC-11** bileşiği Parkinson hastalığı için etki potansiyeli en yüksek bileşik olarak bulunmuşken, düşük konsantrasyonlarda dahi hücre ölümüne sebep olmayan **MC-04** bileşiğinin ve/veya western blot analizi sonucunda α -sinüklein fibrillerinin azalmasında en etkili bulunan MCE-Fr.E kodlu fraksiyonun bu ileri çalışmalarda değerlendirilmesi, ayrıca qTOF-LC-MS çalışmaları ile hedeflenmiş yöntemler geliştirilerek standardize ekstraların hazırlanmasında kullanılacak işaretleyici bileşiklerin tespit edilmesi planlanmıştır. Bunun yanında farklı moleküllerin keşfi ile doğal kaynaklı ilaç adaylarının elde edilmesi de mümkün olup devam eden fitokimyasal ve prelinik aktivite çalışmalarımız ile yapısı yeni ve aktif olan sekonder metabolitlerin izole edilmesi de hedeflenmiştir. Tezimizde elde edilen sekonder metabolitler ve bunların yapı-aktivite ilişkileri tartışılarak hedeflerimize bir başlangıç yapılmıştır. Bir diğer taraftan bitkisel tıbbi ürünler pazarında yer alan bitkilerin kullanılan kısımlarının ve/veya bitkisel preparatlarının Türk ve/veya Avrupa Farmakopesi'nde monografi olması gerektiğinden tarafımızca bitkinin yapraklarının farmakope analizleri tamamlanarak monograf taslağı hazırlanmıştır. Bitkinin kullanılan kısmı ekolojik şartlardan etkilendiği için güvenilir sonuçları elde etmek

adına farklı bölgelerden toplanan *M. communis* yaprakları üzerinde farmakope analizleri tekrar edilerek sınır değerler aralıklı olarak belirlenecek ve Türk Farmakopesi'ne yayın olarak sunulacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Tekin A, Tatlı Çankaya İ, Zeybek AU. Fitoterapi Uygulama Kitabı. Ankara: Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü;2022.
2. Gates M, Tschudi G. The synthesis of morphine. J Am Chem Soc. 1956;78(7):1380-1393.
3. Howat S, Park B, Oh IS, Jin Y-W, Lee E-K, Loake GJ. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. N Biotechnol. 2014;31(3):242-245.
4. Novak BH, Hudlicky T, Reed JW, Mulzer J, Trauner D. Morphine synthesis and biosynthesis-an update. Current Organic Chemistry. 2000;4(3):343-362.
5. Schrör K. Acetylsalicylic acid. 2th ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2016.
6. Aleksic V, Mimica-Dukic N, Simin N, Nedeljkovic NS, Knezevic P. Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. Phytomed. 2014;21(12):1666-1674.
7. Gupta PD, Birdi TJ. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. J Ayurveda Integr Med. 2017;8(4):266-275.
8. Javadian F, Saeidi S, Javadian E, Mirzaei H, Birjandi M. Evaluation of the antibacterial effect of ethanol and ethyl acetate extracts of *Myrtus communis* against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Gene, Cell and Tissue. 2019;6(1): e86354
9. Khder AK. Effect of *Allium sativum* and *Myrtus communis* on the elimination of antibiotic resistance and swarming of *Proteus mirabilis*. Jordan Journal of Biological Sciences. 2008;1(3):124-128.
10. Mulat M, Pandita A, Khan F. Medicinal plant compounds for combating the multi-drug resistant pathogenic bacteria: a review. Curr Pharm Biotechnol. 2019;20(3):183-196.
11. Nisar B, Sultan A, Rubab S. Comparison of medicinally important natural products versus synthetic drugs-a short commentary. Natural Product Chemistry Research. 2018;6(2): 1000308.
12. Njimoh DL, Assob JCN, Mokake SE, Nyhalah DJ, Yinda CK, Sandjon B. Antimicrobial activities of a plethora of medicinal plant extracts and hydrolates against human pathogens and their potential to reverse antibiotic resistance. Int J Microbiol. 2015;1:547156.
13. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını; 2012.
14. Atik AD, Öztekin M, Erkoç F. Biyoçeşitlilik ve Türkiye'deki Endemik Bitkilere Örnekler. Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi. 2010;30(1).
15. Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1982.

16. Akaydın G, Şimşek I, Arıtuluk ZC, Yeşilada E. An ethnobotanical survey in selected towns of the Mediterranean subregion (Turkey). *Turk J Biol.* 2013;37(2):230-247.
17. Şen A, Yüksel M, Bulut G, Bitiş L, Ercan F, Özyılmaz-Yay N ve ark. Therapeutic potential of *Myrtus communis* subsp. *communis* extract against acetic acid-induced colonic inflammation in rats. *J Food Biochem.* 2017;41(1):e12297.
18. Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother Res.* 2014;28(8):1125-1136.
19. Long H-Z, Cheng Y, Zhou Z-W, Luo H-Y, Wen D-D, Gao L-C. PI3K/AKT signal pathway: a target of natural products in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Front Pharmacol.* 2021;12:648636.
20. Arıcan YE YY, Ecevit Genç G. A preliminary ethnobotanical survey of Kumluca(Antalya). *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University.* 2013;43(2):95-102.
21. Bulut G, Tuzlacı E. An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa-Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2013;149(3):633-647.
22. Güler B, Kümüştekin G, Uğurlu E. Contribution to the traditional uses of medicinal plants of Turgutlu (Manisa-Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2015;176:102-108.
23. Öztürk M, Uysal I, Gücel S, Altundağ E, Doğan Y, Başlar S. Medicinal uses of natural dye-yielding plants in Turkey. *Research Journal of Textile and Apparel.* 2013;17(2):69-80.
24. Sargın SA, Akçiçek E, Selvi S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2013;150(3):860-874.
25. Şenkardes İ, Tuzlacı E. Some Ethnobotanical notes from Gündoğmuş district (Antalya/Turkey). *Clinical and Experimental Health Sciences.* 2014;4(2):63.
26. Güzel Y, Güzelşemme M, Miski M. Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: a multicultural district in Hatay Province of Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2015;174:118-152.
27. Kalankan G, Özkan ZC, Akbulut S. Medicinal and aromatic wild plants and traditional usage of them in Mount Ida (Balıkesir/Turkey). *Journal of Applied Biological Sciences.* 2015;9(3):25-33.
28. Gürdal B, Kültür Ş. An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2013;146(1):113-126.
29. Korkmaz M, Karakuş S, Selvi S. An ethnobotanical study on medicinal plants in Erzincan, Turkey. *Indian Journal of Traditional Knowledge.* 2016;15(2):192-202.
30. Bulut G, Haznedaroğlu MZ, Doğan A, Koyu H, Tuzlacı E. An ethnobotanical study of medicinal plants in Acipayam (Denizli-Turkey). *J Herb Med.* 2017;10:64-81.
31. Akbulut S, Karaköse M, Özkan ZC. Traditional uses of some wild plants in Kale and Acipayam provinces in Denizli. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty.* 2019;19(1):72-81.

32. Güneş S, Savran A, Paksoy MY, Koşar M, Çakılcıoğlu U. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Karaisalı and its surrounding (Adana-Turkey). *J Herb Med.* 2017;8:68-75.
33. Nacakcı FM, Dutkuner İ. A study of ethnobotany in Kumluca (Antalya). *Turkish Journal of Forestry.* 2018;19(2):113-119.
34. Sargın SA, Büyükcengiz M. Plants used in ethnomedicinal practices in Gulnar district of Mersin, Turkey. *J Herb Med.* 2019;15:100224.
35. Emre G, Doğan A, Haznedaroğlu MZ, Şenkardes İ, Ülger M, Satıroğlu A ve ark. An ethnobotanical study of medicinal plants in Mersin (Turkey). *Front Pharmacol.* 2021;12:664500.
36. Bouasla A, Bouasla I. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytomedicine.* 2017;36:68-81.
37. Hamza N, Berke B, Umar A, Cheze C, Gin H, Moore N. A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2019;238:111841.
38. Sarri M, Mouyet FZ, Benziane M, Cheriet A. Traditional use of medicinal plants in a city at steppic character (M'sila, Algeria). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research.* 2014;2(2):31-35.
39. Senouci F, Ababou A, Senouci S, Bouzada N. Traditional medicinal plants applied for the treatment of gastrointestinal diseases in Chlef, Algeria. *Egyptian Journal of Botany.* 2023;63(2):419-429.
40. Zatout F, Benarba B, Bouazza A, Babali B, Bey NN, Morsli A. Ethnobotanical investigation on medicinal plants used by local populations in Tlemcen National Park (extreme North West Algeria). *Mediterranean Botany.* 2021;42: e69396.
41. Alemu M, Asfaw Z, Lulekal E, Warkineh B, Debella A, Sisay B, et al. Ethnobotanical study of traditional medicinal plants used by the local people in Habru District, North Wollo Zone, Ethiopia. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2024;20:4.
42. Getaneh S, Girma Z. An ethnobotanical study of medicinal plants in Debre Libanos Wereda, Central Ethiopia. *African Journal of Plant Sciences.* 2014;8(7):366-379.
43. El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J Ethnopharmacol.* 2003;86(2-3):149-58.
44. Idm'hand E, Msanda F, Cherifi K. Ethnobotanical study and biodiversity of medicinal plants used in the Tarfaya Province, Morocco. *Acta Ecologica Sinica.* 2020;40(2):134-144.
45. Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol.* 2001;77(2-3):175-182.
46. Khabbach A, Libiad M, Ennabili A, Bousta D. Medicinal and cosmetic use of plants from the province of Taza, Northern Morocco. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas.* 2012;11(1):46-60.

47. Ouhaddou H, Boubaker H, Msanda F, El Mousadik A. An ethnobotanical study of medicinal plants of the Agadir Ida Ou Tanane province (southwest Morocco). *Journal of Applied Biosciences*. 2014;84:7707-7722.
48. Mohamadi N, Sharififar F, Koochpayeh A, Daneshpajouh M. Traditional and ethnobotanical uses of medicinal plants by ancient populations in Khabr and Rouchon of Iran. *J Appl Pharm Sci*. 2015;5(11):101-107.
49. Nasab FK, Khosravi AR. Ethnobotanical study of medicinal plants of Sirjan in Kerman Province, Iran. *J Ethnopharmacol*. 2014;154(1):190-7.
50. Sadat-Hosseini M, Farajpour M, Boroomand N, Solaimani-Sardou F. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants in the south of Kerman, Iran. *J Ethnopharmacol*. 2017;199:194-204.
51. Cocco E, Maccioni D, Sanjust E, Falconieri D, Farris E, Maxia A. Ethnopharmacobotany and diversity of Mediterranean endemic plants in Marmilla subregion, Sardinia, Italy. *Plants*. 2022;11(22):3165.
52. Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti M. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *J Ethnopharmacol*. 2009;125(1):16-30.
53. Guarrera PM, Salerno G, Caneva G. Folk phytotherapeutical plants from Maratea area (Basilicata, Italy). *J Ethnopharmacol*. 2005;99(3):367-378.
54. Leto C, Tuttolomondo T, La Bella S, Licata M. Ethnobotanical study in the Madonie Regional Park (Central Sicily, Italy)-Medicinal use of wild shrub and herbaceous plant species. *J Ethnopharmacol*. 2013;146(1):90-112.
55. Maruca G, Spampinato G, Turiano D, Laghetti G, Musarella CM. Ethnobotanical notes about medicinal and useful plants of the Reventino Massif tradition (Calabria region, Southern Italy). *Genet Resour Crop Evol*. 2019;66:1027-1040.
56. Savo V, Giulia C, Maria GP, David R. Folk phytotherapy of the amalfi coast (Campania, Southern Italy). *J Ethnopharmacol*. 2011;135(2):376-392.
57. Scherrer AM, Motti R, Weckerle CS. Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (Campania, Southern Italy). *J Ethnopharmacol*. 2005;97(1):129-143.
58. Samaha AA, Fawaz M, Salami A, Baydoun S, Eid AH. Antihypertensive indigenous lebanese plants: ethnopharmacology and a clinical trial. *Biomolecules*. 2019;9(7):292.
59. Karous O, Ben Haj Jilani I, Ghrabi-Gammar Z. Ethnobotanical study on plant used by semi-nomad descendants' community in Ouled Dabbeb-Southern Tunisia. *Plants*. 2021;10(4):642.
60. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. *Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford:Blackwell Publishers;2006.
61. Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2014;2(7):377-392.

62. Yoshimura M, Amakura Y, Tokuhara M, Yoshida T. Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. Journal of Natural Medicines. 2008;62:366-268.
63. Tuberoso CI, Barra A, Angioni A, Sarritzu E, Pirisi FM. Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts and essential oils. Journal of agricultural and food chemistry. 2006;54(4):1420-1426.
64. Taamalli A, Iswaldi I, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Zarrouk M. UPLC–QTOF/MS for a Rapid Characterisation of Phenolic Compounds from Leaves of *Myrtus communis* L. Phytochemical Analysis. 2014;25(1):89-96.
65. Čulina P, Cvitković D, Pfeifer D, Zorić Z, Repajić M, Elez Garofulić I ve ark. Phenolic profile and antioxidant capacity of selected medicinal and aromatic plants: Diversity upon plant species and extraction technique. Processes. 2021;9(12):2207.
66. Wannas WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G ve ark. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. Food and chemical toxicology. 2010;48(5):1362-1370.
67. Correddu F, Maldini M, Addis R, Petretto GL, Palomba M, Battacone G ve ark. *Myrtus communis* liquor byproduct as a source of bioactive compounds. Foods. 2019;8(7):237.
68. Shaheen F, Ahmad M, Nahar Khan S, Samreen Hussain S, Anjum S, Tashkhodjaev B ve ark. New α -glucosidase inhibitors and antibacterial compounds from *Myrtus communis* L. European Journal of Organic Chemistry. 2006;(10):2371-2377.
69. Senadeera SPD. Investigation of anti-infective compounds within the flowers of Myrtaceae [MScThesis]. Australia:Griffith University; 2017.
70. Tuberoso CIG, Rosa A, Bifulco E, Melis MP, Atzeri A, Pirisi FM ve ark. Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. Food Chemistry. 2010;123(4):1242-1251.
71. Franco AM, Tocci N, Guella G, Dell'Agli M, Sangiovanni E, Perenzoni D ve ark. Myrtle Seeds (*Myrtus communis* L.) as a rich source of the bioactive ellagitannins oenothein B and eugeniflorin D2. ACS omega. 2019;4(14):15966-15974.
72. Martín T, Rubio B, Villaescusa L, Fernández L, Díaz AM. Polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*. Pharmaceutical Biology. 1999;37(1):28-31.
73. Maldini M, Chessa M, Petretto GL, Montoro P, Rourke JP, Foddai M ve ark. Profiling and simultaneous quantitative determination of anthocyanins in wild *Myrtus communis* L. berries from different geographical areas in sardinia and their comparative evaluation. Phytochemical Analysis. 2016;27(5):249-256.
74. Bouzabata A, Cabral C, Gonçalves MJ, Cruz MT, Bighelli A, Cavaleiro C ve ark. *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil. Food and Chemical Toxicology. 2015;75:166-172.
75. Belahcene S, Kbsa W, Akingbade TV, Umar HI, Omoboyowa DA, Alshihri AA ve ark. Chemical composition antioxidant and anti-inflammatory activities of *Myrtus*

communis L. leaf extract: Forecasting ADMET profiling and anti-inflammatory targets using molecular docking tools. *Molecules*. 2024;29(4):849.

76. Tanaka N, Jia Y, Niwa K, Imabayashi K, Tatano Y, Yagi H ve ark. Phloroglucinol derivatives and a chromone glucoside from the leaves of *Myrtus communis*. *Tetrahedron*. 2018;74(1):117-123.

77. Appendino G, Maxia L, Bettoni P, Locatelli M, Valdivia C, Ballero M ve ark. Antibacterial galloylated alkylphloroglucinol glucosides from myrtle (*Myrtus communis*). *Journal of Natural Products*. 2006;69(2):251-254.

78. Appendino G, Bianchi F, Minassi A, Sterner O, Ballero M, Gibbons S. Oligomeric acylphloroglucinols from myrtle (*Myrtus communis*). *Journal of Natural Products*. 2002;65(3):334-338.

79. Celaj O, Duran AG, Cennamo P, Scognamiglio M, Fiorentino A, Esposito A ve ark. Phloroglucinols from Myrtaceae: attractive targets for structural characterization, biological properties and synthetic procedures. *Phytochemistry Reviews*. 2021;20:259-299.

80. Cottiglia F, Casu L, Leonti M, Caboni P, Floris C, Busonera B, et al. Cytotoxic phloroglucinols from the leaves of *Myrtus communis*. *Journal of Natural Products*. 2012;75(2):225-229.

81. Zomorodian K, Moein M, Lori ZG, Ghasemi Y, Rahimi MJ, Bandegani A ve ark. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Myrtus communis* leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2013;16(1):76-84.

82. Chen M, Chen L-F, Li M-M, Li N-P, Cao J-Q, Wang Y ve ark. Myrtucomvalones A-C, three unusual triketone-sesquiterpene adducts from the leaves of *Myrtus communis* 'Variegata'. *RSC Adv*. 2017;7(37):22735-22740.

83. Aykaç A, Özbeyli D, Uncu M, Ertaş B, Kılınç O, Şen A ve ark. Evaluation of the protective effect of *Myrtus communis* in scopolamine-induced Alzheimer model through cholinergic receptors. *Gene*. 2019;689:194-201.

84. Yalman K, Şen A, Çevik Ö, Kadioğlu-Yaman B, Ertaş B, Yıldız S ve ark. Investigation of the protective and therapeutic efficacy of *Myrtus communis* extract in aluminum chloride and D-galactose-induced Alzheimer's disease in rats. *Journal of Research in Pharmacy*. 2022;26(5):1363-74.

85. Yaman BK, Çevik Ö, Yalman K, Ertaş B, Şen A, Şener G. *Myrtus communis* subsp. *communis* improved cognitive functions in ovariectomized diabetic rats. *Gene*. 2020;744:144616.

86. Tümen İ, Şenol FS, Orhan İE. Inhibitory potential of the leaves and berries of *Myrtus communis* L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2012;63(4):387-392.

87. Cevikelli-Yakut Z-A, Ertaş B, Şen A, Koyuncuoglu T, Yeğen B, Şener G. *Myrtus communis* improves cognitive impairment in renovascular hypertensive rats. *Journal of Physiology & Pharmacology*. 2020;71(5):665-677.

88. Özbeyli D, Yarımbaş G, Ertaş B, Şen A, Sakarcan S, Şener G. *Myrtus communis* extract ameliorates high-fat diet induced brain damage and cognitive function. *Journal of Research in Pharmacy*. 2020;24(6):865-873.
89. Caputo L, Capozzolo F, Amato G, De Feo V, Fratianni F, Vivenzio G ve ark. Chemical composition, antibiofilm, cytotoxic, and anti-acetylcholinesterase activities of *Myrtus communis* L. leaves essential oil. *BMC complementary medicine and therapies*. 2022;22(1):142.
90. Hussein BA, Karimi I, Yousofvand N. Chemo-and bio-informatics insight into anti-cholinesterase potentials of berries and leaves of *Myrtus communis* L., Myrtaceae: an *in vitro/in silico* study. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2023;23(1):421.
91. Maggio A, Loizzo MR, Riccobono L, Bruno M, Tenuta MC, Leporini M ve ark. Comparative chemical composition and bioactivity of leaves essential oils from nine Sicilian accessions of *Myrtus communis* L. *Journal of Essential Oil Research*. 2019;31(6):546-555.
92. Rhyaf AG. Protective effect of *Myrtus communis* L. on arsenic-induced pathological changes on brain tissue of white rats. *Basrah Journal of Veterinary Research*. 2018;17(2).
93. Begum S, Ali M, Gul H, Ahmad W, Alam S, Khan M ve ark. *In vitro* enzyme inhibition activities of *Myrtus communis* L. *African J Pharm Pharmacol*. 2012;6(14):1083-1087.
94. Ma J-Q, Luo R-Z, Jiang H-X, Liu C-M. Quercitrin offers protection against brain injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Food & Function*. 2016;7(1):549-556.
95. Wang L, Sun J, Miao Z, Jiang X, Zheng Y, Yang G. Quercitrin improved cognitive impairment through inhibiting inflammation induced by microglia in Alzheimer's disease mice. *Neuroreport*. 2022;33(8):327-335.
96. Wagner C, Vargas AP, Roos DH, Morel AF, Farina M, Nogueira CW ve ark. Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. *Arch Toxikol*. 2010;84:89-97.
97. Rattanajarasroj S, Unchern S. Comparable attenuation of $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity by quercitrin and 17β -estradiol in cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem Res*. 2010;35:1196-1205.
98. Nakayama M, Aihara M, Chen Y-N, Araie M, Tomita-Yokotani K, Iwashina T. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Mol Vis*. 2011;17:1784.
99. Rajamanickam G, SL M. Bio-guided isolation of anti-Alzheimer's compounds from *Phyllanthus niruri* and role of niruriflavone in the reversal of aluminum chloride-induced neurobehavioral and biochemical changes in an animal model. *Medicinal Chemistry Research*. 2022;31(10):1740-1753.

- 100.** Kim JH, Lee S, Cho EJ. Neuroprotective effects of three flavonoids from *Acer okamotoanum* against neurotoxicity induced by amyloid beta in SH-SY5Y cells. *Korean Journal of Agricultural Science*. 2022;49(2):227-237.
- 101.** Zhen LY, Du Y, Yan QX, Tong WH, Jun HY, Cheng CY ve ark. Comprehensive evaluation of effective polyphenols in apple leaves and their combinatory antioxidant and neuroprotective activities. *Ind Crops Prod*. 2019;129(7):242-252.
- 102.** Plekratoke K, Waiwut P, Yenjai C, Monthakantirat O, Takomthong P, Nualkaew N ve ark. Multi-target actions of flavonoid derivatives from *Mesua ferrea* Linn flower against Alzheimer's disease pathogenesis. *Biomedical Sciences and Clinical Medicine*. 2023;62(4):169-180.
- 103.** Azib L, Debbache-Benaid N, Da Costa G, Atmani-Kilani D, Saidene N, Ayouni K ve ark. *Pistacia lentiscus* L. leaves extract and its major phenolic compounds reverse aluminium-induced neurotoxicity in mice. *Ind Crops Prod*. 2019;137:576-584.
- 104.** Franco JL, Posser T, Missau F, Pizzolatti MG, Santos AR, Souza DO ve ark. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010;30(3):272-278.
- 105.** Li L, Zhang X, Cui L, Wang L, Liu H, Ji H ve ark. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. *Brain Research*. 2013;1497:32-39.
- 106.** Ding H, Wang H, Zhu L, Wei W. Ursolic acid ameliorates early brain injury after experimental traumatic brain injury in mice by activating the Nrf2 pathway. *Neurochem Res*. 2017;42:337-346.
- 107.** Zahra W, Rai SN, Birla H, Singh SS, Rathore AS, Dilnashin H ve ark. Neuroprotection of rotenone-induced parkinsonism by ursolic acid in PD mouse model. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 2020;19(7):527-540.
- 108.** Liu K-M, Huang Y, Wan P-P, Lu Y-H, Zhou N, Li J-J ve ark. Ursolic acid protects neurons in temporal lobe epilepsy and cognitive impairment by repressing inflammation and oxidation. *Front Pharmacol*. 2022;13:877898.
- 109.** Salau VF, Erukainure OL, Ayeni G, Ibeji CU, Islam MS. Modulatory effect of ursolic acid on neurodegenerative activities in oxidative brain injury: An *ex vivo* study. *J Food Biochem*. 2021;45(2):e13597.
- 110.** Rai SN, Yadav SK, Singh D, Singh SP. Ursolic acid attenuates oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in MPTP-induced Parkinsonian mouse model. *J Chem Neuroanat*. 2016;71:41-49.
- 111.** Bang Y, Kwon Y, Kim M, Moon SH, Jung K, Choi HJ. Ursolic acid enhances autophagic clearance and ameliorates motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease mice model. *Acta Pharmacol Sin*. 2023;44(4):752-765.
- 112.** Rai SN, Zahra W, Singh SS, Birla H, Keswani C, Dilnashin H ve ark. Anti-inflammatory activity of ursolic acid in MPTP-induced parkinsonian mouse model. *Neurotox Res*. 2019;36:452-462.
- 113.** Mirza FJ, Amber S, Hassan D, Ahmed T, Zahid S. Rosmarinic acid and ursolic acid alleviate deficits in cognition, synaptic regulation and adult hippocampal

neurogenesis in an $A\beta_{1-42}$ -induced mouse model of Alzheimer's disease. *Phytomedicine*. 2021;83:153490.

114. Peshattiwar V, Muke S, Kaikini A, Bagle S, Dighe V, Sathaye S. Mechanistic evaluation of ursolic acid against rotenone induced Parkinson's disease-emphasizing the role of mitochondrial biogenesis. *Brain Res Bull*. 2020;160:150-161.

115. Lu J, Zheng Y-L, Wu D-M, Luo L, Sun D-X, Shan Q. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(7):1078-1090.

116. Lu J, Wu D-M, Zheng Y-L, Hu B, Cheng W, Zhang Z-F ve ark. Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain Behav Immun*. 2011;25(8):1658-1667.

117. Zhang Y, Li X, Ciric B, Curtis MT, Chen W-J, Rostami A ve ark. A dual effect of ursolic acid to the treatment of multiple sclerosis through both immunomodulation and direct remyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(16):9082-9093.

118. Tang FR, Loke WK, Wong P, Khoo BC. Radioprotective effect of ursolic acid in radiation-induced impairment of neurogenesis, learning and memory in adolescent BALB/c mouse. *Physiol Behav*. 2017;175:37-46.

119. Wang N, Wang E, Wang R, Muhammad F, Li T, Yue J ve ark. Ursolic acid ameliorates amyloid β -induced pathological symptoms in *Caenorhabditis elegans* by activating the proteasome. *Neurotoxicology*. 2022;88:231-240.

120. Liang W, Zhao X, Feng J, Song F, Pan Y. Ursolic acid attenuates beta-amyloid-induced memory impairment in mice. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016;74:482-488.

121. Machado D, Neis V, Balen G, Colla A, Cunha M, Dalmarco J ve ark. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;103(2):204-211.

122. Yoon J-H, Youn K, Ho C-T, Karwe MV, Jeong W-S, Jun M. *p*-Coumaric acid and ursolic acid from Corni fructus attenuated β -Amyloid (25-35)-induced toxicity through regulation of the NF- κ B signaling pathway in PC12 cells. *J Agric Food Chem*. 2014;62(21):4911-4916.

123. Wang Y-J, Lu J, Wu D-M, Zheng Z-H, Zheng Y-L, Wang X-H ve ark. Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in mouse brain through suppressing p38/NF- κ B mediated inflammatory pathways. *Neurobiol Learn Mem*. 2011;96(2):156-165.

124. Nguyen HT, Le XT, Van Nguyen T, Phung HN, Pham HTN, Nguyen KM ve ark. Ursolic acid and its isomer oleanolic acid are responsible for the anti-dementia effects of *Ocimum sanctum* in olfactory bulbectomized mice. *J Nat Med*. 2022;76(3):621-633.

125. Yamamoto S, Sakemoto C, Iwasa K, Maruyama K, Shimizu K, Yoshikawa K. Ursolic acid treatment suppresses cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction via upregulation of IGF-1. *J Pharmacol Sci*. 2020;144(3):119-122.

126. Li S-J, Liu Q, He X-B, Liu J-P, Liu X-L, Hu J ve ark. *Pyrola incarnata* demonstrates neuroprotective effects against β -amyloid-induced memory impairment in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020;30(2):126858.
127. Chen D, Zhang X-Y, Sun J, Cong Q-J, Chen W-X, Ahsan HM ve ark. Asiatic acid protects dopaminergic neurons from neuroinflammation by suppressing mitochondrial ROS production. *Biomolecules & Therapeutics*. 2019;27(5):442.
128. Nataraj J, Manivasagam T, Justin Thenmozhi A, Essa MM. Neuroprotective effect of asiatic acid on rotenone-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress-mediated apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells. *Nutr Neurosci*. 2017;20(6):351-359.
129. Zhang X, Wu J, Dou Y, Xia B, Rong W, Rimbach G ve ark. Asiatic acid protects primary neurons against C2-ceramide-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2012;679(1-3):51-59.
130. Xu M-F, Xiong Y-Y, Liu J-K, Qian J-J, Zhu L, Gao J. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(5):578-587.
131. Ding H, Xiong Y, Sun J, Chen C, Gao J, Xu H. Asiatic acid prevents oxidative stress and apoptosis by inhibiting the translocation of α -synuclein into mitochondria. *Front Neurosci*. 2018;12:354837.
132. Xiong Y, Ding H, Xu M, Gao J. Protective effects of asiatic acid on rotenone-or H_2O_2 -induced injury in SH-SY5Y cells. *Neurochem Res*. 2009;34:746-754.
133. Loganathan C, Thayumanavan P. Asiatic acid prevents the quinolinic acid-induced oxidative stress and cognitive impairment. *Metabolic Brain Disease*. 2018;33:151-159.
134. Suryavanshi J, Prakash C, Sharma D. Asiatic acid attenuates aluminium chloride-induced behavioral changes, neuronal loss and astrocyte activation in rats. *Metabolic Brain Disease*. 2022;37(6):1773-1785.
135. Islamie R, Myint SLL, Rojanaratha T, Ritthidej G, Wanakhachornkrai O, Wattanathamsan O ve ark. Neuroprotective effect of nose-to-brain delivery of asiatic acid in solid lipid nanoparticles and its mechanisms against memory dysfunction induced by amyloid beta₁₋₄₂ in mice. *BMC Complement Med Ther*. 2023;23(1):294.
136. Zhao M-D, Geng J, Guo W-J, LI J, Zhou B-J, Gao J ve ark. Effects of asiatic acid on MPTP-induced Parkinson's disease-like motor symptoms in mice. *Chinese Traditional Patent Medicine*. 2018;12:33-39.
137. Upaganlawar AB. Supplementation of corosolic acid prevents the development of neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacology and Clinical Sciences*. 2022;7:1.
138. Yuan Z-Z, Suo Y-R, Hao X-Y, Wang S-L, Li G, Wang H-L. Triterpenic acids from *Potentilla parvifolia* and their protective effects against okadaic acid induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y cells. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(6):885-890.
139. Venkateswarulu T, Krupanidhi S, Mikkili I, Angelina J, John Babu D, Peele KA. *In silico* study on evaluation of corosolic acid of *Lagerstroemia speciosa* against Alzheimer's disease. *Arab Gulf Journal of Scientific Research*. 2023;41(2):175-182.

140. Hosseinzadeh H, Khoshdel M, Ghorbani M. Antinociceptive, anti-inflammatory effects and acute toxicity of aqueous and ethanolic extracts of *Myrtus communis* L. aerial parts in mice. *J Acupunct Meridian Stud.* 2011;4(4):242-247.
141. Mubarak SS, Ibrar M, Barkatullah MN, Ehsan M. Evaluation of essential oil of *Myrtus communis* leaves for analgesic and gastrointestinal motility profile. *Pharmacologyonline.* 2012;2(7):41-45.
142. Mirzaee F, Jannesari S, Kariman N, Mojab F, Nasiri M. The effect of *Myrtus communis* cream on wound healing and severity of episiotomy pain: Double-blind clinical trial. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility.* 2019;22(8):52-61.
143. Panahi Y, Mousavi-Nayeeni SM, Sahebkar A, Rahimnia A, Beiraghdar F, Sol-Tanbakhsh M ve ark. *Myrtus communis* essential oil for the treatment of hemorrhoids: a randomized double-blind double-dummy parallel-group comparative study. *Turk J Pharm Sci.* 2014;11(1):1-8.
144. Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaitis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* 2008;107(3):1120-1130.
145. Tuberoso CIG, Boban M, Bifulco E, Budimir D, Pirisi FM. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem.* 2013;140(4):686-691.
146. Ines S, Ines B, Wissem B, Mohamed BS, Nawel H, Dijoux-Franca MG ve ark. *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of 3, 5-O-di-galloylquinic acid extracted from *Myrtus communis* leaves and modulation of cell gene expression by H₂O₂. *J Appl Toxicol.* 2012;32(5):333-341.
147. Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol.* 2008;226:583-590.
148. Benchikh F, Amira S, Benabdallah H. The evaluation of antioxidant capacity of different fractions of *Myrtus communis* L. leaves. *Annual Research & Review in Biology.* 2018;22(5):1-14.
149. Bouyahya A, Benjouad A, Dakka N, Bakri Y. Correlation between the phenol content and antioxidant efficacy of *Myrtus communis* (L.) leaf extracts. *Journal of Nutrition, Food and Lipid Science.* 2018;1:1-9.
150. Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (*Myrtus communis* L.). *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences.* 2015;25(127):10-24.
151. Ali J, Afridi MS, Sher M, Khan FA, Rehman S. Comparative antioxidant potential of *Myrtus communis* Linn leaves aqueous and organic extracts. 2018. *Pharmacologyonline* 2:192-198.
152. Esin Çelik S, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E, Apak R. Identification and antioxidant capacity determination of phenolics and their glycosides in elderflower by online HPLC–CUPRAC Method. *Phytochem Anal.* 2014;25(2):147-154.

- 153.** Ajileye O, Obuotor E, Akinkunmi E, Aderogba M. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. *J King Saud Univ Sci.* 2015;27(3):244-252.
- 154.** Hashim NS, Tan ML, Ooi KL, Sulaiman SF. The effect of flavonols in *Anacardium occidentale* L. leaf extracts on skin pathogenic microorganisms. *Nat Prod Res.* 2023;37(12):2009-2012.
- 155.** Niamnuy C, Charoenchaitrakool M, Mayachiew P, Devahastin S. Bioactive compounds and bioactivities of *Centella asiatica* (L.) Urban prepared by different drying methods and conditions. *Drying Technology.* 2013;31(16):2007-2015.
- 156.** Butkevičiūtė A, Urbškaitė R, Liaudanskas M, Kviklys D, Viškelis J, Janulis V. Seasonal variation of the qualitative and quantitative composition of triterpenic compounds and antioxidant activity in vitro in the apple extracts of cultivars grown in Lithuania. *Chemija.* 2020;31:2.
- 157.** Santiago L, Dayrit K, Correa P, Mayor A. Comparison of antioxidant and free radical scavenging activity of triterpenes α -amyrin, oleanolic acid and ursolic acid. *J Nat Prod.* 2014;7:29-36.
- 158.** Dzoyem JP, Melong R, Tsamo AT, Tchinda AT, Kapche DG, Ngadjui BT ve ark. Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant activity of eight compounds isolated from *Entada abyssinica* (Fabaceae). *BMC Res Notes.* 2017;10:1-6.
- 159.** Etsassala NG, Adeloye AO, El-Halawany A, Hussein AA, Iwuoha EI. Investigation of *in vitro* antioxidant and electrochemical activities of isolated compounds from *Salvia chamelaeagnea* PJ Bergius Extract. *Antioxidants.* 2019;8(4):98.
- 160.** Maxia A, Frau MA, Falconieri D, Karchuli MS, Kasture S. Essential oil of *Myrtus communis* inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF- α . *Nat Prod Commun.* 2011;6(10):1545-1548.
- 161.** Touaibia M. Composition and anti-inflammatory effect of the common myrtle's (*Myrtus communis* L.) essential oil growing wild in Algeria. *Phytothérapie.* 2020;18(3):156-161.
- 162.** Romani A, Coinu R, Carta S, Pinelli P, Galardi C, Vincieri FF ve ark. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radic Res.* 2004;38(1):97-103.
- 163.** Chiocchio I, Mandrone M, Sanna C, Maxia A, Tacchini M, Poli F. Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. *Ind Crops Prod.* 2018;122:498-505.
- 164.** Alyousef AA, Husain FM, Arshad M, Ahamad SR, Khan MS, Qais FA ve ark. *Myrtus communis* and its bioactive phytoconstituent, linalool, interferes with quorum sensing regulated virulence functions and biofilm of uropathogenic bacteria: *In vitro* and *in silico* insights. *J King Saud Univ Sci.* 2021;33(7):101588.
- 165.** Cherrat L, Espina L, Bakkali M, García-Gonzalo D, Pagán R, Laglaoui A. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity

acting alone or in combined processes for food preservation. *J Sci Food Agric*. 2014;94(6):1197-1204.

166. Mansouri S, Foroumadi A, Ghaneie T, Najar AG. Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. *Pharm Biol*. 2001;39(5):399-401.

167. Messaoud C, Laabidi A, Boussaid M. *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities. *J Food Sci*. 2012;77(9):C941-C947.

168. Mehrabani M, Kazemi A, Mousavi SAA, Rezaifar M, Alikhah H, Nosky A. Evaluation of antifungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method. *Jundishapur J Microbiol*. 2013;6(8):e8316.

169. Alyousef AA. Antifungal activity and mechanism of action of different parts of *Myrtus communis* growing in Saudi Arabia against *Candida* spp. *J Nanomater*. 2021;3484125.

170. Nejad BS, Nejad ME, Naanaie SY, Zarrin M. Antifungal efficacy of *Myrtus communis* Linn. *Jentashapir Journal of Health Research*. 2014;5(4): e21879.

171. Barac A, Donadu M, Usai D, Spiric VT, Mazzarello V, Zanetti S ve ark. Antifungal activity of *Myrtus communis* against *Malassezia* sp. isolated from the skin of patients with *Pityriasis versicolor*. *Infection*. 2018;46:253-257.

172. Hmiri S, Harhar H, Rahouti M. Antifungal activity of essential oils of two plants containing 1,8-cineole as major component: *Myrtus communis* and *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2015;6(10):2967-2974.

173. Güzelmeriç E, Uğurlu P, Çelik C, Şen NB, Helvacıoğlu S, Charehsaz M ve ark. *Myrtus communis* L. (myrtle) plant parts: Comparative assessment of their chemical compositions and antioxidant, anticancer, and antimutagenic activities. *S Afr J Bot*. 2022;150:711-720.

174. Roozitalab G, Yousefpoor Y, Abdollahi A, Safari M, Rasti F, Osanloo M. Antioxidative, anticancer, and antibacterial activities of a nanoemulsion-based gel containing *Myrtus communis* L. essential oil. *Chemical Papers*. 2022;76(7):4261-4271.

175. Harassi Y, Tilaoui M, Idir A, Frédéric J, Baudino S, Ajouaoui S ve ark. Phytochemical analysis, cytotoxic and antioxidant activities of *Myrtus communis* essential oil from Morocco. *J Complement Integr Med*. 2019;16(3):20180100.

176. Kadhém RF, Tafreshi SAH, Al-Hakeim HK, editors. Anticancer and antiangiogenesis activity of alkaloids and essential oils from *Myrtus communis*. *AIP Conf Proc*. 2022;2398(1):040029.

177. Yangui I, Younsi F, Ghali W, Boussaid M, Messaoud C. Phytochemicals, antioxidant and anti-proliferative activities of *Myrtus communis* L. genotypes from Tunisia. *S Afr J Bot*. 2021;137:35-45.

178. Terzi MY, Gülbol-Duran G. *Myrtus communis* L. essential oil reduced colony formation and altered cell differentiation markers in lung cancer spheroids. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2023;26(3):626-638.

179. Bilgic N, Duran GG. Chemical composition of *Myrtus communis* L. and Proapoptotic effects on the A549 cell line. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2020;23(6):1283-1295.
180. Panjeshahin MR, Azadbakht M, Akbari N. Antidiabetic activity of different extracts of *Myrtus communis* in streptozotocin induced diabetic rats. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*. 2016;23(2):183-190.
181. Demir GM, Gulaboglu M, Aggöl AG, Baygutalp NK, Canayakın D, Halıcı Z ve ark. Antioxidant and antidiabetic activity of aqueous extract of *Myrtus communis* L. berries on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*. 2016;11(5):11-16.
182. Talebianpoor MS, Talebianpoor MS, Mansourian M, Vafaiee-Nejad T. Antidiabetic activity of hydroalcoholic extract of *Myrtus communis* (myrtle) fruits in streptozotocin-induced and dexamethasone-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res*. 2019;11(2):115-120.
183. Tas S, Tas B, Bassalat N, Jaradat N. *In vivo*, hypoglycemic, hypolipidemic and oxidative stress inhibitory activities of *Myrtus communis* L. fruits hydroalcoholic extract in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedical Research*. 2018;29(13):2727-2734.
184. Issa I, Bule M. A comparative study of the hypoglycemic effect of aqueous and methanolic extracts of *Myrtus communis* on alloxan induced diabetic swiss albino mice. *Medical and Aromatic Plants*. 2015;4(3):1000190.
185. Aggöl AG, Demir GM, Gulaboğlu M. Ethanol extract of myrtle (*Myrtus communis* L.) berries as a remedy for streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022;194(4):1645-1658.
186. Ibrahim FM, Fouad R, El-Hallouty S, Hendawy SF, Omer EA, Mohammed RS. Egyptian *Myrtus communis* L. essential oil potential role as *in vitro* antioxidant, cytotoxic and α -amylase Inhibitor. *Egypt J Chem*. 2021;64(6):3005-3017.
187. Yegin SÇ, Güder A. Investigation of Antioxidant activities and hypoglycemic effect of black and white myrtle fruits. *Erzincan University Journal of Science and Technology*. 2021;14(1):314-21.
188. Jabri M-A, Rtibi K, Tounsi H, Hosni K, Souli A, El-Benna J ve ark. Myrtle berry seed aqueous extract inhibits human neutrophil myeloperoxidase *in vitro* and attenuates acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *RSC Adv*. 2015;5(80):64865-64877.
189. Jabri M-A, Rtibi K, Ben-Said A, Aouadhi C, Hosni K, Sakly M ve ark. Antidiarrhoeal, antimicrobial and antioxidant effects of myrtle berries (*Myrtus communis* L.) seeds extract. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68(2):264-274.
190. Jabri M-A, Tounsi H, Rtibi K, Marzouki L, Sakly M, Sebai H. Ameliorative and antioxidant effects of myrtle berry seed (*Myrtus communis*) extract during reflux-induced esophagitis in rats. *Pharm Biol*. 2016;54(9):1575-1585.
191. Jabri M-A, Rtibi K, Sakly M, Marzouki L, Sebai H. Role of gastrointestinal motility inhibition and antioxidant properties of myrtle berries (*Myrtus communis* L.) juice in diarrhea treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84:1937-1944.

- 192.** Jabri M-A, Rtibi K, Tounsi H, Hosni K, Marzouki L, Sakly M, et al. Fatty acid composition and mechanisms of the protective effects of myrtle berry seed aqueous extract in alcohol-induced peptic ulcer in rat. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95(5):510-21.
- 193.** Zohalinezhad ME, Hosseini-Asl MK, Akrami R, Nimrouzi M, Salehi A, Zarshenas MM. *Myrtus communis* L. freeze-dried aqueous extract versus omeprazol in gastrointestinal reflux disease: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*. 2016;21(1):23-29.
- 194.** Mansour RB, Beji RS, Wasli H, Zekri S, Ksouri R, Megdiche-Ksouri W ve ark. Gastroprotective effect of microencapsulated *Myrtus communis* essential oil against ethanol/HCl-induced acute gastric lesions. *Molecules*. 2022;27(5):1566.
- 195.** Sumbul S, Ahmad MA, Asif M, Saud I, Akhtar M. Evaluation of *Myrtus communis* Linn. berries (common myrtle) in experimental ulcer models in rats. *Human & Experimental Toxicology*. 2010;29(11):935-944.
- 196.** Janbaz K, Nisa M, Saqib F, Imran I, Zia-Ul-Haq M, De Feo V. Bronchodilator, vasodilator and spasmolytic activities of methanolic extract of *Myrtus communis* L. *J Physiol Pharmacol*. 2013;64(4):479-484.
- 197.** Aboutaleb N, Hashem-Dabaghian F, Elahian-Boroujeni A, Shojaii A. Protective effects of *Myrtus communis* Linn fruit and leaf extracts on isoproterenol-induced heart failure in rat. *Traditional and Integrative Medicine*. 2021;6(2):138-151.
- 198.** Hajiaghae R, Faizi M, Shahmohammadi Z, Abdollahnejad F, Naghdibadi H, Najafi F ve ark. Hydroalcoholic extract of *Myrtus communis* can alter anxiety and sleep parameters: a behavioural and EEG sleep pattern study in mice and rats. *Pharm Biol*. 2016;54(10):2141-2148.
- 199.** Walle M, Walle B, Zerihun L, Makonnen E. Sedative-hypnotic like effect of the essential oil from the leaves of *Myrtus communis* on mice. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2014;2(4):70-77.
- 200.** Hailu E, Engidawork E, Asres K. The essential oil of *Myrtus communis* L produces a non-sedating anxiolytic effect in mice models of anxiety. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*. 2011;29(1):1-12.
- 201.** Akbayır E, Şen M, Ay U, Şenyer S, Tüzün E, Küçükali Cİ. Parkinson hastalığının etyopatogenezi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2017;7(13):1-23.
- 202.** Lev N, Barhum Y, Pilosof NS, Ickowicz D, Cohen HY, Melamed E ve ark. DJ-1 protects against dopamine toxicity: implications for Parkinson's disease and aging. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2013;68(3):215-225.
- 203.** Ma SY, Røytta M, Collan Y, Rinne JO. Unbiased morphometrical measurements show loss of pigmented nigral neurones with ageing. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999;25(5):394-399.
- 204.** Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood N. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(11):521-528.

- 205.** Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983;219(4587):979-980.
- 206.** Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH ve ark. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet*. 2006;38(5):515-517.
- 207.** Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(3):207-219.
- 208.** Youdim MB, Riederer P. Understanding Parkinson's disease. *Sci Am*. 1997;276(1):52-59.
- 209.** Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A. Iron levels in the human brain: a post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *J Trace Elem Med Biol*. 2014;28(1):13-17.
- 210.** Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Gallorini M ve ark. The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(26):9843-9848.
- 211.** Pahwa R, Lyons KE. Treatment of early Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(4):442-449.
- 212.** Çakmur R. Parkinson hastalığı ve medikal tedavisi. *Klinik Gelişim*. 2011;23(1):53-61.
- 213.** Yiğit G, Arıcıoğlu F. Günümüz ve gelecekte parkinson hastalığı için farmakolojik tedavi yaklaşımları. *Clinical and Experimental Health Sciences*. 2015;5(4):265-273.
- 214.** Jenner P. Preclinical evidence for neuroprotection with monoamine oxidase-B inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology*. 2004;63:S13-S22.
- 215.** Al-Hadeethi MA. Anatomical and Palynological Study of *Myrtus communis* L. *Diyala Journal for Pure Sciences*. 2016;12:4.
- 216.** Dellaoui H, Berroukche A. Analysis of the Chemical compositions of the alcoholic extract and the essential oil of the leaves of the plant *Myrtus communis* from Blida-Algeria. *Acta Scientific Nutritional Health*. 2019;3(6):150-155.
- 217.** Al-Edany TY, Sahar AA, Al-Saadi M. Taxonomic significance of anatomical characters in some species of the family Myrtaceae. *Am J Plant Sci*. 2012;3:572-581.
- 218.** Baytop A. Bitkisel Droğların Anatomik Yapısı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 1972.
- 219.** Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:1-11.
- 220.** Arıtuluk ZC, Çankaya İT, Özkan AMG. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of some *Tanacetum* L. (Asteraceae) taxa growing in Turkey. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;41:17-25.
- 221.** Broadhurst RB, Jones WT. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J Sci Food Agric*. 1978;29(9):788-794.

222. Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*. 2013;18(6):6852-6865.
223. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):3.
224. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-1237.
225. Alam MN, Bristi NJ, Rafiqzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*. 2013;21(2):143-152.
226. Tsai P-J, Tsai T-H, Yu C-H, Ho S-C. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food Chem*. 2007;103(1):181-187.
227. Williamsom K, Hensley K, Floyd R, Hensley K, Floyd R. *Methods in pharmacology and toxicology: methods in biological oxidative stress*. Totowa: Humana Press; 2003.
228. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*. 2004;52(26):7970-7981.
229. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*. 1986;44:307-315.
230. Masamoto Y, Kubo M. Inhibitory effect of Chinese crude drugs on tyrosinase. *Planta Med*. 1980;40(12):361-365.
231. Van Wart HE, Steinbrink DR. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal Biochem*. 1981;113(2):356-365.
232. Kraunsoe JA, Claridge TD, Lowe G. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*. 1996;35(28):9090-9096.
233. Largman C. Isolation and characterization of rat pancreatic elastase. *Biochemistry*. 1983;22(16):3763-3770.
234. Gao J, Perera G, Bhadbhade M, Halliday GM, Dzamko N. Autophagy activation promotes clearance of α -synuclein inclusions in fibril-seeded human neural cells. *J Biol Chem*. 2019;294(39):14241-14256.
235. Lee BR, Kamitani T. Improved immunodetection of endogenous α -synuclein. *PLoS one*. 2011;6(8):e23939.
236. Zhao M, Cascio D, Sawaya MR, Eisenberg D. Structures of segments of α -synuclein fused to maltose-binding protein suggest intermediate states during amyloid formation. *Protein Sci*. 2011;20(6):996-1004.
237. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H ve ark. The protein data bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235-242.

238. Priya M, Zochedh A, Arumugam K, Sultan AB. Quantum chemical investigation, drug-likeness and molecular docking studies on galangin as alpha-synuclein regulator for the treatment of Parkinson's Disease. *Chemistry Africa*. 2023;6(1):287-309.
239. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform*. 2012;4:1-17.
240. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS ve ark. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785-2791.
241. Kassem MES, Ibrahim LF, Hussein SR, El-Sharawy R, El-Ansari MA, Hassanane MM ve ark. Myricitrin and bioactive extract of *Albizia amara* leaves: DNA protection and modulation of fertility and antioxidant-related genes expression. *Pharm Biol*. 2016;54(11):2404-2409.
242. Souza JN, Silva EM, Silva MNd, Arruda MS, Larondelle Y, Rogez H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. *J Braz Chem Soc*. 2007;18:1276-1280.
243. Carvalho AA, Santos LR, Farias RRS, Chaves MH, Feitosa CM, Vieira Júnior GM ve ark. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. *Química Nova*. 2018;41:405-411.
244. Tsatsop Tsague RK, Kenmogne SB, Djiobie Tchienou GE, Parra K, Ngassoum MB. Sequential extraction of quercetin-3-*O*-rhamnoside from *Piliostigma thonningii* Schum. leaves using microwave technology. *SN Appl Sci*. 2020;2:1-17.
245. Zhang Y, Wang D, Yang L, Zhou D, Zhang J. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. *PloS one*. 2014;9(8):e105725.
246. Eser P. *Salvia trichoclada* bentham üzerinde farmakognozok araştırmalar [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi;2007.
247. Labib RM, Ebada SS, Youssef FS, Ashour ML, Ross SA. Ursolic acid, a natural pentacyclic triterpene from *Ochrosia elliptica* and its role in the management of certain neglected tropical diseases. *Pharmacogn Mag*. 2016;12(48):319.
248. Hernández-Pérez A, Bah M, Ibarra-Alvarado C, Rivero-Cruz JF, Rojas-Molina A, Rojas-Molina JI ve ark. Aortic relaxant activity of *Crataegus gracilior* Phipps and identification of some of its chemical constituents. *Molecules*. 2014;19(12):20962-20974.
249. Lee TH, Juang SH, Hsu FL, Wu CY. Triterpene acids from the leaves of *Planchonella duclitan* (Blanco) Bakhuizen. *J Chin Chem Soc*. 2005;52(6):1275-1280.
250. Liang C, Staerk D, Kongstad KT. Potential of *Myrtus communis* Linn. as a bifunctional food: Dual high-resolution PTP1B and α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS and NMR for identification of antidiabetic triterpenoids and phloroglucinol derivatives. *J Funct Foods*. 2020;64:103623.
251. Chumarina M, Russ K, Azevedo C, Heuer A, Pihl M, Collin A, et al. Cellular alterations identified in pluripotent stem cell-derived midbrain spheroids generated from a female patient with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism

who carries a novel variation (p. Q811R) in the POLG1 gene. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7:1-19.

252. Gegg ME, Verona G, Schapira AH. Glucocerebrosidase deficiency promotes release of α -synuclein fibrils from cultured neurons. *Hum Mol Genet.* 2020;29(10):1716-1728.

253. Rostami J, Jäntti M, Cui H, Rinne MK, Kukkonen JP, Falk A ve ark. Prolyl oligopeptidase inhibition by KYP-2407 increases alpha-synuclein fibril degradation in neuron-like cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2020;131:110788.

254. Aulić S, Le TTN, Moda F, Abounit S, Corvaglia S, Casalis L ve ark. Defined α -synuclein prion-like molecular assemblies spreading in cell culture. *BMC Neurosci.* 2014;15:1-12.

255. Scorrano S, Lazzoi MR, Mergola L, Di Bello MP, Del Sole R, Vasapollo G. Anthocyanins profile by Q-TOF LC/MS in *Myrtus communis* berries from Salento Area. *Food Analytical Methods.* 2017;10:2404-2411.

256. Amensour M, Sendra E, Abrini J, Pérez-Alvarez J, Fernández-López J. Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts. *CyTA-Journal of Food.* 2010;8(2):95-101.

257. Snoussi A, Essaidi I, Koubaier HBH, Chaabouni MM, Bouzouita N. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and ethanol extracts of *Myrtus communis* L. organs (berries, leaves and floral buds). *J la Société Chim Tunisie.* 2012;14:69-76.

258. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998;19(4-5):221-357.

259. Akdemir ZŞ, Tatlı İİ, Saracoğlu İ, İsmailoğlu UB, Şahin-Erdemli İ, Çalış İ. Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry.* 2001;56(2):189-193.

260. Takamatsu S, Galal AM, Ross SA, Ferreira D, ElSohly MA, Ibrahim ARS ve ark. Antioxidant effect of flavonoids on DCF production in HL-60 cells. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives.* 2003;17(8):963-966.

261. Qu Y, Zhan Q, Du S, Ding Y, Fang B, Du W ve ark. Catalysis-based specific detection and inhibition of tyrosinase and their application. *J Pharm Anal.* 2020;10(5):414-425.

262. Nagatsu T, Nakashima A, Watanabe H, Ito S, Wakamatsu K. Neuromelanin in Parkinson's disease: tyrosine hydroxylase and tyrosinase. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4176.

263. Zecca L, Zucca F, Albertini A, Rizzio E, Fariello R. A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 2006;67:S8-S11.

264. Bian D, Liu M, Li Y, Xia Y, Gong Z, Dai Y. Madecassoside, a triterpenoid saponin isolated from *Centella asiatica* herbs, protects endothelial cells against oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol.* 2012;26(10):399-406.

265. Xu C-L, Qu R, Zhang J, Li L-F, Ma S-P. Neuroprotective effects of madecassoside in early stage of Parkinson's disease induced by MPTP in rats. *Fitoterapia*. 2013;90:112-118.
266. Zhang G, Liu A, Zhou Y, San X, Jin T, Jin Y. *Panax ginseng* ginsenoside-Rg2 protects memory impairment via anti-apoptosis in a rat model with vascular dementia. *J Ethnopharmacol*. 2008;115(3):441-448.
267. Zhang Y-F, Fan X-J, Li X, Peng L-L, Wang G-H, Ke K-F ve ark. Ginsenoside Rg1 protects neurons from hypoxic-ischemic injury possibly by inhibiting Ca^{2+} influx through NMDA receptors and L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Eur J Pharmacol*. 2008;586(1-3):90-99.
268. Zhu S-Q, Qi L, Rui Y-F, Li R-X, He X-P, Xie Z-P. Astragaloside IV inhibits spontaneous synaptic transmission and synchronized Ca^{2+} oscillations on hippocampal neurons. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(1):57-64.
269. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*. 2009;22(3):5-13.
270. Ocampo-Gallego JS, Pedroza-Escobar D, Caicedo-Ortega AR, Berumen-Murra MT, Novelo-Aguirre AL, de Sotelo-León RD ve ark. Human neutrophil elastase inhibitors: Classification, biological-synthetic sources and their relevance in related diseases. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2024;38(1):13-32.
271. Bravo K, Alzate F, Osorio E. Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Ind Crops Prod*. 2016;85:341-352.
272. Johnson W, Roberts N, Borkakoti N. Collagenase inhibitors: their design and potential therapeutic use. *J Enzyme Inhib*. 1987;2(1):1-22.
273. Ioghen OC, Ceafalan LC, Popescu BO. SH-SY5Y cell line *in vitro* models for Parkinson disease research-old practice for new trends. *J Integr Neurosci*. 2023;22(1):20.
274. Lu N, Ding Y, Tian R, Peng Y-Y. Inhibition of myeloperoxidase-mediated oxidative damage by nitrite in SH-SY5Y cells: Relevance to neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Eur J Pharmacol*. 2016;780:142-147.
275. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*. 2017;12:1-11.
276. Şafak EK, İlgün S, Çoban KN, Mutlu SA, Yılmaz H, Karatoprak GŞ. Antioxidant, enzyme inhibitory, and cytotoxic activity screening of *Myrtus communis* L. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2023;47(3):827-835.
277. Wang Y-H, Yu H-T, Pu X-P, Du G-H. Myricitrin alleviates methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and AGEs/RAGE/NF- κ B pathway activation in SH-SY5Y cells. *J Mol Neurosci*. 2014;53:562-570.
278. Shao J-W, Dai Y-C, Xue J-P, Wang J-C, Lin F-P, Guo Y-H. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives. *Eur J Med Chem*. 2011;46(7):2652-2661.

- 279.** Ternchoocheep K, Surangkul D, Ysothonsreekul S. The recovery and protective effects of asiatic acid on differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells cytotoxic-induced by cholesterol. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017;7(5):416-420.
- 280.** Chudzik M, Korzonek-Szlacheta I, Król W. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules.* 2015;20(1):1610-1625.
- 281.** Cullen V, Lindfors M, Ng J, Paetau A, Swinton E, Kolodziej P, et al. Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity *in vivo*. *Mol Brain.* 2009;2:1-17.
- 282.** Gu X-L, Long C-X, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T α -synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol Brain.* 2010;3:1-16.
- 283.** Lehri-Boufala S, Ouidja M-O, Barbier-Chassefière V, Hénault E, Raisman-Vozari R, Garrigue-Antar L ve ark. New roles of glycosaminoglycans in α -synuclein aggregation in a cellular model of Parkinson disease. *PloS one.* 2015;10(1):e0116641.
- 284.** Kayed R, Dettmer U, Lesné SE. Soluble endogenous oligomeric α -synuclein species in neurodegenerative diseases: Expression, spreading, and cross-talk. *J Parkinsons Dis.* 2020;10(3):791-818.
- 285.** Ito N, Tsuji M, Adachi N, Nakamura S, Sarkar AK, Ikenaka K, et al. Extracellular high molecular weight α -synuclein oligomers induce cell death by disrupting the plasma membrane. *NPJ Parkinsons Dis.* 2023;9(1):139.
- 286.** Morshedi D, Nasouti M. Essential oils may lead α -synuclein towards toxic fibrils formation. *Parkinson's Disease.* 2016;2016(1):6219249.
- 287.** Lashuel HA. Alpha-synuclein oligomerization and aggregation: All models are useful but only if we know what they model: This is the reply to a comment "Alpha-synuclein oligomerization and aggregation: A model will always be a model" on the original article "Monitoring alpha-synuclein oligomerization and aggregation using bimolecular fluorescence complementation assays: What you see is not always what you get". The articles are accompanied by a Preface "How good are cellular models?". *J Neurochem.* 2021;157(4):891-898.
- 288.** Kartal M. Mersin yaprağı uçucu yağı. *Türk Farmakope Dergisi.* 2019;4:26-29.

8. EKLER

EK-1: Tez Orijinallik Raporu

Zeliha PARLAR-YL-Myrtus communis L. Üzerine Farmasötik Botanik Araştırmalar.docx

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 10	% 6	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	anadolutibbidergisi.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	Gülpinar, Ali Rifat. "Türkiye'de Kültürü Yapılan Echinacea Purpurea (L.) Moench ve Echinacea Pallida (Nutt.) Nutt Türleri Üzerinde Farmakognozok Araştırmalar", Ankara Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1

EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuzu**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Zeliha PARLAR
Ödev başlığı: Zeliha PARLAR- Yüksek Lisans Tezi- Myrtus communis L. Üzer...
Gönderi Başlığı: Zeliha PARLAR-YL-Myrtus communis L. Üzerine Farmasötik B...
Dosya adı: Zeliha_PARLAR-YL-Myrtus_communis_L_Üzerine_Farmasötik_...
Dosya boyutu: 10.19M
Sayfa sayısı: 260
Kelime sayısı: 41,355
Karakter sayısı: 295,854
Gönderim Tarihi: 19-Eyl-2024 08:19ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2459126970



9. ÖZGEÇMİŞ