T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNCİRİN (*FICUS CARICA* L.) HALK TIBBINDA KULLANIM ŞEKLİNİN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELER BAKIMINDAN ETNOFARMAKOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

FATIMA UZAR

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MAHFUZ ELMASTAŞ

FİTOTERAPİ ANABİLİM DALI
FİTOTERAPİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
OCAK/2024

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fitoterapi Anabilim Dalı Fitoterapi Programında Fatıma Uzar tarafından hazırlanan İncirin (*Ficus carica* L.) Halk Tıbbında Kullanım Şeklinin Bazı Biyolojik Aktiviteler Bakımından Etnofarmakolojik Olarak Değerlendirilmesi başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/Başkan: Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ İMZA
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Doç. Dr. Zafer Ömer ÖZDEMİR İMZA
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Analitik Kimya Ana Bilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Doç. Dr. Ali Timuçin ATAYOĞLU İMZA
İstanbul Medipol Üniversitesi, Aile Hekimliği Ana Bilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ebru ÖZDEMİR NATH İMZA
Altınbaş Üniversitesi, Farmasötik Botanik Ana Bilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mümin Yiğit İNAN İMZA
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Farmakognozi Ana Bilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 22/01/2024

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Fatıma Uzar

(22.01.2024)

İTHAF

“İncire ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Öncelikle, hiçbir çabayı karşılıksız bırakmayan yüce Rabbim Allah'a, Hamd ve Şükranlarımı sunarım.

Sadece bir tez danışmanı olarak değil, bir insan olarak da desteğini her zaman sağlayan, bilgi birikimi, yüksek duygusal zekâsı ve empati yeteneği ile her daim psikolojik olarak da desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a

Tez çalışmasının tüm analiz süreçlerinde her zaman yanımda olan en büyük dayanağım can dostum Dr. Duygu MISIRLI'ya

Bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Tez İzleme Komitesi üyeleri sayın Doç. Dr. Zafer Ömer ÖZDEMİR ve Dr. Öğretim Üyesi İrem ATAY BALKAN'a,

Bu zorlu ama heyecanlı sürecin tüm aşamalarında, maddi manevi ve her anlamda yanımda olan, değerli olduğumu hatırlatan ve potansiyelimi ortaya koymam için beni destekleyen Annem Azime UZAR ve Babam Resul UZAR ile kardeşlerim Meryem UZAR, İbrahim UZAR, İsmail UZAR ve Esma UZAR'a

Doktora süreci boyunca birlikte çabalamaktan keyif aldığım arkadaşlarım Diren ERGİN, Miray EGE, Eylem KILIÇ MİROV, Ayten YILMAZ ve Sibel Sima ATASEVEN'e

Son olarak adını burada belirtmediğim, kırılma anlarımda elimden tutup destek olan, mutluluklarımı ve heyecanlarımı paylaştığım, beni motive eden tüm değerli dostlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Ayrıca 2020/138 Proje No ile bu araştırmanın gerçekleşmesine maddi katkı sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine ve incir yaprak örneklerimizi temin etmemiz için desteğini esirgemeyen, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı İncir Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
ÖZET xv
ABSTRACT xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. DOĞAL ÜRÜNLERİN TIBBİ KULLANIMI 4
2.1.1. Bitkisel Ürünler: Tarihsel Arka Plan 4
2.1.2. Bitkisel Ürünler: Zorluklar ve Gelişmeler 7
2.1.3. Bitkisel Ürünler: Dünyada ve Türkiye'de Yasal Düzenlemeler 11
2.2. ETNOFARMAKOLOJİ 13
2.2.1. Etnofarmakoloji ve İlaç Keşfi 13
2.2.2. Etnobotani ve Etnofarmakoloji 16
2.2.3. Akılcı Fitoterapi 17
2.2.4. Deney Tasarımı ve Optimizasyon 20
2.2.5. Bitkisel İlaçlar: Arttırıcılık, Antagonizm ve Sinerji 23
2.3. FİTOKİMYASALLAR VE BİYOLOJİK AKTİVİTE 25
2.3.1. Fitokimyasallar 25
2.3.2. Antioksidan Aktivite 29
2.3.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT): 30
2.3.2.2. Reaktif Nitrojen Türleri (RNT): 32
2.3.2.3. Reaktif Kükürt Türleri (RKT): 33
2.3.2.4. Antioksidanların mekanizması: 34
2.3.3. Antienflamatuvar Aktivite 36
2.3.4. Doğal Ürünlerin Ekstraksiyonu 41
2.4. BİTKİLER 43
2.4.1. *Ficus carica* L. (İncir) 43
2.4.2. *Laurus nobilis* (Defne) 47

2.4.3. *Platanus orientalis* L. (Çınar) 52
3. GEREÇ VE YÖNTEM 55
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR 55
3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR 55
3.3. BİTKİ MATERYALİ TEMİNİ 57
3.4. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ 57
3.5. YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) İLE FİTOKİMYASAL İÇERİK ANALİZİ 59
3.6. ANTİOKSİDAN ANALİZLERİ 59
3.6.1. DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi 59
3.6.2. ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) Radikali Giderme Aktivitesi 60
3.6.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Gücü Antioksidan Aktivitesi (FRAP) 61
3.6.4. Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (CUPRAC) 62
3.7. DENEY TASARIMI 62
3.8. DENEY TASARIMI SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 66
3.9. SİKLOOKSİGENAZ-2 (COX-2) VE SİKLOOKSİGENAZ -1 (COX-1) ENZİM İNHİBİSYONU 69
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 69
4. BULGULAR 70
4.1. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ 70
4.2. YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) İLE FİTOKİMYASAL İÇERİK ANALİZİ 71
4.3. ANTİOKSİDAN ANALİZLERİ 88
4.3.1. DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil) Radikal Giderme Aktivitesi 88
4.3.2. ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) Katyon Radikali Giderme Aktivitesi 90
4.3.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Gücü Antioksidan Aktivitesi (FRAP). 91
4.3.4. Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (CUPRAC) 94
4.4. DENEY TASARIMI SONUÇLARI 96
4.5. DENEY TASARIMI SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 99
4.5.1. Etanol Ekstreleri 99
4.5.2. Su Ekstreleri 108
4.5.3. Optimizasyon ve Etkileşimlerin Belirlenmesi 116

4.6. SİKLOOKSİGENAZ-2 (COX-2) VE SİKLOOKSİGENAZ -1 (COX-1) ENZİM İNHİBİSYONU 119
5. TARTIŞMA 122
5.1. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ 122
5.2. FİTOKİMYASAL İÇERİK VE BİYOLOJİK AKTİVİTE 125
5.2.1. DPPH 129
5.2.2. ABTS 131
5.2.3. FRAP 133
5.2.4. CUPRAC 135
5.3. DENEY TASARIMI SONUÇLARI 138
5.4. COX İNHİBİSYONLARI 142
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 147
KAYNAKLAR 149
EKLER 166

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Bazı ülkelerde doğal ürünlere ilişkin yasal düzenlemeler 13

Tablo 2.2: Türkiye *Ficus carica L.* etnobotanik çalışmaları 46

Tablo 2.3: Türkiye *Laurus nobilis* L. etnobotanik çalışmaları 50

Tablo 2.4: Türkiye *Platanus orientalis* L. etnobotanik çalışmaları 53

Tablo 3.1: Gradient pompa akış programı 59

Tablo 3.2: Birinci dereceden denklem ile deney tasarımı 65

Tablo 3.3: Karışım örneklerinin isimleri 66

Tablo 4.1: Ekstrelerin verimleri (%) 70

Tablo 4.2: Etanol ekstrelerinin fitokimyasal içeriği 71

Tablo 4.3: Su ekstrelerinin fitokimyasal içeriği 80

Tablo 4.4: Ekstrelerin DPPH$^{\cdot}$ giderme aktivitesi (IC_{50}) 88

Tablo 4.5: ABTS$^{\cdot+}$ için ekstrelerinin IC_{50} değerleri 90

Tablo 4.6: Etanol ve su ekstrelerinin FRAP kapasiteleri 92

Tablo 4.7: Etanol ekstrelerinin CUPRAC aktivitesi 95

Tablo 4.8: Deney tasarımı için etanol ekstrelerinin antioksidan sonuçları 97

Tablo 4.9: Deney tasarımı için su ekstrelerinin antioksidan sonuçları 98

Tablo 4.10: Etanol ekstreleri DPPH$^{\cdot}$ aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri 99

Tablo 4.11: Etanol ekstreleri DPPH$^{\cdot}$ aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları 100

Tablo 4.12: Etanol ekstreleri ABTS$^{\cdot+}$ aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri 101

Tablo 4.13: Etanol ekstreleri ABTS aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları 102

Tablo 4.14: Etanol ekstreleri FRAP aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri 104

Tablo 4.15: Etanol ekstreleri FRAP aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları 104

Tablo 4.16: Etanol ekstreleri CUPRAC aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri .. 106

Tablo 4.17: Etanol ekstreleri CUPRAC aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları 106

Tablo 4.18: Su ekstreleri DPPH˙ aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri..... 108

Tablo 4.19: Su ekstreleri DPPH˙ aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları 108

Tablo 4.20: Su ekstreleri $ABTS^{\cdot+}$ aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri 110

Tablo 4.21: Su ekstreleri $ABTS^{\cdot+}$ aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları ... 110

Tablo 4.22: Su ekstreleri FRAP aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri 112

Tablo 4.23: Su ekstreleri FRAP aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları 112

Tablo 4.24: Su ekstreleri CUPRAC aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri 114

Tablo 4.25: Su ekstreleri CUPRAC aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları 114

Tablo 4.26: Etanol ekstreleri denklemlerinin parametre katsayıları 116

Tablo 4.27: Su ekstreleri denklemlerinin parametre katsayıları 116

Tablo 4.28: Etanol ekstreleri optimum karışımlar 117

Tablo 4.29: Su ekstreleri optimum karışımlar 117

Tablo 4.30: Etanol ekstreleri için etkileşimler 118

Tablo 4.31: Su ekstreleri için etkileşimler 119

Tablo 4.32: COX-1 inhibisyon aktivitesi 120

Tablo 4.33: COX-2 inhibisyon aktivitesi 121

Tablo 5.1: Farklı incir türlerinin yaprak ekstre verimleri 123

Tablo 5.2: Bitkiler ve çeşitli kısımlarının fitokimyasal içeriği ve biyolojik aktivitesi 137

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: On dokuzuncu yüzyılda bitkisel etken madde keşif örnekleri 7

Şekil 2.2: Üç bileşenli karışımın simpleks koordinat sistemi**.** 22

Şekil 2.3: Flavonoit türleri, yapıları ve örnekler 28

Şekil 2.4: Dünya incir üretimi 44

Şekil 3.1: Soxhlet düzeneği 58

Şekil 3.2: Deney tasarımının birinci adımı 63

Şekil 3.3: Deney tasarımının ikinci adımı 63

Şekil 3.4: Deney tasarımının son adımı 64

Şekil 4.1: İncir etanol ekstresi kromatogramı 73

Şekil 4.2: Defne etanol ekstresi kromatogramı 74

Şekil 4.3: Çınar etanol ekstresi kromatogramı 75

Şekil 4.4: Karışım 1 etanol ekstresi kromatogramı 76

Şekil 4.5: Karışım 2 etanol ekstresi kromatogramı 77

Şekil 4.6: Karışım 3 etanol ekstresi kromatogramı 78

Şekil 4.7: Karışım 4 etanol ekstresi kromatogramı 79

Şekil 4.8: İncir su ekstresi kromatogramı 81

Şekil 4.9: Defne su ekstresi kromatogramı 82

Şekil 4.10: Çınar su ekstresi kromatogramı 83

Şekil 4.11: Karışım 1 su ekstresi kromatogramı 84

Şekil 4.12: Karışım 2 su ekstresi kromatogramı 85

Şekil 4.13: Karışım 3 su ekstresi kromatogramı 86

Şekil 4.14: Karışım 4 su ekstresi kromatogramı 87

Şekil 4.15: $DPPH^{\cdot}$ için etanol ekstrelerinin IC_{50} değerleri 89

Şekil 4.16: $DPPH^{\cdot}$ için su ekstrelerinin IC_{50} değerleri 89

Şekil 4.17: $ABTS^{\cdot+}$ için etanol ekstrelerinin IC_{50} değerleri 90

Şekil 4.18: $ABTS^{\cdot+}$ için su ekstrelerinin IC_{50} değerleri 91

Şekil 4.19: Fe^{2+} standart grafiği..... 92

Şekil 4.20: Etanol ekstrelerinin FRAP kapasitesi 93

Şekil 4.21: Su ekstrelerinin FRAP kapasitesi..... 93

Şekil 4.22: Trolox standart grafiği 94

Şekil 4.23: Etanol ekstrelerinin CUPRAC aktivitesi..... 95

Şekil 4.24: Su ekstrelerinin CUPRAC aktivitesi..... 96

Şekil 4.25: Etanol ekstreleri için DPPH modeli 101

Şekil 4.26: Etanol ekstreleri için ABTS modeli 103

Şekil 4.27: Etanol ekstreleri için FRAP modeli 105

Şekil 4.28: Etanol ekstreleri için CUPRAC modeli 107

Şekil 4.29: Su ekstreleri için DPPH modeli 109

Şekil 4.30: Su ekstreleri için ABTS modeli 111

Şekil 4.31: Su ekstreleri için FRAP modeli 113

Şekil 4.32: Su ekstreleri için CUPRAC modeli 115

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA : Tek Yönlü Varyans Analizi

COX-1 : Siklooksigenaz-1

COX-2 : Sikloosigenaz-2

CUPRAC : Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite

ELISA : Enzime Bağlı İmmünosorban Yöntem

ET : Elektron Transferi

FAO : Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FRAP : Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi

FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GBIF : Global Biyoçeşitlilik Bilgi Tesisi

GBTÜ : Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürün

GC-MS : Gas Kromatografi-Kütle Spektrometresi

GÇT : Geleneksel Çin Tıbbı

GETAT : Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp

HAT : Hidrojen Atom Transferi

HPLC-DAD : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Diyod Array Dedektörü

İTK : İnce Tabaka Kromatografisi

İÜU : İyi Üretim Uygulamaları

KDT : Karışım Deney Tasarımı

LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

PEP : Fosfoenolpiruvat

RKT : Reaktif Kükürt Türleri

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

RNT **:** Reaktif NitrojenTürleri

SOD **:** Superoksit Dismutaz

TİTCK **:** Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

TÜİK **:** Türkiye İstatistik Kurumu

UV-VIS **:** Ultraviyole Görünür Spektroskopisi

YVT **:** Yüksek Verimli Tarama

İNCİRİN (*FICUS CARICA* L.) HALK TIBBINDA KULLANIM ŞEKLİNİN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELER BAKIMINDAN ETNOFARMAKOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada *Ficus carica* (incir), *Laurus nobilis* (defne) ve *Platanus orientalis* (çınar) yaprakları ile bunların karışımlarının etnofarmakolojik olarak incelenmesi hedeflenmiştir. Rasyonel fitoterapi yaklaşımı ile geleneksel bilgilerin bilimsel bir zemine oturtulması ve standardizasyon ile kalite kontrol süreçlerine destek olunması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Tüm örneklerin modern (soxhlet) ve geleneksel (dekoksiyon) yöntemler ile elde edilen sırasıyla etanol ile su ekstrelerinin antioksidan ve antienflamatuvar etkinlikleri ölçülüp kıyaslanmıştır. Bu aktivitelere sebep olan fenolik bileşik içerikleri HPLC-DAD analizi ile aydınlatılmıştır. Rasyonel fitoterapi bağlamında Design Expert programının Karışım Deney Tasarımı (KDT) yaklaşımı ile karışım oranları belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı modeller seçilerek, en yüksek antioksidan aktiviteyi ortaya koyacak optimum karışım tespit edilmiştir. Son olarak karışımlardaki sinerjsitik ve antagonistik etkileşimler ortaya konulmuştur.

Bulgular: DPPH aktivitesi bakımından tüm bitkilerde modern ekstreler daha aktifken ABTS aktivitesi bakımından sadece incir modern ekstresi daha etkiliydi. FRAP aktivite, incir ve defne geleneksel ekstrelerinde daha yüksekken çınar için modern ekstre daha etkiliydi. CUPRAC aktivitesi incir ve çınar geleneksel ekstrelerinde daha yüksekti, defnede ise modern ekstre daha etkiliydi. Tüm bitkiler arasında defne ve defneyi yüksek oranda içeren karışımlar daha yüksek antioksidan aktiviteye sahipti. Dört antioksidan çalışmanın sonucunda tasarlanan dört model ile optimum karışım oranları etanol ekstreleri için %1,59 incir, %19,43 çınar ve %78,98 defne, su ekstreleri için %2.27 incir, %8,10 çınar ve 89,63 defne olarak belirlenmiştir. En yüksek defne oranını içeren karışımda güçlü sinerjik etki hesaplanmıştır.

Sonuç: Sonuçlar doğrultusunda fitokimyasal içeriğin antioksidan etki ile bağlantısı olduğu, bu antioksidan etkinin sinerjistik etkileşimler sayesinde artabileceği önerilmiştir. Geleneksel reçetelerdeki bileşik oranlarını optimize etmek için KDT'nin uygunluğu doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antienflamatuvar, Antioksidan, Etnofarmakoloji, Fitokimyasal İçerik, Karışım Deney Tasarımı, Rasyonel Fitoterapi.

ETHNOPHARMACOLOGICAL EVALUATION OF FIG (*FICUS CARICA* L.) IN TERMS OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES EMPLOYED IN FOLK MEDICINE PREPARATIONS

ABSTRACT

Aim: The current study aims to ethnopharmacologically investigate *Ficus carica* (fig), *Laurus nobilis* (bay), and *Platanus orientalis* (plane) leaves and their mixtures. The rational phytotherapy approach seeks to establish a scientific basis for traditional knowledge and support quality control processes through standardization.

Materials and Methods: Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol and water extracts obtained by modern (soxhlet) and traditional (decoction) methods for all samples were measured and compared. The phenolic compound contents responsible for these activities were elucidated by HPLC-DAD analysis. In the context of rational phytotherapy, mixture ratios were determined using the Mixture Design approach of the Design Expert program. Statistically significant models were selected, and optimum mixture ratios exhibiting the highest antioxidant activity were determined. Finally, synergistic, and antagonistic interactions in the mixtures were identified.

Results: Modern extracts were more active in all plants for DPPH activity, while for ABTS activity, only modern fig extract was more effective. FRAP activity was higher in traditional extracts of fig and bay, while for plane, modern extract was more effective. CUPRAC activity was higher in traditional extracts of fig and plane, whereas in bay, the modern extract was more effective. Among all plants, mixtures containing bay and higher amounts of bay exhibited higher antioxidant activity. Based on the results of the four antioxidant studies, optimum mixture ratios for ethanol extracts were determined as 1.59% fig, 19.43% plane, and 78.98% bay, and for water extracts as 2.27% fig, 8.10% plane, and 89.63% bay. A strong synergistic effect was calculated in the mixture containing the highest amount of bay.

Conclusion: In line with the results, it is suggested that there is a connection between phytochemical content and antioxidant effect, and this antioxidant effect may increase through synergistic interactions. The suitability of the Design of Experiments approach for optimizing compound ratios in traditional recipes has been confirmed.

Keywords: Anti-inflammatory, Antioxidant, Ethnopharmacology, Experimental Mixture Design, Phytochemical Content, Rational Phytotherapy.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkilerin insan tarafından tedavi amaçlı kullanımı insanlık tarihi kadar eski olan bir gelenektir. Günümüzdeki birçok çalışmanın da vurguladığı gibi, bitkisel içerikli tedaviler eski uygarlıkların tıp sistemlerinde kayıt altına alınmıştır. Çivi yazısı ile Asurlu hekimlerin muhafaza ettiği bilgilerden, İbn-i Sina'nın el yazısı ile tarih sayfalarına aktardığı bilgilere, ve ardından matbaa devrimini başlatan Johannes Gutenberg ile çoğu tıbbi bilgiler elimize ulaşmış olup, araştırmaların konusu olmayı beklemektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda ve her gün biraz daha gelişen teknolojik imkanlar sayesinde, 19. yüzyılın ortalarına doğru Avrupa'da bitkilerden ilaç keşfi hızlanmıştı; morfin, kinin, kafein, nikotin, kodein ve atropin gibi birçok madde izole edilip araştırılmıştır. İkinci dünya savaşından sonraki dönemlerde ilaç sektörleri teknolojiyi en iyi şekilde değerlendiren kimyasal sentez yöntemleri ile odaklarını saf kimyasal bileşiklere kaydırmışlardı (1,2). Buna rağmen 1940-2019 arası FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı küçük moleküllerin büyük bir kısmı doğal veya doğal ürünlerden elde edildiği rapor edilmiştir (3). Bu sebeple, etkili olduğu kayıt altına alınan bitkilerin kimyasal içeriklerini aydınlatmak, sadece güncel ilaç keşfi için değil, aynı zamanda besin takviyesi veya Geleneksel ve Bitkisel Tıbbi Ürün (GBTÜ) olarak standardize edilecek tıbbi bitkileri veya bunların işlenmiş ürünlerini daha kaliteli hale getirmek için de önemlidir.

Tıbbi bitkilerin gerek ilaç sektörünün sistematik süreçleri ile ilaç üretimi için kullanımları, gerekse halk arasında geleneksel olarak kullanımları günümüzde halen devam etmektedir. Özellikle halk tarafından kullanımlarından dolayı bilimsel camialar, bu ürünlerin kullanımına ilişkin güvenlik ve etkinlik bilgilerinin netleştirilmesini teşvik etmiştir. Yirminci yüzyılın teknolojik gelişmeleriyle beraber etkin bileşikler ve etki mekanizmaları artık bilinebilmektedir. Analiz yöntemlerinin tespit etme ve dakiklik limitlerindeki artış, hesaplama yöntemlerinin güçlenmesi, kimyasalların yapılarını içeren erişilebilir veri tabanlarının artması gibi gelişmeler hız kazanmıştır. Bu gelişmelerin akabinde geleneksel tıp bilgisinden esinlenen ilaçlar, modern yöntemler ile sentezlenip modern analitik ve farmakolojik yöntemler ile tekrardan değerlendirilmiştir. Bu süreçler doğal ürünlerin tekrardan değerlendirilmesine, aktif bileşiklerin keşfine ve yeni ilaçların geliştirilmesine olanak sağlamıştır (4).

Halk tıbbında kullanılan ve çoğunlukla bitki karışımlarından oluşan reçeteler birçok etnobotanik araştırmanın konusu olmaktadır. Etnofarmaklojinin de gelişmesiyle birlikte reçeteler ve geleneksel kullanımlar akılcı fitoterapi gereği rasyonel bir zeminde ele alınmaktadır. Bu sayede hem bu reçetelerin içerdiği bitki oranları optimize edilebilir hem de reçete bileşenleri arasındaki sinerjik veya antagonistik etkileşimler incelenebilir. Bilgiye erişimin kolaylaştığı ve bilgi kirliliğinin yaygın olduğu çağımızda bitkilerin sağlık açısından kullanımında tağşiş, kontaminasyon, bilinmeyen zararlı etkiler/yan etkiler gibi birçok sorun ile karşılaşılmaktadır. Dolayısıyla güvenlik ve etkinlik parametreleri bitkisel çaylar gibi hafif etkili preparatlar da bile doğrulanmalıdır. Bitkisel tedavi uygulayıcılarının bir kısmı deneyim ve nesiller boyu aktarılan bilgiler ile mesleklerini icra etmektedir. Ancak insan fizyolojisi kompleks ve çok yönlü olduğu gibi bitkisel karışımlar da aynı şekilde kompleks ve çok yönlü etkilere sahiptir; bu iki tarafı birleştirmek deneme yanılma yöntemlerinden daha derin gözlemler gerektirmektedir. Yasal düzenleyici kurumlar tarafından tanınmayan ve denetlenemeyen bitkisel tedavi uygulayıcılarının yanlış uygulamalarının sonucu ölümcül bile olabilmektedir. Bu durumda mağdurların hesap sorma imkanları da yasal olarak ortadan kalkmaktadır. Dolayısıyla insan sağlığını ilgilendiren tedavi yöntemlerinde rasyonel ve doğrulanabilir gerekçelerle ilerlemek gereklidir.

İncirin (*Ficus carica* L.), en kadim yazıtlar dahil birçok kaynakta tıbbi kullanımına yer verilmiştir. Modern bilimsel çalışmalar incelendiğinde de aynı şekilde *F. carica* ve diğer *Ficus* türleri hakkında çalışmalara rastlamak mümkündür. Bu anlamda genellikle organik çözücüler kullanılarak biyoaktif ekstreler elde edilerek analizler yapılmıştır. Ülkemiz incir üretimi açısından son 10 yıla bakıldığında ilk sıradadır. Dolayısıyla çok sayıda ekim alanı ve çok sayıda incir ağcı bulunmaktadır. Literatürde rastlanan çalışmaların büyük bir kısmı lateksin anti-kanser özelliğine odaklanmaktadır. Çalışmamızda kullanılan incir yaprakları, yüksek miktarlarda olmalarına rağmen henüz tıbbi anlamda bir kullanımlarına rastlanmamıştır. İncir meyvesinin paketlendiği kolilere yerleştirilerek meyvenin ezilmesini önleyen bir kaplayıcı olarak kullanılmaktadır veya mevsimsel şartlardan dolayı dökülerek fitoterapi araştırmalarında başlangıç malzemesi olarak değerlendirilememektedir. Dolayısıyla erişim ve miktar açısından avantaj sağlayan yaprakların fitoterapötik açıdan değerlendirilmesi yeni bir yaklaşımdır.

Geleneksel reçetelerde bitki materyalleri genellikle su ile ekstrakte edilip doğrudan tüketilmektedir veya uygulanmaktadır. İncelenen reçetelerde incir kısımlarının dekoksiyon gibi işlemlerinin yanı sıra karışım içinde kullanımları da rapor edilmiştir. Uygulamada bölgesel ve kültürel farklılıkların etkili olmasıyla beraber referans alınabilecek tek bir karışım elde etmek mümkün değildir. Dolayısıyla halk tıbbında kullanılan incir yapraklarının karışım içindeki etkisini ortaya koymak için antioksidan ve antienflamatuvar etkiye sahip olan 2 farklı bitki ile karışımlar hazırlanmıştır. Fitoterapi araştırma laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızın sonucunda 10 bitki arasında en etkili olarak saptanan defne ve çınar yaprağı seçilerek karışımlar hazırlanmıştır.

Karışımların hazırlanması için rastgele oranların seçilmesi yerine Design Expert deney tasarım programı kullanılmıştır. Böylelikle optimum karışım istatistiksel olarak belirlenebilir ve akılcı fitoterapi bağlamında geleneksel reçeteler incelenebilir. Ayrıca geleneksel olarak hazırlanan reçetelerin modern yöntemlerin tercih ettiği etanol ve metanol gibi çözücülerle elde edilen ekstrelere kıyasla etkinlikleri de ortaya konmuştur.

Bu bilgiler ışığında tezin ana amaçları aşağıda sıralanmıştır:

- Modern ekstraksiyon yöntemlerine göre etanol ve soxhlet düzeneği ile hazırlanmış ham ekstrelerin antioksidan ve antienflamatuvar etkinliklerinin ölçülmesi ve bunların içeriklerinin kantitatif olarak analiz edilmesi.
- Halk tıbbı reçetelerinde sıkça kullanılan bitkilerden dekoksiyon yoluyla ekstrelerin hazırlanması, bunların antioksidan ve antienflamatuvar etkinliklerinin analiz edilmesi ve kantitatif olarak içeriklerinin tayin edilmesi.
- Halk arasında kullanıma uygun bir şekilde incir (*Ficus carica* L.), defne (*Laurus* nobilis) ve çınar (*Platanus orientalis* L.) yapraklarından oluşan ve Design Expert programı kullanılarak en iyi antioksidan aktiviteyi sağlayacak bitki karışımının belirlenmesi. Ardından karışım bileşikleri arasındaki etkileşimlerin (sinerjistik veya antagonistik) incelenmesi.
- Karışımların kantitatif olarak içeriklerinin incelenmesi.
- Aynı ekstre karışımlarının sikloksijenaz (COX-1 ve COX-2) inhibisyonu üzerine etkisinin incelenmesi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOĞAL ÜRÜNLERİN TIBBİ KULLANIMI

Doğal ürünlerin biyoaktif içeriklerinden kaynaklı ilaç olarak tıbbi alanlarda kullanımları çağlar boyu yaygındır ve bugüne dek eşsiz kimyasal içerikleri ile devasa bir ilaç deposu olarak görülmektedirler (3,5). Bilimin bazı verilerine göre yerküredeki yaklaşık 8,7 milyon bitki ve hayvan türünden sadece 1,2 milyonunun (çoğunlukla böcek türleri) tanımlanmış olduğu düşünülürse, potansiyel ilaç kaynağı olabilecek türlerin keşfi daha da heyecan verici hale gelmektedir (6).

2.1.1. Bitkisel Ürünler: Tarihsel Arka Plan

Dünyanın neresinde olursa olsun insanların bulunduğu her toplulukta ve tarihin her aşamasında tıbbi bitkilerin kullanımına rastlanabilmektedir. MÖ 2600'ların Mezopotamya uygarlığında, sedir türleri (*Cedrus*), Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens*), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*), mür (*Commiphora myrrha*) ve afyon (*Papaver somniferum*) yağlarının da dahil olduğu yaklaşık 1000 bitkinin kullanımı belgelenmiştir. Günümüzde bakıldığında, bahsi geçen bitkiler grip ve enfeksiyon gibi birçok hastalığın tedavisinde halen kullanılmaktadır (7). Antik Mısır'ın yaklaşık MÖ 2500'lere dayanan yazıtları olan Ebers ve Edwin Smith Papirüslerinde, nar (*Punica granatum*), hint yağı bitkisi (*Ricinus communis*), sarımsak (*Allium sativum*), soğan (*A. cepa*), aloe (*Aloe vera*), sinameki (*Cassia* türleri), incir (*Ficus carica*), söğüt (*Salix* türleri), kişniş (*Coriandrum sativum*), ardıç (*Juniperus* türleri) vb. dahil olmak üzere yaklaşık 700 bitki türüne atıfta bulunan yüzlerce terkip ve halk ilacı anlatılmaktadır (8).

Geleneksel Çin Tıbbının (GÇT) erken Zhou Hanedanlığından başladığı düşünülürse yaklaşık 3000 yıllık bir geçmişi vardır. Şifalı bitkilerin kullanımı üzerine en eski tıbbi yazılar arasında Yi Jing ve Shi Jing gibi edebi eserlerin yanı sıra imparator Shen Nung'in kaleme aldığı Büyük Tıp Nebatları Mecmuası (Pen T'Sao) eseri de bulunmaktadır. Bu eserde tarçın kabuğu (*Cinnamomum* türleri), ginseng (*Panax ginseng*), efedra (*Ephedra* türleri) ve kafur (*Cinnamomum camphora*) gibi bitkilerin de bulunduğu 365 drogun kullanımı geçmektedir (9). Hindistan geleneksel tıbbı olarak uygulanan Ayurveda'ya ait en eski ve temel eserler MÖ 900-600 tarihli Caraka Samhita ve Sushruta Samhita eserleri olup binlerce tıbbi bitkiyi içermektedir (10).

Tüm bu uygarlıklarda hastalıkların mucizevi dış etkenler, tanrıların cezalandırması ve büyü ile sihir sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Dolayısıyla tanrıları ve inançları, ayinler ve kehanetler ile birleşerek hem ruhu hem de bedeni iyileştirme etkisi olan bütüncül bir sistem oluşturmayı hedeflemişlerdir. Sonraki dönemlerde gözlem ve düşünce daha ön plana çıkmaya başlamıştır. Evrenin akıl ile bilinebilirliği ve anlaşılabilirliği düşüncesini savunan Thales, Pisagor, Sokrates ve Platon gibi felsefecilerin etkisi yayılmıştır. Bunun sonucunda diğer tüm bilimlerin de daha rasyonel zeminlere oturtulma çabaları artmıştır. Nitekim günümüzün modern tıbbı, aynı çağlarda yaşamış Hipokrat ve sonrasında bu geleneği devam ettiren Galen ve Dioscorides gibi hezârfenlerin temelini atmış olduğu prensiplere dayanmaktadır.

Hipokrat (MÖ 460-377) bitkisel ürünlerin daha bilimsel bir temel ile değerlendirilmesi adına ayinler ve sihirden bağımsız bir şekilde ilaç olarak uygulanmalarını teşvik etmiştir. Eserlerinde 300'ü aşkın tıbbi bitkinin fizyolojik etkileri bakımından sınıflandırmaları mevcuttur. Örneğin ateş için pelin otu (*Artemisia absinthium*) ve kantaron (*Hypericum perforatum*), bağırsak parazitlerine karşı sarımsak (*A. sativum*), narkotik olarak afyon (*P. somniferum*), banotu (*Hyoscyamus* türleri), güzelavrat otu (*Atropa belladonna*) ve adam otu (*Mandragora* türleri), idrar söktürücü olarak deniz soğanı (*Albuca bracteata*), kereviz (*Apium graveolens*), maydanoz (*Petroselinum crispum*), kuşkonmaz (*Asparagus* türleri) ve sarımsak (*A. sativum*) gibi kullanımlara eserlerinde yer vermiştir (8). Ardından Dioscorides (MS 100) Roma ordularıyla yaptığı seyahatler sırasında tıbbi bitkilerin doğru bir şekilde toplanması, depolanması ve kullanımını kaydetmiştir. Galen de (MS 131-200) benzer şekilde tıbbi bitkilerden oluşan reçetelere önem vererek kayda değer formülleriyle tanınmaktadır; "galenik preparatlar/formülasyonlar" kavramı halen günümüzde aktif bir şekilde kullanılmaktadır (11).

Orta çağ süresince devam eden karanlık çağlar (MS 5.–12. yüzyıllar) boyunca değerli bilgilerin büyük bir kısmı yakılıp yok edilmiştir. Karanlık çağlarda yaşananlar, tarihçiler tarafından da halen yazılı bilgi eksikliğinden dolayı tartışma konusudur, ancak aynı dönemlerde Peygamberimiz Hz. Muhammed'in (MS 6. y.y.) mesajı ve misyonu ile İslam alemi bilime yeni bir anlayış ve kavrayış biçimi ile yaklaşmaya başlamıştır. Karanlık çağların başlamasından kısa süre sonra İslam bilim dünyası altın çağını yaşamaktaydı (MÖ 8.–14. yüzyıl). Bu dönemin İslam alimleri, Yunan eserleri de dahil

olmak üzere bilim adına ellerine geçen her eseri detaylı öğrenip inceleyip yorumlayarak hezârfen geleneğini yoğun bir şekilde sürdürmüşlerdir. Birçok değerli eserin kurtarılıp o dönemde yaygın olan Arapça diline çevrilmesinde büyük rol oynamışlardır (11).

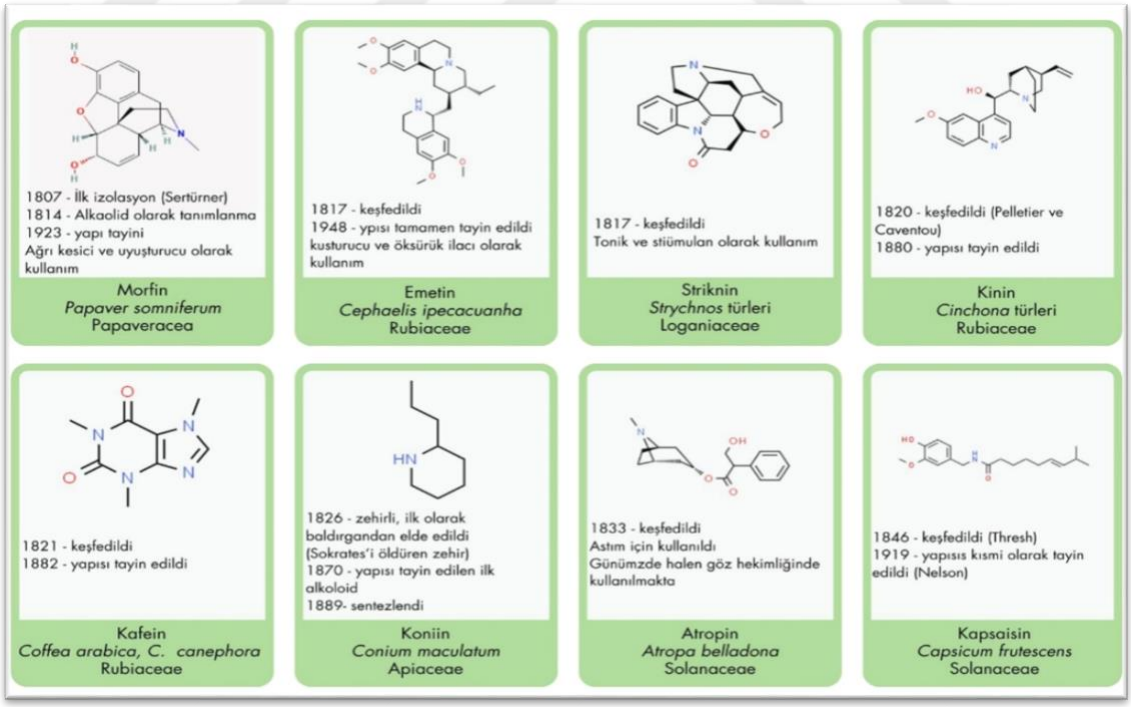
Ebû Bekr Muhammed b. Zekeriyyâ er-Râzî (MÖ 850–932) tarafından kişisel anılarına ve notlarına dayanarak yazılmış olan *Kitāb Al-Ḥāwī fī-l-Ṭibb* eseri, doğal halk hekimliği ve şifa uygulamalarına ağırlık veren, hastalık tedavileri hakkında 900 vaka çalışmasını içeren bir çalışmadır. Bu kitap ayrıca önceki yazarların çeşitli hastalıklar ve tedavilerle ilgili özetlerini içermekte olup 13. yüzyılda Latinceye tercüme edilmiş ve Avrupa ilaçları üzerinde hatırı sayılır bir etkiye sahip olmuştur (12). İslam altın çağının en bilinir ve etkili isimlerinden biri olan Abu Ali al-Husayn İbn Abd Allah İbn Sina (MS. 980-1037), *El-Kanun Fil-Tıbb* eserinin ikinci cildinde tıbbi bitkilerin kullanımına yer vermiştir (13). Bunlara ek olarak Sâbûr İbn Sahl (ö. 869) ve el-Kindî'nin (ö. 870'den sonra) terkiplerine bakıldığında, Helenistik dönemde kullanımı mevcut olan ve bu dönemin bilgi kaynaklarında olmayan birçok tıbbi bitkiyi içerdiği görülebilir (kafur ve misk gibi). İbnü'l-Baytar (ö. 1248) 1400'den fazla ilacı ve kullanımını *Materia Medica*'sında alfabetik sıralamaya göre kayıt altına almıştır (14).

Bahsi geçen uygarlıklar arası bilgi geçişlerinde bilim ilerlemiş olsa da halen ilaç olarak kullanılan maddelerin etki mekanizmalarına dair bilgiler, teknolojik gelişmelerin eksikliğinden dolayı kısıtlıydı. Yine de deneme yanılma veya belirli gözlem yöntemleri ile tıbbi ürünler iksir, ekstre ve yağlar şeklinde geliştirilip o dönemlerin kendince farmakopilerinde kayıt altına alınmıştır. Ancak ilaçların biyoaktif içeriklerine ve aktivite mekanizmalarına dair detaylı bilgi eksikliği 16.-18. yüzyıllara kadar devam etmiştir (15). Bu dönemlerde tıbbi bitkilerin maserasyon, dekoksiyon ve infüzyon şeklindeki kullanımlarından öte daha spesifik formülasyonlar geliştirilmiştir, bu da maddelerin teknolojik gelişmelerle izolasyonlarını ve analizlerini gerektirmiştir. Nitekim bu çabaların sonucunda Sertürner 1804 yılında morfini izole ederek narkotik etkili ilaçlar alanında bir başarı kaydetmiştir. İzolasyonu, kristalleşmesi, kristal yapısı ve farmakolojik özellikleri üzerine kapsamlı bir çalışma yayınlamıştır (16). 18. yüzyılda Linneaus'un bitkilerin adlandırılmasını sistemleştirmesiyle birlikte botanik tanımlamalar kolaylaşmıştır. Dolayısıyla 19. yüzyıl dönüm noktası sayılabilirdi. Bu dönem, haşhaş (1806), ipecacuanha (1817), strychnos (1817), kinin (1820) gibi keşifleri barındırarak bir nevi bilimsel olarak eczacılık alanını özellikle tıptan ayırarak özerkliğine kavuşturmuştur.

Kimyasal yöntemler geliştikçe tanenler, saponinler, eterik yağlar, vitaminler ve hormonlar başta olmak üzere tıbbi bitkilerin aktif maddeleri aydınlatılmaya başlanmıştır (8).

2.1.2. Bitkisel Ürünler: Zorluklar ve Gelişmeler

Günümüz ilaç keşif süreçleri, Avrupa'nın Aydınlanma dönemi ve 19. yüzyılın ikinci yarısında başlayan ilaç endüstrilerinin hızlı genişlemesinin bir sonucudur. 19. yüzyıl, ilaç olarak kullanılan bitkilerin ve diğer doğal ürünlerden elde edilen saf kimyasal varlıkların karakterize edilmeye başlanıldığı dönemdir. Bu dönemde keşfedilen ilaç etken maddeleri, bir önceki bölümde bahsedilen tarihi metinlerde yer almaktayken bir kısmı ise yerel halkların şifacıları ve güncel geleneksel tıp sistemleri tarafından halen kullanılmaktadır. Modern ilaç keşif süreçlerinin başlangıçlarında yer alan bazı örnekler Şekil 2.1'de verilmiştir (2). Bu örnekler geleneksel tıbbi kullanımı olan bitkilerin incelenme çabaları sonucunda keşfedilmiştir; dolayısıyla etnofarmakolojik yöntemli keşifler olarak da düşünülebilir.



Şekil 2.1: On dokuzuncu yüzyılda keşfedilen bitkisel etken madde örnekleri

On dokuz ve yirminci yüzyıl boyunca devam eden bu saflaştırma çabaları, uzmanlaşmış eczacılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu eczacılar ilaç firmalarının temelini atan girişimcilerdir. Bunlardan ilki, 1826'da morfin ve diğer alkaloitlerin izolasyonu üzerine çalışan H.E. Merck'dir (15,17). Ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleri geliştikçe doğal ürünlerden biyoaktif madde izolasyon süreçleri kolaylaşmıştır. Ancak eşzamanlı olarak biyoloji alanındaki ilerlemeler, hastalıkların arka planındaki moleküler mekanizmaları netleştirerek terapötik müdahaleler için etkin hedefler sunmaya başlamıştır. Ayrıca inorganik kimyada yaşanan gelişmeler de karmaşık ilaç moleküllerinin tasarımını ve kimyasal sentezini mümkün kılmaktaydı. Üretimi optimize etmek, kaliteyi arttırmak ve maliyeti düşürmek adına doğal ürünlerin de kimyasal sentez yöntemleri ile üretimi popülerlik kazanmaktaydı; 1853'te salisilik asit, kimyasal sentez yoluyla üretilen ilk doğal ürün olmuştur (17,18).

On dokuzuncu yüzyılın ortalarına (1950'ler) gelindiğinde tamamen sentetik ilaçlar, doğal ürün kaynaklı ilaçlarla yarışmaktaydı. Doğal ürünler halen ilaç geliştirme için değerli bir kaynak olarak kabul edilse de son 20 yıl içinde Yüksek Verimli Tarama (YVT) – "*High Thoroughput Screening (HTS)"* – yaklaşımı ve kombinatoryal kimyanın gelişmesiyle doğal ürün kaynaklı ilaçlar yerini, bu iki yönteme daha uygun olan sentetik küçük moleküllere bırakmıştır (19). Doğal ürün kaynaklı ilaç keşif süreçlerinde popülerliğin bir dönem azalmasına sebep olan zorluklar günümüzde de geçerliliğini korumaktadır. Bu zorluklar aşağıda özetlenmiştir:

1. *Tanımlama ve adlandırma:* Morfolojik, anatomik, genetik ve kimyasal analiz gibi farklı yöntemlerin kullanımını gerektirmektedir (20,21).

2. *Bitki miktarı ve bitkiye erişim*: Başlangıçta yapılan farmakolojik değerlendirmeler için az miktarda bitki gerekse de potansiyel bir ilaç başlangıç maddesi keşfi durumunda daha yüksek miktarda bitkiye ihtiyaç olacaktır (15,18).

1- *Kalite ve içerik standardizasyonu*: Bitkilerin kimyasal içerikleri ve istenen düzeyde ve kalitede miktarlara sahip olmaları bitkinin türüne, toplanma zamanına, toprak yapısı ve kalitesine, yükseklik ve havanın kalitesine, taşınma ve muhafaza koşulları gibi değişken etkenlere bağlıdır. Ek olarak bitkideki biyoaktif madde miktarları işlenmesi esnasında (kurutma, ekstraksiyon, saflaştırma, izolasyon vb.) değişebilmektedir (18,22).

2- *Karmaşık kimyasal içerik ve mekanizma belirleme*: Bitkisel ürünlerin kompleks içerik ve yapıları ilaç keşif süreçlerinde saflaştırma, izolasyon, karakterizasyon, sentez ve türetme gibi işlemler için zorluklar oluşturmaktadır (15).

3- *YVT ile uyumsuzluk*: Ham bitki ekstreleri topaklanma veya çökelme eğimlinde olan birçok farklı bileşiğin karmaşık ve çoğu zaman yüksek viskozlu karışımlarıdır. Bu özellikleri YVT yaklaşımında kullanılan *in-vitro* deney ortamları ile uyumsuzluk yaratmaktadır (15,18,23).

Yukarıda bahsi geçen maddeler başta olmak üzere standardizasyon ve patentlenme süreçlerindeki zorluklar da doğal ürünlerden ilaç keşfine olan ilgiyi bir süreliğine azaltmıştır. Son 20 yıl içinde orta ve büyük ölçekli ilaç firmaları doğal ürünlerden ziyade, özellikle YVT ile uyumlu olan, kimyasal sentez yöntemleri ile daha kolay üretilebilen ve kombinatoryal kimya uygulamalarında sonuç veren küçük moleküllere ve türevlerine ilgisini yöneltmiştir (15,19,20). Ancak tahminlerin aksine kimyasal sentez yöntemleri ilaç endüstrisinin beklentilerini karşılamamıştır ve piyasaya yeni ilaçların giriş hızında bir artış görülmemiştir.

Bu azalmanın sebepleri birçok çalışmanın konusu olmuştur. Durumu analiz eden bir çalışmada genel faktörler detaylı incelenmiştir. Çalışmada ele alanın konular arasında ilaç şirketlerinin benimsediği Ar-Ge modellerindeki değişimler, yeni ilaçların önceki türevlerine göre daha etkili olamayışları, düzenleyici kurumların daha temkinli olmasından kaynaklı zorlaşan onay süreçleri, endüstrinin çoğunlukla tek bir biyolojik hedefe yüksek afiniteyle bağlanan moleküllere odaklanması, sentetik ürünlerin kimyasal çeşitlilik açısından kısıtlı olmaları, endüstri, akademi ve yasaları düzenleyici kurumlar arasındaki etkin olmayan ilişkiler sıralanmıştır (24).

Bu zorluklardan bazıları doğal ürün keşif süreçlerinde de etkilidir, ancak doğal ürünlerin sürekli olarak araştırma konusu olmalarının ardında yatan bazı avantajlar dikkat çekmektedir. Doğal ürünler, canlı organizmalardan elde edildikleri için çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirme açısından optimize edilmiş özelliklere sahiplerdir. Sentetik kimyasal moleküllere kıyasla daha geniş bir kimyasal alan kaplamaktadırlar. Bu geniş kimyasal alanda doğrudan kullanılabilecek ürünler olduğu gibi, modifiye edilerek etkisi arttırılabilecek birçok ilaç başlangıç malzemesi de bulunabilmektedir. Ayrıca genellikle doğal ürünlerin karmaşık yapıları hastalıklarda tek bir hedef ile etkileşim yerine birkaç hedefle etkileşime girerek daha kapsamlı bir tedavi sürecinin oluşmasına yardımcı

olmaktadır. Son olarak tıbbi bitkilerin kullanımlarına dair bir önceki bölümde bahsedilen tarihsel kayıtların yanı sıra güncel olarak sayısı gittikçe artan etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışmalar, referans kaynağı olarak kullanılabilmektedir (15,20).

Doğal ürün bazlı ilaç keşfine yönelik yenilenen ilgi, ilgili araştırma alanlarındaki büyük bilimsel ve teknolojik ilerlemelerle paralellik göstermektedir. Bu gelişmelerden bazıları hastalıkların ve mekanizmalarının daha iyi kavranması, tarama yöntemleri ve analitik ekipmanlardaki gelişmeler, biyolojideki ilerlemelerle artan hedef sayısı ve doğal ürünlerin sentetik modifikasyonlarla optimize edilebilme olanaklarıdır (15). Ek olarak hastalıkların altında yatan sebepler aydınlatıldıkça çoğu durumda birden fazla karmaşık faktörler birleşimi olduğu görülmektedir. Dolayısıyla güncel "her şey için tek ilaç" yaklaşımı gelecekte popülerliğini kaybedebilir. Geleneksel tedavi yöntemlerinde sıkça kullanılan çok bileşenli sinerjistik formülasyonlara yeniden duyulan ilgi ise alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. Çok bileşenli karışımların akılcı bir şekilde tasarlanması, çok hedefli terapötik ve profilaktik uygulamalar için bir seçenek olarak geliştirilmektedir. Bu yaklaşım, bireysel bileşiklerin karmaşık karışımlardan izole edilmesi ve karakterize edilmesinde gereken zaman ve maliyetten tasarruf sağladığı için de ekonomik olarak tercih edilebilir (25).

Newman ve Cragg'in 39 yıllık değerli çalışmasında (1981 – Eylül 2019), sadece ABD (FDA) olmaksızın farklı otoriteler tarafından onaylanmış toplam 1881 ilaç maddesi olduğu belirtilmiştir (3). Onaylanan ilaçlar arasında 346 ilaç biyolojik kökenlidir; yani genellikle ya bir organizmadan/hücre hattından izole edilen ya da konakçı hücrede biyoteknolojik yollarla üretilen büyük (>50 kalıntı) peptitler veya proteinler. 142 onaylı aşı ve biyolojik ürünler hariç tutulup küçük molekülden oluşan ilaçların onaylanma durumu incelendiğinde, 1392 toplam onaylanmış ilaç hammaddesi bulunmaktadır. Bunlardan 463'ü tamamen sentetik iken, 930'u doğal, doğal kaynaklı veya doğal kaynaklardan esinlenmiş olduğu görülmektedir. Doğal kaynaklardan esinlenen ilaçlar hariç tutulsa bile doğrudan doğal ürünlerden elde edilen ilaçların yine %32'lik bir oranı temsil ettiği görülmektedir. Bu oranlar, küçük moleküllü ilaçların keşfinde doğal ürünler ile bağlantısı olan ürünlerin halen çoğunluğu oluşturduğuna işaret etmektedir. Çalışmada listelenen onaylanan ilaçlar ek bilgi olarak Ekler kısmında Tablo Ek-1A olarak verilmiştir.

Doğal kaynaktan elde edilen ürünler genellikle ABD ve Avrupa başta olmak üzere birçok ülkenin İlaç ve Tıbbi kurumlarınca onaylanmış reçeteli veya reçetesiz olarak satılan ürünlerdir. Ancak birçok tıbbi bitkisel ürün geleneksel olarak veya doğaya dönüş "new age" akımları sonucunda halkın ilgisini çekmektedir. Dolayısıyla normal ilaç onay süreçlerinin gerektirdiği süreçlerin haricinde yeni yasal düzenlemeler, halkın sağlıklı bir yaşam arayışında güvenli ve etkili ürünlere ulaşabilmeleri için gerekli hale gelmiştir.

2.1.3. Bitkisel Ürünler: Dünyada ve Türkiye'de Yasal Düzenlemeler

Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürünlere (GBTÜ) yönelik artan talebi karşılamak amacıyla 2004 yılında Avrupa Birliği Direktifi (Directive, 2004/24/EC) yürürlüğe girmiştir. Bu Direktifin gerekliliği, GBTÜ'lerin ilaç ruhsatı için gerekli olan alışılagelmiş tesirli olma kanıtını karşılamadıkları ve normal düzenleyici prosedürlere uymadıklarından ötürü ortaya çıkmıştır. Günümüzde bu Direktif Avrupa Birliği ülkeleri tarafınca reçetesiz ürünlerin onaylanması için kullanılmaktadır. Temel gereksinim, ürünün "*belirli kullanım koşullarında zararlı olmadığına ve uzun süreli kullanım ve deneyime dayanarak ilacın farmakolojik etkilerinin ve etkinliğinin makul olduğuna*" kanıtını barındırması yönündedir. Buna binaen "geleneksel kanıt" olarak adlandırılan ve Direktifin 16c maddesinin 1. fıkrasının c bendinde "*söz konusu tıbbi ürünün veya ilgili ürünün kendi toplumunda [yani Avrupa Birliği içinde] en az 15 yıl dahil olmak üzere en az 30 yıllık bir süre boyunca tıbbi kullanımda olduğuna dair bibliyografik veya uzman kanıtı*" olarak tanımlanan kanıt sunulmalıdır (26).

Akabinde üye ülkeler kendi ulusal mevzuatlarında bu Direktifi dahil etmeye başlamıştır. Türkiye'de de aynı şekilde 03.02.2023 tarih ve 32093 sayılı Resmî Gazete'de Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği yayınlanmıştır (27). Bu Yönetmeliğin 36. maddesinde açıkça belirtilen husus, bu Direktifin kullanımını göstermektedir:

"Bu Yönetmelik, 6/11/2001 tarihli ve 2001/83/AT sayılı Beşerî Tıbbi Ürünler ve 31/3/2004 tarihli ve 2004/24/AT sayılı Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürünler hakkındaki Avrupa Parlamentosu ve Konsey Direktifi dikkate alınarak Avrupa Birliği mevzuatına uyum çerçevesinde hazırlanmıştır."

AB Direktifi ve TİTCK yürütmesinde olan GBTÜ Yönetmeliğinde ortak olarak her iki düzenlemenin de kapsamına giren ürün terimleri aşağıda sıralamıştır. Bu terimlerin tanımları yönetmelikte detaylı verilmiştir.

- Drog
- Bitkisel drog
- Bitkisel preparat
- Etkin madde
- Bitkisel tıbbi ürün
- Geleneksel bitkisel tıbbi ürün (GBTÜ)
- Bitmiş ürün

Ülkemizde bitkisel ilaç ve GBTÜ olarak onaylanması istenilen ürünler için Ortak Teknik Doküman Formatında hazırlanan dosyanın başvuru ve onay mercii Sağlık Bakanlığı'na bağlı olan Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'dur (TİTCK). Genel olarak uzun süreli geleneksel kullanıma dair kanıt olmayan ürünler için klinik öncesi ve klinik çalışmaların sonuçları gerekirken, mevzuatta belirtilen süre boyunca bibliyografik olarak geleneksel kullanımın kanıtlandığı ürünler için bu çalışmalar gerekmemektedir. Başvuru dosyasında bitkisel hammadde, etkin madde ve bitmiş ürün için ayrı ayrı tüm deneysel veriler, farmakope kayıtlarına göre sonuç tablosu ve stabilite testlerinin sonuçları bulunmalıdır. Ruhsatlı GBTÜ ve bitkisel ilaçların satışlarına sadece eczanelerde izin verilir ve herhangi bir şekilde medya ve internet üzerinden reklamları yapılamaz (28). Bu ürünlere ek olarak doğal ürünlerden elde edilen ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından onaylanan takviye edici gıdalar için bu şartlar aranmamaktadır. Ancak genel olarak insan sağlığı ile ilişkili tüm ürünlerin üretim süreçlerinde kalite ve güvenilirlik şartları, İyi Üretim Uygulamaları (İÜU) gibi düzenlemeler ile kurumlarca denetime tabi tutulmaktadır.

GBTÜ yönetmeliği uyarınca Türkiye'de 2013 yılından itibaren reçetesiz satılmak üzere 39 GBTÜ ruhsatlandırılmıştır ve TİTCK'nın sayfasında yıl, içerik, üretici firma gibi detayları ile güncellenerek yayınlanmaktadır. Avrupa Birliği ülkeleri ve Türkiye'de durum bu şekildeyken farklı ülkelerde insan sağlığı ile ilgili ürünlerin düzenlemeleri

çeşitlilik göstermektedir. Aşağıda Tablo 2.2'de (29,30) bazı ülkelerdeki durumlar özetlenmiştir.

Tablo 2.1: Bazı ülkelerde doğal ürünlere ilişkin yasal düzenlemeler

Ülke	Düzenleyici kurum/lar	Mevzuat	Notlar
İngiltere	İlaç ve Sağlık Ürünleri Düzenleme Kurulu (MHRA)	AB GBTÜ Yönetmeliği (2004/24/EC)	-Tıbbi ürün üreticileri Piyasa Ruhsatı (MA) almak zorundadır ve çeşitli gereksinimlere tabidir. -Doğal ürünler çeşitli kategorilere ayrılır, bunlar arasında ruhsatlı bitkisel ilaçlar, GBTÜ, ruhsattan muaf bitkisel ilaçlar ve reçeteli ilaçlar bulunur.
Avusturalya	Terapötik Ürünler İdaresi (TGA) Federal Kurumu	1989 Terapötik Ürünler Yasası	-İlaçlar 2 kademeli sistemde sınıflandırılır: "listelenen" (düşük riskli) ve "kayıtlı" (yüksek riskli) ilaçlar. -AUST L ve AUST R numaraları ile ilaçlar etiketlenir ve denetimler düzenli olarak yapılır.
Kanada	Kanada Sağlık Kurumu	2004 Doğal Sağlık Ürünleri Yönetmeliği	-Bitkisel ilaçlar için "Doğal Sağlık Ürünleri" lisansı gereklidir. -Ürünlerin kaydedilmesi için çeşitli bilgilere ihtiyaç vardır ve onaylanan ürünler özel bir ruhsat numarası taşır. -İÜU ve diğer düzenlemelere uyum gereklidir.
Hindistan	Sağlık Bakanlığı altında *AYUSH* (Ayurveda, Yoga ve Naturopati, Unani, Siddha ve Homeopati) departmanı	2006 Geleneksel Bitkisel İlaçlar Kanunu	-Geleneksel bitkisel ilaçlar için düzenlemeler ve İÜU gereklidir. -Ulusal Tıbbi Bitkiler Kurulu, sektörü desteklemek için kurulmuştur ve Geleneksel Bilgi Dijital Kütüphanesi (TKDL) korunan geleneksel bilgileri içerir.
Nijerya	Ulusal Gıda ve İlaç İdaresi ve Kontrol Ajansı (NAFDAC)	-	-Tablet halinde sıkıştırılmış ve kapsül formundaki bitki ekstreleri ile belirli sıvı preparatları düzenler. -Ürünlerin kaydı ve izlenmesi gereklidir.
ABD	Gıda ve İlaç Kurumu (FDA)	-	-Bitkisel ilaçlar "besin takviyeleri" olarak kabul edilir ve FDA tarafından düzenlenir. -Pazalamadan önce takviye ürünler için güvenlik ve etkinlik değerlendirmesi zorunlu değildir; ürünlerin etiketleri belirli kısıtlamalara tabidir.
Çin	Devlet Gıda ve İlaç İdaresi	-	-Çin'de bitkisel ilaçlar, ilaç olarak düzenlenir. -Çin farmakopesi, bitkisel ilaçların kimliği ve kalite kontrol gereksinimlerini belirler ve İÜU gereklidir.

2.2. ETNOFARMAKOLOJİ

2.2.1. Etnofarmakoloji ve İlaç Keşfi

Bir önceki bölümlerde bahsi geçen bitkisel ürünlerin büyük bir kısmı mevcutta halen geçerli olan geleneksel uygulamaların ve tarihsel (2.1.1) bilgi birikiminin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Bunun için iki ana akım örneğe başvurmak yerinde

olacaktır. Birinci örnek Çinli bilim insanı Youyou Tu'nun 2015 Nobel Tıp Ödülünü kazanmasıyla sonuçlanan, sıtma tedavisinde kullanılan artemisinin biyoaktif maddesinin keşif sürecini (31) içermektedir. 1960'larda Tu, araştırma ekibi ile Çin edebiyatını incelerken MÖ 1401 ile 1122 yılları arasında kehanet kalıntılarında direk "Malaria" anlamına gelen Çince karakterli bir yazıt bulmuştur. Daha sonraki dönemlerin eski tıp literatüründe sıtma semptomlarının, salgının ve kendine özgü periyodik ateş ve soğuk algınlığının hafifletilmesinin kapsamlı tanımları da geçmekteydi. Bu kaynaklardan, pelin otu türlerinden olan *Artemisia annua* L. (Qinghao) dahil olmak üzere çok sayıda tıbbi bitkiyi seçerek incelemelerine devam etmişlerdir. Sıtma semptomlarının (periyodik ateşler) Qinghao kullanılarak hafifletilmesi ilk olarak Ge Hong tarafından Acil Durumlar için Reçeteler El Kitabı'nda (Doğu Jin Hanedanlığı, MS 317-420 civarı) kaydedilmiş olduğunu ve sonrasında 1700 yıl boyunca kaydedilmeye devam ettiğini bulmuşlardır. Çinli araştırma ekibi ayrıca bu kaynaklardan ekstraksiyon prosedürüne ve artemisinin izolasyonuna dair temel bilgilere de erişmişlerdir. Klinik çalışmalar maddenin etkinliğine dair olumlu kanıt sağladı ve bugün artemisinin (türevleri de dahil olmak üzere), Asya, Afrika ve Güney Amerika'da klinik açıdan önemli bir sıtma karşıtı ilaç olarak kullanılmaktadır (26).

İkinci örnek ise artemisininden farklı olarak, küraın geleneksel kullanımı ve akabindeki etnofarmakolojik incelemeleri, bir hastalığın tedavi edilmesi hedefiyle ilerlememişti. Ancak süreç, geleneksel kullanımı yaygın olan bir maddenin incelenmesi ve tıbbi yararının keşfedilmesi ile sonuçlanmıştı. Güney Amerika yerli kabileleri tarafından kullanılan bu ok zehiri ve oklara yüklenmeden önceki karmaşık hazırlanışı, 1800'de Alexander von Humboldt'un da aralarında bulunduğu bazı kaşiflerin belgelerinde yer almaktadır. Von Humboldt, yerli halkın kullandığı süreci ve derme çatma laboratuvarı detaylandırmaktaydı, ancak kaynak bitkisi olan *Chondrodendron tomentosum*'un erişilmesi zor konumu ve çiçek ile meyve eksikliği nedeniyle küraın botanik kaynağını belirlemekte zorluk çekmekteydi. Bu bitkinin yanı sıra küraın Menispermaceae familyasının türleri (*Chondrodendron* spp., *Curarea* spp. ve *Abuta* spp.) ve Loganiaceae familyasının türleri (*Strychnos* spp.) tarafından da üretildiği tespit edilmişti. Kürar, Claude Bernard (1813-1878) tarafından detaylı farmakolojik çalışmalar ile incelenmiştir. Claude'ın dikkat çeken bulguları arasında zehirin kana hızlı karışabildiği oranda kas felcine ve ölüme yol açtığı, ancak gastrointestinal sistemde herhangi bir toksik etkisinin olmamasıydı; yerli halk mide-bağırsak rahatsızlıklarında kullanmaktaydı. Aktif

bisbenzilisokinolin alkaloit bileşiği olan D-tubocurarine, *C. tomentosum*'dan 1947 yılında izole edilip yapısı aydınlatılmıştır. Tubokurarinin kullanımı birçok Avrupa ülkesinde azalmış olsa da cerrahi kas gevşetme amacıyla, özellikle Fransa'da, tıbbi uygulamalarda kullanımı devam etmektedir (2).

Bu örnekler günümüzde de hızla gelişen dinamik bir araştırma alanı olan etnofarmakolojik çalışmaların önemini vurgulamaktadır. 1967 yılında yayımlanan ilk makalenin ardından çarpıcı bir artışla, anahtar kelimelerde, özette veya başlıkta 'etnofarmakoloji' terimini içeren 2000'den fazla kaynak olduğu ve bu kaynakların çoğunlukla yerel ve geleneksel olarak kullanılan bitkilerin anti-inflamatuar ve anti-kanser etkileri araştırdığı gözlemlenmiştir (32). Etnofarmakoloji alanındaki en etkili makaleleri (alıntılara göre) saptamak ve bu alandaki önemli itici güçleri ve araştırma eğilimlerini belirlemek için yapılan kapsamlı bir araştırmanın (33) sonuçlarına göre:

- 100 makalenin 44'ü derleme çalışması.
- Ortalama olarak 100 makalenin her biri 632 atıf almış ve yayınlandıkları tarihten itibaren yıllık olarak 43 kere atıf almış.
- Yayınların yapıldığı makaleler çoğunlukla "*Journal of Ethnopharmacology*", "*Food Chemistry*", "*Life Sciences*" ve "*Journal of Agricultural and Food Chemistry*" olarak belirlenmiş.
- Çalışma konuları arasında antioksidan etkinin en yaygın terim ve en çok atıf alan konu olduğu tespit edilmiş. Nörofarmakoloji alanı ise antioksidan etkiye oranla daha az zikredilmiştir.
- 2000'li yıllardan sonraki dönemde, 2000'li yılların öncesindeki döneme kıyasla, daha geniş çaplı bir bitki, gıda ve biyolojik etki yelpazesi görülmektedir.
- Çalışmaların büyük kısmı Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan ve Birleşik Krallık'ta yapılırken daha geniş coğrafi bölge olarak, sırasıyla Asya, Amerika kıtası, Afrika ve Okyanusya bölgesi olduğu ortaya çıkmıştır.

Yapılan bu analiz, etnofarmakolojinin çeşitli disiplinlerin (en önemlisi farmakoloji ve gıda bilimi) kesişim noktasında olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu alan ile uğraşanlar için doğru bağlantıları kurabilme zorluklarına rağmen bir o kadar da gelişmelere açık bir alandır. Farmasötik bilimciler, farmakologlar, antropologlar,

biyologlar, botanikçiler, toksikologlar ve farklı tıp geleneklerinin uygulayıcıları/araştırmacıları da dahil olmak üzere farklı uzmanlık alanlarından araştırmacılar bu tür araştırmalara katılabilmektedir. Etnofarmakolojik araştırmalar, özellikle "BRICS" ve "MINT" olarak adlandırılan ülkelerin (Brezilya, Rusya, Hindistan, Çin, Güney Afrika, Meksika, Endonezya, Nijerya ve Türkiye gibi) yanı sıra Tayland ve Malezya gibi diğer gelişmekte olan ekonomilerde de yoğun bir şekilde yapılmaktadır (32).

2.2.2. Etnobotani ve Etnofarmakoloji

Etnofarmakoloji teriminin kullanımı yeni olup ilk olarak halusinojenler üzerine yazılmış (34) bir eserde rastlanmaktadır (2). 1981'de yayınlanan bir çalışmadan alıntılanın tanım aşağıda verilmiştir ve günümüzde de bu tanım kullanılmaktadır:

"Etnofarmakoloji, insan tarafından geleneksel olarak kullanılan veya gözlenen biyolojik olarak aktif maddelerin disiplinler arası bilimsel keşfi olarak tanımlanmaktadır" (35).

Uygulama olarak daha eskilere dayandığı gerçeğiyle birlikte tarihsel süreçte benzer, ancak alan olarak ufak farklılıkları içeren "*etnobotani*" terimi ise ilk olarak Amerikalı botanikçi William Harshberger'in 1896 yılında yayınlanan makalesinde kullanılmıştır (36). Bu makaledeki kullanılan "*ilkel ve yerli insanlar tarafından bitki kullanımının incelenmesi*" tanımı, artık ilkel kabul edilmektedir. Nancy Turner'ın 1995 yılında önerdiği "*Etnobotani, insanların bitkilerle olan etkileşimlerinin bilimidir…zaman ve mekân içinde… bilgileri, inançları, yönetimi ve sınıflandırma sistemleri dahil hem modern hem de geleneksel toplumların kullanımları*" tanım ise artık kabul görmektedir (37). Bu iki tanım arasındaki zaman diliminde etnobotani çalışmaları ile kültürel antropoloji, fitokimya, ekoloji, ekonomi, dilbilimi, tarih ve ziraat bilimi gibi alanlar arasındaki iş birlikler sayesinde etnobotani teriminin tanımları genişletilip birçok açıdan ele alınmıştır. Schultes'a göre etnobotani (etnofarmakoloji gibi) olgu olarak insanlığın yazılı tarihinde her zaman yer almış olsa da sadece son 100 yılda bilimsel bir disiplin olarak tanınmıştır (38).

Etnobotani terimi genel olarak ele alındığında toplumlar tarafından bitkilerin kullanımı ve bu kullanımla ilişkili tüm inançların ve kültürel uygulamaların ayrıntılı bir gözlemi ve analizini ifade etmektedir. Etnobotani ile ilgilenen araştırmacılar bitkileri kullanan topluluklar ile yaşayıp saygı çerçevesinde gündelik hayatlarını gözlemlerler.

Gözlemlerini belgeleyip bilimsel camiaya olan bilgi aktarımı sorumluluklarını gerçekleştirmek için ise bir dizi yöntem kullanırlar. Bunlardan bazıları ayrıntılı saha notları almak, bildirilen kullanımları niceliksel olarak değerlendirmek, bitki kullanımını bilişsel ve sembolik olarak analiz etmek, bitki türlerinin kesin olarak belirlenmesine olanak tanıyan bitki örneklerini toplamak ve herbaryum örneklerini hazırlamaktır (2).

Buna binaen etnofarmakoloji, etnobotani ile yakından ilişkili bir alan olarak düşünülebilir, ancak bitkilerin halk tarafından her alanda kullanımından ziyade, sağlık alanındaki kullanımını ele alır. Hastalıkları tedavi etmek için kullanılan geleneksel preparatların değerlendirilmesine ve etkinliklerinin test edilmesine odaklanır. Bu, farklı kültürler tarafından geleneksel olarak kullanılan yerli ilaçların ve biyolojik olarak etkili maddelerin bilimsel olarak keşfini içerir. Etnofarmakolojik araştırma, yeni ilaçlar keşfetmek için en güvenilir ve anlamlı yaklaşımlardan biri olarak da kabul edilmektedir (4).

2.2.3. Akılcı Fitoterapi

Etimolojik olarak bakıldığında Fitoterapi terimi, Yunancada bitki anlamına gelen *phyton* ve tedavi anlamına gelen *therapeia* kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Tanım gereği kökleri çok eskilere dayanan bir uygulama olsa da terimin ilk olarak Fransız Hekim *Henri Lecrec* tarafından kullanıldığı düşünülmektedir (28). 1922 yılında yayınladığı "*Fitoterapi El Kitabı" (Précis de Phytotherapeute*) isimli eserinin ardından 1934 yılında, şifalı bitkiler ve homeopati uygulayıcısı olan Eric Frederick William Powell tarafından İngilizceye geçmiştir. Alman bitki uzmanı ve hekim Rudolf Fritz Weiss ise 1960 yılında konu ile ilgili Almanca ders kitabı hâline gelen "*Fitoterapi Ders Kitabı*" (*Lehrbuch der Phytotherapie*) isimli eserini yayınlayarak Leclerc ile kanıta dayalı tıbbın gelişmesine yol açacak yaklaşımın katalizörü olmuştur (39).

Türkiye'de fitoterapi uzun yıllar eczacılık fakülteleri dahilinde varlığını sürdürmekteyken 2014 yılında Resmî Gazete'de yayımlanan 29158 sayılı Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp (GETAT) Uygulamaları Yönetmeliği kapsamında da anılmaya başlamıştır. Bu yönetmelik gereği fitoterapi de dahil 15 geleneksel tedavi yöntemi, gerekli eğitimlerle sertifikaları elde etmiş sağlık çalışanları başta olmak üzere belirli meslek grupları tarafından uygulanabilmektedir. Dolayısıyla günümüzde eczacılık, diş hekimliği ve tıp alanlarının konusudur ve uzun süreçte tekrardan bu alanları birleştirebilecek multidisipliner bir çalışma alanı potansiyelini taşımaktadır.

Eczacılık açısından bakıldığında farmakognozinin, yani "ilâç hammaddelerinden, doğal kaynaklı olanlarını tanıtan, inceliyen ve eczacılık öğretiminde, başlıca disiplinlerden birini oluşturan" (40) alanın kapsamındadır. Ancak tüm doğal kaynaklar yerine sadece bitkisel kaynakları inceleyen bilim dalı olarak tanımlanabilir. Tıp veya spesifik olarak GETAT olarak bakıldığında ise yayınlanan yönetmeliğe göre (41) şu şekilde tanımlanmıştır:

"Fitoterapi, geleneksel bitkisel tıbbi ürünler ve bitkisel ilaçlarla yapılan bir tıbbi tedavi yöntemidir. Fitoterapi ürünlerinin ruhsat sürecinde, bilim komisyonunun uygun görüşü alınarak belirlenmiş endikasyonlar dahilinde sertifikalı tabip önerisiyle uygulanabilir."

Halk ve tüketim açısından bakıldığında ise sentetik ilaçların yan etkileri, yüksek maliyetleri, üretim süreçlerinin uzun olması gibi gerçekçi kaygıların yanı sıra halk tarafından doğal olana doğru bir eğilim söz konusudur. Doğal olan tedavi süreçlerinin zararsız olduğu kanısı ne kadar yanlışlanabilir olsa da halk tarafından, özellikle geleneksel bilgi bakımından muhafazakâr bir kültürü olan "doğu ülkelerinde", çokça benimsenen bir düşüncedir (42,43). Sonuç olarak doğal ürünlere olan ilgi arttıkça sektör ve pazar da çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. Türkiye'de bakıldığında tıbbi ve aromatik bitkiler hem Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, hem de Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanan ürünlerin üretimi için kullanılmaktadır. Sağlık Bakanlığı onay süreçleri bir önceki bölümde anlatıldığı üzere daha katıdır, ancak Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı süreçleri daha esnek olup takviye edici gıda ürünleri olarak üretim olanakları sağlamaktadır.

Artan ilgi ve insan sağlığını ilgilendirdiği için hassas bir alan olması gerçeklerinden dolayı fitoterapi alanının, bugün olduğu gibi, önümüzdeki yıllarda da gündemde olmaya devam edeceği beklenmektedir. Bu eğilimlerin farkında olan yasal düzenleyiciler çeşitli düzenlemeler ile ürünlerin ve uygulamaların etkisi ve güvenliğini sağlamaktadır. İlaç geliştirme süreçlerinin 19. yüzyıldan itibaren kanıta dayalı bir zemine oturtulduğu gibi modern tıbbi uygulamalar ve tedaviler de kanıta dayalı temellerden işlevlerini sürdürmektedir. Her iki alan ile bağlantısı olan fitoterapinin kanıta dayalı uygulaması ise günümüzde **rasyonel** veya **akılcı fitoterapi** olarak bilinmektedir.

Çıkış noktası Almanya olsa da çoğu Avrupa ülkesinde hızlıca yayılan rasyonel fitoterapinin temel amacı, bitkisel ürünlerin tıbbi amaçlı kullanım süreçlerinde daha

güvenli, etkili ve klinik çalışmalar ile kanıtlanmış yöntemleri ortaya koymaktır. Başlangıç noktası standardize bitkisel ekstreler olan bu alan, ürünlerdeki biyoaktif içeriklerin kimyasal tanımı aydınlatılmış, dozları belirlenmiş ve doza göre terapötik etki ortaya konmuş olması ile karakterizedir. Aynı zamanda ürünlerin yan etkisi, kontrendikasyonları ve farmasötik kaliteleri açıklanmış ve standardize edilmiş olmaları gerekmektedir (44).

Rasyonel fitoterapi ile bitkisel tedavi (batıda herbalizm) arasındaki farklara dikkat çeken Heinrich, başlıca farklar arasında aşağıdakileri sıralamıştır (30):

- Bitkisel tedavi karışımları sinerjik etkinin varlığını varsayarken rasyonel fitoterapi bu sinerjik etkilerin oluşumuna dair kanıt aramaktadır.
- Bitkisel tedavide daha holistik bir yaklaşım ile bireylere özel tedaviler önerilmekteyken rasyonel fitoterapi rahatsızlıkların semptomları üzerinden giderek reçeteler oluşturmaktadır.
- Bitkisel tedavide çoğunlukla tentürler kullanılır, rasyonel fitoterapi de ise planlı bir şekilde tablet ve kapsüller hazırlanır.
- Bitkisel tedavide bitki karışımlarının kullanımı daha yaygın iken rasyonel fitoterapide tek bitki içeren formülasyonlar odak noktasıdır.
- Bitkisel tedavide zaman zaman preparatların sıkı standardizasyonuna karşı çıkılmaktadır. Rasyonel fitoterapide ise standardize ekstreler hedef noktasıdır.

Bu bağlamda bitkisel tedavide her zaman bilimsel kanıt aranmazken rasyonel fitoterapide her zaman bilimsel kanıtlara dayalı bir şekilde ilerleme yaklaşımı benimsenmektedir. Çalışmamızda modern ve geleneksel yöntemler ile elde edilen bitki ekstreleri kıyaslanmaktadır. Modern ekstraksiyon yöntemleri farmakopeler ve ilaç üretim süreçlerine uygun ilerlerken geleneksel yöntemler etnobotanik bilgilere dayanmaktadır. Bu bilgiler halk ağzı ile elde edildiği için laboratuvar ortamında gerçekleştirmeleri zorluk yaratmaktadır. Geleneksel olarak kullanılan bitkisel reçetelerin büyük bir kısmı yöreden yöreye farklılık göstermektedir. Ek olarak hazırlanış ve kullanım şekilleri de her geleneğin adetlerine göre değişmektedir. Bu zorluklara aşabilmek için teknolojik gelişmelerden faydalanarak reçetelerin içerikleri standardize edilebilir.

2.2.4. Deney Tasarımı ve Optimizasyon

Aşağıda Tablo 2.2, 2.3 ve 2.4'te tezimizin konusu olan bitkilerin Türkiye'nin farklı bölgelerinde geleneksel kullanımları özetlenmiştir. Bu tablolardaki bilgilerde dikkat çeken noktalardan birisi ise kullanılan reçetelerin içeriğindeki farklı bileşiklerin (çoğunlukla bitkiler veya bitkisel ürünler) oranlarına dair bilgi eksikliğidir. Akılcı fitoterapi bağlamında bu oranların netleştirilmesi ve standardize edilmesi beklenmektedir. Bunun için rastgele oranlar seçilerek karışımların laboratuvar ortamında etkinlikleri ölçülebilir ancak bu hem maliyet hem de zaman açısından olumsuz bir yöntemdir. Çeşitli sektörlerin endüstriyel üretim süreçlerine bakıldığında maliyet ve zaman optimizasyonu sağlayan deney tasarımı (DT) yöntemi tercih edilmektedir.

DT yöntemi, neden-sonuç ilişkilerini belirlemek için planlı bir bir yaklaşım olup ölçülebilir girdi ve çıktılara sahip her türlü sürece uygulanabilir. DT başlangıçta tarımsal amaçlar için geliştirilse de II. Dünya Savaşı sırasında ve sonrasında istatistiksel süreç kontrolünü ve kaliteyi iyileştirmeye yönelik bir araç haline gelmiştir (45,46). DT için Design Expert®, Minitab® ve JMP® başta olmak üzere birçok program kullanılmaktadır. DT programları, faktöriyel, tepki yüzeyi ve karışım deneylerinin tasarımı için olanak sağlamaktadır. Bu deneyler aracılığıyla istatistiksel testler ışığında optimizasyon, bileşenler arası etkileşimlerin aydınlatılması ve girdi-çıktı kıyaslamaları yapılabilmektedir.

Çalışmamızda geleneksel reçetelerdeki karışımların oran optimizasyonu için Design Expert® programının karışım DT özelliğinden faydalanılmıştır. Karışım Deney Tasarımı (KDT) "*ölçülen çıktının sadece bileşen oranlarına bağlı olduğu ve karışım miktarına bağlı olmadığı varsayımı altında, gelişmiş ve çok terimli modellerle özelleştirilmiş bir tepki yüzeyi yöntemi*" olarak tanımlanmıştır (46). Bu tanımdan anlaşılacağı üzere KDT yönteminde iki kriter bulunmaktadır:

1- Toplam kriteri: karışımda yer alan tüm bileşenlerin toplamı yüzde olarak ifade edildiğinde %100'e, oran olarak ifade edildiğinde ise (ağırlık, mol veya hacim) 1'e veya belirtilen maksimum toplama eşit olmalıdır.

$$\sum_{i=1}^{q} x_i = x_1 + x_2 + \ldots + x_q = 1$$

2- Pozitif değer alma kriteri: tüm bileşenler pozitif değer almalıdır.

$$0 \leq x_i \leq 1, i = 1, 2, 3 \ldots q$$

Yukarıdaki denklemlerde q, karışımdaki toplam bileşen sayısını, x_i ise i sayılı bileşeni temsil etmektedir.

KDT'larında, karışım bileşenlerinin farklı oranlarını test edebilmek için modelleme kullanılmaktadır. Modelleme ile kastedilen, tepki yüzeyini temsil edecek bir model veya denklemin kestirilmesidir. Bu kestirim gereği program bir DT oluşturur ve bu tasarım sonucunda modelimizi temsil eden alan içinden değişik oranlarda karışımlar belirlenir. Önerilen oranlara göre hazırlanan karışımların etkileri ölçülüp yanıtlar toplandıktan sonra, bu yanıtlar kestirilen denkleme uydurulur ve denklemin katsayıları hesaplanır. Son olarak modelin yeterliliği istatistiksel yöntemler ile test edilir. Böylelikle modelin yanıt alanını doğru bir şekilde temsil ettiği doğrulanmış olup bu model sistem hakkında tahminlerde bulunmak, optimum bir karışım bulmak ve bileşenler arası etkileşimleri analiz etmek için kullanılabilmektedir (47).

KDT'larda kullanılan model, yanıtın (y) bağımsız değişkenlerin (x) bir fonksiyonu olduğu temeline dayanmaktadır; yani $y = f(x_1, x_2, x_3, \ldots\ldots x_q)$ şeklinde çokterimli (polinomik) bir denklemdir. Bu denklemler aracılığıyla regresyon analizi gerçekleştirilerek denklemin katsayıları ve anlamlılığı ölçülmektedir. KDT'lerde genellikle Scheffé tipi çokterimliler kullanılmaktadır (48). Bu çok terimliler 2 bileşenli bir karışım örneği için aşağıda belirtilmiştir:

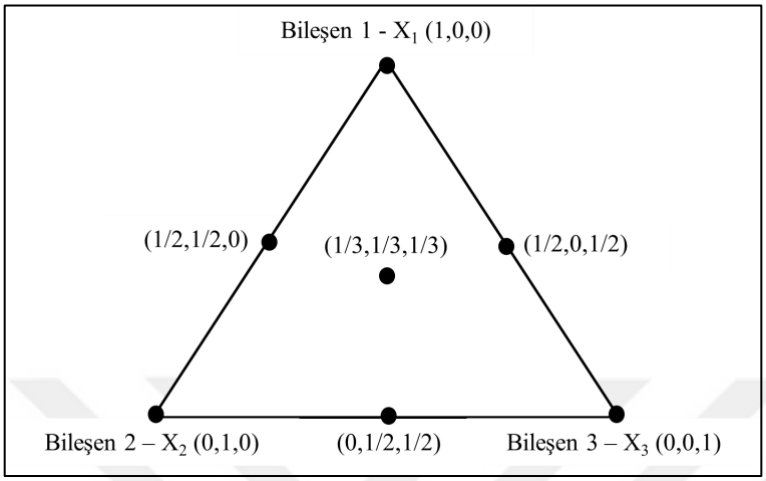
Birinci dereceden: $y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2$

İkinci dereceden: $y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_2 x_1$

Üçüncü dereceden: $y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_2 x_1 + \delta_{12} x_1 x_2 (x_1 - x_2)$

Genel olarak kestirilen model için birinci veya ikinci dereceden çok terimli modeller yeterli olduğu için 3. derece ve daha kompleks modeller yaygın olarak kullanılmamaktadır. İki veya daha fazla bileşen arasındaki etkileşimlerin analizinin de mümkün olması için x_1x_2 terimini içeren ikinci dereceden modeller tercih edilmektedir. Bileşenlerin değerleri modele göre bir koordinat sistemi içinden seçilir ve bu koordinat sistemine simpleks denir. İki bileşenin olduğu karışımlarda tek boyutlu bir simpleks sistemi beklenmektedir; yani x-ekseninde 1. bileşen ve y-ekseninde 2. bileşen olacak şekilde düz bir çizgi oluşmaktadır. Tezimizde olduğu gibi 3 bileşenli sistemlerde ise tepki yüzeyi 2 boyutlu bir şekil almaktadır; bu durumda kenarlardan her biri saf olarak

bileşenlerden birini temsil edecek şekilde eşkenar bir üçgen oluşmaktadır (49). Bu üçgen aşağıda şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2: Üç bileşenli karışımın simpleks koordinat sistemi**.**

Yukarıdaki simpleks sisteme istinaden birkaç farklı nokta seçilebilir ve bu noktalarda önerilen bileşen oranları ile karışımlar hazırlanabilir. Hazırlanan karışımların etkileri ölçüldükten sonra modelin doğruluğu test edilebilir. Böylelikle model, optimum karışım oranlarını tespit etmek için kullanılabilir. Modelin denkleminde anlamlı olmayan sonuçlar çıkarılıp sadece anlamlı olan sonuçlar ile ilerlenir. Normalde deneme yanılma ile akla gelebilecek tüm oranların denenmesi gerekecekken, bu yöntemler sayesinde istatistiksel anlamlılığı sağlayacak minimum deney sayısı ile ilerlenebilir ve maliyet ile zaman açısından avantaj sağlanabilir.

KDT yöntemi gıda endüstrisi (50,51), ilaç endüstrisi (52) ve biyoaktif bileşiklerin izolasyonu için optimal ekstraksiyon sistemlerinin geliştirilmesinde de kullanılmıştır (53–55). Biyoaktif bileşiklerin izolasyonu, optimum biyoaktiviteye sahip karışımların hazırlanması ve en iyi optimum ekstraksiyon çözücü karışımlarının elde edilmesi gibi birçok amaç için kullanılabilecek bu istatistiksel yöntemler, maliyet ve zaman açısından uygun bir alternatif sunmaktadır (56). Bu yöntemler, akılcı fitoterapi için gerekli olan zemini hazırlayarak kanıta dayalı bir fitoterapi alanının geliştirilmesinde büyük rol oynayabilir.

2.2.5. Bitkisel İlaçlar: Arttırıcılık, Antagonizm ve Sinerji

Bitki kaynaklı ürünler genellikle botanik karışımlar veya rasyonel fitoterapi mantığı ile standardize tek bitki ekstreleri formunda hazırlanmaktadır. Tıbbi etkide bitkiler arası ve bileşikler arası etkileşimler büyük rol oynamaktadır. Doğal ürünlerin kullanımının, tek bir saf maddeden oluşan kimyasal sentetik ilaçların kullanımlarına kıyasla daha etkili olduklarına dair iddialar da bu bilgiyle gerekçelendirilmektedir (57). Çağımız tıbbının halen bazı alanlarda tedaviye yaklaşımı olan "tek hedef-tek ilaç" konseptinin zayıf yanları artık tartışılmaktadır (58).

Sinerji çalışmaları son 30-40 yılda yeni analitik kimya ve moleküler biyoloji yöntemlerinin gelişmesi ve kemoterapide çoklu ilaç terapisine geçiş sayesinde hız kazanmıştır. Hastalıkların pek çok faktörün etkisiyle ortaya çıktığı gerçeğiyle birlikte AIDS, bulaşıcı hastalıklar, hipertansiyon, kanser ve romatizma gibi rahatsızlıklarda terapötik yöntemlerin yaklaşımları değişmektedir. Bu değişim sonucu tek ilaçlı/maddeli tedavi yerine çok ilaçlı/maddeli tedavi yöntemler tercih edilmektedir. Bitkisel tedavide ise bu yaklaşım zaten çağlar boyu uygulanmaktadır (59). Örneğin edatreksat ve cisplatin ile metotreksat ve cisplatin arasında sinerji gözlemlenmiştir. Bu kombinasyonlar sayesinde her iki ilacın daha düşük dozları kullanılsa da kanser hücrelerinin ölüm düzeyi azalmamıştır. Bir diğer örnekte ise non-Hodgkin lenfomasında siklofosfamid, hidroksidaunomisin, onkovin ve prednizon (CHOP) tedavisine rituksimabın eklenmesi, genel yanıtı artırırken toksisiteleri etkilememektedir. Son olarak, vincristin ve prednizonun uzun süredir kullanılan kombinasyonu, kan kökenli tümörler için oldukça etkilidir ve bunlara antrasiklinin eklenmesi, sadece remisyon değil, iyileşme için önemli rol oynamaktadır (60).

Sinerji konusu ele alınırken birden fazla bitki/madde arasındaki etkileşimler antagonistik veya sinerjik olarak sınıflandırılabilir. İki bileşenin birleşiminden kaynaklanan toplam etki arttırıcı etki olarak tanımlanır ve bu bir etkileşim sayılmamaktadır. Arttırıcı etkiden farklı olarak antagonistik etkileşimlerde toplam etkiden daha düşük bir etki ve sinerjik etkileşimlerde beklenen toplam etkiden daha yüksek bir etki ortaya çıkmaktadır (57). Sinerjik etkileşimlerin olası olumlu sonuçlarından bazıları aşağıda sıralanmıştır (20,30,61):

1) Terapötik etkinin artması.

2) Dozajın azaltılmasına rağmen etkinliğin artması.

3) Düşük dozların kullanımından kaynaklı olası toksisitede azalma.

4) Hedefe karşı seçici bir şekilde sinerjik etki.

5) Farklı hedefler üzerinde etki.

6) Etkileşimler sayesine çözünürlük ve biyoyararlanımda değişiklikler.

7) İlaca karşı direnç gelişiminde azalma veya yavaşlama.

Sinerji, (a) çok hedefli etkiler yoluyla farmakodinamik sinerjizm, (b) ilaç taşınması, nüfuz etmesi (permeasyon) ve biyoyararlanımın düzenlenmesi yoluyla farmakokinetik sinerjizm, (c) yan etkilerin ortadan kaldırılması ve (d) hastalığın direnç mekanizmalarının hedef alınması gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkabilir (57,59). Sinerjik ve çoklu etkiye örnek olarak *Ginko biloba* L. bitkisi verilebilir. Bu bitkide bulunan diterpenoit bileşikler olan ginkolidler trombosit aktive edici faktörlerin antagonistleri işlevine sahiplerdir. Ginkolid A ve ginkolid B üzerine yapılan *in-vitro* çalışmalarda bu ikisi arasında sinerjik bir etki olduğu gözlemlenmiştir (30,62). Bu bileşiklere ek olarak ginkoflavonlar, bilobalid ve flavonol glikosidlerin sonucu ek olarak hem antienflamatuvar hem de antioksidan etki söz konusudur. Bitkinin *Panax ginseng* bitkisi ile karışımında da bilişsel fonksiyonlar üzerine olumlu sinerjik etkileri ortaya konulmuştur (30).

Bitkisel karışımlar, bitkisel tedavi uygulayıcıları ve geleneksel tıp sistemlerinin sıklıkla başvurduğu bir tedavi yaklaşımıdır. Bitkisel tedavinin ve fitoterapinin ayrılmaz bir parçası olan bu olguyu rasyonel fitoterapi bakış açısıyla bilimsel bir zemine oturtmak ve etkileşimlerin mekanizmasını ve tabiatını aydınlatmak daha etkin tedavi yöntemleri geliştirilmesinde atılacak adımlar arasındadır.

Literatürde sinerjiyi tespit etmek için çeşitli yöntemler bulunmaktadır ve bu yöntemler geliştirilerek eksiklikleri kapatacak yeni ve daha iyi yöntemler sıklıkla geliştirilmektedir. Temelde izobologram (63–66), etkileşim indeksi (67) ve istatistiksel modele (68,69) dayalı yöntemler üzerinden gidilmektedir. 1992 yılında alanda en çok çalışmaları yürüten 6 bilim insanı tarafından Finlandiya'nın Saariselkä bölgesinde düzenlenen bir konferansta, Saariselkä anlaşması gereği 2 bileşenli sistemler için 2 yöntem üzerinde karar kılınmıştır. Şu an halen kullanılan bu iki yöntem Bliss Bağımsızlık (70) ve Loewe Arttırıcılık (70) yöntemleridir.

Loewe Arttırıcılık modeli genellikle ilaçların aynı hedef veya yolakta benzer etki modlarına sahip olduğu durumlarda uygulanır. Bliss Bağımsızlık modeli ise tepkilerini birbirinden bağımsız bir şekilde ortaya koyan ve etkileşime girmeyen ilaçların durumunda kullanılmaktadır (71) Bliss ve Loewe yöntemlerine ek olarak Chou-Talalay ve En Yüksek Tek Ajan (Highest Single Agent – HAS) yöntemlerine de literatürde yer verilmiştir. Loewe arttırıcılık yöntemine dayalı olan İzobol ve Kombinasyon İndeksi yöntemleri geliştirilirmiştir ve ilaç etkileşim araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (30).

Pemovska ve arkadaşlarının bir çalışmasında tüm bu yöntemler ile ilgili detaylı bilgi paylaşılmış olup avantaj ve dezavantajları da ortaya konmuştur (72). Bu çalışma ve diğer çalışmaların da ortaya koyduğu ortak bir kaygı ise her yöntemin farklı sonuçlar verebilmesidir. Örneğin bir yöntem kullanılarak hesaplanan etki sinerjik çıkabilirken diğer bir yöntem ile antagonistik etki sonucu verebilmektedir. Belirtilen diğer dezavantajlar arasında deneysel değişkenliklerin hesaba katılmaması ve etkin istatistiksel analizlerin yapılamaması yer almaktadır (73). Alternatif olarak önerilen istatistiksel yöntemlerin uygulanması, bir önceki bölümde anlatılan yazılım programlarının geliştirilmesiyle kolaylaşmıştır ve etkileşimler hakkında bilgi vermektedir.

2.3. FİTOKİMYASALLAR VE BİYOLOJİK AKTİVİTE

2.3.1. Fitokimyasallar

Doğal ürün denildiğinde organik olan, yaşamsal faaliyetler gerçekleştiren canlıların ürünleri akla gelmektedir. Ancak bu tanımı daraltmak gerekirse doğal ürünler, yaşayan organizmalar tarafından sentezlenen, yaşamsal faaliyetlerine katkı sağlayan ve aynı zamanda biyolojik aktivitelerine sebep olan organik maddeler olarak tanımlanabilir (74). Fitoterapi alanı bitkiler bazında doğal ürünleri incelediği için bu içeriklerin arasında bitkilerde bulunan ve tüketildiğinde insan vücudunda belirli fizyolojik değişikliklere sebep olan “fitokimyasalların” bulunduğu söylenebilir. Bitkilerde sentezlenen kimyasal bileşikler 200.000-1.000.000 arasında olup bu kimyasal maddeler veya metabolitler çok etkili ve sistematik mekanizmalar ile sentezlenmektedir (75). Bu metabolitlerin çeşitliliği, hidroksiller, alkoller, aldehitler, alkiller, benzen halkaları, steroitler gibi fonksiyonel

grupların sonsuz bir kombinasyonuna dayalıdır. Sonuç olarak çok özgün ve faydalı/zararlı kimyasal ve fiziksel özellikler ortaya çıkmaktadır (76).

Bitkilerin ürettikleri metabolitler genel olarak primer ve sekonder metabolit olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler, fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme ile ilişkili temel rollere sahip bileşiklerdir. Bunlar arasında fitosteroller, lipitler, nükleotidler, amino asitler ve organik asitler bulunur. Sekonder metabolitler ise bitkileri otçullardan ve mikrobiyal enfeksiyondan korumada, tozlayıcılar ve tohum dağıtan hayvanlar için cezbedici olarak, allelopatik maddeler, UV koruyucular ve hatta baklagillerde nitrojen bağlayıcı kök nodüllerinin oluşumunda sinyal molekülleri olarak çok çeşitli işlevlere sahip oldukları düşünülmektedir (77). İkincil metabolitler ayrıca boyalar, lifler, yapıştırıcılar, yağlar, mumlar, tatlandırıcı maddeler, ilaçlar ve parfümler olarak kullanımları nedeniyle ilgi çekicidir. Dolayısıyla bu metabolitler, yeni doğal ilaçlar, antibiyotikler, böcek öldürücüler ve herbisitlerin potansiyel kaynakları olarak görülürler (78).

Bitki sekonder metabolitleri biyosentez mekanizmalarına göre üç kategoriye ayrılmaktadırlar (78,79):

1. **Terpenler**: uçucu yağlar, steroller, karotenoitler, saponinler ve glikositler.
2. **Fenolik bileşikler**: flavonoitler, fenolik asitler, ligninler, lignanlar, kumarinler, stilbenler ve tanenler.
3. **Azot içeren bileşikler**: alkaloitler, glukosinatlar, siyanojik glikositler.

Bu üç kategoriye dair birçok yazılmış kitap ve çalışma mevcuttur ancak özet olarak terpenler 5 karbonlu izopren yapısı ve bunun türevlerinden, azot içeren bileşikler ise amino asitlerden biyosentezlenmektedir. Tezimizin odak noktası olan fenolik bileşikler bir veya daha fazla benzen halkasına sahip olup aynı zamanda bir veya birden fazla hidroksil grubuna da sahip olan bileşiklerdir. Çoğunluğu şikimat yolağı ve fenilalanin ile başlayan fenilpropanoit yolağı aracılığıyla üretilmektedirler. Benzen halkasının varlığı fenolat iyonunu stabilize ettiğinden kimyasal özellikleri bakımından diğer tersiyer alkollerden farklıdırlar; bu nedenle daha asidik ve daha reaktiftirler (79).

Şikimat yolağı, mikroorganizmalar ve bitkilerde bulunan, ancak hayvanlarda olmayan bir yolaktır. Yolağın merkezinde bulunan şikimik asit yıllar önce *Illicium* türlerinden (Japoncada 'shikimi') izole edilen bir bileşik olup günümüzde de aktif olarak

kuş gribine karşı kullanılan antiviral ilaç olan oseltamivirin (Tamiflu®) sentezi için hammadde olarak kullanılmaktadır (79,80). Bu yolağın sonucunda üretilen fenolik asitler, dehidrasyon ve enolizasyon sonucu protokateşuik asit, dehidrojenasyon ve enolizasyon ile gallik asittir. Gallik asit bir dizi enzim reaksiyonu ile tanenlerin oluşumunda öncül moleküldür (79).

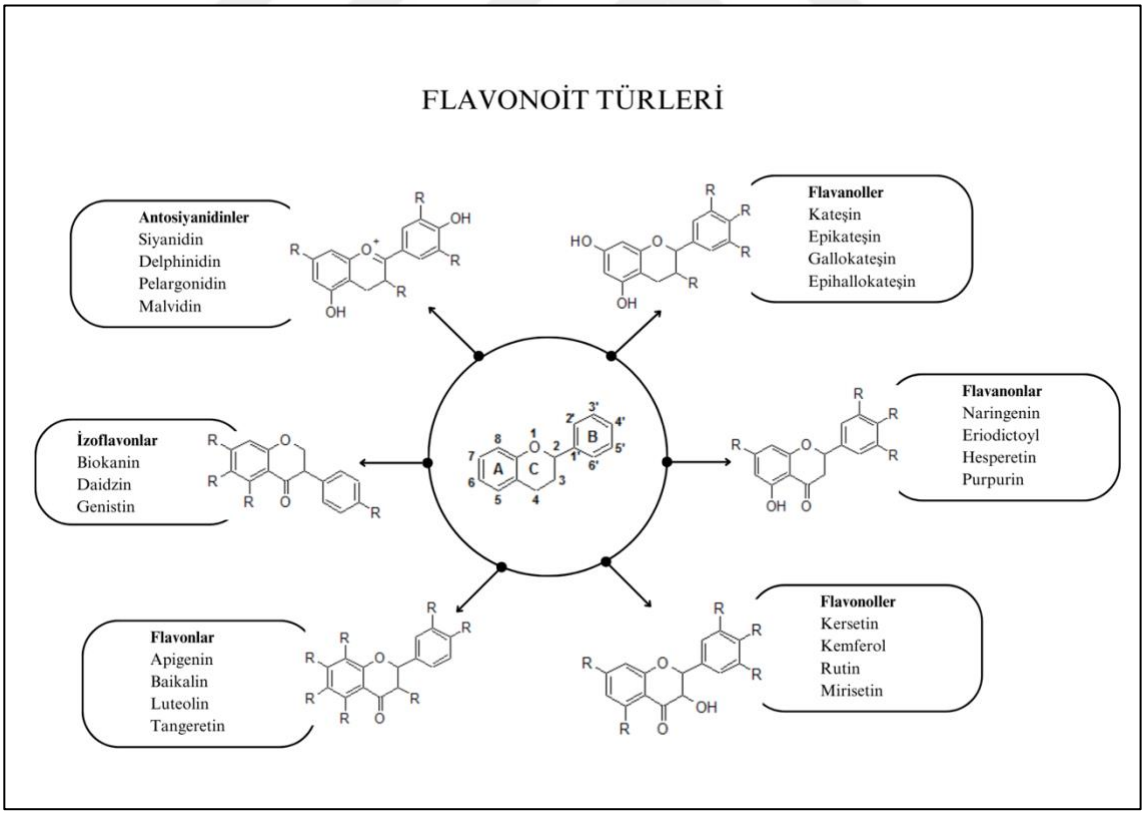
Tüm Süreç özetle eritroz-4-fosfat ve fosfoenolpiruvat (PEP) moleküllerinin bir dizi enzimatik reaksiyonları sonucu dihirdoşikimatın oluşması ile başlar. Sonrasında fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzimi aracılığıyla fenilalanin trans-sinnamik asite dönüşerek süreç devam eder. Bu noktadan itibaren ise çeşitli mekanizmalar ile fenolik asitler, flavonoitler, kumarinler, hidrolize olabilen tanenler, monolignoller, lignanlar ve ligninler gibi diğer birçok fenolik bileşik biyosentezi gerçekleşir (81). Birkaç kaynaktan bilgiler derlenerek oluşturulan fenilpropanoid biyosentez yolağı genel hatları ile Ek-2A'da özetlenmiştir (30,78,79,82,83).

Bitkiler aleminde çok yaygın bir şekilde bulunan fenolik bileşikler fitokimyasal grubu, yapısal olarak yaklaşık 8000'i aşkın tanımlanmış türe sahiptir (84). Fenolik bileşikler, fenil taşıyan hidroksil grubunun hidrojen donör yetisi nedeniyle antioksidan olarak etkilidirler. Dokuların yapıtaşlarını oluşturan lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere oksidatif olarak zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girerler. Radikal süpürücü veya metal iyon şelasyonu şeklindeki bu antioksidan etkileri, hücre bileşenlerine verilen oksidatif hasarı azaltabildiğinden insan sağlığı alanındaki birçok araştırmanın konusudur. Oksidatif hasar ileri seviyelerde kanser, karaciğer rahatsızlıkları, erken yaşlanma, enflamasyon, diyabeti, artrit, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve ateroskleroz gibi hastalıkların oluşmasına yol açan faktörler arasındadır (85).

Fenolik asitler, ek olarak en az bir karboksilik asit grubuna sahip olan basit fenol türleridir. Genellikle terim, gallik asit, salisilik asit, kafeik asit, vanilik asit ve ferulik asit gibi yalnızca benzoik ve sinnamik asit türevleriyle sınırlandırılmaktadır. Klorojenik asit ve rosmarinik asit de dahil olmak üzere sinnamik asit türevleri bitkilerde genellikle esterler halinde bulunurlar. Çok sayıda *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmada fenolik asitlerin antioksidan (86,87), antitümör (88–92), antibakteriyel (93–95), antiviral (96–98), antienflamatuvar (99–102), hipoglisemik (103–105), antikoagülan (106), antidepresan ve anksiyolitik (107–111) etkileri ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar, biyomoleküllerin bu

etkileri ürettiği mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasının ve bu moleküllerin potansiyel yeni ilaçlar olarak daha iyi kullanılmasının önemini vurgulamaktadır.

Flavonoitler bitkiler aleminde son derece yaygın birçok çiçek ve meyvenin renklerinden sorumlu pigmentlerdir. 'Flavonoit' kelimesi Latince sarı anlamına gelen *flavus* kelimesinden gelir ve birçok flavonoit aslında sarı renktedir. Bir kısmı serbest halde (aglikon), çoğunluğu ise *O*- veya *C*-glikozitler halinde olan flavonoitlerin yaklaşık sayısı 6000'i aşmaktadır (79,112,113). Flavonoitler B halkasının bağlı olduğu C halkasının karbonuna ve C halkasının doymamışlık ve oksidasyon derecesine bağlı olarak farklı alt gruplara ayrılırlar (Şekil 2.4). B halkası, C halkasının üçüncü karbonundan bağlandığı durumlarda izoflavonlar meydana gelmektedir. B halkası, C halkasının ikinci karbonundan bağlandığı durumlarda ise C halkasının yapısal özelliklerine göre çeşitli alt gruplar oluşmaktadır. Bu alt gruplar flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanoller veya kateşinler, antosiyaninler ve kalkonları içermektedir (114,115).



Şekil 2.3: Flavonoit türleri, yapıları ve örnekler

Şekil 2.3'te gösterilen flavonoit türleri, R olarak işaretlenen konumlara bağlanan gruplara göre farklı özelliklere sahip olabilmektedirler. Hidroksil grupları genellikle 4', 5 ve 7 konumlarına bağlı bulunurlar. Glikosidik flavonoitlerde ise bazı R konumlarına bağlı şekerler olabilmektedir. Her iki grupta flavonoitlerin suda çözünürlüğünü arttırırken metil grupları ve isopentil birimleri flavonoitleri daha lipofilik hale getirirler (77). Flavonoitler başlıca antioksidan aktivitelerinden dolayı araştırma konusu olmuşlardır. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) süpürülmesi, antioksidan enzimlerin aktivasyonu, oksidazların inhibisyonu (örneğin, ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz ve fosfoinositid-3-kinaz) ve α-tokoferilin radikalinin indirgenmesi yoluyla serbest radikallerin neden olduğu hasarı önleyebilmektedirler (115).

Flavonoitler üzerinde yapılan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda, antioksidan ve antienflamatuvar aktiviteleri başta olmak üzere (116–126), özellikle oksidatif hasarı önlemeye yönelik mekanizmalarından kaynaklı antikanser (127–131), antinörodejeneratif (132,133), kardiyovasküler rahatsızlıklara karşı (134–137), antidiyabetik ve antiobezite (138,139) gibi etkileri ele alınmıştır.

2.3.2. Antioksidan Aktivite

Antioksidan "oksitlenebilir bir substratınkine kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda, bu substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden herhangi bir madde" olarak tanımlanmıştır (140). Savunma mekanizmaları açısından canlı türleri arasında farklı olsalar da evrensel olarak hücre içi ve hücre dışı ortamda hem enzimatik hem de enzimatik olmayan formlarda bulunurlar (141). Oksidasyon temelde aerobik organizmaların biyolojik işlevlerini devam ettirmelerini sağlayan enerjiyi üretmek için gerekli bir süreçtir. Oksijen bu organizmaların biyolojik mekanizmaları aracılığı ile ihtiyaç duyulan tüm hücrelere taşınmaktadır ve yaklaşık %85 ila %90'ı mitokondri tarafından adenozin trifosfat (ATP) üretmek için kullanılırken, %1-4'ü serbest radikallere dönüşmektedir (142).

Oksidasyona sebep olan maddeler en geniş şekilde ele alındıklarında Reaktif Türler (RT) olarak tanımlanıp, Reaktif Oksijen Türleri (ROT), Reaktif Nitrojen Türleri (RNT) ve Reaktif Kükürt Türleri (RKT) olarak sınıflandırılabilirler. Bunların arasında eşleşmemiş bir elektron içeren potansiyel zarar verici kimyasal türler olarak tanımlanan serbest radikal (143) türleri ve radikal olmayan türler olabilmektedir. Hepsinin ortak özelliği ise hücre içinde normalin üstü bir düzeyde birikmeleri sonucunda oksidatif strese

neden olmalarıdır (144). Normal biyokimyasal reaksiyonların yanı sıra dışsal kaynaklar (alkol, diyet, çevre kirliliği, duman ve tütün kullanımı vb.) ve metabolik anormallikler gibi faktörler oksidatif stresten sorumludur. Bu süreçte karbohidratlar, proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi hücre bileşenleri okside olarak yapı ve işlevlerinde kalıcı hasar veya değişiklik oluşmaktadır. Bu da yaşlanmanın yanı sıra artrit, otoimmün bozukluklar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, enflamasyon ve kanser gibi kronik ve dejeneratif bozuklukların gelişiminde etkilidir (145).

Antioksidanlar ve oksidanları konu edinen çalışmalarda genellikle oksidan türleri, kaynakları, oluşumları ve etki mekanizmaları ele alınmaktadır. Antioksidanların etkileri ise bu bağlamda ele alınarak hangi aşamalarda ve nasıl etkili oldukları çokça ortaya konmuştur. Oksidan türleri ve oluşum süreçleri bir sonraki bölümlerde detaylandırılmıştır.

2.3.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT): Düşük miktarlardaki ROT, transkripsiyon faktörlerini tetikleyerek hücre çoğalması, apoptoz ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan sinyal molekülleri olarak işlemektedirler. Ayrıca fagositler tarafından üretilerek çeşitli bakteri veya mantar türlerine karşı savunma mekanizmasının bir parçasıdırlar. Ancak olumlu etkilerinin yanı sıra ve aerobik metabolizmanın gerekli ürünleri oldukları düşünülürse belirli bir seviyenin üzerinde olmalarıyla birlikte oluşan toksik etkiler kaçınılmazdır (146). "ROT" terimi hem serbest radikalleri hem de radikal olmayan diğer ara ürünleri kapsamaktadır (142). ROT arasında en çok bilinen ve üretilenler süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$) olarak sıralanabilir. Fizyolojik koşullar altında, en yaygın serbest oksijen radikali $O_2^{\cdot -}$ olup mitokondri ana kaynağı olarak kabul edilir.

Normal şartlar altında, tüketilen oksijenin %2'si mitokondride suya indirgenmek yerine enzimatik olmayan yollarla $O_2^{\cdot -}$'ye dönüştürülür (147). Endoplazmik retikulumda gerçekleşen protein katlanmaları için gerekli olan disülfit bağları oksidatif bir işlem olduğu için $O_2^{\cdot -}$'in %25 kadar bir kısmı da burada enzimatik olmayan şekilde üretilmektedir (148). Enzimatik yollar ise NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve peroksidazlar gibi hücresel oksidaz sistemleri sonucunda üretilmektedir (149). Örneğin ksantin dehidrogenaz enzimi normal koşullar altında önemli pürinleri, ksantin ve hipoksantini ürik asite indirger. Ancak hipoksik koşullar altında proteolitik olarak oksidaz formuna bölünür, moleküler oksijene elektron verir ve $O_2^{\cdot -}$ oluşumunu destekler (150).

$O_2^{\cdot -}$ oluşumu ayrıca indirgenmiş geçiş metalleri veya ağır metallerin oto-oksidasyonu sonucunda da üretilmektedir (142).

$O_2^{\bullet -}$, yüksek reaktivitesi ve stabil olmayışından kaynaklı vücutta doğal yollarla üretilen süperoksit dismutaz (SOD) enziminin antioksidan etkisi ile H_2O_2 ve oksijen moleküllerine dönüşür (143). H_2O_2, hücre ve organel zarlarından geçerek sinyal iletim yolaklarında ikincil haberci olarak geniş çapta görev yapar (151). H_2O_2 serbest radikal olmayan türden bir ROT'dür ve $O_2^{\bullet -}$'den daha az reaktiftir. H_2O_2 ayrıca peroksizomlarda bulunan D-amino asit oksidaz ve glikolat oksidaz gibi enzimler tarafından moleküler oksijenin iki kez indirgenmesi sonucunda da üretilmektedir (152). H_2O_2 doğrudan demir salınımı, enzim inaktivasyonu ve DNA'nın, lipitlerin, -SH gruplarının ve keto asitlerin oksidasyonu ile proteinlerin yapısına saldırarak etki edebilmektedir (153). Dolayısıyla normal koşullarda enzimatik antioksidan olan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından suya indirgenerek ileri aşamada hem kendisinden kaynaklı hem de daha zararlı radikallere dönüşümü sonucu oluşacak etkisi engellenir. H_2O_2, nötrofil sitoplazmasında bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığıyla ve klorür iyonunun varlığında güçlü bir oksidan ve antimikrobiyal madde olan hipokloröz asite (HOCl) dönüşür (141).

HOCL, α-2-makroglobulin dahil anti-proteinazları inaktive eder ve bu sayede modifiye edilen proteinler, ateroskleroz ve Alzheimer gelişiminde büyük rol oynarlar (143). H_2O_2 radyasyona maruz kaldığında hemolitik olarak yarılarak en toksik radikallerden biri olan $^{\bullet}OH$ oluşmaktadır (154). $^{\bullet}OH$ ayrıca Haber-Weiss reaksiyonu ile H_2O_2 ve $O_2^{\bullet -}$'in demir veya bakır iyonları varlığında birleşmesi sonucunda veya H_2O_2'in demir iyonu ile birleşerek Fenton reaksiyonu sonucunda da üretilebilmektedir (142,151,154,155).

$^{\bullet}OH$ en reaktif serbest radikal türdür ve etrafında bulunan her türlü biyolojik bileşenlerle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girebilir. $^{\bullet}OH$, DNA'nın baz çiftleri ile reaksiyona girerek, oligonükleotidlerdeki heterosiklik kısmın ve şeker kısmın çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasarına neden olur. DNA'daki bu tür oksidatif hasar, mutajenez, karsinojenez ve yaşlanma gibi fizyolojik koşullara sebep olmaktadır (153,156). $^{\bullet}OH$'nin bir diğer etkisi plazma zarında veya büyük miktarlarda çoklu doymamış yağ asidi yan zincirleri içeren herhangi bir organelde lipit peroksidasyonuna neden olmasıdır. Yağ asidi molekülünün yan zinciri ile etkileşime girerek karbon merkezli bir radikalin ($C^{\bullet}$) oluşumuna yol açar. Ortamda oksijenin bulunması durumunda

ise peroksil radikali (–C–O–O˙) oluşarak bitişik bir yağ asidinden hidrojenin çıkarılması ile reaksiyon yayılmaktadır. Sonuç olarak kararsız yapıda olan lipit hidroperoksitler ve siklik peroksitler oluşarak hidroksi-yağ asitleri, epoksitler ve toksik olan aldehitler (malondialdehit dahil), ketonlar ve laktonlar gibi ürünlere dönüştürülürler (157). Ayrıca ˙OH karbonhidratların depolimerizasyonuna ve protein yapılarında değişikliğe sebep olmaktadır (152).

2.3.2.2. Reaktif Nitrojen Türleri (RNT): Bu türler arasında en yaygın olan ve diğer nitrojen türlerinin oluşumuna öncülük eden nitrik oksit (NO), 1986 yılı ve sonrasında yapılan çalışmalarda endotelyal hücreler tarafından üretilen endotel kökenli gevşetici faktör olarak tanımlanmıştır (158). NO, vazodilatasyon ve nörotransmisyonda rol oynayan nadir gazlı sinyal moleküllerinden biri olup ayrıca bağışıklık sistemi reaksiyonu sonucu fagositler (monositler, makrofajlar ve nötrofiller) tarafından salınarak hücre içi patojenleri ve tümörleri öldürmede rol oynar (143,153,158,159). NO nitrik oksit sentaz (NOS) yoluyla L-argininin sitrüline enzimatik olarak oksidasyonu ile veya enzimatik olmayan şekilde üretilen serbest radikal lipofilik diatomik bir gazdır (159).

Serbest radikal olan NO'da bulunan eşleşmemiş elektronlar sebebiyle oksijen, $O_2^{\bullet-}$, nitrojen türevleri ve geçiş metalleri ile yüksek oranda etkileşime girer. $NO^{\bullet}$ ve $O_2^{\bullet-}$''in aynı ortamda bulunmaları durumunda hızlı bir şekilde reaksiyona girip çok güçlü bir oksidan olan peroksinitrit üretilmektedir (141).

$ONOO^-$ ve onun protonlanmış formu peroksinitröz asidi (ONOOH), bir veya iki elektronlu oksidasyon işlemleri yoluyla doğrudan oksidatif modifikasyonlara neden olabilmektedir. $ONOO^-$ ile doğrudan reaksiyona giren biyolojik gruplardan bazıları ise proteinlerde bulunan tiyoller, demir/kükürt merkezleri ve çinko parmaklarıdır (160). $ONOO^-$, enzimlerin aromatik amino asit kalıntılarıyla reaksiyona girerek aromatik amino asitlerin nitrasyonuna ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olur. Ayrıca membranlarda, lipozomlarda ve lipoproteinlerde lipit peroksidasyonunu tetiklemelerinin yanı sıra düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyon potansiyelleri de yüksektir. Oksitlenmiş LDL aterogenezin önemli bir etkeni olan oksitlenmiş kolesteril esterlerin birikmesine ve köpük hücre oluşumuna yol açar (141,142,158).

Çoğu durumlarda $ONOO^-$ fizyolojik ortamlarda bolca bulunan CO_2 ile doğrudan reaksiyona girerek nitrozoperoksikarbonat ($ONOOCO_2^-$) oluşumuna yol açar. Bu molekül ise kararsız yapısından dolayı hızlıca karbonat ($CO_3^{\bullet-}$) ve nitrojen diyoksit

($NO_2^{\bullet}$) radikallerine ayrışır. $^{\bullet}OH$'den daha toksik olduğu düşünülen $CO_3^{\bullet-}$ genellikle aynı tip oksidasyon hasarlarına sebep olur. Bazı durumlarda ise ONOOH ayrışarak $^{\bullet}OH$ ve $NO_2^{\bullet}$ oluşumuna sebep olabilmektedir (158). Akciğer hasarı, protein inaktivasyonu, lipitlerin peroksidasyonu, ikincil aminlerle reaksiyona girerek kanserojen nitrozaminlerin oluşumu, $NO_2^{\bullet}$'in toksik etkileri arasındadır (161).

2.3.2.3. Reaktif Kükürt Türleri (RKT): RKT nispeten yeni sınıflandırılmış, tiol radikali ($RS^{\bullet}$) ve glutatyonil radikali ($GSSG^{\bullet}$) gibi radikal türlerinin yanı sıra tiol (RSH) ve sulfenik asit (RSOH) gibi radikal olmayan maddeleri de içeren bir oksidan grubudur (143). RKT tiyollerin (SH grubu içeren moleküller) hidrojen peroksit, peroksinitrit ve süperoksit gibi reaktif türler ile reaksiyonu sonucunda oluşabilmektedir. Bu reaksiyonlar aracılığı ile SH grupları bir yandan diğer reaktif türleri indirgeyerek "antioksidan" görevi üstlenirken diğer yandan farklı kükürt bazlı radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. İlk aşamada yüksek oranda reaktif olan ve kararsız olan $RS^{\bullet}$ oluşmaktadır.

Tiol radikalleri ayrıca DNA'nın karbonhidrat bazlı radikallerinin tamiri esnasında hidrojen transferi ile veya tiyollerin enzimatik peroksidaz katalizli oksidasyonu sonucu da üretilebilir. Tiol radikali moleküler oksijenle reaksiyona girerek tiyol peroksil radikalini ($RSOO^{\bullet}$) oluşturur. $RSOO^{\bullet}$ fotoizomerizasyon sonucu sulfonil radikaline ($RS(O)_2^{\bullet}$) dönüşür, bu radikal de oksijen ile reaksiyona girerek sulfonil peroksil radikalini ($RS(O)_2OO^{\bullet}$) oluşturmaktadır (162). Kükürt içeren türlerin vücuttaki doğal fizyolojik fonksiyonlarının yanı sıra oksidatif strese katkıda bulunmaları, DNA hasarı, protein modifikasyonları ve enzim inhibisyon etkileri araştırılmaktadır (163).

2.3.2.4. Antioksidanların mekanizması: Reaktif türlerin oksidatif strese yol açmaları durumunda biyolojik ortamlarda hem içsel hem de dışarıdan takviye yolu ile antioksidan savunma mekanizmaları devreye girmektedir. Antioksidanlardan "ilk savunma hattı" olarak bilinen enzimatik antioksidanlar arasında $O_2^{\cdot -}$ giderilmesinde rol oynayan SOD, H_2O_2'i parçalayan katalaz ve glutatyon peroksidaz/glutatyon redüktaz sistemi yer almaktadır. "İkinci savunma hattı" ise indirgenmiş tiyoller ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanları (tokoferoller, askorbat, retinoller, polifenoller, ürat, askorbat ve indirgenmiş glutatyon) içermektedir (149,153).

Antioksidanlar, moleküler oksijeni tüketerek veya lokal konsantrasyonunu azaltarak, oksidatif metal iyonlarını uzaklaştırarak, $O_2^{\cdot -}$ veya H_2O_2 gibi agresif reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girerek, hidroksil $OH^{\cdot}$ ve $ROO^{\cdot}$ gibi zincir başlatıcı radikalleri süpürerek etkisini gösterebilmektedir (153). Antioksidanların etki mekanizmaları çeşitli olsa da üç genel ana başlık altında özetlenebilirler (164):

1- Antioksidandan oksidana elektron transferi (ET-mekanizması)

2- Antioksidandan oksidana hidrojen atomunun transferi (HAT-mekanizması)

3- Donör-alıcı mekanizması gereği bir veya birden fazla elektron çiftinin transferi ile kovalent bağın oluşumu (şelatlaşma mekanizması)

Tezimizin odak noktası olan fenolik bileşikler çoğunlukla yapılarındaki OH grubuna ilaveten dihidroksi (-OH) ve metoksi ($-OCH_3$) gibi gruplardan da kaynaklı bu üç mekanizma ile antioksidan etkinliklerini ortaya koymaktadırlar (165):

1- Fenolik bileşikler (ArOH) HAT mekanizması ile OH bağının homolotik kopması sonucunda serbest radikale bir hidrojen atomu transfer eder. Bu bağın kopması Bağ Ayrışma Enerjisi (BAE) ile ölçülmektedir. Dihidroksi grupları içeren fenolik bileşiklerin BAE daha düşük olduğu için hidrojen verme yetileri daha yüksektir. Bu tip fenolik bileşiklerdeki OH gruplarının radikalleşerek rezonans, konjugasyon ve delokalizasyon etkilerinden kaynaklı kararlı radikaller ($ArO^{\cdot}$) oluşmaktadır.

2- ArOH, ET mekanizması ile radikale elektron transferi gerçekleştirirler. Bu mekanizma açısından etkinlikleri, hidroksiller gibi belirli fonksiyonel grupların varlığından ziyade, rezonans ile π elektronlarının delokalizasyonu ve konjugasyonu etkisiyle oluşan İyonizasyon Potansiyeli (İP) ile ölçülmektedir. IP değerleri daha düşük olan bileşiklerin antioksidan etkinlikleri daha yüksektir. ET

mekanizması sonucu oluşan radikal anyonu (R^-) eşit sayıda elektrona sahip olup daha kararlıyken diğer yandan oluşan fenolik bileşikin katyon radikali ($ArOH^{+\bullet}$) daha az reaktiviteye sahiptir.

Genel olarak $ArO^\bullet$ ve $ArOH^{+\bullet}$ moleküllerindeki elektron sayısı tekil olsa da aromatik yapılarından dolayı elektronlar eşit bir şekilde dağılarak kararlı bir radikal formunu almaktadır.

3- Şelatlaşma mekanizması ile geçiş metal iyonları ile kompleks oluşturan fenolik bileşikler, örneğin Fenton reaksiyonunda Fe^{2+} ile H_2O_2 birleşimi sonucu $OH^\bullet$ oluşumunu engeller. Metallerin şelasyonu genellikle polifenollerdeki protonu alınmış hidroksiller yoluyla meydana geldiğinden, bu bileşiklerin asitlik oranları önemli rol oynamaktadır. OH gruplarını (asitlik) protondan arındırmak için gereken enerji ne kadar küçük olursa, metallerin şelasyonu o kadar kolay olur.

Yukarıdaki mekanizmalar sayesinde ve bazı zamanlarda endojen antioksidanlar ile sinerjik etki yoluyla bu antioksidanların etkisini arttırmaları ile birçok araştırmanın konusu olan çeşitli bitki kaynaklı fenolik bileşikler mevcuttur. Yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu antioksidan etkinlik seviyelerini etkilemektedir. Örneğin flavonol grubundaki kuersetin tarzı bileşikler, 3-hidroksil gruplarından kaynaklı bu gruba sahip olmayan bileşiklere kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedirler. Orto ve/veya para pozisyonunda bulunan hidroksil gruplarına sahip bileşiklerin antioksidan etkinlikleri daha yüksektir. Ayrıca, B halkasındaki katekol kısmı, hidroksil aromatik halkaların sayısı, C halkasındaki 4-okso grubu ve 2,3-çift bağ ile antioksidan ve metal şelatlayıcı aktiviteler arasında doğrudan bağlantı olduğu ortaya konmuştur (166).

Antioksidanların aktivitesini ölçmek için çeşitli *in-vitro* ve *in-vivo* yöntemler olsa da tezimizde dört *in-vitro* antioksidan aktivite ölçüm metodu kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen üç antioksidan aktivite mekanizmasına dayalı olarak metotlar da iki başlık altında toplanabilmektedir (167):

1. HAT-dayalı testler: Bir antioksidanın/fenolik bileşiğin hidrojen bağışı yoluyla serbest radikalleri söndürme aktivitesini ölçen yöntemler grubudur.
2. ET-dayalı testler: Antioksidanın veya fenolik bileşiğin metal iyonlarını, karbonilleri ve radikalleri indirgemek için bir elektronu transfer etme kapasitesinin ölçüldüğü yöntemlerdir.

Çoğu antioksidan aktivite ölçüm testlerinde hem ET hem de HAT mekanizmaları aynı anda gerçekleşebilmektedir, ancak bazı testler ikisinden birinin mekanizması ile de ilerleyebilmektedir. Antioksidan ölçüm testlerinin sınıflandırılması konusunda çokça farklı yöntem önerilmiştir. Örneğin yukarıdaki iki mekanizmanın yanı sıra radikalleri/reaktif türleri süpürme aktiviteleri ile toplam indirgeme kapasiteleri bakımından da sınıflandırılabilmektedir (168).

Flavonoit ve fenolik yapıda olan 9 bileşiğin antioksidan etkinliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada, DPPH radikal giderme aktivitelerinin IC_{50} değerleri 10,69 µg/mL – 536,41 µg/mL arasında değişirken ABTS radikal giderme aktivitelerinin IC_{50} değerleri 5,28 µg/mL – 12,54 µg/mL arasındaydı. Aynı çalışmada 30 µg/mL konsantrasyonda bazı bileşiklerin FRAP ve CUPRAC indirgeme kapasiteleri referans olarak kullanılan standarttan daha etkili olduğu ortaya konmuştur (117).

Allium cepa metanol/su ekstreleri üzerine yapılan bir çalışmada kuersetin ve kuersetin-4′-glukozit tespit edilerek DPPH radikali giderme aktivitesi ölçülmüştür. 20 µg/mL örnek konsantrasyonunda %1 ile %62,5 arası değişiklik göstermiştir (169). Farklı bir çalışmada kuersetinin DPPH IC_{50} değeri 7,76 µg/mL ve ABTS IC_{50} değeri 0,83 µg/mL olarak, epikateşinin ise DPPH IC_{50} değeri 9,92 µg/mL ve ABTS IC_{50} değeri 0,70 µg/mL olarak ortaya konmuştur (138).

Menta türlerinin metanol/diklorometan ekstreleri üzerinde yapılmış bir çalışmada ise rosmarinik asit, *p*-hidroksi benzoik asit ve şiringik asit yüksek miktarda tespit edilmiş olup ekstrelerin DPPH ve ABTS radikallerini giderme ile FRAP kapasitesi ölçülmüştür. Elde edilen en düşük DPPH IC_{50} değerleri 8-9 µg/mL, ABTS IC_{50} ise 3-4 µg/mL arası olup yüksek aktiviteye işaret etmektedir. FRAP kapasitesi için elde edilen en yüksek, dolayısıyla en etkili değer 6-7 µmol Troloks eşdeğeri/mg ekstre olarak hesaplanmıştır (170). *Origanum* türlerinin *n*-butanol ekstrelerinden izole edilen biyoaktif bileşiklerin arasında 3,4-dihidroksibenzoik asit, eriyodiktyol, luteolin ve rosmarinik asit bileşikleri DPPH ve ABTS radikallerini giderme ile FRAP ve CUPRAC kapasiteleri bakımından yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (171).

2.3.3. Antienflamatuvar Aktivite

Terim olarak enflamasyon, Latincede *inflammare* (ateşe vermek) kelimesinden türemiştir. Kadim zamanların Romalı ansiklopedisti Cornelius Celsus ‘De Medicina’

eserinin III. kitabında “Enflamasyonun belirtileri dörttür: kızarıklık ve ısı ve acı ile gelen şişme” (172) diye detaylandırmıştır. Enflamasyon genel olarak doku yaralanmaları, mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar veya toksik kimyasallar gibi uyaranlara karşı karmaşık bir biyolojik tepki olarak tanımlanır. Sonrasında bu tanım genişletilip spesifik olmayan bağışıklık sistemi tepkisinin bir parçası şeklinde ele alınmıştır. Belirtileri arasında kan akışında artış, hücre metabolizmasında yükselme, vazodilatasyon, çözünür mediyatörlerin salınması ve sıvı ile hücresel inflüksün ekstravazasyonu sıralanmıştır (173).

Güncel olarak kapsamlı bir şekilde tanımlanacak olursa, ilerlemesini önlemek ve doku hasarını onarmak için zararlı bir ajanın ortadan kaldırılması amacıyla iç veya dış uyaranlara bağlı olarak dokuda oluşturulan lokal veya sistemik bir reaksiyondur. Ajanlar çok geniş bir yelpazeyi kapsamakta olup virüs veya bakteri gibi patojenler, dokuyu tahriş eden yabancı cisimler ve radyasyon, alkol ve otoimmünite gibi kaynaklardan kimyasal ajanlar örnek olarak verilebilir. Enflamasyonu uyaran bu ajanlar ilk aşamada ancak akut enflamasyon şeklinde etki gösterse de sürekli maruz kalınması durumunda kronik enflamasyon gelişmektedir (174).

Mekanizmanın işlemesinde hem doğuştan gelen ve hem de sonradan kazanılmış (adaptif) bağışıklık sistemleri rol oynar. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi hızlı fakat spesifik olmayan bir şekilde yanıt verirken, adaptif bağışıklık sistemi “hafıza” kapasitesinden kaynaklı daha önceki enfeksiyonlara karşı spesifik bir yanıt verebilmektedir (175).

Enflamasyon sürecinin ilk adımı enfeksiyon veya hasarın uyarılmasını içerir. Bu, patojen kaynaklı moleküler modeller (PAMP – pathogen-associated molecular patterns) veya hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMP – damage-associated molecular patterns) ile gerçekleşmektedir. İkinci aşamada bu uyaranların reseptörler aracılığı ile tespit edilme süreci gelişmektedir. PAMP’lar için genellikle membran içindeki TLR (Toll-Benzeri Reseptörleri) ve DAMP için hücre içindeki NLR (NOD-Benzeri Reseptörler) söz konusu uyaranların algılanmasında büyük rol oynamaktadır. Uyaranlara karşı sinyal iletim yolaklarının aktifleşmesi, sitokin ve kemokin denilen mediyatörlerin üretimine yol açmaktadır (176).

Mediyatörler arasında tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin-1β (IL-1β), makrofajların ve nötrofillerin lokal aktivasyonuna yol açma özelliklerine sahiptir, ancak

büyük miktarlarda salınmaları durumunda karaciğerden akut faz proteinlerinin uyarılması, trombositlerin aktivasyonu, ateş, yorgunluk ve anoreksi gibi endokrin etkiler de yaratabilmektedirler. Sitokinler damar geçirgenliğini arttırmak ve bağışıklık hücrelerinin enfeksiyon bölgesindeki dokulara girişini kolaylaştırmak için endotel hücreleri aktive ederler. Ancak aynı zamanda kılcal sızıntıya, vazodilatasyona ve hipotansiyona da yol açabilirler. Kemokinlerin ana işlevi, patojenlerin fagositozunda ve öldürülmesinde çok önemli bir rol oynayan nötrofiller de dahil olmak üzere enfeksiyon bölgesine ek bağışıklık hücrelerini toplamaktır (177).

Kanla taşınan nötrofiller ve monositler enflamasyon bölgesine geldiklerinde beraberlerinde protein açısından zengin bir sıvı ile bölgeye nüfuz ederek ödemi (şişmeyi) artırırlar. Mast hücreleri ve dokuda yerleşik makrofajlar, vazodilatasyon ve artan damar geçirgenliği de dahil olmak üzere damar sistemi üzerinde hızlı etkileri olan histamin, lökotrienler ve prostaglandinler üreterek bu akışı desteklerler. Nötrofiller, spesifik olmayan ve hem patojene hem de konakçıya zarar veren ROT, RKT ve çeşitli proteazlar da dahil olmak üzere toksik bileşikler salgılarlar (176,178,179). Kan dolaşımında, aktive edilmiş monositler ve nötrofiller, salgıladıkları sitokinlerle hipotalamusa etki ederek hastalık belirti ve semptomlarına (uyku hali, yorgunluk, ateş) aracılık eden prostaglandinlerin salınımını uyarırlar (177).

Akut enflamatuar yanıt, tetikleyici durum ortadan kaldırıldığında, enfeksiyon temizlendiğinde ve hasarlı doku onarıldığında sonlanır. Enflamatuvar yanıtın sona ermesi ve homeostatik duruma geri dönüş, iyileşme olarak bilinen aktif ve sistematik bir süreçtir. Enflamasyonu tetikleyen prostaglandinlerden antienflamatuvar olan ve iyileşmeyi indükleyen lipoksinlere geçişi de dahil olmak üzere, iyileşmenin temel mekanizmaları birçok çalışmada detaylandırılmıştır. Sonuç olarak nötrofilden monosite geçiş ile ölü hücreler ve diğer kalıntıların temizlenmesi sonrasında etkilenen bölgede doku onarımı gerçekleşir. Tetikleyici ajanların ortadan kaldırılamaması durumunda süreç devam eder ve yeni özellikler kazanır. Nötrofiller yerini makrofajlara ve enfeksiyon durumunda adaptif sisteme karakteristik olan T hücrelerine bırakırlar. Bu hücrelerin etkileri halen yetersiz kalırsa, granülomların ve tersiyer lenfoid dokuların oluşumunu içeren, kalıcı patojenlere ek olarak otoimmün tepkiler veya parçalanamayan yabancı cisimler gibi diğer doku hasarı ajanlarından kaynaklı kronik bir enflamatuvar durum ortaya çıkar (178,179).

Herhangi bir fizyolojik süreçte olduğu gibi enflamasyon sürecinde de birçok protein ve enzim aktif olarak görev almaktadır, ancak tezimizin çalışma konularından birisi olan siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) enzimlerini ilgilendiren süreçler daha detaylı şekilde ele alınacaktır. Bu enzimler lipit türünden mediyatörler veya eikosanoidlerdir. Bunlar ayrıca araşidonik asit yolağı ile yakından alakalı olup steroid olmayan antienflamatuvar ilaçların etki mekanizmaları arasındadır. Doku hasarı sırasında membranlardaki fosfolipitler fosfolipaz A_2 (PLA_2) enzimi etkisiyle araşidonik asit ve lisofosfolipite dönüşmektedir. Lisofosfolipitler astım, anafilaksi ve böbrek enflamasyonunda etkili olan trombosit etkinleştirici faktörün (PAF) oluşumunda rol oynarlar. Araşidonik asit ise COX enzimleri aracılığıyla ilk olarak prostaglandin endoperoksit H_2'ye dönüşür, bu da prostaglandin I_2 (veya prostasiklin), tromboksanlar (örneğin A_2 ve B_2) ve birkaç önemli prostaglandin (örneğin PGD_2, PGE_2 ve PGE_2F) türü mediyatörün öncüsü işlevini görür (174,180).

Yukarıda bahsi geçen mediyatörler kan damarı geçirgenliğinin artmasından, kan damarlarının genişlemesinden, granülositlerin kemotaksisinden, kıkırdak bozulmasından ve B- ile T-lenfositlerin çoğalmasından tamamen veya kısmen sorumludur. Lökotrienler ve prostaglandinler, enflamatuvar hücrelerin (nötrofiller ve makrofajlar) aktivasyonunda ve diğer mediyatörlerin salgılanmasında (örneğin, mast hücreleri ve bazofillerde histamin salgılanması; trombositlerde serotonin salgılanması) kritik bir rol oynarlar (181).

COX-1 ve COX-2 olarak adlandırılan iki COX izoformu bulunur. COX-1 ve COX-2 neredeyse aynı üç boyutlu yapılara sahip olmalarına rağmen kodlayan genleri farklı kromozomlar üzerinde yer alırlar. Dolayısıyla hücresel, genetik, fizyolojik, patolojik ve farmakolojik profil açısından farklılaşırlar. COX-1 enziminin homeostazın sağlanmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir; vasküler homeostaz, renal ve gastrointestinal kan akışının sürdürülmesi, böbrek fonksiyonu, bağırsak mukozal proliferasyonu, trombosit fonksiyonu ve antitrombogenez gibi fizyolojik rolleri üstlenmektedir. COX-2 enzimi ise enflamasyon anında indüklenerek iltihaplanma, ateş, ağrı, omurilik ağrısı uyaranlarının iletilmesi, mitogenez (özellikle gastrointestinal epitelyumda), vasküler hemodinamikler, trabeküler kemik birikimi, ovülasyon ve doğum sırasındaki uterus kasılmaları gibi fizyolojik işlevlerin bir faktörüdür (181,182).

Enflamasyon tedavisi kompleks ve çok faktörlü bir yaklaşım gerektirmektedir. Mevcutta glukokortikoitler ile steroit olmayan antienflamatuvarlar pazarlanan ilaçlar

arasındadır. Glukokortikoitler sentetik steroitlerdir ve vücutta oluşan doğal steroitlere dayanırlar. Hidrokortizon, kortizon, beklometazon, betametazon, budesonid, deksametazon ve metilprednizolon bu ilaç grubunun örnekleri arasındadır. Antienflamatuvar etki glukokortikoit reseptörüne bağlanmaları ile gerçekleşir. Bu bağlanma sonucunda lipokortin (anneksin-1) üretilerek PLA_2, COX-1/COX-2 enzimleri ve lökosit enflamatuvar yanıtın inhibisyonu gerçekleşir. Glukokortikoitlerlerin etkinliği kanıtlanmış olsa da uzun süreli kullanımları immünosupresyon de dahil sistemik yan etkilere neden olmaktadır (183–185).

Steroit olmayan antienflamatuvar ilaçlar (NSAID) arasında aspirin, ibuprofen, indometasin, naproxen, proxicam, diklofenak ve metil salisat gibi örnekler bulunmaktadır. Temelde eikosanoit grubu mediyatörlerin engellenmesine dayanırlar ve spesifik olarak mekanizmaları prostaglandin inhibisyonu üzerinden ilerler. Prostaglandinler ne kadar enflamasyonda ağrı ve ateşin mediyatörleri olsalar da midenin korunması ile trombosit ve pıhtılaşmayı desteklemek gibi önemli fizyolojik görevleri de tespit edilmiştir. NSAID kullanımında mide ülserleri ve kanamanın indüklenmesi gibi yan etkilerin sebebi ise COX-1 inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Celecoxib ve refecoxib gibi sadece COX-2'yi inhibe eden selektif inhibitörlerin (COXIB) gelişmesi umut verici olsa da kardiyovasküler sistemde yan etkileri dolayısıyla refecoxibin piyasadan geri çekilmesi yeni tedavilerin geliştirilmesinin önemini tekrardan hatırlatmıştır (185–187).

Birçok araştırmada araşidonik asit yolağı hedef alınarak siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerinin farklı izoformlarının inhibisyonunun istenilen antienflamatuvar aktivite için önemli olduğu vurgulanmıştır. Bitkisel ilaç ekstrelerinin, fitokimyasalların ve doğal ürün kaynaklı bileşiklerin antienflamatuvar aktivitesi uzun yıllardır araştırılmaktadır. Fitokimyasallar arasında örneğin alkaloitler, terpenoitler, flavonoitler, saponinler ve yağ asitleri gibi ürünlerin farklı sınıflarının potansiyel COX-2 inhibitörleri olduğu belirtilmiştir (188). Lipoksijenaz (5-LOX) inhibitörleri üzerinde de benzer incelemeler yapılmış olup kumarin türevleri, benzokinonlar, fenolikler, triazol kafeik asit analogları vb. gibi bitki bazlı doğal ürünlerin farklı sınıflarının potansiyel 5-LOX inhibitörleri olarak faydalı olabileceği belirtilmiştir (189).

Epigallokateşin (190), kafeik asit (191), kikorik asit (192), apigenin (193,194), eriyodiktoyl (194), kateşin (195) ve kuersetin glikosidi olan hiperosit (196,197) gibi

fenolik bileşiklerin COX-2 inhibisyonu ve enflamasyon yolağının diğer bileşikleri üzerine etkinlikleri ortaya konmuştur. Kuersetin ve türevlerinin antienflamatuvar etkinlikleri de birçok çalışmanın konusu olmuştur. Kuersetin tedavisinin, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)- (p85), COX ve LOX üretimini azaltabildiği ortaya konmuştur (198). Choi ve arkadaşları, *Cratoxylum formosum*'dan izole edilen kuersetin ve kuersetin glikozitlerinin (izokuersetin, kuersetin-3-O-α L-ramnosit ve kuersetin-3-O-β-D-galaktopiranosit (hiperin)) antienflamatuvar etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Kuersetin, türevlerine kıyasla NF-κB aktivasyonu, NO üretimi ve NOS ekspresyonunu baskılama konusunda daha etkiliydi. Ayrıca kuersetin ve kersitrinin, COX-2'nin protein seviyesini doza bağlı bir şekilde azalttığını gözlemlemişlerdir (199).

2.3.4. Doğal Ürünlerin Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon, arzu edilen doğal ürünleri ham maddelerden ayırmanın ilk adımıdır. Genellikle çözücü ekstraksiyonu, damıtma yöntemi, presleme, süblimasyon ve bunların türevleri gibi yöntemler baz alınmaktadır. Çözücü ekstraksiyonu en yaygın kullanılan yöntem olup farklı polariteye sahip organik çözücüler, su ve bunların karışımları kullanılmaktadır. Çözücü ekstraksiyonu temelde ham maddeye nüfuz ederek istenilen maddeleri diğer bileşiklerden ayıran yöntemdir. Ekstraksiyonu etkileyen faktörler arasında çözücü türü ve içeriği, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon pH'sı yer almaktadır ve bunların optimum şartlarda gerçekleştirilmesiyle ekstraksiyon verimliliği artırılabilmektedir. Ekstraksiyon yöntemi ayrıca ham maddenin ve ürünün niteliğine de bağlıdır. Her yöntemin kendi sınırlamaları ve avantajları olduğu için doğal ürünlerden biyoaktif bileşikleri elde etmek için tek tip ve kesin bir ekstraksiyon yöntemi olması tercih edilmez (85,200).

Tıbbi bitkilerin ekstraksiyon işlemleri için çeşitli çözücüler kullanılmaktadır. Çözücü seçimi, ekstrakte edilecek bileşiğin kimyasal yapısına ve polaritesine dayanmaktadır. Fenoliklerin, flavonoitlerin ve antosiyaninlerin çoğu suda çözünebilen maddelerdir. Dolayısıyla su, etanol, metanol, propanol, aseton ve bunların sulu karışımları gibi polar ve orta polariteye sahip çözücüler ekstraksiyon için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Karotenoitler gibi yağda çözünebilen maddeler için ise heksanın aseton, etanol, metanol ile karışımları veya etil asetatın aseton, etanol, metanol ile karışımları gibi yaygın organik çözücüler ekstraksiyon için kullanılmışlardır (201).

Ekstraksiyon yöntemleri arasında konvansiyonel ve ileri teknolojik yöntemlerin kullanıldığı metotlar yer almaktadır. Konvansiyonel yöntemlere örnek olarak maserasyon, dekoksiyon, perkolasyon ve soxhlet ekstraksiyonu verilebilir. Ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga ekstraksiyonu, süper kritik sıvı ekstraksiyonu, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemler ise ileri teknoloji veya konvansiyonel olmayan yöntemler arasındadır. İleri teknoloji yöntemler ekipman açısından maliyetli olup tezimiz için tercih edilmemiştir (202).

En yaygın konvansiyonel yöntemlerden biri olan maserasyon, malzemenin çözücü ile ıslatılarak sürekli karıştırılması ile gerçekleştirilir. Isıtmaya dayalı bir yöntem olmadığı için ısıya hassas maddelerin etkilenmemesi ve karmaşık ekipman gerektirmemesinden kaynaklı tercih sebebidir. Ancak tek seferde tüm bileşiklerin elde edilemeyeceği için birkaç kez saf solvent ile ekstraksiyon gerektirmesinden kaynaklı yüksek solvent tüketimi, uzun ekstraksiyon süreleri ve düşük ekstraksiyon verimi gibi dezavantajlara sahiptir (203).

Dekoksiyon, bitki örneklerinin kısa bir süreliğine – genellikle 1 saat – kaynatılmasıdır. Bu yöntem çoğunlukla ham ilaçlardaki ısıya dayanıklı ve suda çözünebilen fitokimyasallar için uygundur. Perkolasyon yöntemi, toz haline getirilmiş numunenin kapalı bir sisteme yerleştirilmesini ve çözücünün yukarıdan aşağıya doğru kademeli olarak damlatılmasını içermektedir (204). Perkolasyon yönteminin sorunları, maserasyon yönteminin sorunlarına benzerdir; zaman alıcı ve büyük çözücü hacimlerinin kullanılması. İnfüzyon, numunenin su veya organik bir çözücü içinde bekletilerek biyoaktif maddelerin ekstraksiyonudur. Bu, bitki örneğinin kaynamış veya soğuk su kullanılarak daha kısa bir süre boyunca yumuşatılması ve bir süre boyunca solvent içinde demlenmesine izin verilmesiyle yapılır. Bu teknik çoğunlukla polifenolik bileşikler veya az çözünen maddeler içeren bitki materyalleri için kullanılır (203).

Soxhlet ekstraksiyonu diğer konvansiyonel yöntemler ile kıyaslandığında daha az çözücü ve zaman gerektirirken, işlem maliyeti de çok düşüktür. Ek olarak ekstraksiyon cihazının kullanımı kolaydır, otomatik bir sisteme dayalıdır ve iyi bir verim oranıyla başlangıç ve yüksek sayıda ekstraksiyon işlemleri için uygundur (205). Soxhlet ekstraksiyonundaki geri akış sistemi, taze solventin saf bir şekilde geri dönüşümüyle numunedeki maddelerin tamamen elde edilmesini sağlar.

Soxhlet düzeneği eş zamanlı bir kaç örneğin ekstraksiyon süreci için kullanılabilmektedir. Örnek filtre kağıdına sarılarak veya soxhlet düzeneğine uygun üretilen filtre materyalinden oluşan tüpler içine koyularak üst tarafta bulunan hazneye yerleştirilir. Aşağıda cam balonda bulunan saf çözücü ısıtılarak buharlaşır. Buharlaşan çözücü en tepede ve içinden soğuk su geçen yoğunlaştırıcı ile teması sayesinde örneğin bulunduğu hazneye damlamaya başlar. Bu hazne tam dolduğunda, bypass kolunun seviyesine ulaşır ve sifon oluşmasıyla çözücü, ekstrakte ettiği maddelerle beraber tekrar cam balona boşalır. Bu döngü 48 saate kadar uzatılabilmektedir. Bu yöntemde ısının kullanılması çözünürlüğü ve difüzyonu arttırsa da (200) uzun ekstraksiyon süresi boyunca ısıya hassas bileşikler bozulabilmektedir (22,206). Dolayısıyla olabildiğince düşük kaynama derecesine sahip çözücülerin seçimi önemlidir.

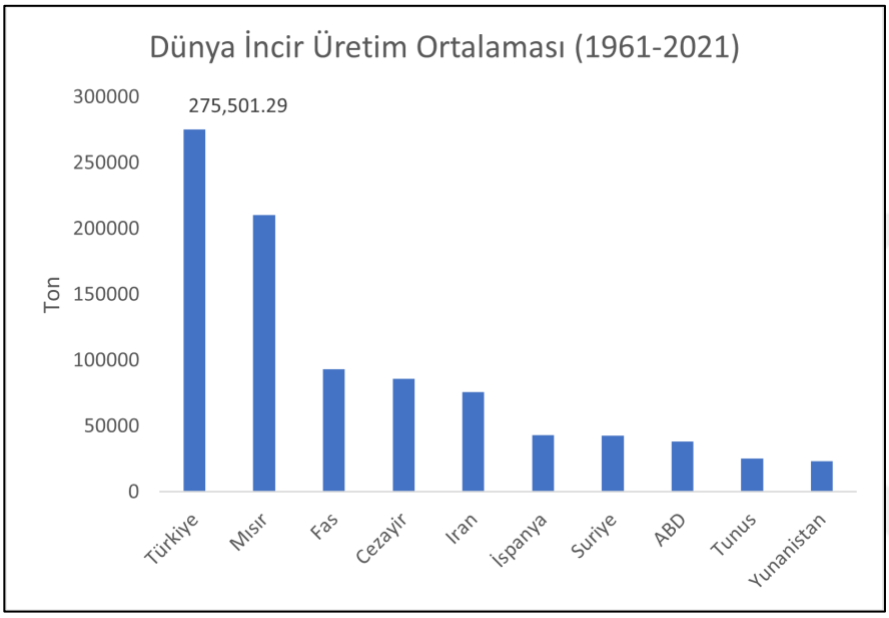
2.4. BİTKİLER

2.4.1. *Ficus carica* L. (İncir)

Tarih kaynaklarında genellikle arpa ve buğday gibi tahılların ilk evcilleştirilen türler olduğu geçse de 2006 yılında yapılan ve Science dergisinde yayınlanan bir araştırma makalesi, incir ağacının kalıntılarının yaklaşık 11.000 yıl öncesine dayandığı ve tahıllardan yaklaşık 1000 yıl öncesinde bile ekimi yapıldığına işaret etmektedir (207). Farklı dinlerin kutsal metinlerinde de incire yer verilmiştir, neredeyse insanlığın ömrüne yakın bir ömrü olmasından dolayı antik zamanlardaki farklı sosyal ve bilimsel iklimlerde çeşitli amaçlar için kullanılmıştır. Bu tarihsel derinliğinin sebeplerinden bazıları, çok yıllı esnek bir tür olması ve insana genel olarak sağladığı yarardır.

Urticales takımından Moraceae familyasında bulunan *Ficus* L. cinsi yaklaşık 800'e yakın türe sahiptir. İncir yetiştiği bölge ve iklime göre ufak çalımsı bitkilerden büyük ağaçlara kadar çeşitli morfolojik özelliklere sahip olabilmektedir (208). *F. carica*'nın kaynağı Himalaya, Bengal ve Hindistan olmasına rağmen tüm dünyada kültürü yapılan ticari bir ürün olup, Türkiye'de de en çok ekimi yapılan türdür. Global Biodiversity Information Facility (GBIF) veri tabanına göre Türkiye'de kayıt altına alınan türlerin çoğunluğu *F. carica* L.'dir (209). Ayrıca "Türkiye Bitkileri Geleneksel İlaç Rehberi" eserinde *F. carica* subsp. carica, *F. carica* subsp. rupestris alt türleri ve *F. elastica* türüne yer verilmiştir (210).

ABD Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 1961-2021 yıllarının ortalamasına bakıldığında dünya incir üretiminde Türkiye birinci sıradadır (211). 2021 yılına ait verilerde Türkiye tarafından 320.000 ton incir üretilmekte olup hasat alanı 54.698 hektardır. FAO kaynağından elde edilen verilerin görseli aşağıda Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4: Dünya incir üretimi

TÜİK verilerine göre Türkiye'de 306.499 ton incir meyvesi üretilmekte olup, bu üretimi mümkün kılan 9.746.562 adet ağaç bulunmaktadır (212). Sofralık, kurutmalık ve reçellik gibi çeşitli amaçlar ile ilişkilendirilen meyvelerin arasında en yaygın olanlardan bazıları sarılop, bursa siyahı, sultan selim ve bardak gibi çeşitlerdir. Türkiye'de incir üretiminin %86'sı Aydın, İzmir, Bursa, Mersin ve Hatay illerinde yapılırken, en yüksek üretici il %63.5'lik bir pay ile Aydın'dır (213). İstatistiklerin gösterdiği üzere, dünya incir üretim haritası üzerinde önemli bir yere sahip olan Türkiye, aynı zamanda bu bitkinin geleneksel kullanımını aydınlatan birçok etnobotanik çalışmaya da ev sahipliği yapmaktadır.

Etnofarmakoloji bağlamında bakıldığında, farklı kültürlerin geleneksel tıp uygulamalarında incirin kullanımına sıkça rastlanmaktadır. Örneğin Yunanlarda farenjit için kullanımı (214,215), Romalılarda meyvelerin solunum yolu hastalıkları ve antitüsif

ajan olarak, lateksin ise siğil tedavisinde kullanımı, tarih kaynaklarında geçmektedir (216). Yaşlı Plinius (Pliny the Elder) "*Doğal Tarih*" adlı eserinde incir üzerine yüz on bir gözlem yaparak "bu meyve gençliği canlandırır, yaşlıların sağlığını iyileştirir ve kırışıklık oluşumunu geciktirir" şeklinde beyanda bulunmuştur (217). İbn-i Sina, *Kanun fil Tıbb* isimli meşhur eserinde incirin şişikler, farenjit, parotit, öksürük ve kabızlık için kullanımına yer vermiştir (218). Aynı şekilde Razi'nin *Al-Hawi fi Al-Tıbb*'ında idrar söktürücü etkisinden dolayı kullanımı zikredilmiştir (219).

Daha güncel etnobotanik araştırmaların sonuçlarına göre, küçük Himalaya sakinleri *Amaranthus viridis* ile incir meyvelerini göz problemleri için ve laksatif olarak kullanmıştır (220). Arjantin Kordoba eyaletinin iç kısımlarında, ısıtılmış kuru meyvelerin cilt püstülleri ve fronküllere doğrudan uygulandığında olgunlaşmasını hızlandırdığı ve lateksin siğil tedavisinde kullanıldığı kaydedilmiştir (221,222). İtalya'nın Abruzzo bölgesinde ise meyveler, *Larus nobilis* yaprağı ve 1 tane soyulmuş elma ile dekoksiyon olarak idrar yollarında antiseptik, bronşlarda ekspektoran ve kan basıncını düşürücü olarak kullanılmıştır. Yine *L. nobilis* ve limon kabuğu ile kan akışını düzenlemek için kuru meyvelerin dekoksiyonu; öksürüğe karşı *Papaver rhoeas*'ın tohum kapsülleri ve bal ile meyvelerin dekoksiyonu; karın ağrısı için soyulmamış badem ile kurutulmuş meyvelerin kullanıldığı rapor edilmiştir (223,224).

Farmakopeler incelendiğinde; Fransız Farmakopesinde *F. carica*'nın taze, genç ve yapraklı dallarının ana tentürü homeopatik preparatlar altında geçmektedir. İngiliz Farmakopesinde incir, Bitkisel İlaç ve Bitkisel İlaç Preparatları başlığı altında geçmektedir, buradaki tanımı ise "*Ficus carica* L.'nin güneşte kurutulmuş sulu meyvesi" şeklinde yapılmıştır. *F. carica*'nın kabız tedavisinde laksatif olarak ve disanteri ile enterit tedavisindeki kullanımından bahsedilmektedir (221).

Türkiye'de incirin kullanımına ilişkin (*Ficus carica* L.) taranan etnobotanik çalışmaların bir özeti aşağıda Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2: Türkiye *Ficus carica L.* etnobotanik çalışmaları

Bölge	Bitki kısmı	Kullanım alanı	Yöntem	Kaynak
Çatalca	Yapraklar	Hemoroit	Soğuk dekoksiyon (H)	(225)
	Meyveler	Hepatit	Sirke ile kesilmiş soğuk (D)	
	Meyveler	Çıbanlar	(H)	
	Lateks	Siğil ve nasırlar	(H)	
İzmir	Lateks	Siğiller	Ezilerek günde 1 veya 2 kez (H)	(226)
Alaşehir	Lateks	Siğiller	Taze olarak	(227)
Torosların iç kesimleri	Lateks	Siğiller ve akrep sokmaları	(H)	(228)
	Meyveler	Çıbanların olgunlaşmasını hızlandırmak	Taze meyve bölünerek çıbana uygulanır (H)	
Doğu Anadolu illeri	Kuru meyveler	Göğüs iltihabı	Kuru nemlendirilmiş, 3-4 gün (H)	(229)
	Kuru meyveler	Diyare	Sütle birlikte (D)	
Akdeniz bölgesi	Meyveler	Öksürük, balgam söktürücü	Bir bardak sütün içine 3-4 adet taze veya kuru meyve rendelenip kaynatılır, günde 2 kez içilir (D)	(230)
Turgutlu, Manisa	Lateks	Siğil	(H)	(231)
	Yapraklar	Egzama	İnfüzyon (D)	
	Filizler	Hemoroit	İnfüzyon (D)	
	Lateks	Diş ağrısı	Direk dişlere uygulanır	
	Lateks	Kulak ağrısı	Kulağa damlatılır	
	Kuru meyveler	İnfertilite	Küçük parçalara kesilerek su, un ve süt ile pişirilir, vajinal bölgeye uygulanır	
Edremit körfezi, Balıkesir	Lateks	Siğiller, arı ve böcek sokmaları	Taze (H)	(232)
Gönen, Balıkesir	Yapraklar	Egzama	Suda kaynatılır, buhar banyosu	(233)
	Yapraklar	Hemoroit	Ezilir, bal ile karıştırılır (D), günde 3 kaşık	
	Yapraklar + *Arbutus unedo* yaprakları + Or*iganum vulgare* subsp. + *Allium sativum* soğancıkları	Hemoroit	Ezilier, günde 2-3- kez uygulanır ve bez ile sarılır (H)	
Hatay	Yapraklar	Ağrı kesici	Dekoksiyon (D)	(234)

(H) – Haricen, (D) – Dahilen

Son olarak ürün bazında bakıldığında ise, İsviçre'deki Swissmedic tarafından onaylanmış ve Zeller firması tarafından üretilmiş laksatif ürünlere erişmek mümkündür (235). Alman Euromed firması tarafından üretilen ABAlife® incir meyvesi ekstresi (absissik asit üzerinden standardize edilmiş), kan şekerini dengelemek için kullanılmaktadır (236,237). Türkiye'de Berko ilacın ürünü olan CUCA®, takviye edici gıda olarak satılmakta olup, herhangi bir endikasyon belirtilmemiştir. Piyasada mevcut benzer ürünler, incirin diyabete bağlı durumlarda ve laksatif olarak veya takviye edici gıda olarak kullanımını içermektedir.

İncir ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda besin bileşenleri olarak mineraller (kalsiyum, demir, potasyum), vitaminler (tiyamin ve riboflavin) ve amino asit içeriği

bakımından zengin bir kaynak olduğu rapor edilmiş ve sodyum, yağ ve kolesterol içermeyen fakat buna karşılık lif ve antioksidan bakımından zengin olduğu için tavsiye edilen bir besindir (238,239). İncir doğal antioksidan olarak bilinen fenolik bileşikler bakımından da zengin bir sekonder metabolit kaynağıdır. İncirde bulunan fenolik bileşikler hakkında literatürde çeşitli çalışmalardan birinin ortaya koyduğu sonuçlara göre, kuru veya taze meyve ve kabuklarında bulunan fenolik asitlerden saptanabilenler gallik asit, sirinjik asit, benzoik asit, ferulik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve sinnamik asittir. Flavonoitler bakımından ise rutin, kuersetin-3-*O*-rutinosit ve epikateşin mevcuttur. Meyvelerde bulunan antosiyaninler çoğunlukla siyanidin-3-*O*-glukosit ve siyanidin-3-*O*-rutinosittir (239).

Taze ve kuru meyvelerde toplam fenolik, flavonoit ve antosiyanin içerikleri tür, kurutma yöntemi, renk ve işleme yöntemine göre değişmektedir. Sekonder metabolit içeriği açısından değerlendirildiğinde genel olarak flavonoitler meyve ve yapraklardan, kumarinler yaprak ve köklerden, steroller yapraklardan ve triterpenoidler lateks (sterol türevleri olarak) ve köklerden elde edilmiştir. Uçucu yağlardan çoğunluğunun monoterpenoit ve seskiterpenoit olarak mevcut olduğu rapor edilmiştir (221,240).

2010'da yayınlanan incir üzerine yazılan kitapta belirtildiği üzere meyve veren ağaçlar yaprakları toksik içeriklerinden kaynaklı gıda olarak tüketilmekten uzak olup ilaç olarak kullanılmaya daha yakındırlar. Bu kullanım potansiyeli, meyvelere kıyasla yapraklarda bulunan daha güçlü antioksidan içeriğe bağlanmaktadır (241). Lateksde antioksidan etki ve asetilkolinesteraz inhibisyonu (242), antifungal ve antihelmintik etki (243,244), antikarsinojenik etki (245–247) saptanmıştır. Meyve, yaprak ve lateksin diyabetik sıçanlarda antioksidan etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (248). LDL oksidasyonunu engellediği (240), ve çeşitli kanser hasarlarında proliferasyonu inhibe edici (246) etkileri de literatürde yer almaktadır.

2.4.2. *Laurus nobilis* (Defne)

L. nobilis, Lauraceae familyasına ait, çok yıllık çok dallı, aromatik, geniş yapraklı, yaprak dökmeyen, çiçeği ve meyvesi olan bir ağaç veya büyük bir çalıdır (249,250). Akdeniz havzasında yerli bir bitki olsa da Kuzey Afrika, Batı Asya ve Güney Avrupa'da yaygın olarak bulunmaktadır. Antik Yunan ve Roma döneminde barışın sembolü, askeri ve spor müsabakalarında zaferi sembolize eden bu bitkinin çapraz şekilde yerleştirilmiş yaprakları oyunları kazananların başlarına yerleştirilen taçlarda da görülebilir. Bu tacı

giyenler kraliyet saygısına layık asiller olarak adlandırılırdı, günümüzde de Nobel ödülü alanların “laureate” olarak adlandırılmaları aslında defne yaprağını taşıyan ve saygıyı sembolize eden “tacı” giymeye layık olmalarından kaynaklıdır (250).

Binlerce yıldır yemek pişirmede ve birçok geleneksel uygulamada kullanılan temel bir bitkidir. *Laurus* cinsinin tür sayısı halen net olmasa da Kew Royal Botanical Garden ve World Flora Online gibi bitki türlerini derleyen web sayfalarında resmi olarak 3 tür kabul edilmektedir; *L. azorica, L. nobilis* ve *L. novocanariensis*. Çoğunlukla Güney Akdeniz bölgesi, Doğu Asya, Güney ve Kuzey Amerika, Balkanlar ve Küçük Asya'nın subtropik ve tropik bölgelerinde yetişmektedir. Türkiye, yıllık 7000 ile 7500 ton *L. nobilis* ile üretimin neredeyse %97’sini karşılayarak yaklaşık 64 ülkeye ihraç etmektedir (250,251). Orman Genel Müdürlüğü (OGM)’nin 2015-2017 yıllarında dış ticaret istatistiklerine göre yaklaşık 35 milyon dolar getiri ile Türkiye'den yaklaşık 12.000.000 kg defne yaprağı ihraç edilmiştir (252,253).

Defne, İbn-i Sina’nın *Kanun fil Tıbb* eserinde idrar söktürücü ve mesane taşlarını kırıcı bir terkibinde yer almaktadır. Terkipte defneye ilaveten *Acorus calamus* L. (köksap), *Apium graveolens* L. (tohumlar), *Carum carvi* L. (meyve), *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl. (kabuk), *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. (gövdenin doğal çatlaklarından salgılar), *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl. (odun), *Crocus sativus* L. (stigma), *Cuminum cyminum* L. (meyve), *Cymbopogon jwarancusa* (Jones) Schult. (tüm bitki), *Piper longum* L. (meyve), *P. nigrum* L. (meyve), *Portulaca tuberosa* Roxb. (tohum), *Saussurea hypoleuca* Spreng. DC ve bal yer almaktadır (219).

Yapraklar geleneksel olarak yüksek kan şekerini düşürmek, mantar ve bakteri enfeksiyonlarını azaltmak, mide-bağırsak ağrılarını ve şişkinliği gidermek için kullanılmaktadır. Yaşlı Plinius, felç, spazmlar, siyatik, morluklar, baş ağrıları, nezle, kulak enfeksiyonları ve romatizma tedavisinde kullanımını belgelemiştir (250). Yapraklarının terletici, antiseptik ve mide üzerine etkileri, meyvesinin idrar arttırıcı ve dekoksiyonunun romatizmaya karşı etkisi, çekirdek yağının ise romatizma ağrılarını dindirici ve vücut parazitlerine karşı etkisi de literatür kaynaklarında geçmektedir (254).

Defne yaprakları geleneksel olarak günümüzde de orta ve güney İtalya’da 'Ricotto' veya 'Ricuotto' olarak adlandırılan ve solunum yolu ile mide rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılan preparatın bileşenleri arasındadır (255). Güney İtalya’nın Calabria bölgesinde yaprak dekoksiyonları sindirimi kolaylaştırıcı ve bağırsak ağrılarına karşı

kullanılırken yaprakların bal ve ıhlamur ile infüzyonu hafif sakinleştirici olarak kullanılmaktadır (256). İtalya'nın Maratea bölgesinde de yaprak dekoksiyonu bağırsak ağrıları için kullanılmaktadır (257). Yine Güney İtalya'nın Castelmezzano bölgesindeki İtalyan ve Zhurë/Ginestra bölgesindeki Arnavut topluluklarının defne yapraklarını sindirimi kolaylaştırıcı ve strese karşı kullandıkları tespit edilmiştir (258).

Kuzey batı İspanya'nın El Caurel bölgesinde meyvelerin dekoksiyonu şişkinliğe karşı, kızarmış meyveler ise karn ağrısı (kolik) için kullanılmaktadır (258). İspanya'nın Doğu Malorca bölgesinde yaprakları haricen merhem olarak antienflamatuar etkisi için kullanılmaktadır (259). Yunanistan, Thessaloniki'de yaprak ve meyvelerin şişkinlik, ishal, hazımsızlık, bağırsak iltihabı, bağırsak parazitleri, grip ve idrar söktürücü gibi kullanımları için infüzyon, baharat olarak, yıkama gibi yöntemler kaydedilmiştir (260). Fas'ın Ksar Lakbir bölgesinde yaprak ve meyvelerin yağı yüze direk uygulanır, yaprak ve meyvelerin infüzyonu dahilen karaciğer, pankreas ve sindirim sistemi için kullanılır ve yine yaprak ve meyvelerinin dekoksiyonu dahilen romatizma ağrıları için kullanılır (261).

Arjantin kuzeybatı bölgesinde kaydedilen kullanımında 250 mL'de iki yaprağın kaynatılması ve yemeklerden sonra içilmesi sindirim sisteminde etkilidir. Yine defnegillerden olan *Ocotea porphyria* yaprakları suda 1:1 oranda olacak şekilde 3 defne yaprağı ve 1 tutam kara mürver yaprak ve çiçekleri ile karıştırılır ve hazırlanan infüzyonu bağırsak şişkinliği ve ishal için günde 3 kez içilir (262). Meksika'nın kuzeydoğu bölgesinde de defne yapraklarının dekoksiyonları gastorintestinal ve kas-iskelet sistemi rahatsızlıkları için kullanılmaktadır (263). Türkiye de en fazla defne üreten ülke olarak farklı bölgelerde geleneksel kullanımlara ev sahipliği yapmaktadır. Bazı etnobotanik çalışmalar aşağıda Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3: Türkiye *Laurus nobilis* L. etnobotanik çalışmaları

Bölge	Bitki kısmı	Kullanım alanı	Yöntem	Kaynak
Alaşehir	Meyveler	Antiseptik	Ezilerek (H)	(227)
İzmir	Yapraklar	Ateş düşürücü, ağrı kesici	İnfüzyon, günde 2-3 kez 1 çay bardağı içilir, 3-5 gün boyunca (D)	(226)
	Yapraklar	Hemoroit, sindirim kolaylaştırıcı	İnfüzyon, günde 2-3 kez yemekten önce 1 çay bardağı içilir, 5-7 gün boyunca (D)	
	Meyveler	Antiseptik	Ezilerek (H)	
Akdeniz Bölgesi	Yapraklar	Öksürük	Dekoksiyon, çay olarak içilir (D)	(230)
	Sabit yağ	Bel fıtığı	Masaj yoluyla uygulanır (H)	
	Yapraklar	Diyabeti	Dekoksiyon, çay olarak içilir (D)	
	Sabit yağ	Romatizmal ağrı	Masaj yoluyla uygulanır (H)	
Turgutlu, Manisa	Yapraklar	Karın ağrısı	İnfüzyon (D)	(231)
	Yapraklar	Diş ağrısı	Ezilerek (H)	
Edremit körfezi, Balıkesir	Yapraklar	Kadınlarda kısırlık için	Dekoksiyon, günde 2 kez 1 çay bardağı içilir, 1 hafta boyunca (D)	(232)
Çatalca, İstanbul	Yapraklar	Diyabeti, böbrek ve mide rahatsızlıkları	Dekoksiyon (D)	(225)
	Yapraklar	Astım, boğaz ağrısı	İnfüzyon (D)	
	Yapraklar ve çiçekler	Kalp rahatsızlıkları	İnfüzyon (D)	
Hatay	Yapraklar ve meyveler	Ağrı kesici, diyabeti	Dekoksiyon (D)	(234)
	Meyve yağı	Hemoroit, kaşıntı, uyuz	Direk uygulanır (H)	
Marmaris, Muğla	Yapraklar	Karın ağrısı, grip, nefes darlığı	Dekoksiyon (D)	(264)
Espiye, Giresun	Yapraklar	Egzema	Kaynatılır, kompres olarak uygulanır (H)	(265)
Güce, Giresun	Yapraklar	İdrar söktürücü	Dekoksiyon, günde 1 kez içilir (D)	(266)
Gönen, Balıkesir	Goncalar	Karın ağrısı	Dekoksiyon (D)	(233)

(H) – Haricen, (D) – Dahilen

Japonya menşeli Tokiwaph firmasının LAURESH® ürünü *L. nobilis* yaprağından elde edilen ve seskiterpen lakton olan deasetil laurenobiyolid bileşiği üzerinden standardize edilmiş olup diş çürümesini önlemek için periodontal hastalıklara ve ağız boşluğunda bakteri üremesine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (267). 2017 yılında yayınlanan FFD monograflarında bitkinin Avrupa ve Türkiye'de endikasyon belirtilerek satılan preparatı olmadığı belirtilmiştir. Eser geniş bir şekilde defnenin *in-vitro* anlamda antimikrobiyal, antiviral, böcek kovucu, sitotoksik, asetilkolinesteraz inhibitör, antioksidan, antihiperlipidemik, antimutajenik, antihipersensitif, antiproliferatif etkilerini ve *in-vivo* anlamda antienflamatuvar, antinosiseptif, gastroprotektif, kan etanol düzeyi üzerine, antikonvülzan, hipolipidemik, antioksidan ve nöroprotektif etkilerini detaylandırmıştır (268). Genel olarak defnenin uçucu yağı ve yaprakları endikasyon belirtilmeden satılmakta olup çoğu ürünler gıda ve tarım bakanlığı onayında pazarlanmaktadır.

Defnenin değerli içeriğine atfedilen geleneksel kullanımı ve ticari önemi, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde çeşitli uygulama olanaklarına yol açmaktadır. Yapraklar, birçok ülke mutfağında, çorbalar, balıklar, etler, güveçler, pudingler, sirkeler ve içecekler için tatlandırıcı bir baharat olarak kullanılmak üzere toplanır ve gölgede kurutulur. Bu güzel kokulu yaprakların uçucu yağ bileşikeri ve meyvelerinden elde edilen sabit yağlar da kozmetik endüstrisinde kremlerde, parfümlerde ve sabunlarda kullanılmaktadır (254,269).

Yapraklardaki yağlar palizad ve mezofil hücrelerinde birikirler ve miktarları toplam ağırlık açısından %1-3 arasında değişmektedir. Uçucu yağlar arasında tespit edilen toplam 150 bileşikten en yüksek miktarda bulunan 1,8-sineolün yaklaşık miktarı %50-70 arasındadır (270–274). Farklı ülkelerin defne içeriği üzerine yapılan çalışmalarda 1,8-sineole ek olarak sabinen, α-terpinil asetat, linalool, α-pinen, α-terpineol, ve metil eugenol uçucu yağları tespit edilmiştir (275). Defne yapraklarındaki α-pinen ve β-pinen gibi bisiklik monoterpenler, lipofilik, insektisidal, sedatif, fungisidal ve antikarsinojenik etkilere sahiptir (275,276). Fenilpropen türevleri olan eugenol ve metil eugenol de yaprakların baharatlı aroması ile ilişkili olup antioksidan aktiviteye sahiptir (277). Genel olarak defne uçucu yağlarının antioksidan ve antibakteriyel özellikleri çokça çalışılmıştır (278–282).

Doğadan toplanan yabani türden ve ekimi yapılarak elde edilen türden yapraklar üzerine yapılan bir çalışmada sırasıyla karbonhidratlar (lif dahil), proteinler, yağlar ve kül makro besinler arasındaydı. Şekerler arasından fruktoz, glukoz ve sukroz tespit edilmiştir. Organik asitlerden oksalik asit ve malik asit her iki yaprak örneğinde tespit edilirken yabani yapraklarda ek olarak askorbik asit de saptanmıştır (283). Yapılan analizlerde sabit yağlardan palmitik asit, linolenik asit, linoleik asit ve laurik asit tespit edilmiştir (269,283).

Tezimizin konusu olan fenolik bileşik içeriği ile antioksidan ve antienflamatuvar aktivitesi literatür açısından incelendiğinde ise çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür. Yapraklarda hidroksisinnamik asitlerden kafeik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit, sinapik asit ve ferulik asit tespit edilmiştir (250). Yabani ve ticari defne yapraklarının metanol ekstreleri ve infüzyonları üzerinde yapılan bir çalışmada, çalışmamıza benzer şekilde HPLC-DAD ile fenolik bileşik profili incelenirken, örneklerin DPPH radikalini giderme aktiviteleri ve demir indirgeme

kapasiteleri de ölçülmüştür. Sonuç olarak ticari defne yapraklarının infüzyonları, metanolik ekstrelere ve yabani defne örneklerine kıyasla daha güçlü antioksidan etki ve daha yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu ortaya konmuştur (283).

2.4.3. *Platanus orientalis* L. (Çınar)

P. orientalis L., *Platanus* cinsi, Platanaceae familyasının 35 m'ye kadar ulaşabilen büyük, hızlı büyüyen ve yaprak döken bir ağaç türüdür. Doğu Akdeniz'den Orta Doğu'ya, Himalayalar'dan güneydoğu Sibirya'ya kadar yayılımı bulunmaktadır. Çok uzun ömürlü olan bu ağaç türü yüz yıllar boyu yaşayabilir; İstanbul Sarıyer'de Büyükdere çınarının yıkılmadan önceki yaşı düşünülürse 1000 yılı aşkın bir ömür ile tarihi bir anıt olarak günümüze kadar gelebilmektedir. Genel olarak kent içlerinde yol kenarlarında, park ve bahçelere ek olarak orman ve dere kenarlarında da görülmesi mümkündür (284,285).

İbn-i Sina ve Hakim Momen gibi hekimlerin eserlerinde çınarın diş ağrısı, diz ağrısı ve iltihap için analjezik ve antienflamatuvar etkileri gibi tıbbi kullanımlarına yer verilmiştir (286). Eski kaynaklarda da geçen bu bitki günümüzde halk tıbbında halen kullanılmaktadır. Yunanistan'ın Thessaloniki bölgesinde, çınar meyvelerinin kan dindirici, apseler, yanıklar, böbrek taşları ve prostat için haricen dekoksiyon yoluyla uygulanmaktadır (260). Pakistan'ın Battagram bölgesinde (Batı Himalayalar) çınarın gövde ve yaprakları ishal, dizanteri, göz hastalıkları, karaciğer rahatsızlıkları, ateş ve vücut ağrısı için kullanılmaktadır (287). Kuzey Pakistan'ın Malakand bölgesinde yaşayan Hazar Nao Ormanı'nın kabile toplulukları tarafından gastrointestinal rahatsızlıklar, dermatolojik rahatsızlıklar ve diş problemleri için kullanılmıştır (288).

İran'ın Meşhed bölgesinde meyve infüzyonlarının prostat rahatsızlıklar için kullanıldığı belgelenmiştir (289,290). Batı Azerbaycan'da Urmia bölgesi şifacılarının kullandığı çınar bitki kısımları kaynatılarak astım tedavisi ve ses kısıklığı için kullanılmıştır (290). İtalyan'ın Campania bölgesinde yapraklardan infüzyon yoluyla elde edilen yağların topikal olarak romatizma için kullanıldığı belgelenmiştir (291). Literatür incelendiğinde, çoğunlukla Türkiye ve Pakistan'da yapılan etnobotanik çalışmalarda *P. orientalis* L.'in geçtiği görülmektedir. Türkiye'de yapılan bazı çalışmalar aşağıda Tablo 2.4'te derlenmiştir.

Tablo 2.4: Türkiye *Platanus orientalis* L. etnobotanik çalışmaları

Bölge	Bitki kısmı	Kullanım alanı	Yöntem	Kaynak
İzmir	Gövde kabuğu	İdrar söktürücü	Dekoksiyon, günde 2-3 kez 1 çay bardağı içilir, 8-10 gün boyunca (D)	(226)
	Yapraklar	Ödem	Dekoksiyon (H)	
Turgutlu, Manisa	Meyveler	Adet düzenleyici	Dekoksiyon (D)	(231)
	Yapraklar	Kireçlenme	İnfüzyon, 2 ay boyunca günde 1 su bardağı içilir (D)	
	Yapraklar	Diyabeti	Dekoksiyon (D)	
	Yapraklar	Hemoroit	İnfüzyon (D)	
Edremit körfezi, Balıkesir	Kozalaklar	Böbrek taşları	Dekoksiyon, günde 2 kez 1 çay bardağı içilir, 3-4 gün boyunca (D)	(232)
	Gövde kabukları	İshal	Dekoksiyon, günde 3 kez 1 çay bardağı içilir, 1-2 gün boyunca (D)	
	Yapraklar	Eklem iltihabı	İnfüzyon, günde 2 kez 1 çay bardağı içilir, 2 hafta boyunca (D)	
	Kozalaklar	Kaşıntı	Dekoksiyon, banyo (H)	
Çatalca, İstanbul	Yapraklar	Diyabeti ve böbrek rahatsızlıkları	Dekoksiyon (D)	(225)
Hatay	Yaprak ve meyve karışımı	Romatizma ağrıları	Dekoksiyon (D)	(234)
Malatya	Yapraklar	Diyabeti	İnfüzyon (D)	(292)
Güce, Giresun	Yapraklar	Romatizma, eklem ağrıları, osteoartrit, böbrek rahatsızlıklar, idrar yolu enfeksiyonu	Dekoksiyon, günde 1 kez içilir (D)	(266)
Ulukışla, Niğde	Dal kabukları	Hepatit	Dekoksiyon, günde 2 kez 1 çay bardağı içilir (D)	(293)
Gönen, Balıkesir	Meyveler	Böbrek taşı	İnfüzyon (D)	(233)

(H) – Haricen, (D) – Dahilen

Çınar bitkisinin kısımlarının halk tıbbında kullanımı diğer bitkilerde de olduğu gibi biyolojik aktivitesine sebep olan değerli bileşikler içermesindendir. Diğer iki bitkimiz kadar yaygın bir şekilde etnofarmakolojik çalışmalar bulunmasa da genel olarak fitokimyasal içeriği ve biyolojik aktivitesine yönelik bazı çalışmalar mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada çınar gövde kabuklarından antioksidan aktiviteye sahip olan betulinik asit, betulinik asit-3-asetat, 3-asetilbetulinaldehit, oleanolik asit-3-asetat, 3-β-hidroksi-28,19-β-olenolid ve β-sitosterol bileşikleri yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) kullanılarak tespit edilmiştir (294). Farklı bir çalışmada çınar yapraklarının metanol ve su ekstrelerinin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri ile Alzheimer hastalığı ve diyabetle ilişkili enzimleri inhibe ettiği de ortaya konmuştur (295).

Çınar yapraklarının fenolik bileşik içeriği ile ilişkilendirilen antioksidan ve antienflamatuar etki, böbrek taşları üzerine yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (342). Çınar yapraklarının çeşitli çözücüler ile elde edilen ekstrelerinin hepatotoksisteye karşı etkisi bağlamında antioksidan ve sitotoksik etkileri ortaya konmuştur. Bu çalışmada ekstreler CCL_4 ile hasara maruz bırakılmış karaciğer hasarında alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferz ve alkalin fosfataz seviyelerini düşürerek etkilerini göstermişlerdir (354).

Çınar etanol ve su ekstrelerinin *in-vivo* antinosiseptif etkileri de ortaya konmuştur ancak bu etkiyle ilişkili olarak aktif içerik tayini yapılmamıştır (306). Benzer şekilde Haider ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da yaprakların etanol ekstreleri antienflamatuvar ve antinosiseptif etkileri bakımından incelenerek etkinlikleri ortaya konmuştur ancak etkiye sebep olarak biyoaktif içerik tayini yapılmamıştır (307).

Bitkinin fenolik içerik haricinde uçucu bileşikleri hakkında kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Hatay, Harbiye bölgesinden toplanan *P. orientalis* yapraklarında tespit edilen uçucu yağlar arasında trans,trans-2,4-heptadienal (%6,6), nonanal (%6,5), benzaldehyde (%6,4), cis-3-hexen-1-ol (%6,3), benzenmetanol (%6,2) ve trans-2-hexenal (%3,5), en fazla oranda bulunan bileşikler olarak belirlenmiştir. Isparta ilinin farklı bölgelerinden toplanan çınar yapraklarında ise uçucu bileşik olarak (E)-2-hexenal, n-hexanal, benzaldehid ve cis-3-hexene-1-ol tespit edilmiştir. Çınar yapraklarının infüzyonu etanol ile tetiklenen oksidatif strese karşı etkili olduğu ortaya konmuştur ve bu etki, içeriğindeki bazı terpenoit yapısındaki bileşiklere atfedilmiştir.

Genel olarak bitkinin fitokimyasal içeriği ve çeşitli biyolojik aktiviteleri üzerine güncel, kapsamlı ve nitelikli araştırmalar kısıtlı sayıda olduğu için bu kısımda bir araştırma açığı bulunmaktadır. Daha detaylı çalışmaların yapılması bu bitkinin etkinliğini ortaya koyarak potansiyel kullanım alanlarını genişletecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

- Heidolph Rotari Evoporatör Hei-VAP Precision (Heidolph, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Isaolab, Almanya)
- Isıtıcı (Isotex, Türkiye)
- Isolab Isıtıcı (Isaolab, Almanya)
- Ultrasound Sonikatör (Isolab, Türkiye)
- Liyofilizatör (Christ 2-4 LSCbasis, Almanya)
- UV-Vis Spektrofotometre 1900 (Shimadzu, Japonya)
- Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus HPLC ve PDA Dedektör (Shimadzu, Japonya)
- Fenilheksil 4,6 x 150 mm, 3 μm (UP) C6 Kolon (GL Sciences InterSustain, Japonya)
- pH metre (Mettler Toledo, İsviçre)
- ELİSA Cihazı (Biochrom Ez Read 400, Birleşik Krallık)

3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

- Etanol (HPLC grade) (Merck, Almanya)
- Asetonitril (HPLC grade) (Merck, Almanya)
- Formik asit (HPLC grade) (Merck, Almanya)
- 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), CAS No.: 1898-66-4 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Trolox, CAS No.: 111-762-2 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Bakır (II) Klorür, CAS No.: 7447-39-4 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Amonyum asetat, CAS No.: 631-61-8 (TEKKİM, Türkiye)

- Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), CAS No.: 484-11-7 (Sigma-Aldrich, ABD)
- TPTZ (2,4,5-Tris(2-piridil)-*s*-triazin, CAS No.: 3682-35-7 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Demir(III) Klorür, CAS No.: 7705-08-0 (Sigma-Aldrich, ABD)
- ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit), CAS No.: 30931-67-0 (Roche, İsviçre)
- Potasyum persülfat, CAS No.: 7727-21-1 (Alev Kimya, Türkiye)
- COX Kolorimetrik Kit (Cayman, ABD)

HPLC Standartları:

- Gallik asit; ≥98.0% (HPLC), CAS No.: 149-91-7, Ürün No.: PHL89198 (Sigma-Aldrich, ABD)
- 4-hidroksibenzoik asit; 99.0% (HPLC), CAS No.: 99-96-7, Ürün No.: PHL83051 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Klorojenik asit; ≥95.0% (HPLC), CAS No.: 327-97-9, Ürün No.: PHL89175 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Vanilik asit; ≥97.0% (HPLC), CAS No.: 121-34-6, Ürün No.: 94770 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Kafeik asit; ≥98.0% (HPLC), CAS No.: 331-39-5, Ürün No.: C0625 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Epikateşin; ≥98.0% (HPLC), CAS No.: 490-46-0, Ürün No.: E4018 (Sigma-Aldrich, ABD)
- *p*-kumarik asit; ≥98.0% (HPLC), CAS No.: 501-98-4, Ürün No.: C9008 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Ferulik asit; ≥99.0% (HPLC), CAS No.: 1135-24-6, Ürün No.: 90034 (Supelco, Almanya)
- Salisilik asit; ≥99.0%, CAS No.: 69-72-7, Ürün No.: PHL80529 (Sigma-Aldrich, ABD)

- Rutin; ≥94.0% (HPLC), CAS No.: 207671-50-9, Ürün No.: R5143 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Kikorik asit; ≥95.0% (HPLC), CAS No.: 6537-80-0, Ürün No.: C7243 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Apigenin-7-*O*-glikozit; ≥97.0% (HPLC), CAS No.: 578-74-5, Ürün No.: 44692 (Supelco, Almanya)
- Sinnamik asit; ≥99.0% (HPLC), CAS No.: 140-10-3, Ürün No.: 8.00235 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Kuersetin; ≥95.0% (HPLC), CAS No.: 117-39-5, Ürün No.: Q4951 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Naringenin; ≥95.0% (HPLC), CAS No.: 67604-48-2, Ürün No.: PHL89738 (Sigma-Aldrich, ABD)

3.3. BİTKİ MATERYALİ TEMİNİ

İncir örnekleri 2020 yılının Eylül ayında, Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı olan Aydın İncir Araştırma Enstitüsünden elde edilmiştir. *Ficus carica* L. türünden Bursa siyahı çeşidine ait yapraklar üniversitemizin Fitoterapi Araştırma Laboratuvarına ulaşmıştır. Yapraklar kuru ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 1 hafta süreyle kurutulmuştur.

Bitki karışımlarını oluşturmak için kullanılan *Laurus nobilis* ve *Platanus orientalis* L. kuru yaprakları ticari bir üreticiden temin edilmiştir. Tüm kuru yapraklar çekilerek toz haline getirilmiştir ve kullanılana dek ağızları kapalı ve nem almayacak şekilde 4°C'de saklanmıştır.

3.4. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ

Modern ekstraksiyon yöntemi olarak kuru yaprak örnekleri soxhlet düzeneğinde (Şekil 3.1) etanol ile 8 saat boyunca ısıtıcı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminde 20 g bitki için 300 mL çözücü kullanılmıştır. Sıvı ekstredeki çözücü rotari evaporatör kullanılarak uzaklaştırılıp kuru ekstre elde edilmiştir.

Geleneksel yöntemleri temsilen ise yaprakların dekoksiyon yöntemi kullanılarak ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için her bir bitki yaprağından ayrı ayrı 5 g

yaprak örnekleri 75 mL saf suda 1 saat boyunca manyetik karıştırıcısı olan bir ısıtıcı ile açık hava atmosferinde kaynatılarak su ekstresi elde edilmiştir. Su ekstreleri daha sonra filtre kağıdından geçirilerek iyice süzülmüştür. -20°C'de dondurulan süzülmüş örneklerdeki su, liyofilizatör kullanılarak uzaklaştırılmış ve toz forma getirilmiştir. Tüm ekstreler analizler yapılana kadar sıkıca kapatılarak 4°C'de saklanmıştır. Yaprakların ekstre verimleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%\ verim = \left(\frac{kuru\ ekstre\ ağırlığı}{kuru\ bitki\ ağırlığı}\right) \times 100$$



Şekil 3.1: Soxhlet düzeneği

3.5. YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) İLE FİTOKİMYASAL İÇERİK ANALİZİ

Örneklerdeki fenolik bileşiklerin karakterizasyonu ve miktar hesaplaması için Diyod Array Dedektörüne (DAD) bağlı Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus HPLC cihazı kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar ışığında tıbbı bitkilerde yaygın olarak bulunan 15 adet fenolik bileşik bu çalışmada taranmış ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Numunelerde analiz edilecek her bir fenolik bileşiğin 1000 mg/L'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Ekstre çözeltileri 0.22 µm'lik şırınga tipi filtrelerden şırınga yardımıyla süzülerek viallere aktarıldıktan sonra analiz için cihazın otomatik örnekleyici kısmına yerleştirilmiştir. Mobil faz A için su (% 0,1 formik asitli) ve mobil faz B için asetonitril kullanılmıştır. Ayırım işlemi ters faz C6 fenilheksil kolon (4,6 x 150 mm, 3 µm GL Sciences InterSustain Kolon) kullanılmıştır. Kullanılan gradient pompa programı aşağıda Tablo 3.4'te verilmiştir. Enjeksiyon hacmi 1,0 µL, kolon sıcaklığı 30°C ve akış hızı 1 mL/dak olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.1: Gradient pompa akış programı

Dakika	Mobil Faz B (%)	Mobil Faz A (%)
0,01	5	95
7	9,5	90,5
20	17	83
35	40	60
40	0	100
40,01	Son (stop)	

3.6. ANTİOKSİDAN ANALİZLERİ

3.6.1. DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi

İlk olarak 1958'de Blois tarafından kullanılan radikal, tiyol içeren amino asit sistemine dayalı antioksidan içerik ölçümleri için kullanılmıştır (296). Bu radikal diğer radikaller veya indirgeyici maddelerle reaksiyona girerek koyu mor rengini kaybeder ve bu renk değişimi spektroskopik olarak ölçülebilmektedir. DPPH çözeltisi metanol 0,1

mM olacak şekilde hazırlanmıştır ve bu çözeltiden 3 mL'sine farklı konsantrasyonlarda 1 mL ekstre çözeltileri ilave edilmiştir. Karışım çalkalandıktan sonra 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanarak bu karışımların ve pozitif kontrolün (3 mL $DPPH^{\bullet}$ + 1 mL etanol), negatif kontrole (4 mL etanol) karşı absorbansları 517 nm'de ölçülmüştür. Karşılaştırma adına trolox standardı 6 farklı konsantrasyonda ölçülmüştür ve örnekler ile standardın $DPPH^{\bullet}$ giderici kapasiteleri aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır:

$$DPPH^{\cdot}\,giderme\ aktivitesi\ (\%) = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100$$

A_0: pozitif kontrol absorbansı ($DPPH^{\cdot}$ çözeltisi)

A_1: örnek absorbansı

Her konsantrasyon için yüzde aktivite hesaplandıktan sonra x-ekseninde konsantrasyon ve y-ekseninde aktivite olacak şekilde lineer bir grafik çizilir. Lineer grafiğin denklemi y=mx+c (m= eğim, c= y-kesimi) formunda elde edildikten sonra y=%50 inhibisyona sebep olan x=konsantrasyon hesaplanır. Bu değer literatürde, başlangıçtaki miktarı baz alarak (pozitif kontrol absorbansı), radikali %50 oranda inhibe eden antioksidan örneğinin konsantrasyonu olarak belirtilmektedir (IC_{50}). Yapılan çalışmalarda bildirilen bu değer, bu çalışmaların konusu olan farklı antioksidan maddelerin/sistemlerin etkinliklerinin kolaylıkla kıyaslanması için önemli bir parametredir.

3.6.2. ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) Katyon Radikali Giderme Aktivitesi

1993 yılında Miller ve arkadaşları (324) tarafından geliştirilen bu yöntem, ABTS bileşiğinin potasyum persulfatla ortalama 12 saat inkübe edildikten sonra ortaya çıkan $ABTS^{\bullet+}$ radikalini temel almaktadır. Bu radikal oldukça karalıdır ve koyu bir renk verir. Bu çözelti su ile seyreltilerek 734 nm'de absorbansı ölçülüp absorbans 0.7±0.05'i geçmeyecek şekilde ayarlanmıştır. Örnekler bu çözelti ile karıştırıldığında oluşan renk açılması antioksidan aktiviteye işaret eder. Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) standardı ile ekstrelerin farklı konsantrasyonları $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi ile karıştırılıp 30 dakika inkübe edilip absorbans 734 nm'de ölçülmüştür. $ABTS^{\bullet+}$ inhibisyonu aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$ABTS^{\bullet+}\ giderme\ aktivitesi\ (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0: pozitif kontrol absorbansı ($ABTS^{\bullet+}$)

A_1: örnek absorbansı

DPPH inhibisyon aktivitesinde olduğu gibi burada da aynı yöntem ve denklem ile IC_{50} değerleri hesaplanır ve genellikle trolox standart olarak kullanılır. Bazı çalışmalar troloxa eşdeğer olan antioksidan kapasitesini sonuç olarak verse de literatürde rastlanan çoğu ilgili çalışmalarda IC_{50} değerinin verilmesinden dolayı tezimizde bu değerin hesaplanması tercih edilmiştir.

3.6.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Gücü Antioksidan Aktivitesi (FRAP)

FRAP testi ilk olarak Benzie ve Strain tarafından plazmada indirgeme gücünü ölçmek için geliştirilse de daha sonra bitkilerin aktivitesini ölçmek için de uyarlanmıştır (298). Fe^{3+}-tripiridiltriazine (TPTZ) kompleksinin indirgenme reaksiyonu aşağıda verilmiştir:

$$Fe(TPTZ)_2^{3+} + AH/ArOH \rightarrow Fe(TPTZ)_2^{2+} + A^{\bullet}/ArO^{\bullet} + H^+$$

$Fe(TPTZ)_2^{3+}$ çözeltisi soluk sarı renktedir ancak $Fe(TPTZ)_2^{2+}$ formuna indirgendiğinde 593 nm dalga boyunda ölçülebilecek bir yeşilimsi mavi renge dönüşmektedir. Reaksiyon koşulları (sıcaklık, pH, reaktif ve numune miktarları, reaksiyon süresi) sabitlenir ve 593 nm'de absorbans değişikliği ölçülür. Antioksidan örneğinin toplam kapasitesi, örnek yerine Fe^{2+} içeren bir standardın (örneğin demir sülfat – $FeSO_4$) farklı konsantrasyonları ve bunların absorbansını gösteren lineer bir grafiğin eğri denklemi kullanılarak hesaplanır.

FRAP reaktifinin hazırlanması için 40 mM hidroklorik asit (HCl) içinde 10 mM 2,4,6-Tripyridyl-S-triazine çözeltisi, 1 mL'lik oranlarda 20 mM $FeCl_3$ çözeltisi ve 0,3 M asetat tamponu (pH 3.6) karıştırılmıştır. Her bir örnek 3 mL taze hazırlanmış FRAP reaktifi ile karıştırıldıktan sonra reaksiyon karışımları, 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. 593 nm'de absorbans ölçülmüştür. $FeSO_4$ pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve sonuçlar mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki olarak verilmiştir.

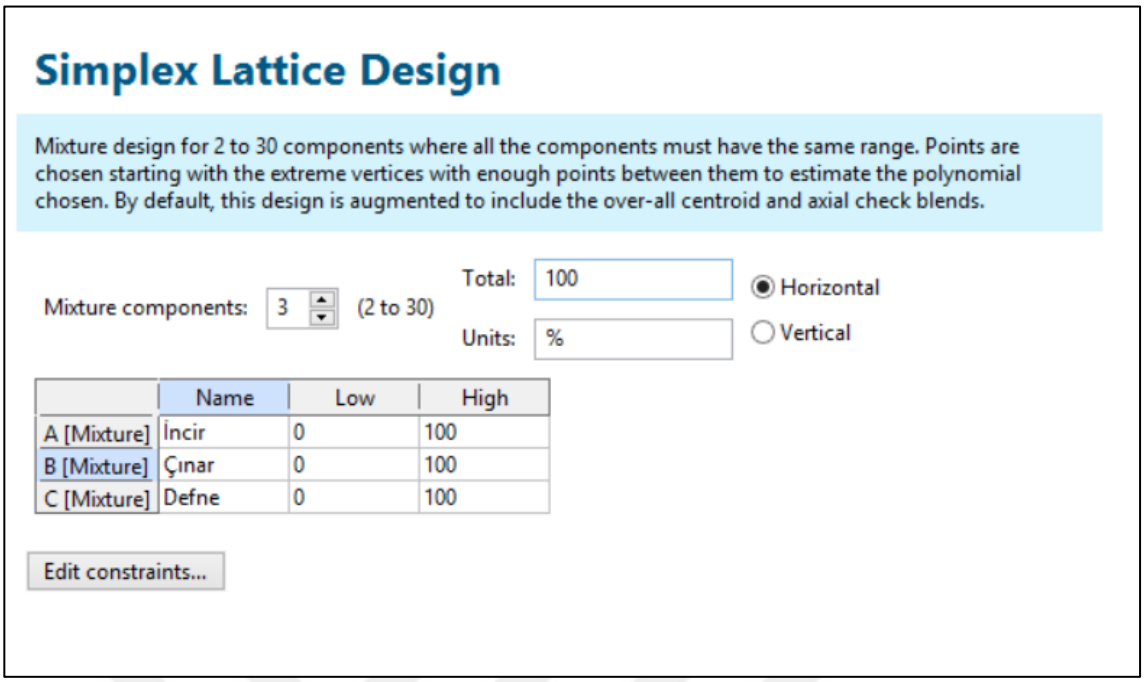
3.6.4. Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (CUPRAC)

Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntemde kromojenik bir yükseltgen olan bakır (II) neokuproin (Nc) reaktifi kullanılarak indirgenmiştir ve örneklerin antioksidan kapasite analizi yapılmıştır (299). 1,0 x 10^{-2} M Bakır (II) klorür çözeltisi ve pH sı 7,0 olan 1 M amonyum asetat tamponu hazırlanmıştır. 7,5 x 10^{-3} M neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi, etanol ile hazırlanmıştır. Bir cam tüp içerisine bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklenmiştir. Üzerine ekstre çözeltileri ilave edilerek toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak troloks kullanılmıştır. Sonuçlar gram kuru madde başına mmol troloks eşdeğer (mmol TEAC/g kuru bitki) olarak hesaplanmıştır.

3.7. DENEY TASARIMI

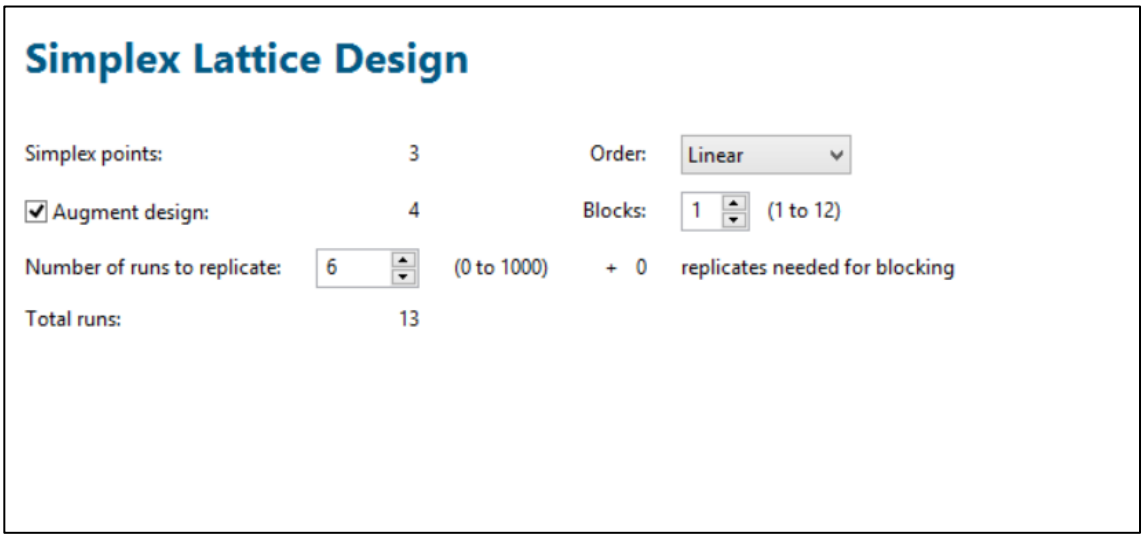
Deney tasarımı için Design Expert® (StatEase, ABD) programının “Mixture Design” özelliği kullanılmıştır. Bu yaklaşımın amacı, karışımlardaki 3 bitkinin oranlarını istatistiksel bir hesaplama doğrultusunda belirlemektir. Farklı oranlara sahip karışımlardan oluşan bir deney tasarımı oluşturulmuştur. Deney tasarımı sonucu önerilen karışımların etkileri analiz edilerek optimum karışım belirlenmiştir. Ayrıca karışımın bileşenleri arasındaki etkileşimler de analiz edilmiştir (56,300). Tasarım süreci sırasıyla aşağıdaki adımları içermektedir:

1- Çalışmamızda ekstraksiyonları yapılan 3 bitki bağımsız faktörlerimizdir. Bitkilerin oranları %0 ila %100 arasında değişmektedir. Tasarım aşamasının ilk adımında Şekil 3.2’de gösterilen ilgili yerlere bitki isimleri, oran sınırları ve birimler girilmiştir.



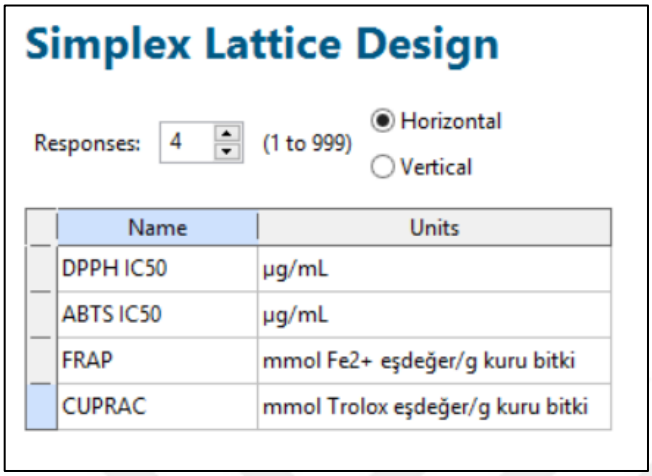
Şekil 3.2: Deney tasarımının birinci adımı

2- Sistemi temsil ettiği kestirilen denklem türünün ve tekrarlı bir şekilde yapılacak örnek sayısının seçimi yapılmıştır. Genellikle 1. dereceden veya 2. dereceden denklemler kullanılmaktadır. Aşağıda Şekil 3.3'de 1. dereceden denklem için tasarım adımının ekran görüntüsü verilmiştir. Tekrarlar istatistiksel anlamlılığı ve denklemin sisteme uyumunu tespit etmek için gereklidir.



Şekil 3.3: Deney tasarımının ikinci adımı

3- Son olarak yanıtımız olan antioksidan analizler ve birimleri aşağıda Şekil 3.4'te gösterildiği gibi ilgili alanları girilmiştir.



Şekil 3.4: Deney tasarımının son adımı

Yukarıdaki adımlar sonucunda oluşturulan tasarımda, birinci dereceden denklem için 13 deney önerilmiştir. Bu deneyler rastgele bir sıra ile yapılmıştır. Bir önceki bölümde Şekil 2.2'de gösterilen simpleks koordinat sistemine göre deneyimizde üçgenin uçları birer deney olarak seçilmiştir. Bu uçların antioksidan aktiviteleri üçer tekrarlı şekilde ölçülmüştür. Simpleks koordinat sistemi içerisinde tam orta nokta da seçilmiştir. Bu da her üç bitkiden eşit oranda içeren bir karışımın hazırlanması demektir. Ek olarak üç tane daha karışım önerilmiştir. Aşağıda Tablo 3.2'de birinci dereceden denklem ile tasarlanan deney listesi verilmiştir.

Tablo 3.2: Birinci dereceden denklem ile deney tasarımı

Deney numarası*	Bileşen 1 (%) İncir	Bileşen 2 (%) Çınar	Bileşen 3 (%) Defne
1	100	0	0
2	100	0	0
3	100	0	0
4	0	100	0
5	0	100	0
6	0	100	0
7	0	0	100
8	0	0	100
9	0	0	100
10	33,34	33,33	33,33
11	66,67	16,67	16,67
12	16,67	66,67	16,67
13	16,67	16,67	66,67

Rastgele sıralamaya göre verilmemiştir

Tablo 3.2'de önerilen karışımlar, yukarıda bölüm 3.2'de belirtilen ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanmıştır. Bu karışımlar ile tek bitkiden oluşan örneklerin analizleri bir sonraki bölümlerde anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiştir. Yukarıdaki deney tasarımına göre hazırlanan ve karışımdan oluşan örneklerin isimleri kolaylık için aşağıda Tablo 3.3.'te olduğu gibi isimlendirilmiştir.

Tablo 3.3: Karışım örneklerinin isimleri

Örnek	İncir (%)	Çınar (%)	Defne (%)
Karışım 1 (K1)	66,67	16,67	16,67
Karışım 2 (K2)	16,67	16,67	66,67
Karışım 3 (K3)	33,33	33,33	33,33
Karışım 4 (K4)	16,67	66,67	16,67

3.8. DENEY TASARIMI SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Yukarıda Tablo 3.2'de belirtilen karışımların antioksidan aktiviteleri (yanıtlar) ölçüldükten sonra sonuçlar Design Expert programına girilmiştir. Bu yanıtların kestirilen denklemlere uyumları ve ardından bu denklemlerin sistemi temsil etmek için yeterlilikleri tespit edilmiştir. Bunun için öncelikle en küçük kareler yöntemi (least squares method) ile regresyon analizi yapılıp denklemlerdeki parametreler hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar Design Expert programı tarafından otomatik bir şekilde gerçekleştirilir. Sistemimizde karışımlar üç bileşikten oluştuğu için 1. ve 2. dereceden denklemler aşağıda olduğu gibidir:

Birinci dereceden denklem: $y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3$

İkinci dereceden denklem: $y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$

Yukarıdaki denklemlerde y yanıtı, x_1, x_2 ve x_3 sırasıyla incir, çınar ve defnenin oranını, β_1, β_2 ve β_3 ise sırasıyla saf incir, saf çınar ve saf defne örneklerinin katsayılarını ifade etmektedir. 2. dereceden denklemde ek olarak görülen x_1x_2, x_1x_3 ve x_2x_3 parametreleri sırasıyla incir/çınar, incir/defne ve defne/çınar karışımlarını ifade etmektedir. β_{12}, β_{13} ve β_{23} ise bu karışımların katsayılarıdır. Katsayıların değerleri program tarafından hesaplandıktan sonra belirli istatistiksel parametreler aracılığıyla anlamlılıkları, geçerlilikleri ve buna bağlı olarak sistemi en iyi şekilde temsil eden denklem türü önerilmiştir. Doğru denklem seçildikten sonra bu denklem kullanılarak en iyi yanıtı verecek optimum karışım oranları bulunmuştur.

Sistemi temsil eden en iyi model ve bu modelin denklemin seçimi için belirli parametreler analiz edilmiştir. Bu parametreler; kareler Toplamı (SS), kareler Ortalaması (MS), df (serbestlik derecesi), F-testi, p-değerleri, R-kare (R^2) değerleri, düzeltilmiş R-

kare (Adjusted R^2) değerleri olarak sıralanabilir. İstatistiksel modeli analiz ederken genel bir model eşleşmesi, etki değerlendirmesi, Pareto grafiği ve artıkların değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir.

Analize konu olan parametrelerin tanımları sekme sıralarına göre aşağıda verilmiştir:

1- İlk sekme "*Configure*" sekmesi olup girilen yanıtların analizi yapılmadan önce gerekli olması durumunda yanıtlar üzerinde ayarlama yapılmasına olanak sağlar. Bazı durumlarda yanıtların değerleri model için uygun olmayabilir. Deney tasarımını sıfırdan başlamadan önce bu sekmede bulunan yanıtları dönüştürme (transformation) işlemi önerilmektedir. Dönüştürmeler arasında yanıtlara uygulanacak olan karekök ve log gibi işlemler bulunmaktadır. İlk etapta dönüştürme yapılmadan sonuçlar analiz edilmiştir.

2- İkinci sekmede modelin yanıtlardan oluşan sisteme uyumluluğunu özetleyen "*Fit Summary*" yer almaktadır. Burada programın uygun olarak seçtiği model/ler **kalın** harfler ile işaretlenmiştir. Uygun modelin p-değeri düşük olup anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. Ayrıca yanıtların modele uyumsuzluğunu gösteren "*lack of fit*" diye adlandırılan uyumsuzluk değerinin p-değeri **0,1**'in üzerinde olmalıdır. Son olarak modele ait iki adet R^2 değeri verilmiştir. R^2 değerlerinden birisi (Adjusted R^2) ölçülen yanıtın faktörlere (farklı oranlarda hazırlanan karışımlar) göre değişkenliğini temsil ederken diğeri (Predicted R^2) ise seçilen ve kestirilen modele göre yanıtın faktörlere göre değişkenliğini temsil etmektedir. **1**'e en yakın değerler tercih edilir ve iki değer arasındaki fark **0.2**'yi aşmamalıdır.

3- Üçüncü sekmede seçilen uygun modelin özeti yer almaktadır. Burada modelde bulunan ve modelin denklemini oluşturan parametreler de yer alır (A-incir, B-çınar, C-defne, AB, AC, ABC vb.). Burada ilk etapta bir değişiklik yapılmaz. Gerekli olması durumunda burada tekrar modeli iyileştirecek parametreler seçilebilir veya modelden çıkarılabilir.

4- Dördüncü sekme standart istatistiksel analiz sekmesidir. Burada, bir önceki sekmede seçilen uygun modelin ANOVA analiz sonuçları yer alır. Bu sekmedeki bilgiler ile model ve modelin denkleminin, faktör ve yanıtları oluşturan sisteme uyumu tespit edilir. Burada önemli birkaç parametre: modelin ve denklemdeki parametrelerin p-değerleri, uyumsuzluk değeri, F-değeri ve R^2 değeridir. Modelin

p-değeri 2. sekmede verilen değerl ile aynıdır, ancak ek olarak model denklemindeki parametrelerin tek tek p-değerleri de burada yer almaktadır. Bazı parametrelerin p-değerleri yüksek olup anlamlı olmayabilmekte, bu da genel olarak modelin uyumsuzluğuna sebep olabilmektedir. Dolayısıyla bir önceki sekmeye dönülüp bu parametreler denklemden çıkarılabilir. Burada ayrıca F-değeri de önemlidir, olabildiğince yüksek olmalıdır ve alınan yanıtın gürültüden kaynaklı olmadığını gösterir. 2. sekmede p-değeri verilen uyumsuzluk değerinin (lack of fit) sayısal değeri burada verilmiştir. Bu değer modelin yanıtlara uyduğunu ve elde edilen yanıtın gürültüden kaynaklı olmadığını doğrulamaktadır. Bu değer belirgin olmamalıdır; genellikle küçük sayılar tercih edilir. Buradan elde edilen ek bazı bilgiler ise R^2 değerleri arasındaki fark, sinyal/gürültü oranı ve seçilen modelin denklemidir.

5- Model seçimi yapıldıktan sonra "*diagnostics*" (tanı/yeterlilik) sekmesinde seçilen modelin validasyonu tamamlanır. Burada ölçülen yanıt ile kestirilen yanıt arasındaki farkı baz alan artıklar (residuals) kavramı temel alınmaktadır. Bu artıklar üzerinden belirli grafikler ortaya çıkmaktadır. Özet olarak bu sekme, yanıtların herhangi bir dönüştürülmeye tabi tutulmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Artık grafiklerinin sonuçlarına göre gereken dönüşüm önerilmektedir. Bu sekmede her karışımın ölçülen ve model tarafından kestirilen sonucu da verilmiştir. Bazı çalışmalar bu sonuçları kullanarak sinerjik veya antagonistik etkileşimlerin varlığına işaret etmektedir.

6- Sonuç kısmında verilen grafikler altıncı sekmeden elde edilmiştir. Burada kontür, 3D ve iki faktör arasındaki bağlantıyı ortaya koyan çeşitli grafiklere erişmek mümkündür.

Analiz kısmı tamamlanıp model seçimi sonuçlandırıldığında optimum karışım için programın optimizasyon özelliği kullanılmıştır. Bu kısımda arzu edilen antioksidan aktiviteyi ortaya koyacak karışımın tespit edilmesi için antioksidan aktivite sonucu için kriter belirlenmiştir (301). Örneğin IC_{50} değerinin daha düşük olması daha yüksek aktiviteye işaret etmektedir. Dolayısıyla DPPH ve ABTS testlerinde IC_{50} değer kriteri mümkün olan en düşük değer şeklinde seçilir. Bu kritere uygun olacak ve modelin alanı içinde olacak bir veya birden fazla karışım sonucu önerilmiştir.

Programın önerdiği optimum karışımların istenirlik (desirability) değerleri de incelenmiştir (302). İstenirlik değerleri, tüm yanıtların tek bir yanıt kümesine toplanarak bu kümenin en istenilebilecek değerine sebep olacak karışımın önerilmesi için kullanılmaktadır. İstenirlik değerleri 0 ile 1 arasında olmaktadır; 0 en istenmeyen, 1 en istenen, 0.5'in üzerinde değerler ise orta derece ve üzeri istenirliği temsil etmektedir.

Son olarak Hugo ve ark. kullandığı yöntem ve Rahim ve ark. modifiye ederek kullandığı yöntem uygulanarak sinerjik ve antagonistik etki hesaplanmıştır (301,303).

3.9. SİKLOOKSİGENAZ-2 (COX-2) VE SİKLOOKSİGENAZ -1 (COX-1) ENZİM İNHİBİSYONU

Araşidonik asitin COX enzimi tarafından prostaglandinler (PG) ve tromboksan A2'ye dönüşmesi enflamasyon metabolizmasında büyük rol oynar. Bu test, PG-G2'nin PG-H2'ye indirgenmesi sırasında N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD)'nin oksidasyonunu ve bu oksidasyon sırasındaki renk değişimini temel almaktadır (304). Ticari olarak temin edilen kolorimetrik kit kullanılmıştır (Cayman, ABD) ve bu kit aracılığıyla hem COX-2 enzim inhibisyonu, hem de COX-1 enzim inhibisyonu tespit edilmiştir. Kit kullanım kılavuzundaki yöntem kullanılmıştır. 50 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan örneklerin üzerine TMPD ve son olarak araşidonik asit eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans 590 nm'de ölçülerek aşağıdaki denklem ile %inhibisyon hesaplanmıştır.

$$\%\text{İ}nhibisyon = \left(\frac{Pozitif\ Kontrol\ Absorbansı - \text{Ö}rnek\ Absorbansı}{Pozitif\ Kontrol\ Absorbansı}\right) \times 100$$

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm ölçümler üç kez tekrarlanarak sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi GraphPad programı (GraphPad Software Inc, ABD) ve Design Expert programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Karışımlar, saf ekstreler ve pozitif kontroller arasında anlamlı fark olup olmadığını tespit etmek için tek yönlü ANOVA testi kullanılıp post test olarak Tukey'in çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ

Modern ekstraksiyon yöntemlerini temsilen etanol çözücüsü ile soxhlet düzeneği kullanılarak ekstrakte edilen incir yaprağı, çınar yaprağı, defne yaprağı ve bu üç bitkinin karışımlarının ekstraksiyon verimleri yöntem kısmında belirtilen denklem ile hesaplanıp aşağıda Tablo 4.1'de verilmiştir. Aynı tabloda geleneksel yöntemler için seçilen su çözücüsü ve dekoksiyon yöntemi ile elde edilen ekstrelerin verimleri de verilmiştir.

Tablo 4.1: Ekstrelerin verimleri (%)

Örnek	**Verim (%)**	
	Etanol ekstreleri	**Su ekstreleri**
İncir	24,10	27,80
Defne	54,50	31,00
Çınar	17,90	23,80
K1	20,92	25,17
K2	35,17	77,00
K3	26,17	50,67
K4	25,00	69,33

Tablo 4.1'deki sonuçlar incelendiğinde saf bitkiden oluşan örneklere kıyasla saf bitkilerin karışımından oluşan örneklerin ekstre verimleri arasında farklılıklar görülebilir. Etanol ekstreleri arasında en yüksek verim defne yaprak ekstresinde (%54,90), en düşük verim ise çınar ekstresinde (%17,90) elde edilmiştir. Karışımlar arasında en yüksek verim K2'de, en düşük verim ise K1'de görülmektedir. Su ekstreleri için ise en yüksek verim, incir:çınar:defne (%16,67 + %16,67 + %66,67) oranlarında hazırlanmış olan K2'de elde edilmiştir (%77). Su ekstrelerinde en düşük verim ise çınar da görülebilir.

4.2. YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) İLE FİTOKİMYASAL İÇERİK ANALİZİ

15 maddeden oluşan standart kullanılarak fenolik bileşik içeriği kantitatif olarak analiz edilmiştir. Cihaza 1000 ppm = 1000 mg/L miktarında verilen ekstre örneğinden elde edilen sonuçlar cihaz tarafından mg/L cinsinden verilmektedir. Literatürde yer alan sonuçların büyük bir kısmı mg madde/g ekstre veya direk mg/L olarak verildiği için bu birim cinsinden sonuçlar etanol ekstreleri için aşağıda Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: Etanol ekstrelerinin fitokimyasal içeriği

	Örnek						
Madde*	İncir	Defne	Çınar	K1	K2	K3	K4
Klorojenik asit	1,08	-	0,03	0,29	-	-	-
Ferulik asit	-	0,21	0,02	0,03	0,05	0,06	-
Rutin	2,69	2,42	15,80	5,19	5,65	4,87	6,82
Kuersetin	39,62	0,13	0,26	16,44	2,36	4,32	2,55
Gallik asit	-	-	0,16	-	-	-	-
Apigenin-7-*O*-glikozit	-	-	0,10	-	0,07	0,03	-
Sinnamik asit	-	-	0,12	0,03	0,02	-	0,09

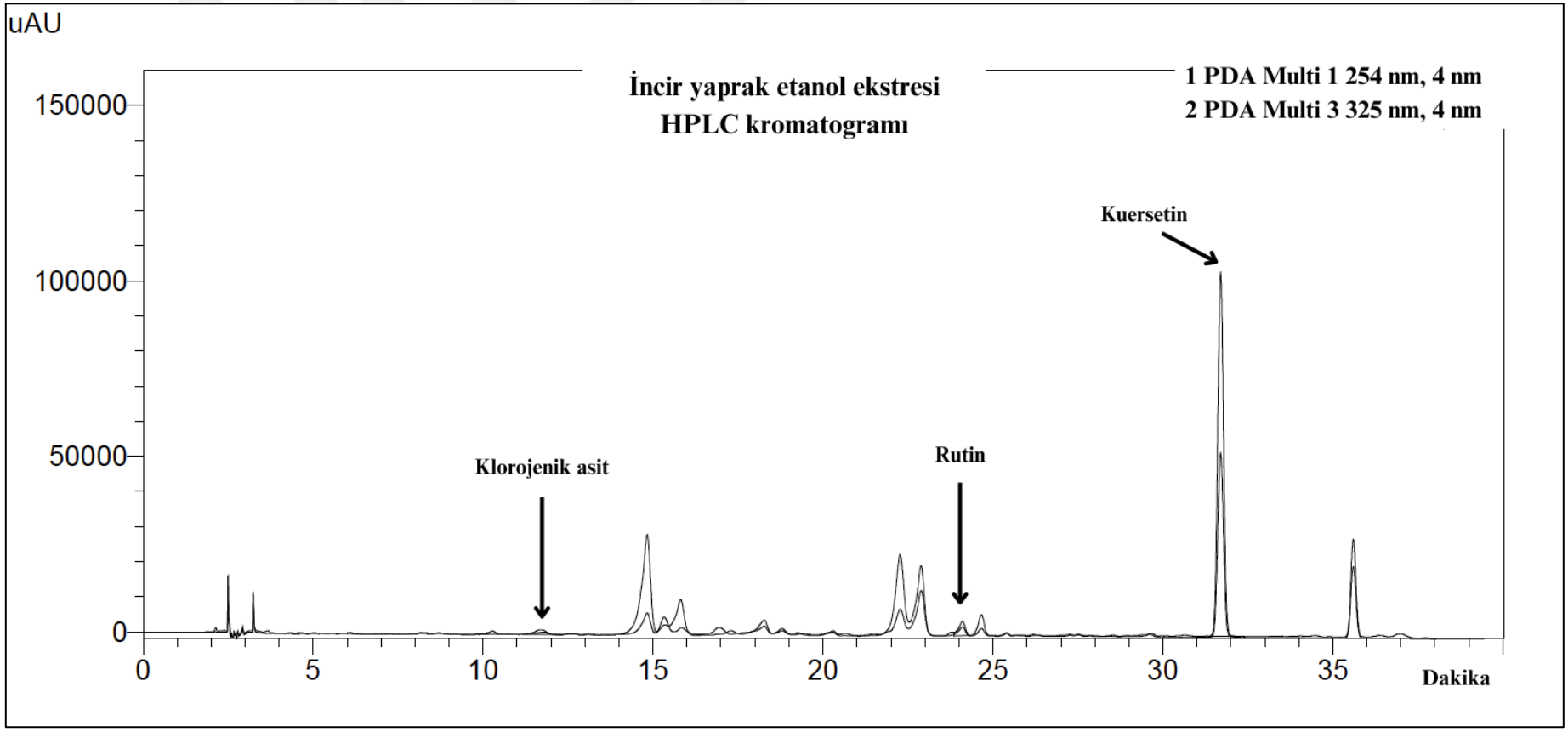
Sonuçlar mg/g ekstre olarak verilmiştir

Sonuçlara bakıldığında tüm örneklerde en yüksek miktarda rutin ve kuersetin bulunmaktadır. İncir yaprak ekstrelerinde klorojenik asit, rutin ve kuersetin saptanmıştır. İncir yapraklarındaki kuersetin miktarı ise diğer tüm örnekler ile kıyaslandığında, 39,62 mg/g ekstre değeri ile en yüksek miktardır. Rutin miktarı incelendiğinde defne, çınar ve tüm karışımların rutin miktarı incir yaprağındaki miktara oranla daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

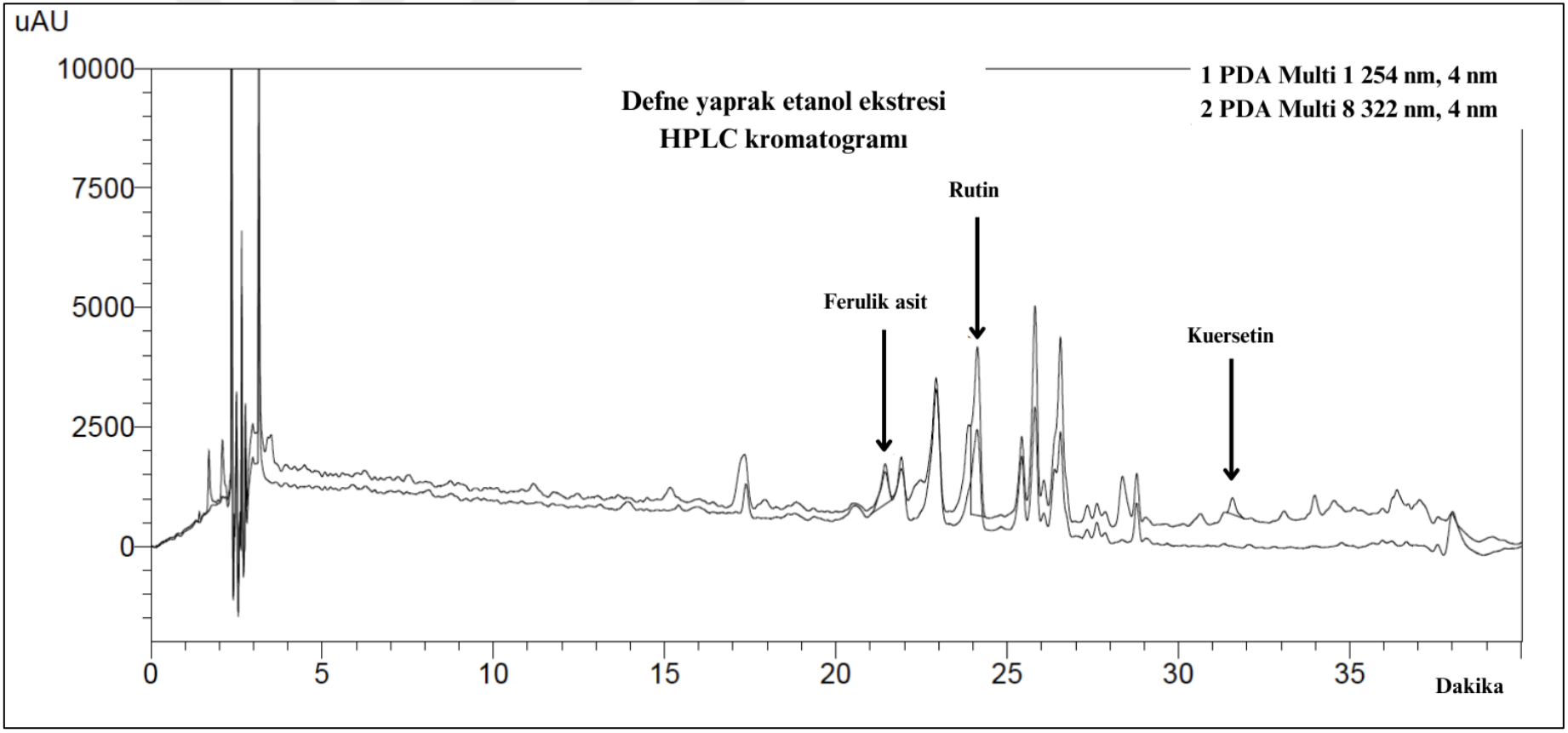
Defne yaprağında rutin ve kuersetinin yanı sıra ferulik asit de tespit edilmiştir. Çınar yaprağında ise bu üç maddeye ek olarak klorojenik asit, gallik asit, apigenin-7-*O*-glikozit ve sinnamik asit de tespit edilmiştir. Kuersetin miktarları defne ve çınar yaprağında oldukça düşüktür.

Karışımlar incelendiğinde ise incir oranının en yüksek olduğu K1'de diğer örneklere kıyasla kuersetin miktarı en yüksek ve ayrıca klorojenik asit de saptanmıştır. Tüm karışımlarda kuersetin miktarı, saf defne ve çınar yaprak ekstresine kıyasla daha yüksektir. K2'de en yüksek oranda defne bulunmakta ve genel anlamda çınardan sonra en zengin içeriğe sahip karışımdır.

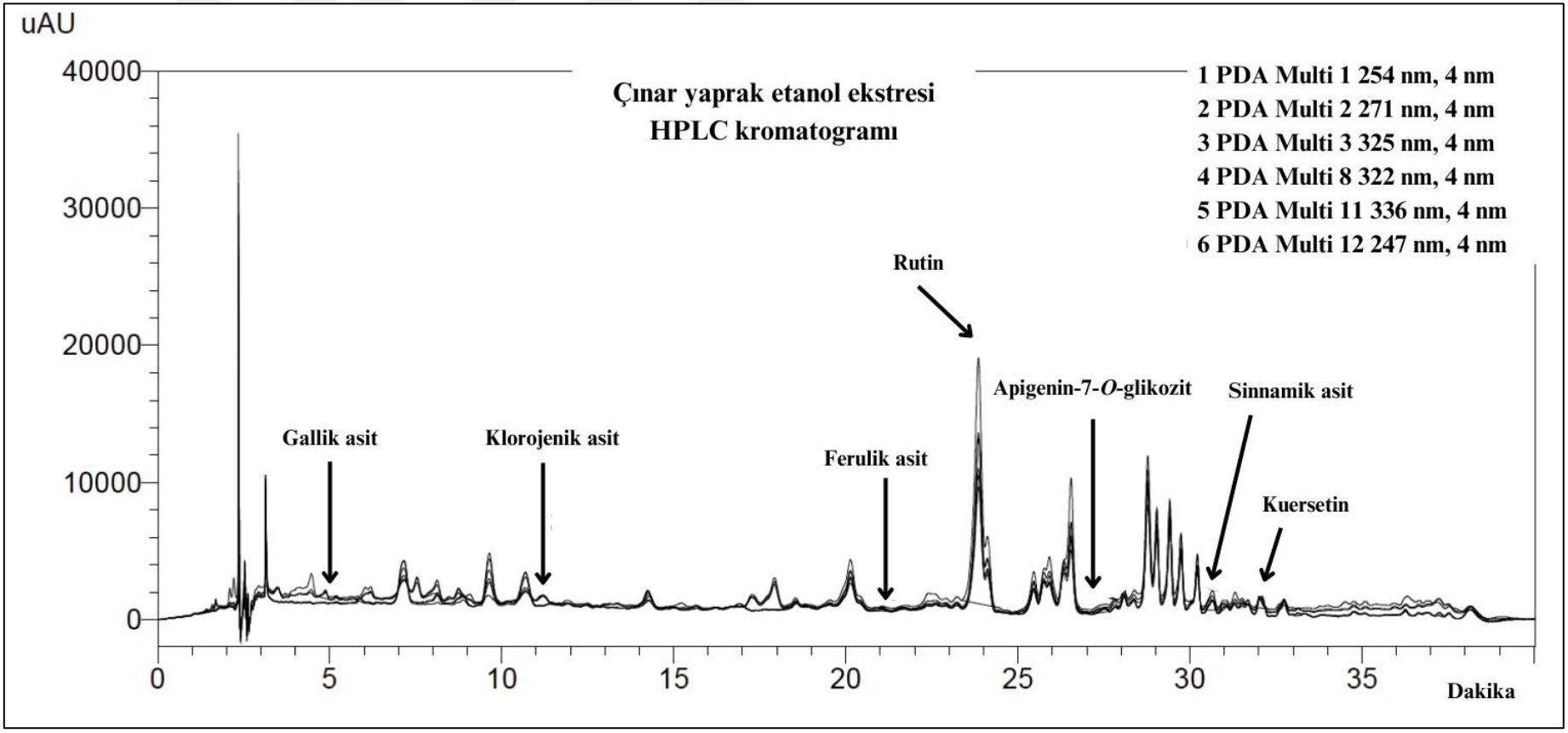
Aşağıda etanol ekstreleri için elde edilen maddelerin kromatogramları verilmiştir (Şekil 4.1-Şekil 4.7). Aşağıdaki kromtagramlarda maddelerin pikleri alıkonma zamanlarına (retention times) göre verilmiştir. Her bir maddenin maksimum absorblandığı dalga boyu farklı olduğu için cihaz yazılımından elde edilen kromatogramlar her bir madde için ayrı şekil olarak verikmektedir. Dolayısıyla tek bir kromatogramda tüm bileşiklerin piklerini göstermek için farklı dalgaboylarında elde edilen kromatogramlar üst üste çakıştırılmıştır. Bunun sonuncunda da aşağıdaki şekillerde her bir madde için görülen birden fazla pik sayısı, diğer dalgaboylarında aynı maddenin daha düşük pik vermesinden kaynaklanmaktadır.



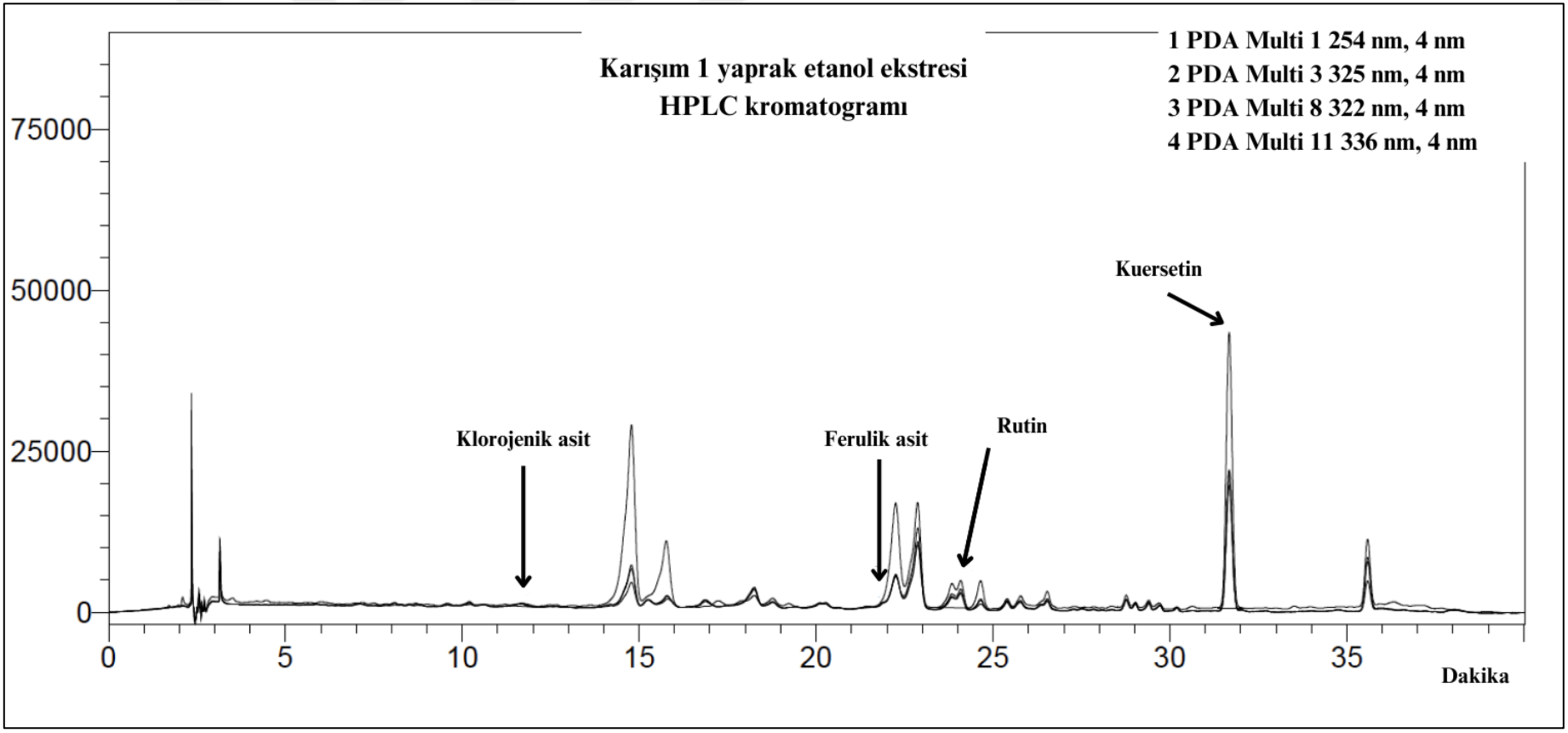
Şekil 4.1: İncir etanol ekstresi kromatogramı



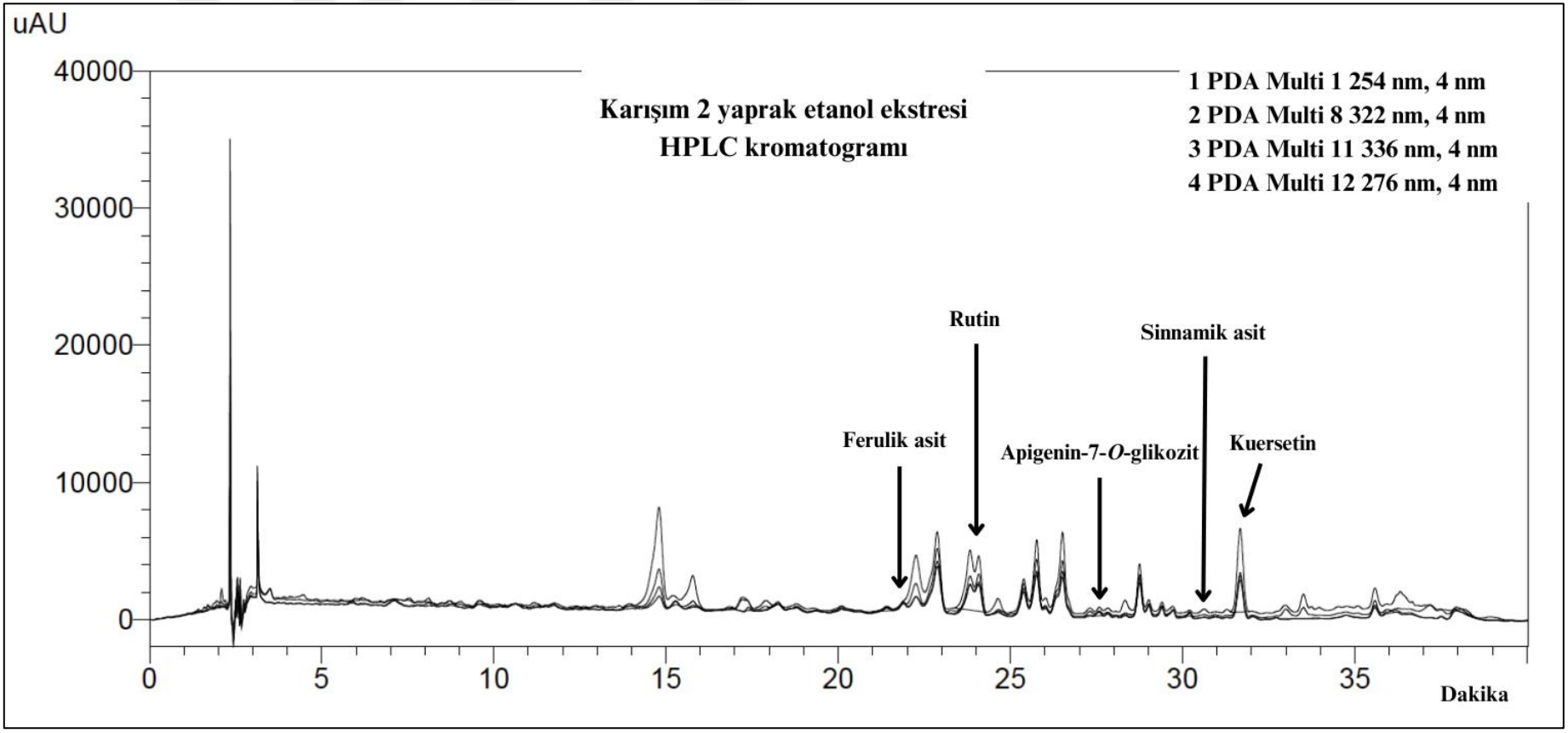
Şekil 4.2: Defne etanol ekstresi kromatogramı



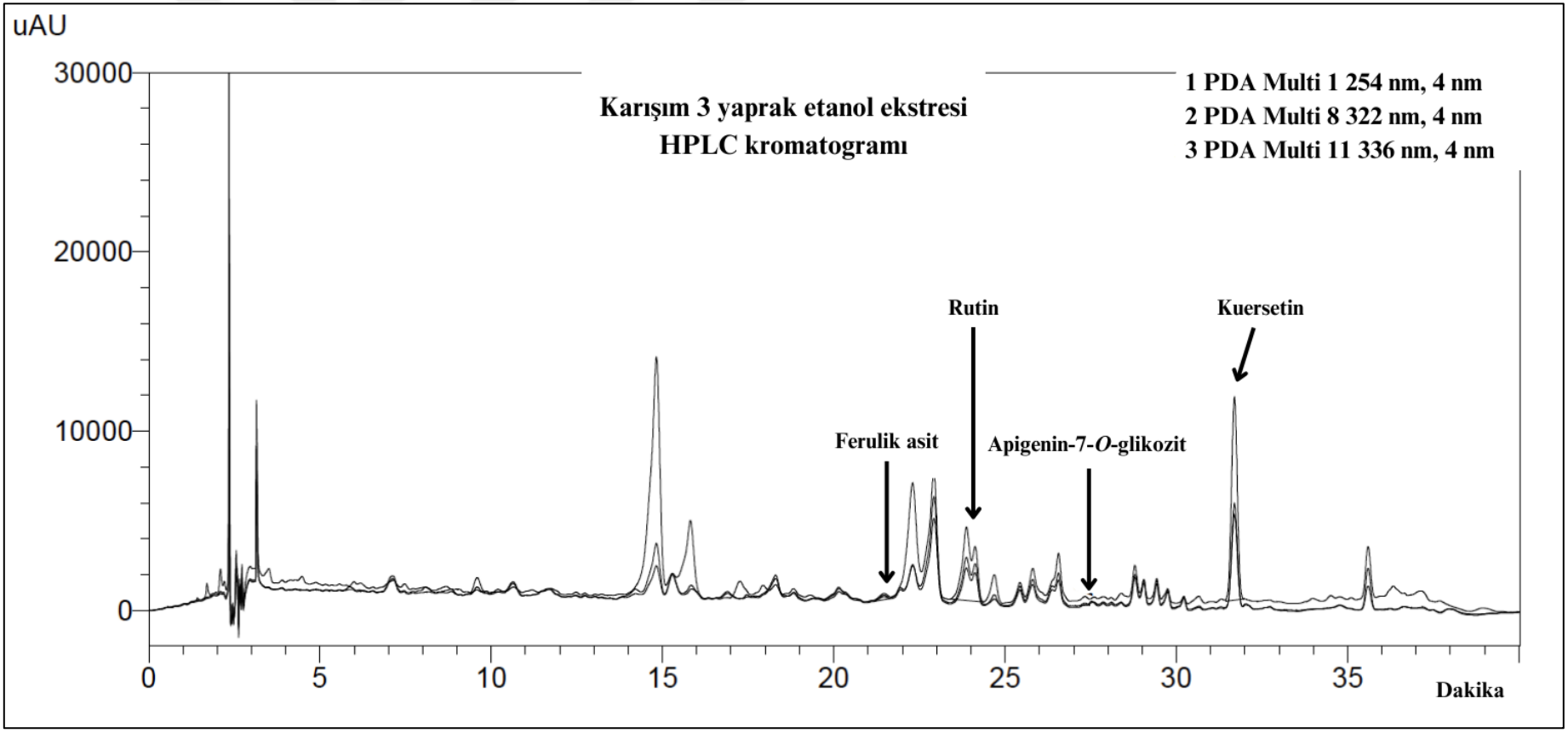
Şekil 4.3: Çınar etanol ekstresi kromatogramı



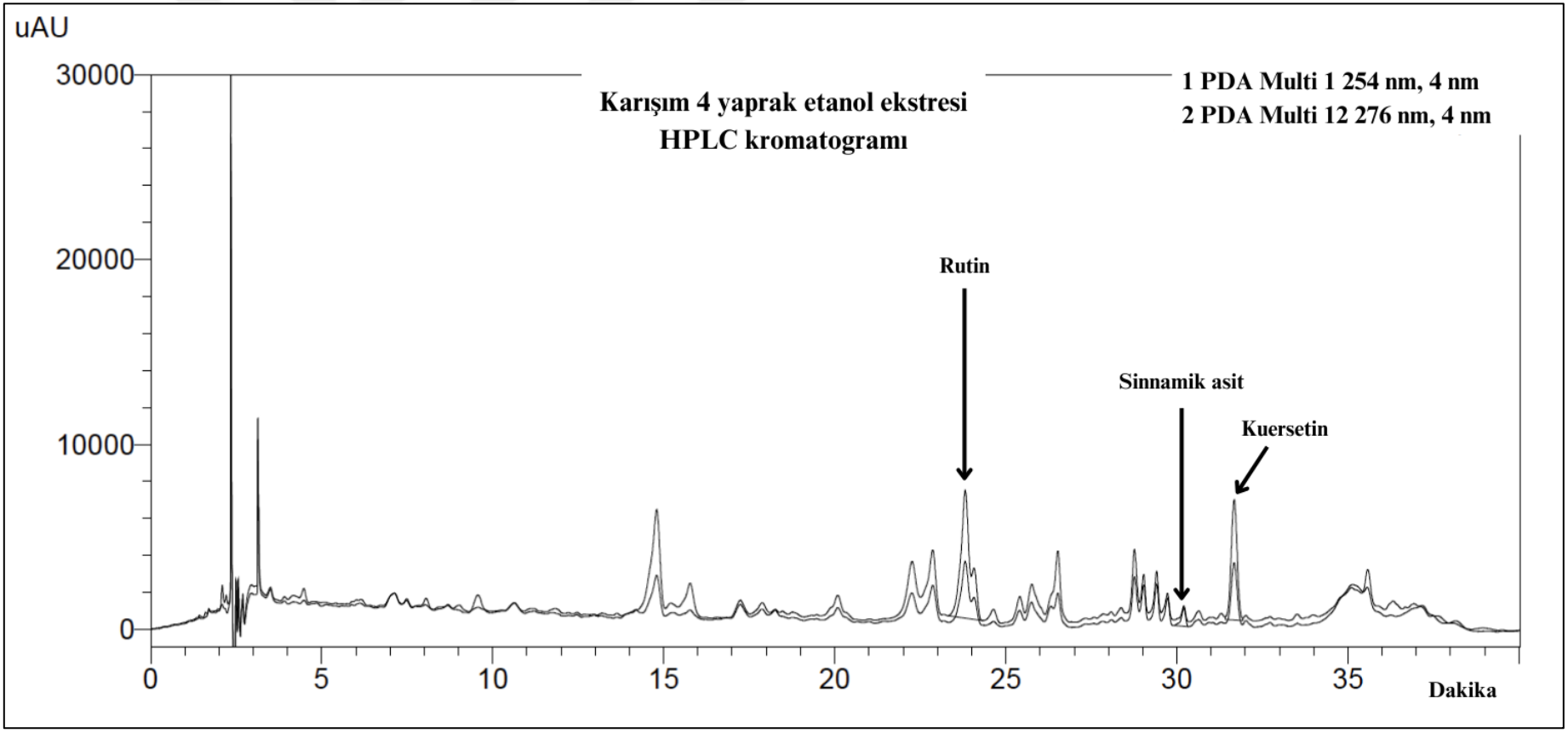
Şekil 4.4: Karışım 1 etanol ekstresi kromatogramı



Şekil 4.5: Karışım 2 etanol ekstresi kromatogramı



Şekil 4.6: Karışım 3 etanol ekstresi kromatogramı



Şekil 4.7: Karışım 4 etanol ekstresi kromatogramı

Su ekstreleri için de aynı şekilde mg madde/g ekstre cinsinden fitokimyasal içerikler aşağıda Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3: Su ekstrelerinin fitokimyasal içeriği

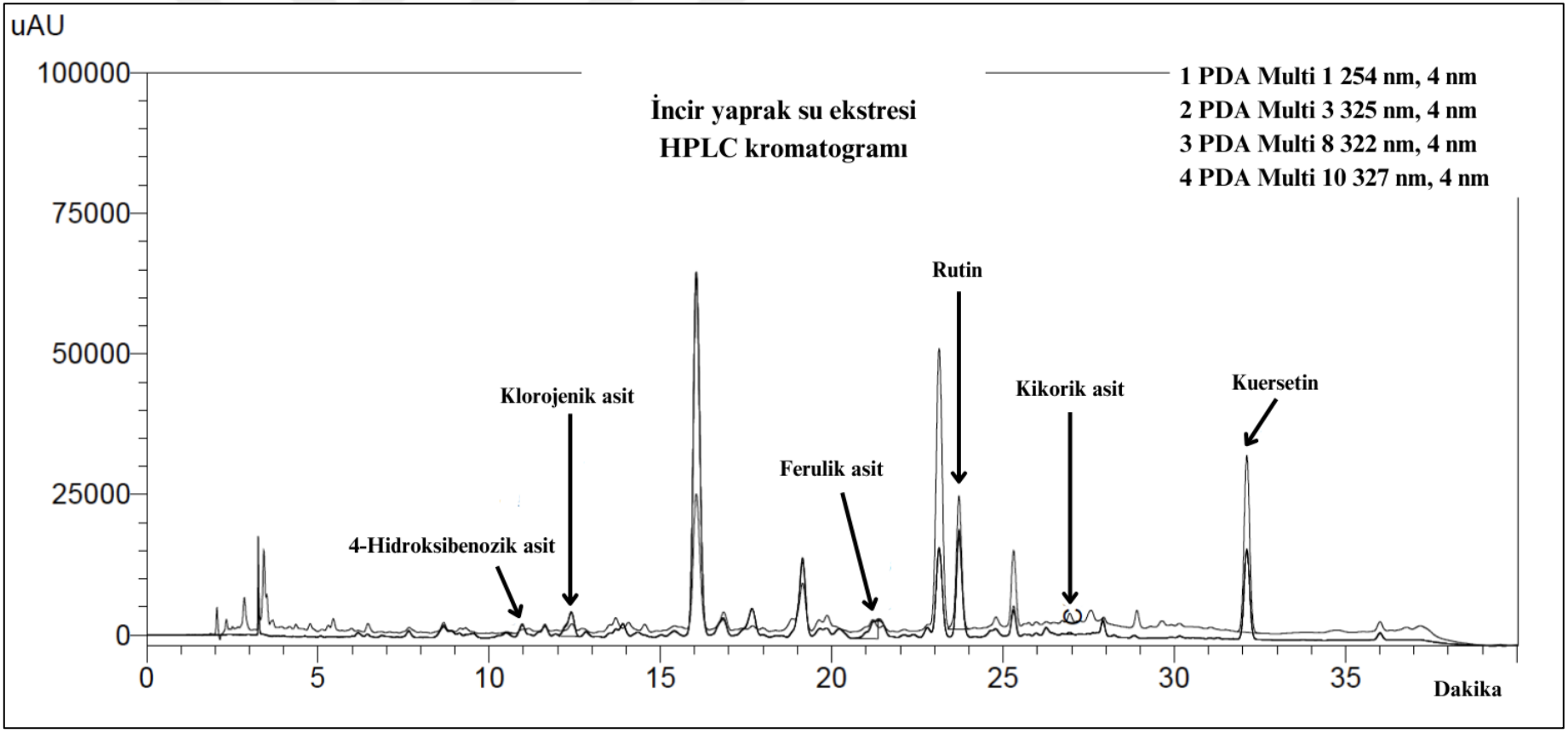
	Örnek						
Madde*	İncir	Defne	Çınar	K1	K2	K3	K4
Klorojenik asit	0,98	-	0,40	0,28	0,24	0,66	0,66
Ferulik asit	0,49	0,08	-	0,38	0,23	0,36	0,14
Rutin	6,41	0,86	0,22	8,35	3,33	4,62	2,80
Kikorik asit	0,18	0,09	-	-	-	-	0,11
Kuersetin	5,81	0,02	0,04	7,00	0,89	1,77	0,90
Gallik asit	-	0,02	0,17	0,02	-	-	0,10
Apigenin-7-*O*-glikozit	-	-	0,06	0,04	0,06	0,04	0,06
4-hidroksibenzoik asit	0,02	-	-	-	-	-	-
Epikateşin	-	1,12	0,23	0,16	0,72	0,33	0,26

Sonuçlar mg/g ekstre olarak verilmiştir

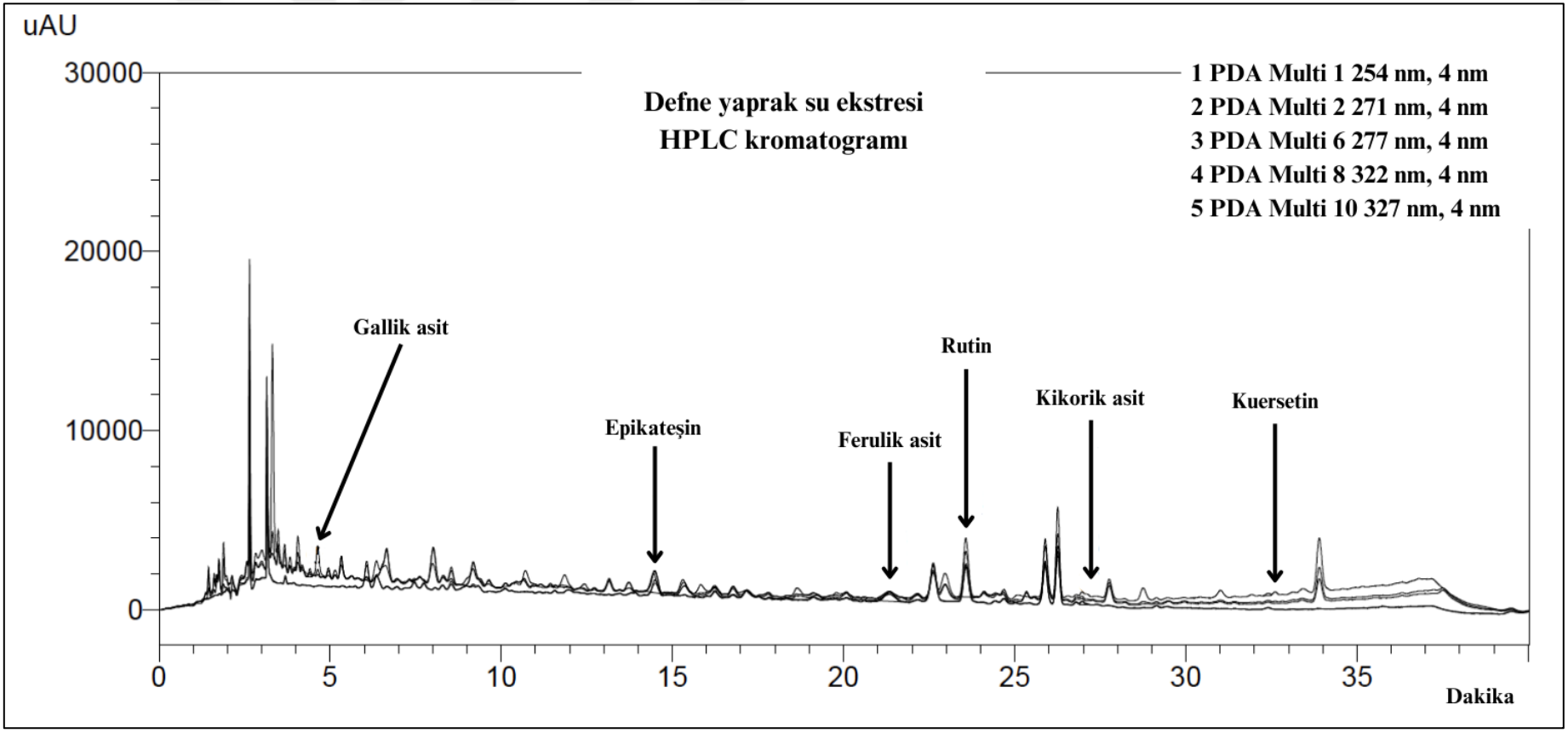
İncir yapraklarında etanol ekstresinde de tespit edilen rutin ve kuersetine ek olarak klorojenik asit, ferulik asit, kikorik asit ve eser miktarda 4-hidroksibenzoik asit tespit edilmiştir. Kuersetin ve rutin miktarı incir yaprağına kıyasla defne ve çınar yapraklarında daha düşük miktardadır. İncir yaprağındaki kuersetin miktarı 5,81 mg/g ekstre iken karışım 1'de (%66,67 incir + %16,67 çınar + %16,67 defne) kuersetin miktarı daha yüksektir (7 mg/g ekstre). Rutin miktarı da benzer şekilde tüm örnekler arasından en yüksek karışım 1'de tespit edilmiştir.

Defne yaprağında rutin ve kuersetinin yanı sıra ferulik asit, kikorik asit, gallik asit ve epikateşin de tespit edilmiştir. Çınar yaprağında ise kuersetin ve rutine ek olarak klorojenik asit, gallik asit, apigenin-7-*O*-glikozit ve epikateşin tespit edilmiştir. Genel olarak karışımlarda tespit edilen maddeler, epikateşin hariç, saf yaprak ekstrelerinde tespit edilenden daha yüksek değildir.

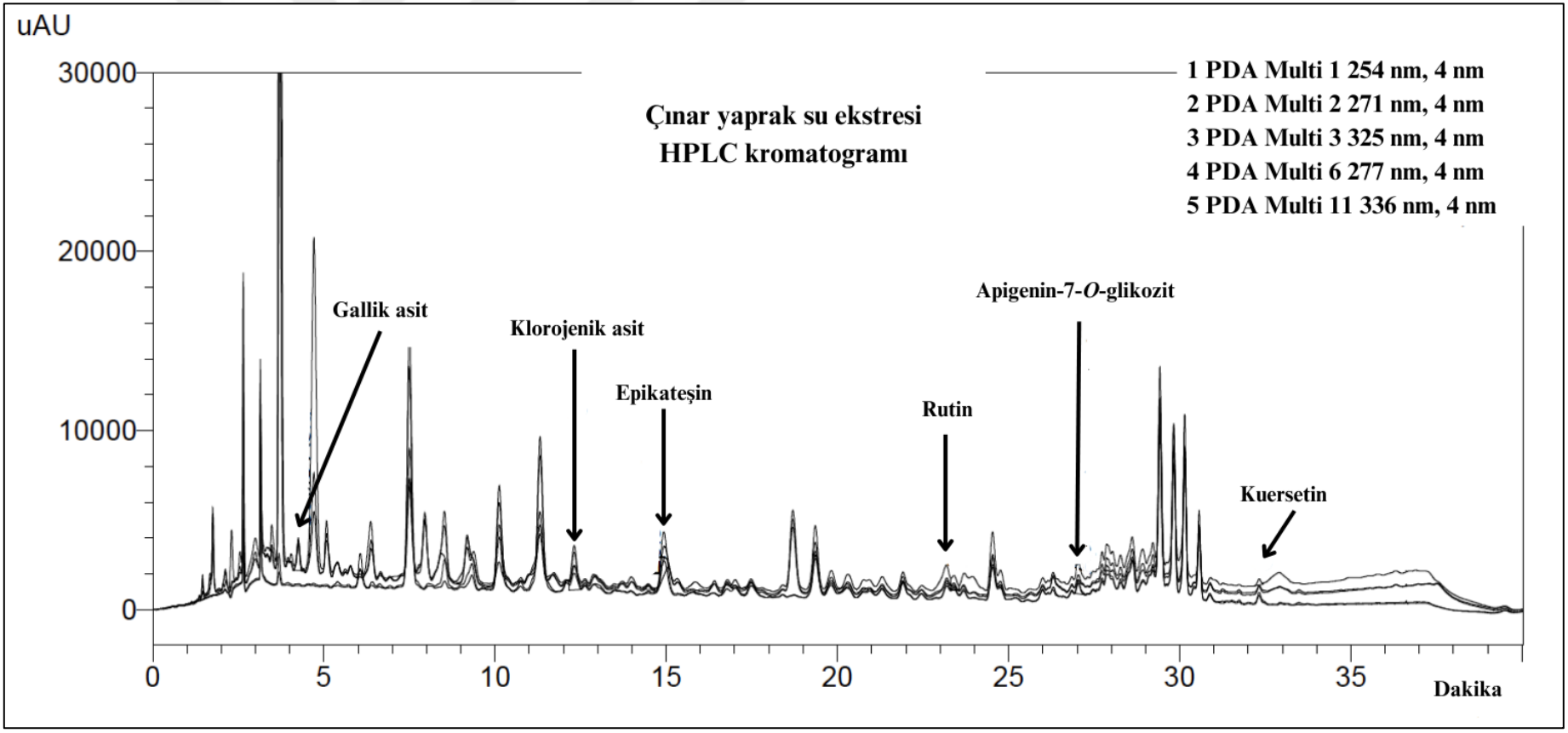
Su ekstreleri için HPLC kromatogramları aşağıda Şekil 4.8'den Şekil 4.14'e kadar verilmiştir.



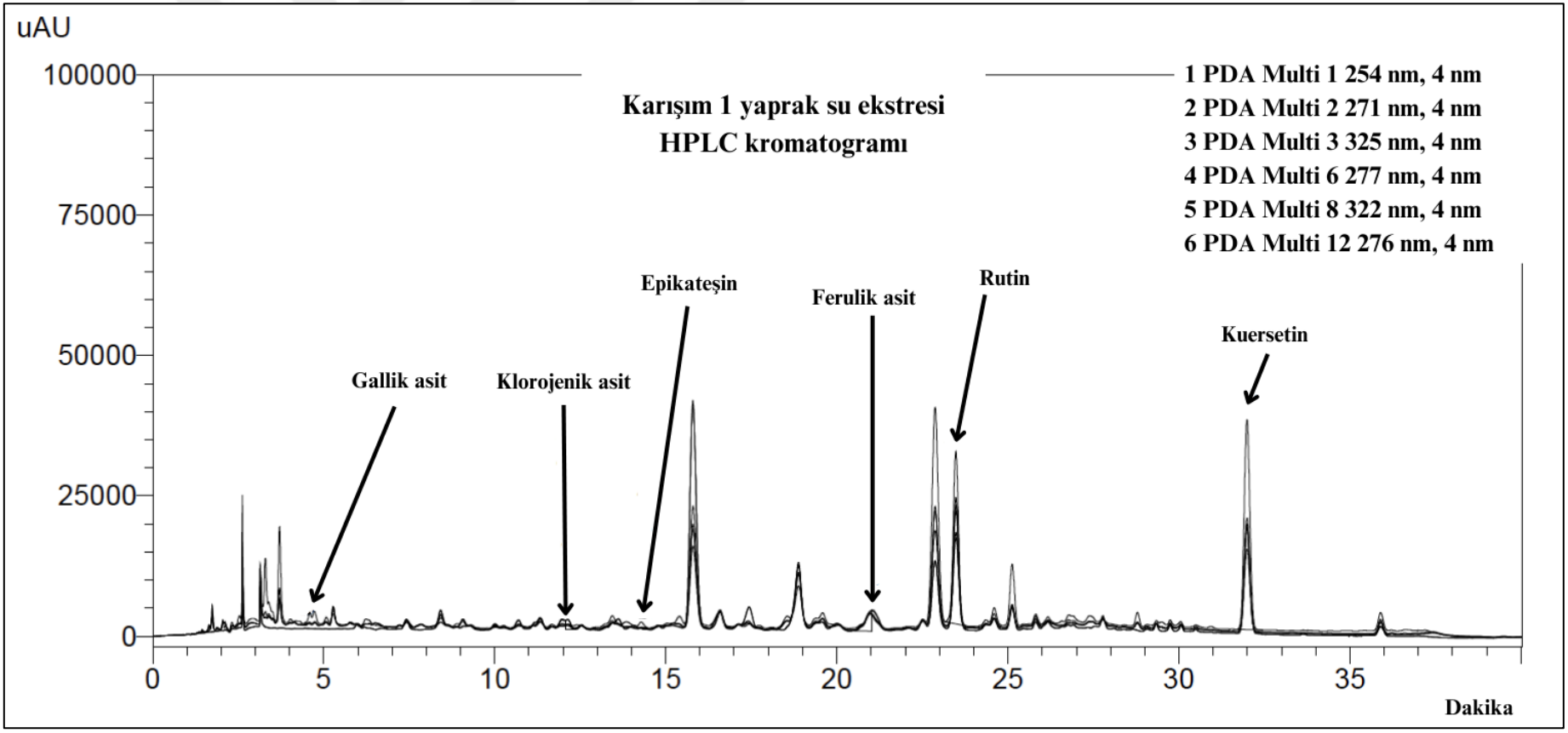
Şekil 4.8: İncir su ekstresi kromatogramı



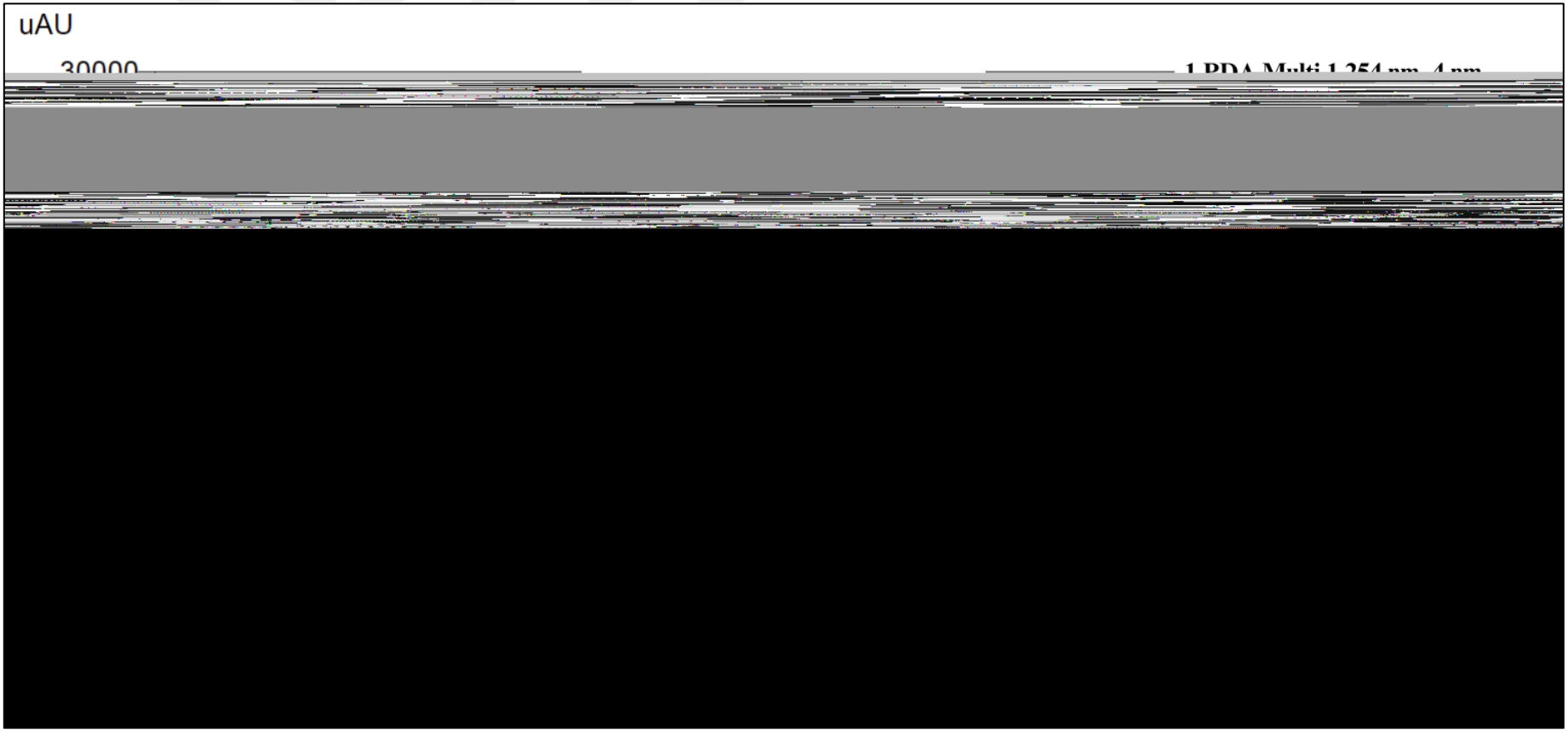
Şekil 4.9: Defne su ekstresi kromatogramı



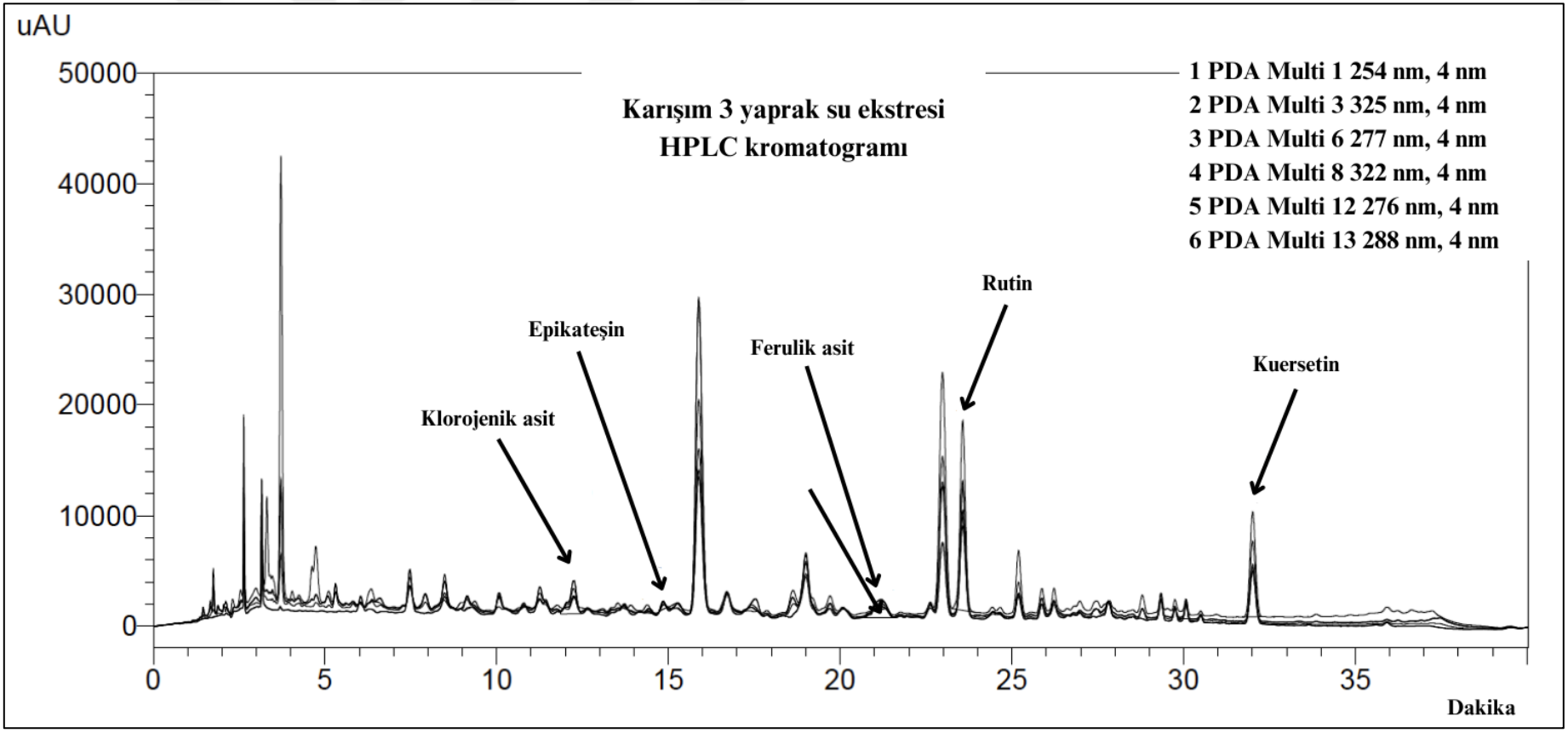
Şekil 4.10: Çınar su ekstresi kromatogramı



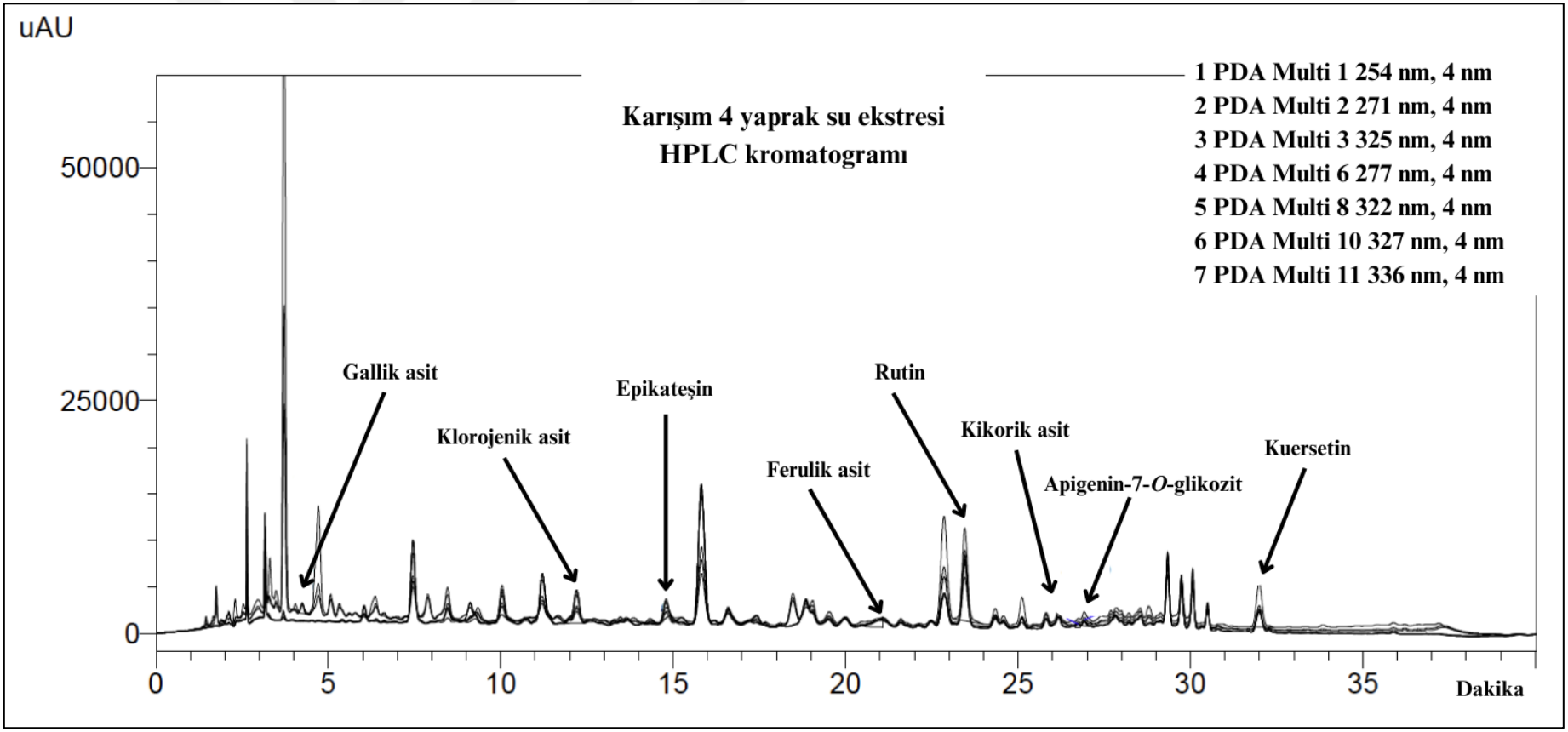
Şekil 4.11: Karışım 1 su ekstresi kromatogramı



Şekil 4.12: Karışım 2 su ekstresi kromatogramı



Şekil 4.13: Karışım 3 su ekstresi kromatogramı



Şekil 4.14: Karışım 4 su ekstresi kromatogramı

4.3. ANTİOKSİDAN ANALİZLERİ

4.3.1. DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil) Radikal Giderme Aktivitesi

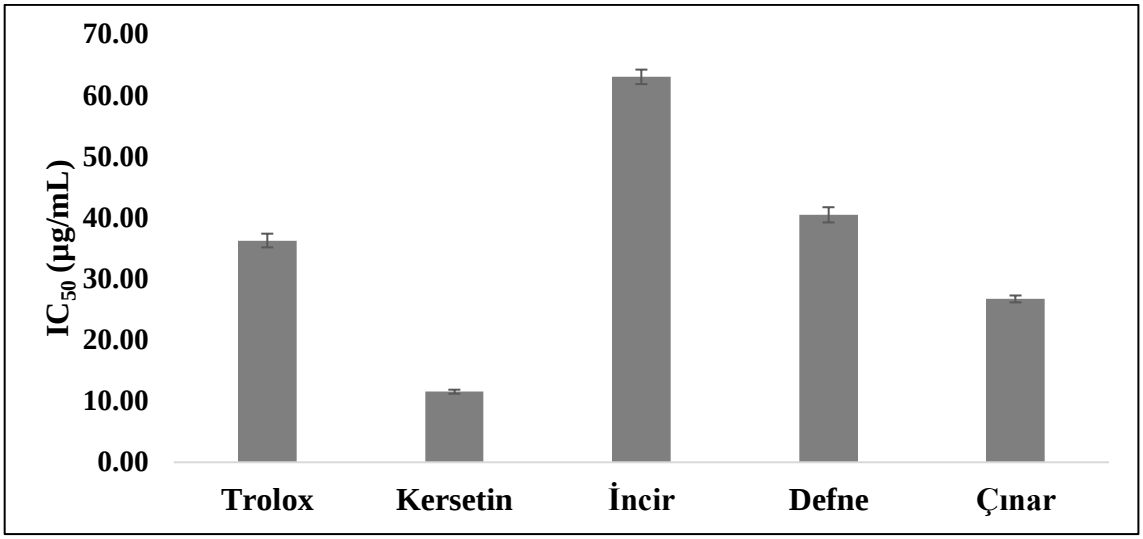
Örneklerin farklı konsantrasyonlarda DPPH˙ inhibe etme aktiviteleri yöntem bölümünde verilen denklem ile hesaplanmıştır. Ardından %50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon (IC_{50}) belirlenmiştir.

Aşağıda Tablo 4.4'te etanol ve su ekstrelerinin IC_{50} değerleri verilmiştir. Ayrıca karışım bileşenlerini oluşturan defne, çınar ve incir türlerinin yapraklarının IC_{50} değerleri de verilmiştir. Kıyas için standart olan trolox ve kuersetin örnekleri kullanılmıştır ve bunların da IC_{50} sonuçları verilmiştir. Şekil 4.15 ve 4.16'da ise bu sonuçların grafikleri verilmiştir. Ekler kısmında bu IC_{50} değerlerinin elde edildiği ham veriler verilmiştir (Ek-3A ve Ek-3B)

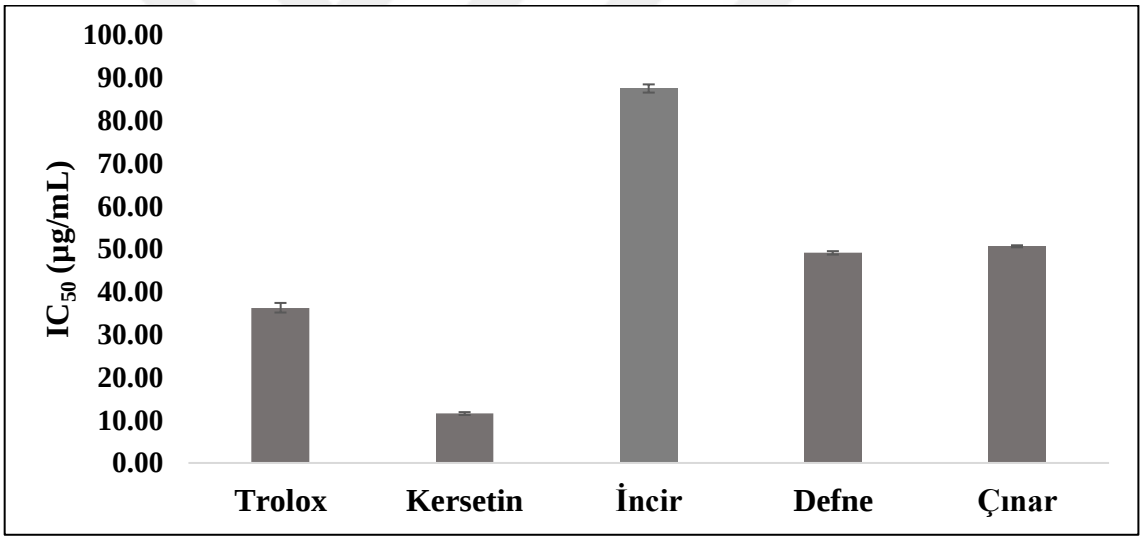
Tablo 4.4: Ekstrelerin DPPH˙ giderme aktivitesi (IC_{50})

	Ortalama IC_{50} (µg/mL) ± standart sapma	
	Etanol Ekstreleri	**Su Ekstreleri**
Trolox	$36,28 \pm 1,12^{a}$	$36,28 \pm 1,12^{a}$
Kuersetin	$11,55 \pm 0,33^{b}$	$11,55 \pm 0,33^{b}$
İncir	$63,06 \pm 1,19^{c}$	$87,55 \pm 0,96^{c}$
Defne	$40,49 \pm 1,25^{d}$	$49,10 \pm 0,40^{a}$
Çınar	$26,73 \pm 0,56^{e}$	$50,64 \pm 0,24^{a}$

Sonuçlar 3 tekrarın ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. ^{a,b,c,d,e}Aynı sütunda yer alan farklı harfler, istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.15: DPPH˙ için etanol ekstrelerinin IC_{50} değerleri



Şekil 4.16: DPPH˙ için su ekstrelerinin IC_{50} değerleri

Tablo 4.4, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da, saf bitki ekstreleri ve pozitif kontrollerin (trolox ve kuersetin) DPPH˙ giderme aktiviteleri %50 inhibisyon sağlayan dozlar (IC_{50}) olarak verilmiştir. Tüm örnekler arasında en düşük IC_{50} değeri pozitif kontrol olarak kullanılan kuersetinde tespit edildi. Diğer pozitif kontrol olan troloxun IC_{50} değeri defne ve incir örneklerine kıyasla düşük olsa da çınar örneğine kıyasla daha yüksekti.

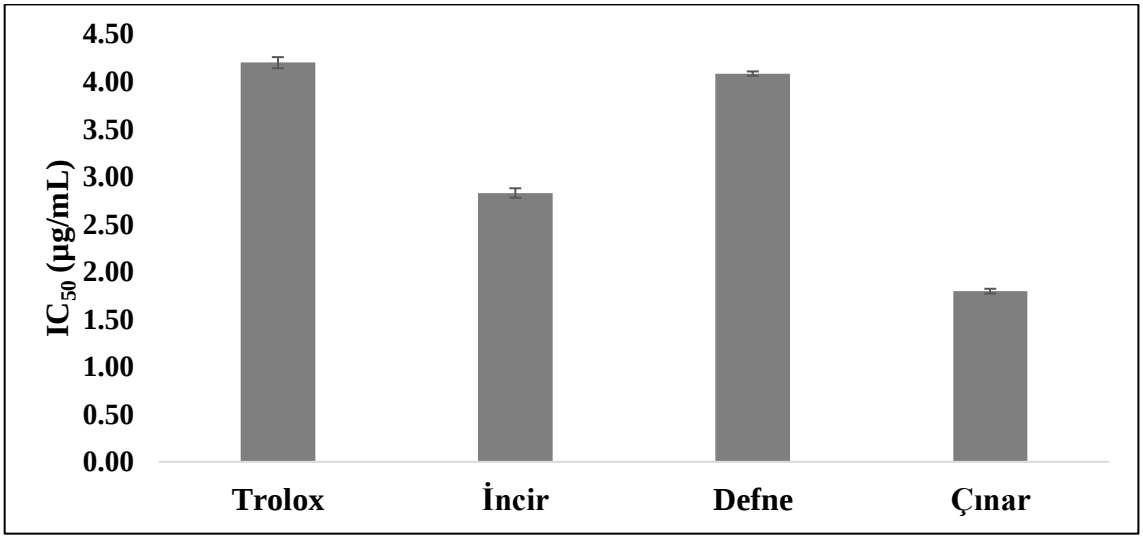
4.3.2. ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) Katyon Radikali Giderme Aktivitesi

Aşağıda Tablo 4.5'de incir, defne ve çınar örnekleri için yaprak etanol ve su ekstrelerinin IC_{50} değerleri verilmiştir. Kıyas için standart olarak trolox kullanılmıştır ve bunun da IC_{50} sonucu verilmiştir. Şekil 4.17 ve 4.18'de ise bu sonuçların grafikleri verilmiştir. Ekler kısmında bu IC_{50} değerlerinin elde edildiği ham veriler verilmiştir (Ek-3C ve Ek-3D).

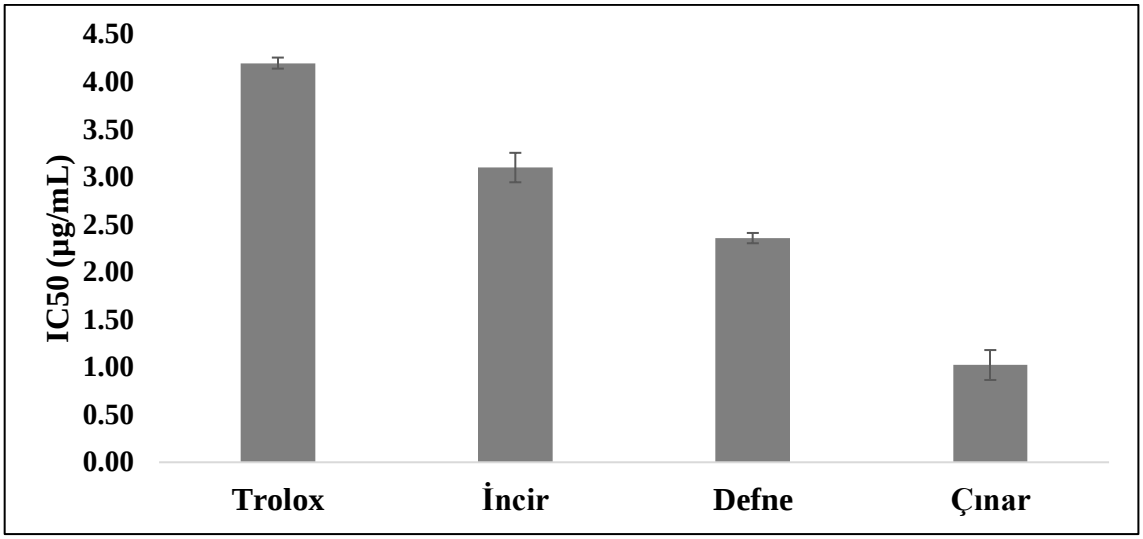
Tablo 4.5: $ABTS^{\cdot+}$ için ekstrelerinin IC_{50} değerleri

	Ortalama IC_{50} (µg/mL) ± standart sapma	
	Etanol Ekstreleri	**Su Ekstreleri**
Trolox	$4,20 \pm 0,06^{a}$	$4,20 \pm 0,06^{a}$
İncir	$2,83 \pm 0,05^{b}$	$3,10 \pm 0,16^{b}$
Defne	$4,08 \pm 0,02^{c}$	$2,36 \pm 0,05^{b}$
Çınar	$1,80 \pm 0,03^{d}$	$1,02 \pm 0,16^{c}$

Sonuçlar 3 tekrarın ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. ^{a,b,c,d}Aynı sütunda yer alan farklı harfler, istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.17: $ABTS^{\cdot+}$ için etanol ekstrelerinin IC_{50} değerleri

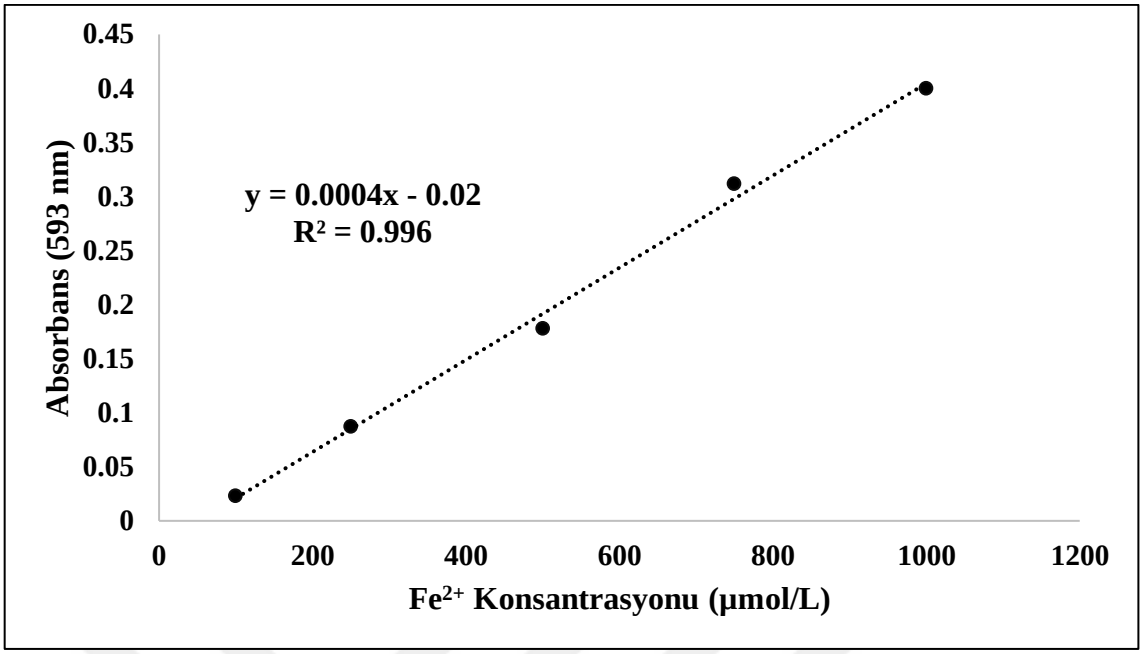


Şekil 4.18: $ABTS^{\cdot+}$ için su ekstrelerinin IC_{50} değerleri

Sonuçlar incelendiğinde tüm ekstrelerin kontrol olan troloxtan daha düşük bir IC_{50} değerine sahip oldukları görülmektedir. En düşük IC_{50} değeri her iki etanol ve su ekstreleri için çınar yaprağında elde edilmiştir (sırasıyla 1,80 ± 0,03 ve 1,02 ± 0,16 µg/mL). İncir yapraklarının etanol ekstresi su ekstresine kıyasla daha yüksek aktiviteye sahiptir. Defne yaprakları için ise tam tersine söylemek mümkündür.

4.3.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Gücü Antioksidan Aktivitesi (FRAP).

Demir (III) indirgeme kapasitesi demir (II) sülfat ($FeSO_4$) eşdeğeri olarak verilmektedir. Aşağıda Şekil 4.19'da $FeSO_4$ standardının eğrisi verilmiştir. Bu eğride görülen R^2 değeri yeterli derecede yüksektir (R^2: 0,996).



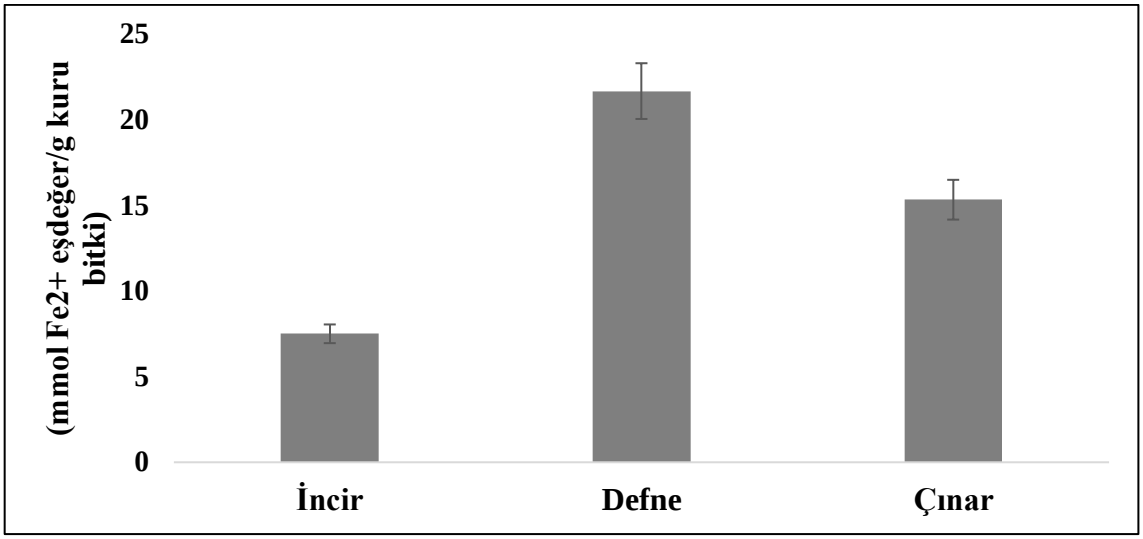
Şekil 4.19: Fe^{2+} standart grafiği

Yukarıdaki eğriden elde edilen denklem ile hesaplanan demir indirgeme aktivitesi mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki olarak verilmiştir. Aşağıda Tablo 4.6 ve Şekil 4.20 ile 4.21'de incir, çınar ve defne bitkilerinden elde edilen etanol ve su ekstrelerin FRAP antioksidan aktivite ölçüm sonuçları verilmiştir. Ekler kısmında bu değerlerin elde edildiği ham veriler verilmiştir (Ek-3E ve Ek-3F).

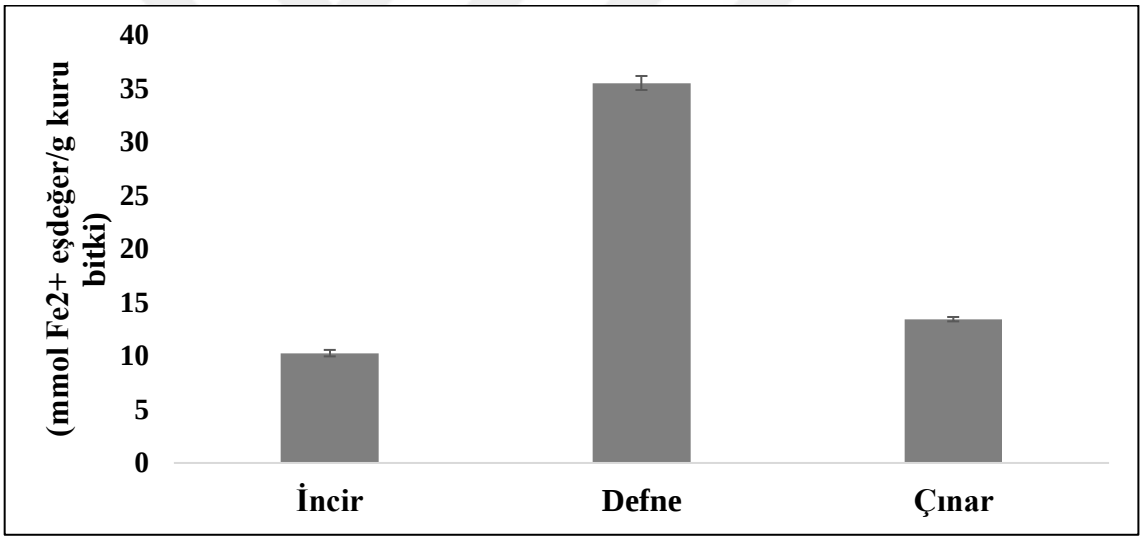
Tablo 4.6: Etanol ve su ekstrelerinin FRAP aktiviteleri

	Etanol ekstreleri (mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki)	**Su ekstreleri** (mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki)
İncir	$7,51 \pm 0,55^{a}$	$10,27 \pm 0,30^{a}$
Defne	$21,69 \pm 1,63^{b}$	$35,53 \pm 0,66^{b}$
Çınar	$15,34 \pm 1,16^{c}$	$13,44 \pm 0,20^{c}$

Sonuçlar 3 tekrarın ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. ^{a,b,c}Aynı sütunda yer alan farklı harfler, istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.20: Etanol ekstrelerinin FRAP aktivitesi

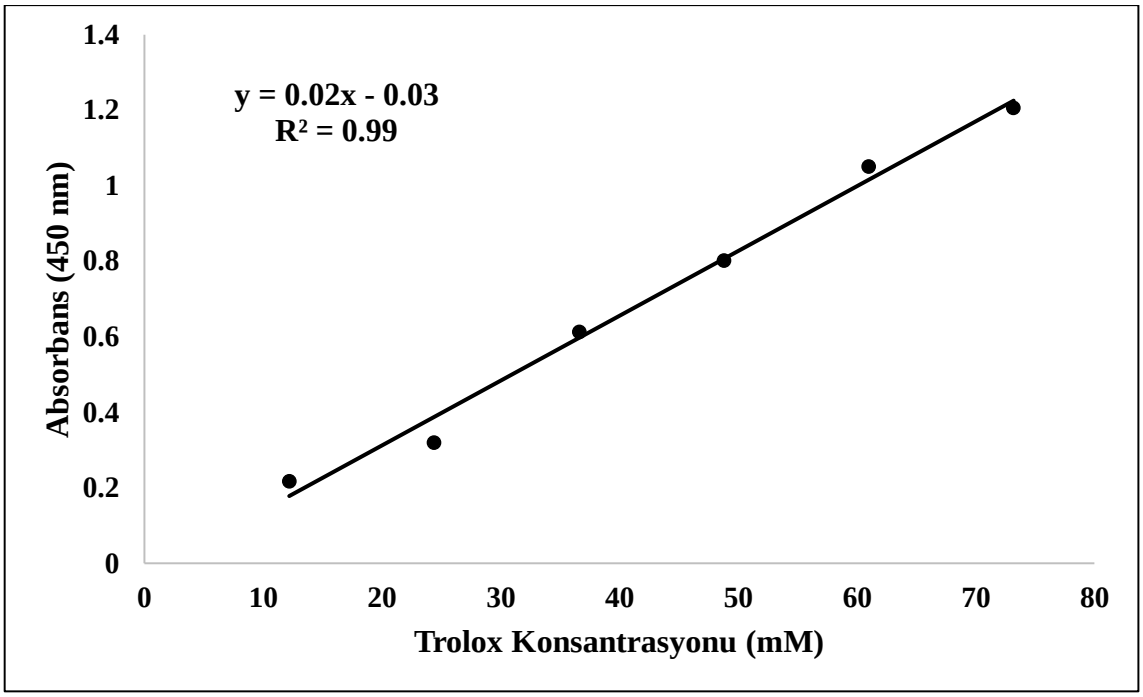


Şekil 4.21: Su ekstrelerinin FRAP aktivitesi

Örnekler arasında defne yapraklarının hem etanol hem de su ekstrelerinin FRAP aktivitesi en yüksekti (sırasıyla 21,69 ± 1,63 ve 35,53 ± 0,66 mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki). İncir yapraklarının hem etanol hem de su ekstrelerinin aktivitesi diğer iki bitkiye göre daha düşüktü.

4.3.4. Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (CUPRAC)

Bakır indirgeme aktivitesi trolox eşdeğeri olarak verilmiştir. Aşağıda Şekil 4.22'de trolox standardının eğrisi verilmiştir. Eğrinin denklemi incelendiğinde R^2 değeri 0,99 olduğu gözlemlenmektedir. Bu da bu eğrinin bağımsız faktör-sonuç ilişkisini doğru bir şekilde temsil ettiğini doğrulamaktadır.



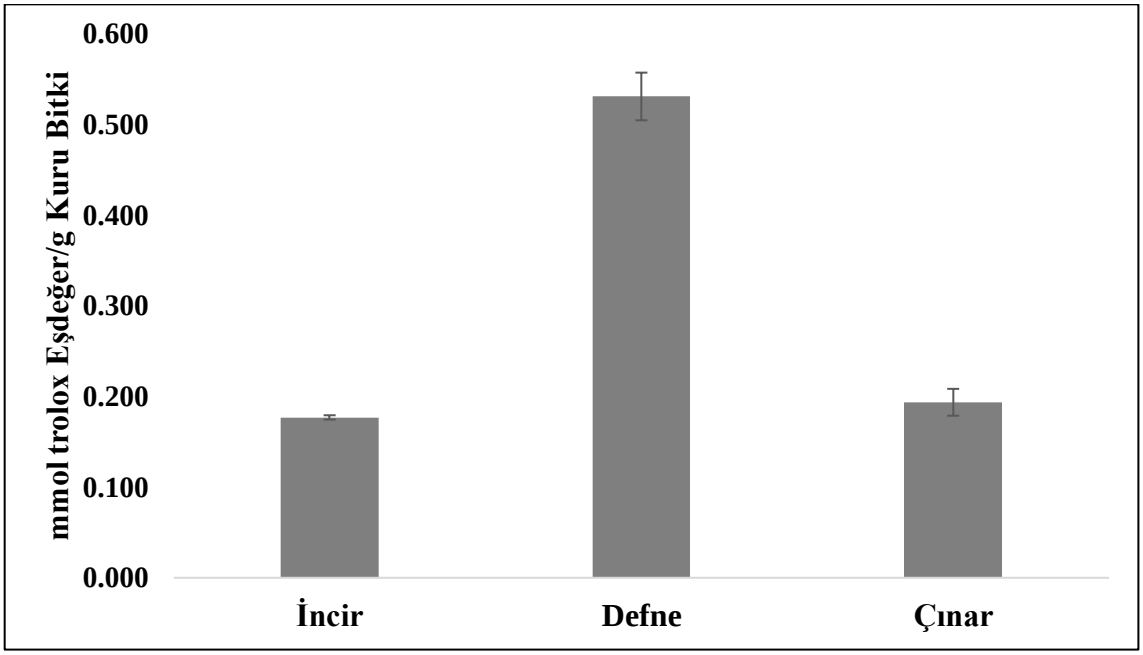
Şekil 4.22: Trolox standart grafiği

Etanol ile soxhlet düzeneğinde ve su ile dekoksiyon yolu ile ekstrakte edilen örneklerin bakırı indirgeme aktivite sonuçları aşağıdaki Tablo 4.7 ve Şekil 4.23 ile 4.24'te verilmiştir. Ekler kısmında bu IC_{50} değerlerinin elde edildiği ham veriler verilmiştir (Ek-3G ve Ek-3H)

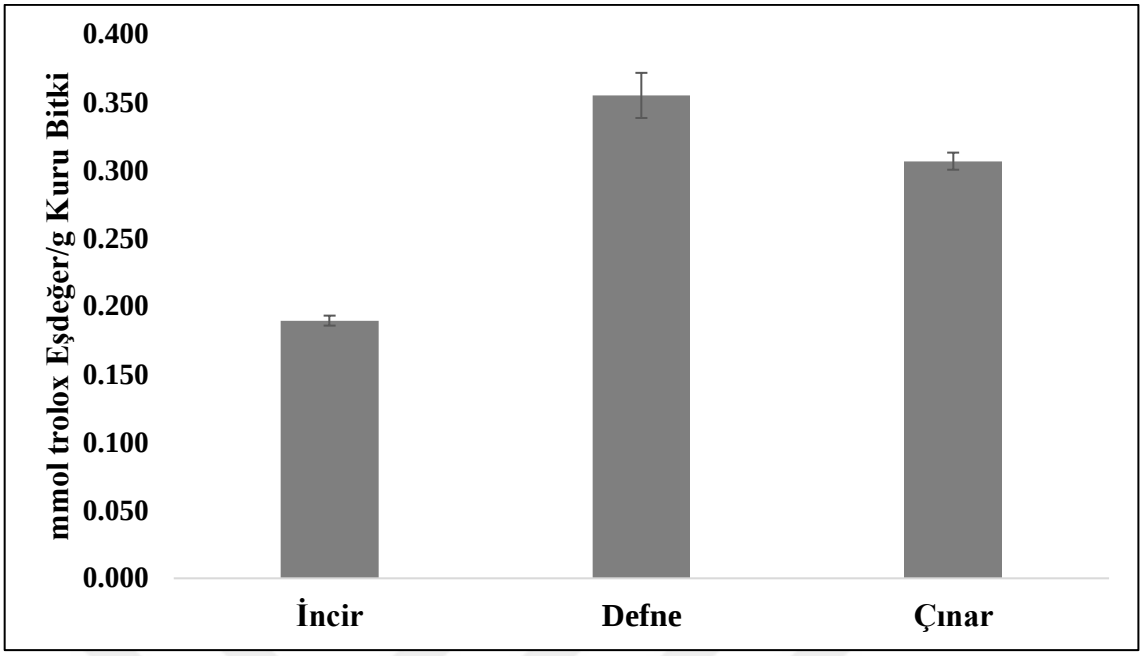
Tablo 4.7: Etanol ekstrelerinin CUPRAC aktivitesi

	Etanol ekstreleri (mmol trolox eşdeğer/g kuru (bitki)	**Su ekstreleri** **(**mmol trolox eşdeğer/g kuru bitki)
İncir	0,18 ± 0,002[a]	0,19 ± 0,004[a]
Defne	0.53 ± 0,03[b]	0,36 ± 0,02[b]
Çınar	0.19 ± 0,02[a]	0,31 ± 0,01[c]

Sonuçlar 3 tekrarın ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. [a,b,c]Aynı sütunda yer alan farklı harfler, istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.23: Etanol ekstrelerinin CUPRAC aktivitesi



Şekil 4.24: Su ekstrelerinin CUPRAC aktivitesi

Şekil 4.23'deki sonuçlar değerlendirildiğinde, defne yaprak ekstreleri en yüksek aktiviteye sahiptir (0,53 mmol trolox eşdeğer/g kuru bitki). İncir yapraklarının aktivitesi ise diğer iki bitkiye kıyasla daha düşüktür. Şekil 4.24'teki yaprak su ekstreleri arasında yine en yüksek aktivite defne yaprağında görülürken en düşük aktivite incir yapraklarında saptanmıştır.

4.4. DENEY TASARIMI SONUÇLARI

Etanol ve su ekstreleri için birinci dereceden denklem ile tasarlanan sistem tarafından önerilen karışımlar hazırlanmıştır. Bu karışımların her birinin antioksidan aktiviteleri yukarıda bahsi geçen dört antioksidan ölçüm yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.8 ve 4.9'da verilmiştir

Tablo 4.8: Deney tasarımı için etanol ekstrelerinin antioksidan sonuçları

Deney numarası	**Örnek**	**DPPH IC_{50}** (µg/mL)	**ABTS IC_{50}** (µg/mL)	**FRAP** (mmol Fe^{2+}/g kuru bitki)	**CUPRAC** (mmol trolox/g kuru bitki)
1	İncir	64,37	2,79	6,93	0,174
2	İncir	62,06	2,81	7,57	0,179
3	İncir	62,75	2,88	8,02	0,177
4	Defne	40,09	4,10	19,87	0,502
5	Defne	39,49	4,06	22,21	0,553
6	Defne	41,88	4,08	23,00	0,538
7	Çınar	27,33	1,82	14,03	0,177
8	Çınar	26,22	1,79	15,77	0,201
9	Çınar	26,63	1,77	16,23	0,203
10	K1	54,15	2,80	8,19	0,221
11	K2	29,45	2,34	15,34	0,342
12	K3	40,13	1,74	10,95	0,240
13	K4	34,15	1,82	7,22	0,255

Tablo 4.8'deki sonuçlar incelendiğinde karışımlar arasında DPPH, CUPRAC ve FRAP yönünden en aktif karışım K2 iken ABTS açısından en aktif karışım K3 olarak tespit edilmiştir. Sadece DPPH sonuçları incelendiğinde çınar ekstresi kadar düşük bir IC_{50} değeri tespit edilmemiştir. K2'nin IC_{50} değeri ikinci en etkili değerdi (29,45 µg/mL). Tüm karışım ekstrelerinin IC_{50} değerleri incir ekstresinin IC_{50} değerine kıyasla daha düşüktü.

ABTS sonuçları açısından K3 IC_{50} değeri tüm ekstreler arasında en düşük değerdi. Bu karışım 3 bitkinin eşit oranlarda karıştırılarak hazırlanan karışımdır. Diğer karışımların IC_{50} değerleri incir ve defneninkine kıyasla daha düşüktü. FRAP aktiviteleri açısından ise tüm karışımların antioksidan aktivitesi defne ekstresinin aktivitesinden daha düşüktü. Karışımlar arasında en yüksek antioksidan aktivite K2'de elde edilmiştir (defnenin en yüksek oranda bulunduğu karışım). Son olarak CUPRAC açısından defneden sonra en yüksek antioksidan kapasite K2'de iken tüm karışımların antioksidan kapasiteleri incir ve çınar ekstrelerine kıyasla daha yüksekti.

Tablo 4.9: Deney tasarımı için su ekstrelerinin antioksidan sonuçları

Deney sayısı	**Örnek**	**DPPH IC_{50}** (µg/mL)	**ABTS IC_{50}** (µg/mL)	**FRAP** (mmol Fe^{2+}/g kuru bitki)	**CUPRAC** (mmol trolox/g kuru bitki)
1	İncir	88,47	3,27	10,59	0,192
2	İncir	86,56	2,96	10,00	0,191
3	İncir	87,55	3,08	10,22	0,185
4	Defne	49,46	2,32	34,78	0,337
5	Defne	48,67	2,42	35,79	0,369
6	Defne	49,16	2,33	36,01	0,359
7	Çınar	50,91	0,97	13,26	0,300
8	Çınar	50,49	1,20	13,41	0,311
9	Çınar	50,51	0,90	13,66	0,310
10	K1	71,47	2,54	8,23	0,171
11	K2	54,02	1,58	17,85	0,668
12	K3	59,86	2,61	10,42	0,465
13	K4	52,95	2,20	13,67	0,695

Tablo 4.9'deki verilen sonuçlara göre karışımlar arasında DPPH ve CUPRAC açısından K4 daha etkiliyken, ABTS ve FRAP yönünden en aktif karışım K2'ydi. DPPH sonuçları incelendiğinde K1 ekstresi incirden daha etkiliyken, çınar, defne ve diğer karışımlara oranla daha yüksek bir IC_{50} değerine sahipti. Diğer 3 karışımın IC_{50} değerleri ise çınar ve defne ile aynı değerlere yakındı, ancak hiçbiri ne çınar ne de defne kadar düşüktü.

ABTS sonuçları açısından ise K2 çınardan daha yüksek bir IC_{50} değerine sahip olsa da diğer tüm ekstreleri nazaran daha etkiliydi. Diğer 3 karışım incirden daha etkili, defne ile benzer seviyede, çınardan ise daha etkisizdi. FRAP aktivitesi incelendiğinde tüm karışımların antioksidan aktivitesi defne ekstresinin aktivitesinden daha düşüktü. Karışımlar arasında en yüksek antioksidan aktivite K2'de elde edilmiştir (defnenin en yüksek oranda bulunduğu karışım). K1 hariç tüm karışımların FRAP değerleri incir ekstresinden daha yüksekti. Son olarak CUPRAC için K4 ve K2 oldukça yüksek aktiviteye sahipti; defneye kıyasla bile neredeyse iki katı aktivite. K1 hariç tüm karışım ekstrelerinin CUPRAC kapasiteleri saf bitkilerinkine oranla daha yüksekti.

4.5. DENEY TASARIMI SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Tablo 4.8 ve 4.9'daki sonuçlar programa girildikten sonra yöntem kısmında belirtilen parametreler programın analiz kısmından elde edilerek sonuçlar ışığında incelenmiştir. Bu sayede modelin geçerliliği ve kullanılabilirliği tespit edilmiştir. Bu anlamda ilk olarak ikinci sekmede (*fit summary*) yer alan uyumluluk özetini içeren tabloda **kalın** harfler ile işaret edilerek önerilen denklem türleri incelenmiştir. Önerilen denklemler p ve f-değerleri ile R^2 değerleri bakımından en uygun denklemler olarak program tarafından önerilmektedir. Aşağıda etanol ve su ekstreleri karışımlarının sırasıyla DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC çalışmaları için uyumluluk özeti tabloları ve seçilen uygun denklemin ANOVA sonuç tabloları verilmiştir.

4.5.1. Etanol Ekstreleri

Tablo 4.10 ve 4.11'de DPPH˙ giderme aktivitesi bakımından etanol ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.10: Etanol ekstreleri DPPH˙ aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	**p-değeri**	**Uyumsuzluk p-değeri**	**Ayarlı R^2**	**Kestirilen R^2**	
Linear	< 0,0001	0,9993	0,9264	0,9125	
Karesel	**0,0002**	**0,1366**	**0,9931**	**0,9593**	**Önerilen**
Özel Kübik	0,1366		0,9946		
Kübik					***Eşlenmiş***

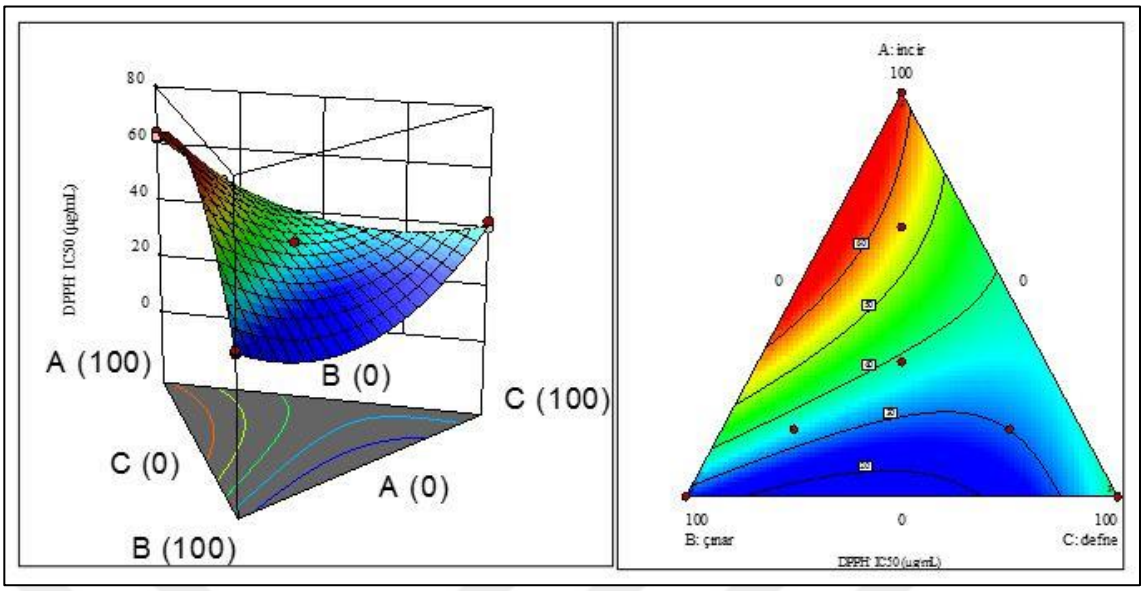
Yukarıda Tablo 4.10'da karesel model önerilmiş olup R^2 değerleri incelendiğinde ise ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olmadığı görülmektedir. Karesel model için ANOVA sonuçları aşağıda Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11: Etanol ekstreleri DPPH˙ aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	**df**	**Kareler Ortalaması**	**F-değeri**	**p-değeri**	
Model	2403,73	5	480,75	345,18	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	2265,41	2	1132,71	813,29	< 0,0001	
AB	67,98	1	67,98	48,81	0,0002	
AC	25,78	1	25,78	18,51	0,0036	
BC	51,64	1	51,64	37,08	0,0005	
Artık	9,75	7	1,39			
Uyumsuzluk	3,21	1	3,21	2,95	0,1366	anlamlı değil
Saf Hata	6,53	6	1,09			
Cor Total	2413,48	12				

Yukarıda Tablo 4.11'de görülebileceği üzere model F-değeri 346,18, p-değeri ise 0,05'ten düşüktür. Bu değerler modelin anlamlı olduğuna işaret etmektedir. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma olasılığı sadece %0,01'dir. 2,95 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk F-değerinin gürültüden kaynaklanma olasılığı %13,66'dır. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir.

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.25'de verilmiştir.



Şekil 4.25: Etanol ekstreleri için DPPH modeli

Şekil 4.25'de mavi renkli kısımlar daha düşük, kırmızı renkli kısımlar ise daha yüksek bir IC_{50} değerini temsil etmektedir. Etanol ekstreleri için DPPH˙ giderme aktivitesi çınar ve defne karışımlarına doğru artmakta, saf incirde ile incir çınar karışımlarında en düşük, üç bitkinin karışım halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Bu modeli temsil eden karesel denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{DPPH}^{\cdot}\ IC_{50} = 63{,}01A + 26{,}67B + 40{,}43C + 86AB - 52{,}96AC - 74{,}96BC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

Tablo 4.12 ve 4.13'te $ABTS^{\cdot+}$ giderme aktivitesi bakımından etanol ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.12: Etanol ekstreleri $ABTS^{\cdot+}$ aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	p-değeri	Uyumsuzluk p-değeri	Ayarlı R^2	Kestirilen R^2	
Linear	0,0006	< 0,0001	0,7301	0,6856	
Karesel	**< 0,0001**	**0,0001**	**0,9830**	**0,7589**	**Önerilen**
Özel Kübik	**0,0001**		**0,9986**		**Önerilen**
Kübik					***Eşlenmiş***

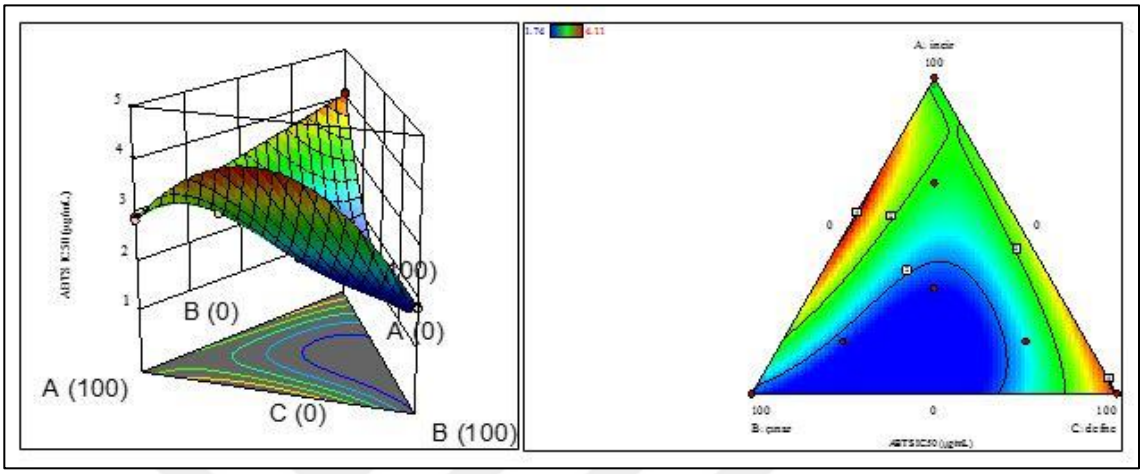
Yukarıdaki tabloda iki model önerilmiştir. Karesel modelin R^2 değerleri incelendiğinde ise ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda modeldeki parametrelerden p-değeri açısından anlamlı olmayan parametrelerin çıkarılması amaçlanmıştır. Ancak tüm parametrelerin p-değerleri 0,05'in altında olup anlamlıdır. Bu şekilde modelin uyumsuzluk değeri yüksek olduğu için özel kübik model ile analizlere devam edilmiştir. Ancak özel kübik model için uyumsuzluk p-değeri ve kestirilen R^2 değeri olmadığı için aynı şekilde anlamlı olmayan AC parametresi model denkleminden çıkarılarak ANOVA analizi tekrar yapılmıştır ve sonuçları aşağıda Tablo 4,13'de verilmiştir.

Tablo 4.13: Etanol ekstreleri ABTS aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	**df**	**Kareler Ortalaması**	**F-değeri**	**p-değeri**	
Model	10,08	5	2,02	1530,37	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	7,82	2	3,91	2967,98	< 0,0001	
AB	0,2622	1	0,2622	198,99	< 0,0001	
BC	0,2003	1	0,2003	151,99	< 0,0001	
ABC	0,1992	1	0,1992	151,17	< 0,0001	
Artık	0,0092	7	0,0013			
Uyumsuzluk	0,0022	1	0,0022	1,91	0,2167	anlamlı değil
Saf Hata	0,0070	6	0,0012			
Cor Total	10,09	12				

Yukarıda Tablo 4.13'te görülebileceği üzere model F-değeri 1530,37, p-değeri ise 0,05'ten düşüktür. Bu değerler modelin anlamlı olduğuna işaret etmektedir. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma olasılığı sadece %0,01'dir. 1,91 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk F-değerinin gürültüden kaynaklanma olasılığı %21,67'dir. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model de sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir.

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26: Etanol ekstreleri için ABTS modeli

Şekil 4.26'da mavi renkli kısımlar daha düşük, kırmızı renkli kısımlar ise daha yüksek bir IC_{50} değerini temsil etmektedir. Etanol ekstreleri için $ABTS^{\cdot+}$ giderme aktivitesi saf çınar, çınar, defne karışımları ve üç bitkinin karışımlarına doğru aktivite artmakta, saf defne ile incir ve çınar karışımında daha düşük, saf incir ile üç bitkinin karışım halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Bu modeli temsil eden basitleştirilmiş özel kübik model aşağıda verilmiştir:

$$ABTS^{\cdot+}\ IC_{50} = 2{,}82A + 1{,}80B + 4{,}08C + 6{,}97AB - 6{,}09BC - 34{,}48ABC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

Tablo 4.14 ve 4.15'te FRAP bakımından etanol ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.14: Etanol ekstreleri FRAP aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	p-değeri	Uyumsuzluk p-değeri	Ayarlı R^2	Kestirilen R^2	
Linear	0,0003	0,0049	0,7692	0,7085	
Karesel	**0,0029**	**0,1914**	**0,9505**	**0,7533**	**Önerilen**
Özel Kübik	0,1914		0,9576		
Kübik					***Eşlenmiş***

Yukarıda Tablo 4.14'te sadece karesel model önerilmiştir. Karesel modelin R^2 değerleri incelendiğinde ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olmadığı görülmektedir. Karesel model için ANOVA sonuçları aşağıda Tablo 4.15'te verilmiştir.

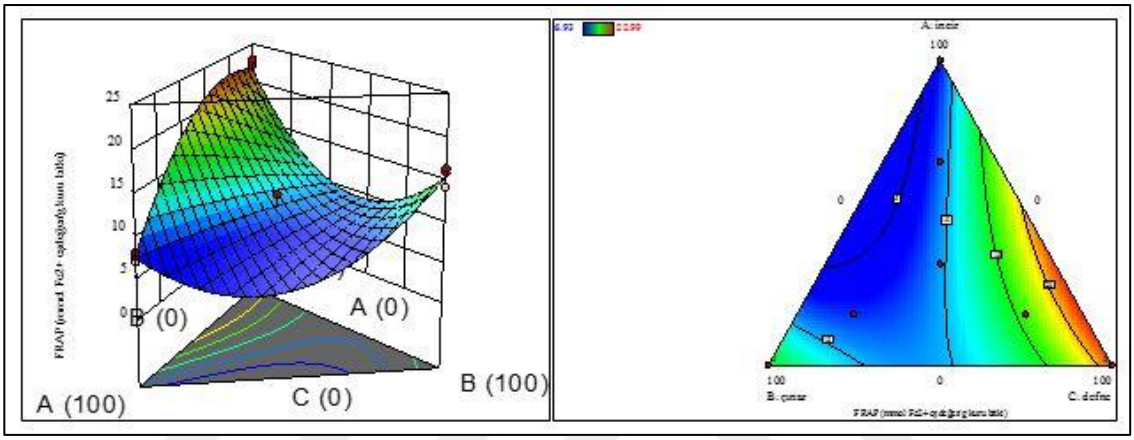
Tablo 4.15: Etanol ekstreleri FRAP aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	393,56	5	78,71	47,11	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	327,31	2	163,66	97,95	< 0,0001	
AB	11,73	1	11,73	7,02	0,0330	
AC	5,13	1	5,13	3,07	0,1232	
BC	11,27	1	11,28	6,75	0,0355	
Artık	11,70	7	1,67			
Uyumsuzluk	3,10	1	3,10	2,17	0,1914	anlamlı değil
Saf Hata	8,59	6	1,43			
Cor Total	405,26	12				

Yukarıda Tablo 4.15'te görülebileceği üzere model F-değeri 47,11 p-değeri ise 0,05'den düşüktür. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma olasılığı sadece %0,01'dir. Model parametreleri arasında sadece AC (İncir-Defne) parametresinin p-değeri 0,05'den yüksektir ve anlamlı değildir. Model manuel olarak modifiye edilerek AC değeri modelden çıkarılınca diğer iki parametrenin (AB ve BC) p-değerleri 0,05'in üzerinde çıktığı için model bu şekilde kullanılmaya devam edilmiştir. 2,17 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını

göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk F-değerinin gürültüden kaynaklanma olasılığı %19,14'tür. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model de sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir.

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.27: Etanol ekstreleri için FRAP modeli

Şekil 4.27'de kırmızı renkli kısımlar daha yüksek, mavi renkli kısımlar ise daha düşük bir FRAP aktivite değerini temsil etmektedir. Etanol ekstreleri için FRAP aktivitesi incir ve defne karışımlarına doğru artmakta, incir çınar karışımlarında en düşük, saf çınar ve üç bitkinin karışımı halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Bu modeli temsil eden karesel denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{FRAP} = 7{,}46A + 15{,}29B + 21{,}64C - 35{,}72AB + 23{,}62AC - 35{,}02BC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

Tablo 4.16 ve 4.17'de CUPRAC bakımından etanol ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.16: Etanol ekstreleri CUPRAC aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	p-değeri	Uyumsuzluk p-değeri	Ayarlı R^2	Kestirilen R^2	
Linear	< 0,0001	0,0200	0,9540	0,9433	
Karesel	**0,0103**	**0,2996**	**0,9857**	**0,9461**	**Önerilen**
Özel Kübik	0,2996		0,9862		
Kübik					***Eşlenmiş***

Yukarıda Tablo 4.16'da FRAP sonuçlarına benzer şekilde sadece karesel model önerilmiştir. Karesel modelin R^2 değerleri incelendiğinde ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olmadığı görülmektedir. Karesel model için ANOVA sonuçları aşağıda Tablo 4.17'de verilmiştir.

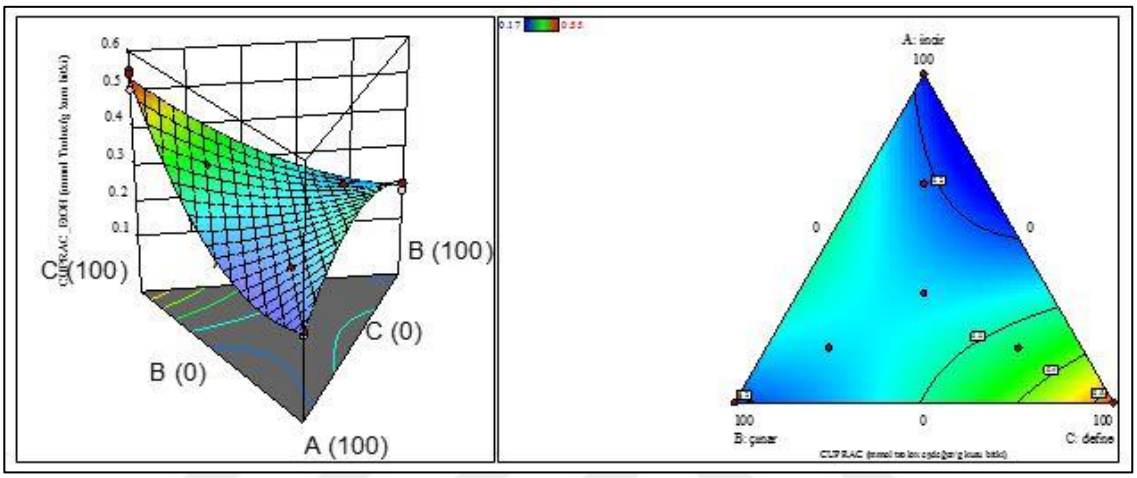
Tablo 4.17: Etanol ekstreleri CUPRAC aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	0,2498	5	0,0500	166,08	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	0,2422	2	0,1221	402,64	< 0,0001	
AB	0,0018	1	0,0018	6,02	0,0438	
AC	0,0035	1	0,0035	11,59	0,0114	
BC	0,0005	1	0,0005	1,70	0,2333	
Artık	0,0021	7	0,0003			
Uyumsuzluk	0,0004	1	0,0004	1,29	0,2996	anlamlı değil
Saf Hata	0,0017	6	0,0003			
Cor Total	0,2519	12				

Yukarıda Tablo 4.17'de görülebileceği üzere model F-değeri 166,08, p-değeri ise 0,05'den düşüktür. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma olasılığı sadece %0,01'dir. Model parametrelerinin p-değerleri de 0,05'den düşüktür ve anlamlıdır. 1,29 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk F-değerinin gürültüden kaynaklanma

olasılığı %29,96'dır. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model de sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir.

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.28: Etanol ekstreleri için CUPRAC modeli

Şekil 4.28'de kırmızı renkli kısımlar daha yüksek, mavi renkli kısımlar ise daha düşük bir CUPRAC aktivite değerini temsil etmektedir. Etanol ekstreleri için CUPRAC aktivitesi saf defne örneğine doğru artmakta, saf incir ve saf çınar ile incir defne karışımlarında daha düşük, bu iki bitkinin defne ile karışımlarına halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Çınar ve incir karışımları, saf çınar ve incir örneklerine kıyasla ise daha yüksek aktivite sergilemektedir. Bu modeli temsil eden karesel denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{CUPRAC} = 0{,}18A + 0{,}19B + 0{,}53C + 0{,}44AB - 0{,}62AC - 0{,}24BC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

4.5.2. Su Ekstreleri

Tablo 4.18 ve 4.19'da DPPH· bakımından etanol ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.18: Su ekstreleri DPPH· aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	p-değeri	Uyumsuzluk p-değeri	Ayarlı R^2	Kestirilen R^2	
Linear	< 0,0001	0,0022	0,9896	0,9896	
Karesel	**0,0016**	**0,1305**	**0,9981**	**0,9896**	**Önerilen**
Özel Kübik	0,1305		0,9985		
Kübik					***Eşlenmiş***

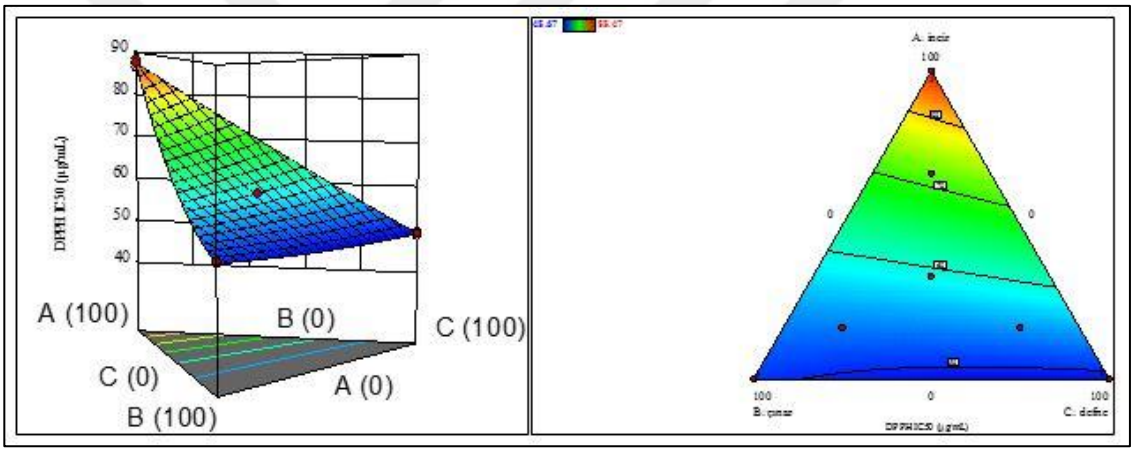
Yukarıdaki tabloda önerilen karesel model ile analizlere devam edilmiştir. Karesel modelin R^2 değerleri incelendiğinde ise ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olmadığı görülmektedir. Karesel model için ANOVA sonuçları aşağıda Tablo 4.19'de verilmiştir.

Tablo 4.19: Su ekstreleri DPPH· aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	3077,69	5	615,54	1264,44	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	3054,32	2	1527,16	3137,10	< 0,0001	
AB	5,54	1	5,54	11,38	0,0119	
AC	0,0560	1	0,0560	0,1150	0,7445	
BC	0,1043	1	0,1043	0.2142	0,6576	
Artık	3,41	7	0,4868			
Uyumsuzluk	1,15	1	1,15	3,07	0,1305	anlamlı değil
Saf Hata	2,26	6	0,3759			
Cor Total	3081,10	12				

Yukarıda Tablo 4.19'da görülebileceği üzere model F-değeri 1264,44, p-değeri ise 0,05'ten düşüktür. Bu değerler modelin anlamlı olduğuna işaret etmektedir. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma olasılığı sadece %0,01'dir. 3,07 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk F-değerinin gürültüden kaynaklanma olasılığı %13,05'dir. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir.

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29: Su ekstreleri için DPPH modeli

Şekil 4.29'da mavi renkli kısımlar daha düşük, kırmızı renkli kısımlar ise daha yüksek bir IC_{50} değerini temsil etmektedir. Su ekstreleri için DPPH$^{\cdot}$ giderme aktivitesi saf çınar, saf defne ve bunların karışımlarına doğru artmakta, saf incirde en düşük, üç bitkinin karışım halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Bu modeli temsil eden karesel denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{DPPH}^{\cdot}\ IC_{50} = 87{,}50A + 50{,}61B + 49{,}07C - 24{,}55AB - 2{,}47AC - 3{,}37BC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

Tablo 4.20 ve 4.21'de $ABTS^{\cdot+}$ giderme aktivitesi bakımından su ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.20: Su ekstreleri $ABTS^{\cdot+}$ aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	p-değeri	Uyumsuzluk p-değeri	Ayarlı R^2	Kestirilen R^2	
Linear	< 0,0001	0,0034	0,8268	0,7995	
Karesel	**0,0174**	**0,0205**	**0,9370**	**0,3768**	**Önerilen**
Özel Kübik	**0,0205**		**0,9720**		**Önerilen**
Kübik					***Eşlenmiş***

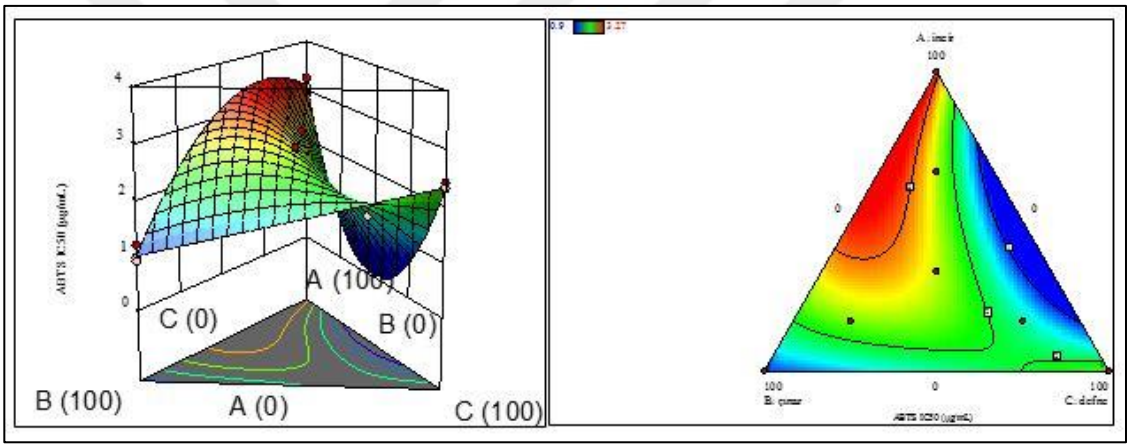
Yukarıdaki tabloda iki model önerilmiştir. Karesel modelin R^2 değerleri incelendiğinde ise ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda modeldeki parametrelerden p-değeri açısından anlamlı olmayan BC (çınar-defne) parametresi çıkarılarak model tekrar incelenmiştir. Sonuç olarak modelin uyumsuzluk değeri halen çok yüksek olduğu için özel kübik model ile analizlere devam edilmiştir. Ancak özel kübik model için uyumsuzluk değeri ve kestirilen R^2 değeri olmadığı için aynı şekilde anlamlı olmayan BC parametresi model denkleminden çıkarılarak ANOVA analizi tekrar yapılmıştır ve sonuçları aşağıda Tablo 4.21'de verilmiştir.

Tablo 4.21: Su ekstreleri $ABTS^{\cdot+}$ aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	7,30	5	1,46	69,11	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	6,37	2	3,18	150,83	< 0,0001	
AB	0,1187	1	0,1187	5,62	0,0495	
AC	0,6239	1	0,6239	29,55	0,0010	
ABC	0,1327	1	0,1327	6,28	0,0406	
Artık	0,1478	7	0,0211			
Uyumsuzluk	0,0436	1	0,0436	2,51	0,1642	anlamlı değil
Saf Hata	0,1042	6	0,0174			
Cor Total	7,44	12				

Yukarıda Tablo 4.21'de görülebileceği üzere model F-değeri 69,11, p-değeri ise 0,05'ten düşüktür. Bu değerler modelin anlamlı olduğuna işaret etmektedir. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma olasılığı sadece %0,01'dir. 2,51 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk değerinin gürültüden kaynaklanma olasılığı %16,42'dir. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.30: Su ekstreleri için ABTS modeli

Şekil 4.30'da mavi renkli kısımlar daha düşük, kırmızı renkli kısımlar ise daha yüksek bir IC_{50} değerini temsil etmektedir. Su ekstreleri için $ABTS^{\cdot+}$ giderme aktivitesi incir ve çınardan oluşan karışımlara doğru artmakta, incir defne karışımında ve saf çınarda daha düşük, üç bitkinin karışım halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Bu modeli temsil eden basitleştirilmiş özel kübik denklem aşağıda verilmiştir:

$$ABTS^{\cdot+}\ \ IC_{50} = 3{,}11A + B + 2{,}34C + 4{,}69AB - 10{,}75AC + 28{,}14ABC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

Tablo 4.22 ve 4.23'te FRAP bakımından su ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.22: Su ekstreleri FRAP aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	p-değeri	Uyumsuzluk p-değeri	Ayarlı R^2	Kestirilen R^2	
Linear	< 0,0001	< 0,0001	0,8445	0,8129	
Karesel	**< 0,0001**	**0,2704**	**0,9928**	**0,9927**	**Önerilen**
Özel Kübik	0,2704		0,9983		
Kübik					***Eşlenmiş***

Yukarıdaki tabloda sadece karesel model önerilmiştir. Karesel modelin R^2 değerleri incelendiğinde ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olmadığı görülmektedir. Karesel model için ANOVA sonuçları aşağıda Tablo 4.23'te verilmiştir.

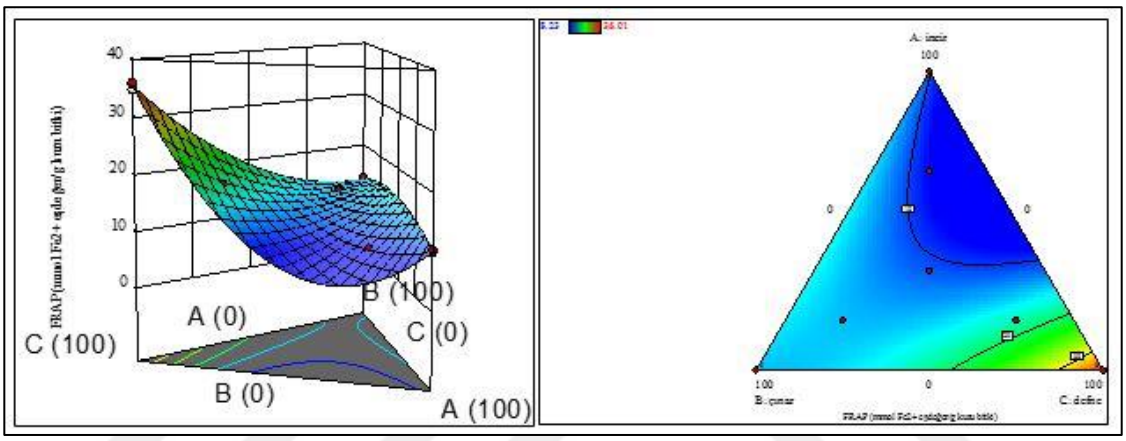
Tablo 4.23: Su ekstreleri FRAP aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	1331,63	5	266,33	1336,39	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	1160,34	2	580,17	2911,22	< 0,0001	
AB	1,48	1	1,48	7,43	0,0295	
AC	44,58	1	44,58	223,70	< 0,0001	
BC	5,03	1	5,03	25,26	0,0015	
Artık	1,40	7	0,1993			
Uyumsuzluk	0,2751	1	0,2751	1,47	0,2704	anlamlı değil
Saf Hata	1,12	6	0,1867			
Cor Total	1333,03	12				

Yukarıda Tablo 4.23'te görülebileceği üzere model F-değeri 133,39, p-değeri ise 0,05'ten düşüktür. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma olasılığı sadece %0,01'dir. Model parametrelerinin p-değerleri de 0,05'ten düşüktür ve

anlamlıdır. 1,47 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk F-değerinin gürültüden kaynaklanma olasılığı %27,04'tür. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model de sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir.

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.31'de verilmiştir.



Şekil 4.31: Su ekstreleri için FRAP modeli

Şekil 4.31'de kırmızı renkli kısımlar daha yüksek, mavi renkli kısımlar ise daha düşük bir FRAP aktivite değerini temsil etmektedir. Su ekstreleri için FRAP aktivitesi saf defne örneğine doğru artmakta, incir defne karışımlarında daha düşük, üç bitkinin karışımı halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Bu modeli temsil eden karesel denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{FRAP} = 10{,}29A + 13{,}46B + 35{,}54C + 12{,}70AB - 69{,}44AC - 23{,}40BC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

Tablo 4.24 ve 4.25'te CUPRAC bakımından su ekstrelerinin sonuçları analiz edilmiştir.

Tablo 4.24: Su ekstreleri CUPRAC aktivitesi için modeller ve uyumluluk özetleri

Model	p-değeri	Uyumsuzluk p-değeri	Ayarlı R^2	Kestirilen R^2	
Linear	0,1943	< 0,0001	0,1353	-0,0315	
Karesel	**< 0,0001**	**< 0,0001**	**0,9512**	**0,3032**	
Özel Kübik	**< 0,0001**		**0,9963**		**Önerilen**
Kübik					***Eşlenmiş***

Yukarıdaki tabloda iki model önerilmiştir. Karesel modelin R^2 değerleri incelendiğinde ise ikisinin arasındaki farkın 0,2'den yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda modeldeki parametrelerden p-değeri açısından anlamlı olmayan AB parametresi çıkarılarak model tekrar incelenmiştir. Sonuç olarak modelin uyumsuzluk değeri halen çok yüksek olduğu için özel kübik model ile analizlere devam edilmiştir. Ancak özel kübik model için uyumsuzluk değeri ve kestirilen R^2 değeri olmadığı için aynı şekilde anlamlı olmayan AB parametresi model denkleminden çıkarılarak ANOVA analizi tekrar yapılmıştır ve sonuçları aşağıda Tablo 4.25'de verilmiştir.

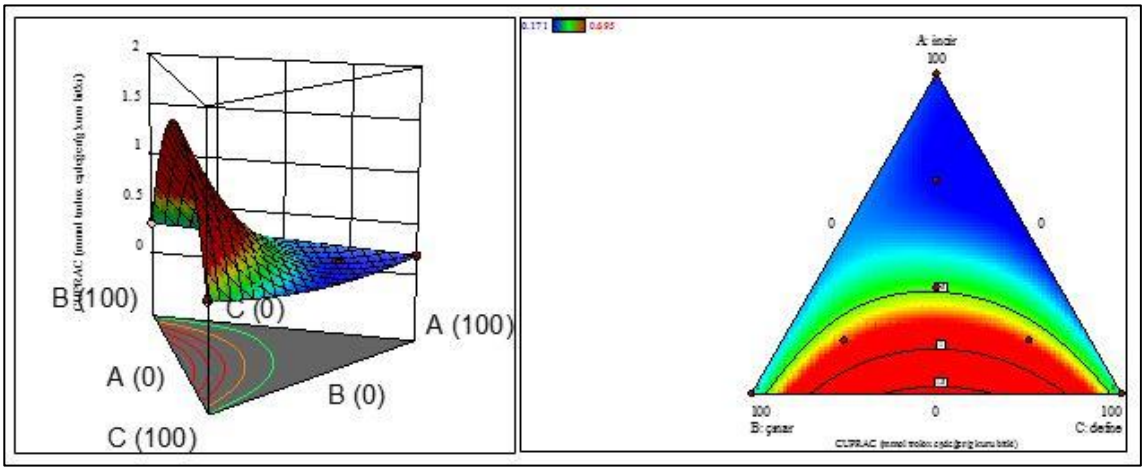
Tablo 4.25: Su ekstreleri CUPRAC aktivitesi için önerilen modelin ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	0,3483	5	0,0697	588,89	< 0,0001	anlamlı
Linear Karışım	0,0975	2	0,0488	412,31	< 0,0001	
AC	0,0011	1	0,0011	9,53	0,0176	
BC	0,1418	1	0,1418	1198,61	< 0,0001	
ABC	0,0135	1	0,0135	113,93	< 0,0001	
Artık	0,0008	7	0,0001			
Uyumsuzluk	0,0002	1	0,0002	1,78	0,2307	anlamlı değil
Saf Hata	0,0006	6	0,0001			
Cor Total	0,3491	12				

Yukarıda Tablo 4.25'de görülebileceği üzere model F-değeri 588,89, p-değeri ise 0,05'ten düşüktür. F-değerinin bu kadar büyük olmasının gürültüden kaynaklanma

olasılığı sadece %0,01'dir. Model parametrelerinin p-değerleri de 0,05'ten düşüktür ve anlamlıdır. 1,78 olarak verilen uyumsuzluk F-değeri, uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Bu kadar büyük bir uyumsuzluk F-değerinin gürültüden kaynaklanma olasılığı %23,07'dir. Uyumsuzluğun anlamlı olmaması istenen bir durumdur. Dolayısıyla bu model de sistemimizi temsil etmek için uygun bir modeldir.

Bir sonraki aşamada modelin tanı grafikleri incelenmiş olup genel anlamda tanı kriterlerine uygun oldukları görülmüştür. Bu modelin 3D ve kontür grafiği aşağıda Şekil 4.32'de verilmiştir.



Şekil 4.32: Su ekstreleri için CUPRAC modeli

Şekil 4.32'de kırmızı renkli kısımlar daha yüksek, mavi renkli kısımlar ise daha düşük bir CUPRAC aktivite değerini temsil etmektedir. Su ekstreleri için CUPRAC aktivitesi çınar ve defne karışımına doğru artmakta, saf incir örneklerinde en düşük, üç bitkinin karışımı halinde olan kısımlarda ise orta düzeyde aktivite sergilemektedir (sarı ve yeşil alanlar). Bu modeli temsil eden basitleştirilmiş özel kübik denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{CUPRAC} = 0{,}19A + 0{,}31B + 0{,}35C - 0{,}46AC + 5{,}12BC - 8{,}97ABC$$

A: İncir, B: Çınar, C: Defne

4.5.3. Optimizasyon ve Etkileşimlerin Belirlenmesi

Yukarıdaki 8 modelin denklemlerindeki parametrelerin katsayılarının özetlendiği tablolar aşağıda verilmiştir (Tablo 4.26 ve 4.27).

Tablo 4.26: Etanol ekstreleri denklemlerinin parametre katsayıları

Parametre	DPPH		ABTS		FRAP		CUPRAC	
	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri
A	63,01	< 0,0001	2,82	< 0,0001	7,46	< 0,0001	0,18	< 0,0001
B	26,67	< 0,0001	1,80	< 0,0001	15,29	< 0,0001	0,19	< 0,0001
C	40,43	< 0,0001	4,08	< 0,0001	21,64	< 0,0001	0,53	< 0,0001
AB	86	0,0002	6,97	< 0,0001	-35,72	0,0330	0,44	0,0438
AC	-52,96	0,0036	-	-	23,62	0,1232	-0,62	0,0114
BC	-74,96	0,0005	-6,09	< 0,0001	-35,02	0,0355	-0,24	0,2333
ABC	-	-	-34,48	< 0,0001	-	-	-	-

Tablo 4.27: Su ekstreleri denklemlerinin parametre katsayıları

Parametre	DPPH		ABTS		FRAP		CUPRAC	
	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri
A	87,50	< 0,0001	3,11	< 0,0001	10,29	< 0,0001	0,19	< 0,0001
B	50,61	< 0,0001	1	< 0,0001	13,46	< 0,0001	0,31	< 0,0001
C	49,07	< 0,0001	2,34	< 0,0001	35,54	< 0,0001	0,35	< 0,0001
AB	-24,55	0,0119	4,69	0,0495	12,70	0,0295	-	-
AC	-2,47	0,7445	-10,75	0,0010	-69,44	< 0,0001	-0,46	0,0176
BC	-3,37	0,6576	-	-	-23,40	0,0015	5,12	< 0,0001
ABC	-	-	28,14	0,0406	-	-	-8,97	< 0,0001

Optimizasyon çalışmalarında DPPH ve ABTS IC_{50} değerleri için minimum kriteri, FRAP ve CUPRAC değerleri için ise maksimum kriteri seçilmiştir. İncir, çınar ve defnenin %0-100 arası değerler için bu kriterler ile yapılan tarama sonucunda etanol ekstreleri için optimum 5 karışım, su ekstreleri için ise optimum 4 karışım elde edilmiştir. Bu karışımların ve istenirlik değerlerinin sonuçları aşağıda Tablo 4.28 ve 4.29'da verilmiştir. Kalın olarak işaretlenmiş olan karışımlar istenirlik değeri en yüksek olanlardır.

Tablo 4.28: Etanol ekstreleri optimum karışımlar

Karışım	İncir (%)	Çınar (%)	Defne (%)	DPPH (IC_{50})	ABTS (IC_{50})	FRAP	CUPRAC	İstenirlik
1	**1,59**	**19,43**	**78,98**	**26,22**	**2,62**	**15,00**	**0,42**	**0,67**
2	**0,00**	**19,11**	**80,89**	**26,22**	**2,70**	**15,01**	**0,43**	**0,67**
3	23,07	0,00	76,93	36,24	3,79	22,56	0,34	0,46
4	2,65	91,12	6,24	26,22	1,74	12,67	0,21	0,44
5	98,63	0,00	1,38	61,98	2,84	7,97	0,17	0,068

Tablo 4.29: Su ekstreleri optimum karışımlar

Karışım	İncir (%)	Çınar (%)	Defne (%)	DPPH (IC_{50})	ABTS (IC_{50})	FRAP	CUPRAC	İstenirlik
1	**2,27**	**8,10**	**89,63**	**49,72**	**2,08**	**30,09**	**0,70**	**0,79**
2	**0,00**	**7,24**	**92,76**	**48,95**	**2,24**	**32,37**	**0,70**	**0,78**
3	0,00	77,92	22,08	49,69	1,30	14,31	1,20	0,65
4	100,00	0	0	87,50	3,11	10,29	0,19	0,046

Sonuçlarda görüldüğü üzere incirin en düşük, defnenin en yüksek olduğu karışımlar önerilmiştir. Her iki ekstre için de incirin az miktarda olduğu karışım ile önerilen karışımın istenirlik değerleri neredeyse aynıdır.

Son olarak yöntem kısmında belirtildiği şekilde yanıtların (antioksidan aktivite) tahmini değerleri, karışımlardaki oranlara göre her tek bitki örneğinin yanıtının yüzdesini birleştirerek hesaplanmıştır. Böylelikle tahmini aktivite değerleri, deneysel aktivite değerleri ile karşılaştırılmış ve etkileşimin sinerjik veya antagonistik tabiatını ortaya koymak için kullanılmıştır. Aşağıda Tablo 4.30 ve 4.31'de bu sonuçlar verilmiştir

Tablo 4.30: Etanol ekstreleri için etkileşimler

	DPPH IC_{50}			**ABTS IC_{50}**			**FRAP**			**CUPRAC**		
	Deneysel	Tahmini	Etkileşim	Deneysel	Tahmini	Etkileşim	Deneyse	Tahmini	Etkileşim	Deneysel	Tahmini	Etkileşim
K1	54,15	53,24	**Ant.**	2,80	2,86	**Sin**	8,19	11,18	**Ant.**	0,22	0,24	**Ant.**
K2	29,45	35,08	**Sin.**	2,34	2,35	**Sin.**	15,34	15,10	**Sin.**	0,34	0,25	**Sin.**
K3	40,13	43,42	**Sin.**	1,74	2,90	**Sin.**	10,95	14,85	**Ant.**	0,24	0,30	**Ant.**
K4	34,15	41,96	**Sin**	1,82	3,49	**Sin.**	7,22	18,27	**Ant.**	0,26	0,42	**Ant.**

Ant.: Antagonistik etkileşim, Sin.: Sinerjik etkileşim.

Sonuçlar incelendiğinde %16,67 incir, %16,67 çınar ve %66,67 defne içeren karışımda (K2) dört antioksidan etkinlik bakımından sinerjik etki elde edildiği gözlemlenmiştir. ABTS çalışması için tüm karışımlarda sinerjik etki görülürken CUPRAC ve FRAP çalışmasında K2 hariç diğer tüm karışımlarda antagonistik etki görülmektedir.

Tablo 4.31: Su ekstreleri için etkileşimler

	DPPH IC_{50}			ABTS IC_{50}			FRAP			CUPRAC		
	Deneysel	Tahmini	Etkileşim	Deneysel	Tahmini	Etkileşim	Deneysel	Tahmini	Etkileşim	Deneysel	Tahmini	Etkileşim
K1	71,47	74,97	**Sin.**	2,54	2,63	**Sin**	8,23	15,01	**Ant.**	0,18	0,24	**Ant.**
K2	54,02	56,53	**Sin.**	1,58	1,59	**Sin.**	17,85	16,60	**Ant.**	0,67	0,30	**Ant.**
K3	59,86	62,42	**Sin.**	2,61	2,16	**Ant.**	10,42	19,75	**Sin.**	0,47	0,28	**Ant.**
K4	52,95	55,76	**Sin**	2,20	2,26	**Sin.**	13,67	27,65	**Sin.**	0,70	0,32	**Ant.**

Ant.: Antagonistik etkileşim, Sin.: Sinerjik etkileşim.

Sonuçlar incelendiğinde %16,67 incir, %66,67 çınar ve %16,67 defne içeren karışımda (K4) üç antioksidan (DPPH, ABTS ve FRAP) etkinlik bakımından sinerjik etki elde edildiği gözlemlenmiştir. CUPRAC çalışması için tüm karışımlarda antagonistik etki görülürken DPPH çalışması için tüm karışımlarda sinerjik etki olduğu ortaya konmuştur

4.6. SİKLOOKSİGENAZ-2 (COX-2) VE SİKLOOKSİGENAZ -1 (COX-1) ENZİM İNHİBİSYONU

COX-1 ve COX-2 enzimlerinin inhibisyonu kit aracılığı ile çalışılmıştır. Antioksidan deneylerine benzer şekilde Design Expert programının önerdiği karışımlar üzerinde çalışılmıştır. Burada aynı deney düzeneğinde hem geleneksel hem de modern ekstrelerin aktivitesi ölçülmüştür. Aşağıda sırasıyla Tablo 4.32 ve 4.33'de COX-1 ve COX-2 inhibisyon aktiviteleri kit içinde bulunan hesaplama yöntemine göre verilmiştir.

Tablo 4.32: COX-1 inhibisyon aktivitesi

Örnek	**Standartlar (%inhibisyon)**	
Salisilik asit	27,97 ± 15^{ac}	27,97 ± 15^{a}
Klorojenik asit	28,36 ± 26,62^{ac}	28,36 ± 26,62^{a}
Kuersetin	118,01 ± 3,32^{b}	118,01 ± 3,32^{b}
	Etanol ekstreleri aktivite (%inhibisyon)	**Su ekstreleri aktivite (%inhibisyon)**
İncir 1	31,42 ± 21,70^{a}	66,28 ± 5,67^{acd}
İncir 2	24,14 ± 16,30^{ac}	70,12 ± 5,04^{cd}
Defne 1	68,97 ± 20,14^{abc}	80,84 ± 10,92^{db}
Defne 2	57,85 ± 2,89^{ac}	41,76 ± 23,03^{acd}
Çınar 1	86,59 ± 25,30^{ab}	57,09 ± 9,29^{acd}
Çınar 2	76,25 ± 39,64^{abc}	46,74 ± 23,03^{acd}
K1	80,46 ± 10,22^{abc}	31,80 ± 18,33^{ac}
K2	45,21 ± 22,56^{ac}	42,91 ± 16,11^{acd}
K3	61,69 ± 3,51^{abc}	47,89 ± 0,66^{acd}
K4	71,26 ± 15,93^{abc}	32,18 ± 8,05^{ac}

Sonuçlar 3 tekrarın ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. ^{a,b,c,d}Aynı sütunda yer alan farklı harfler, istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

COX-1 inhibisyon sonuçları incelendiğinde bazı sonuçların yüzde değer sınırlarının dışında kaldığı görülmektedir. Kuersetinin %118 değeri analizlere dahil edilememektedir. Diğer iki standart maddenin (klorojenik asit ve salisilik asit) yüzde inhibisyon değerleri de oldukça düşüktü. Etanol ekstreleri arasında en yüksek inhibisyon çınar ve karışım 1'de, en düşük inhibisyon değeri ise incir yapraklarında görülmektedir.

Su ekstreleri için incir yapraklarının inhibisyon değerleri etanol ekstrelerine kıyasla daha yüksekti. Defne örneklerinde ise iki örnek arasındaki fark oldukça yüksekti (41,76 ve 57,09). En yüksek inhibisyon ise incir yapraklarında görülmektedir.

Tablo 4.33: COX-2 inhibisyon aktivitesi

Örnek	**Standartlar (%inhibisyon)**	
Salisilik asit	27,08 ± 13,77[a]	27,08 ± 13,77[a]
Klorojenik asit	2,08 ± 8,51[a]	2,08 ± 8,51[a]
Kuersetin	86,67 ± 52,46[a]	86,67 ± 52,46[a]
	Etanol ekstreleri aktivite (%inhibisyon)	**Su ekstreleri aktivite (%inhibisyon)**
İncir 1	28,75 ± 8,20[a]	16,25 ± 6,61[a]
İncir 2	40,42 ± 26,96[a]	16,67 ± 5,20[a]
Defne 1	26,25 ± 7,60[a]	-161,25 ± 224,48[a]
Defne 2	56,67 ± 21,26[a]	42,08 ± 55,58[a]
Çınar 1	40,42 ± 10,48[a]	42,92 ± 97,6[a]
Çınar 2	37,50 ± 9,44[a]	-148,75 ± 189,90[a]
K1	25,42 ± 59,64[a]	18,75 ± 21,69[a]
K2	68,33 ± 24,44[a]	5,42 ± 1,91[a]
K3	70,42 ± 56,66[a]	36,25 ± 21,32[a]
K4	29,17 ± 42,30[a]	-6,67 ± 6,88[a]

Sonuçlar 3 tekrarın ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. [a]Aynı sütunda yer alan farklı harfler, istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Sonuçlar incelendiğinde standart olarak kullanılan kuersetin COX-2 inhibisyonu %86,67 ile oldukça yüksektir. Diğer iki standart arasında klorojenik asitin inhibisyonu düşük iken salisilik asit %50 üzerinde bir inhibisyona sebep olmamıştır.

Etanol ekstreleri arasında çoğu sonuçlar %50 inhibisyonun altında iken yaklaşık %70 inhibisyon ile karışım 2 ve karışım 3'ün COX-2 inhibisyonu diğer örneklere kıyasla daha yüksekti.

Su ekstrelerinde analizlere dahil edilemeyecek eksi sonuçlar defne 1, çınar 2 ve karışım 4 olarak tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon defnenin diğer üçlü tekrarı olan defne 2 ve çınarın diğer üçlü tekrarı olan çınar 1 örneklerinden elde edilmiştir. Karışım 3'ün inhibisyon değerleri de %40 civarındaydı. İncir yapraklarının inhibisyonu ise %16 civarındaydı. En düşük inhibisyon ise %5,42 ile karışım 2'de görülmüştür.

5. TARTIŞMA

5.1. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ

Bitki kısımlarının ekstre verimleri çözücü ve ekstraksiyon işlemlerinin şartlarına göre değişebilmektedir. Tezde yer alan ekstraksiyon işlemlerinin amacı fenolik bileşikleri elde etmek olduğu için polar etanol çözücüsü ve ısı destekli soxhlet düzeneği kullanılmıştır. Çalışmamızda etanol ekstresi için %24,10, su ekstresi için ise %27,80 verim yüzdeleri elde edilmiştir. Literatüre bakıldığında etanolün yanı sıra metanol ve suyun da polar çözücü olarak kullanımları yer almaktadır. Yapılan bir çalışmada manyetik karıştırıcılı bir ısıtıcı aracılığıyla *F. carica* yaprakları %70 etanol ile ekstratkte edilmiştir. Elde edilen ekstrenin verimi %6,67 (3 g örnekten 0,20 g ekstre) olarak hesaplanmıştır (305). *F. carica* yaprak örneklerinin 40°C'ye ayarlanmış su banyosu kullanılarak ekstraksiyonları sonucunda su ve metanol çözücüleri için sırasıyla %45,5 (10 g örnekten 4,55 g ekstre) ve %18,9 (10 g örnekten 18,9 mg ekstre) ekstre verimleri elde edilmiştir (306). Metanol ve etanolün çözücü olarak kullanıldığı bir çalışmada ise oda sıcaklığında karıştırılarak ekstrakte edilen *F. carica* yaprakları için ekstre verimleri metanol ve etanol çözücüleri için sırasıyla %14,9 ve %8,8 olarak ortaya konmuştur (307). Bahsi geçen çalışmalar dışında incir üzerine yapılan araştırmalar meyve ve lateksi üzerine yoğunlaşmıştır. Dolayısıyla tezimizde güncel olarak yaprakların ekstraksiyon verimleri ortaya konmuştur.

Çözücü aynı olsa da literatürdeki diğer konvansiyonel yöntemlere kıyasla çalışmamızda kullanılan soxhlet yönteminden dolayı daha yüksek verimin elde edildiği düşünülmektedir. Soxhlet düzeneğinde çözücünün tekrarlı bir şekilde geri dönüşümü, bitki örneklerindeki tüm ekstrakte edilebilecek maddeleri yüksek bir etkinlikle ayrıştırılmasını sağlayarak daha yüksek verim sonuçları sergilemektedir. Su ekstreleri verimlerinin daha yüksek olmasına katkı sağlayan faktör ise çalışmamızda kullandığımız yüksek ısı değerleri olabilir. Ekstraksiyon esnasında daha yüksek bir ısı değerinin (90°C) kullanıldığı bir çalışmada *F. carica* su ekstreleri verimleri %22-28 olarak elde edilmiştir (308). Bu verim değerleri çalışmamızdaki değerler ile örtüşmektedir. Çalışmamızda ekstraksiyon kaynar su, yani 100°C'ye yakın su ısısı ile gerçekleştirilmiştir. Farklı incir türlerinin üzerine yapılan çalışmalar da incelendiğinde soxhlet düzeneğinin ekstraksiyon

için yaygın olarak kullanılmadığı görülmüştür. Yüksek verimde ham polar içerikli ekstrelerin elde edilmesi için maliyet ve kolaylık bakımından tercih edilebilecek bir yöntemdir. Diğer bazı incir türlerinin yaprak ekstre verimleri aşağıda Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Tablo 5.1: Farklı incir türlerinin yaprak ekstre verimleri

İncir türü	**Ekstraksiyon şartları**	**Ekstre verimi**	**Kaynak**
F. deltoidea	Petrol eter, 37 - 40°C Kloroform, 37 - 40°C Metanol, 37 - 40°C Su, 37 - 40°C	%4,7 %3,6 %8,2 %5,5	(309)
F. deltoidea	Dekoksiyon, 3 saat Etanol, 3 gün maserasyon Metanol, 3 gün maserasyon	%21 %17 %19	(310)
F. deltoidea örnekleri	Metanol, maserasyon	%19-26 arası	(311)
F. sycomorus	Su, maserasyon, 72 saat Metanol, maserasyon, 72 saat Etanol, maserasyon, 72 saat Kloroform, maserasyon, 72 saat Aseton, maserasyon, 72 saat	%8,5 %11,4 %5,3 %5,3 %4,8	(312)
Ficus türleri	Metanol, maserasyon Metanol sonrası su ekstresi, maserasyon	%7-23 arası %27,53	(313)
F. exasperate	Su, heksan ve metanol soxhlet ve maserasyon	%2-%5 arası	(314)
F. elastica Roxb. Ex Hornem	%70 etanol, geri akıtma yöntemi	%13,84	(315)

Defne yapraklarının sonuçları incelendiğinde ise çalışmamızda etanol ekstresi için soxhlet ile elde edilen ekstre verimi %54,50 iken su ekstresi için dekoksiyon verimi %31 olarak elde edilmiştir. Defne için yapılan kapsamlı bir derleme çalışmasında ortaya konulan sonuçlar değerlendirilmiştir (316). Verim açısından kıyaslanabilecek çalışmalardan birinde *L. nobilis* yapraklarının 15 dakikalık dekoksiyonu sonucunda elde

edilen su ekstresinin verimi %8,07 (20 g örnekten 1,614 g ekstre) iken etanol ile maserasyon sonucu elde edilen ekstrenin verimi %6,4 (25 g örnekten 1,6 g ekstre) olarak hesaplanmıştır (317).

Daha eski bir çalışmada *L. nobilis* yaprak ekstrelerinin verimleri, etanol ekstresi için %20,2 ve su ekstresi için %10,1 olarak sunulmuştur (318). *L. nobilis* yapraklarının %80 etanol ekstresi ile oda sıcaklığında tekrarlı maserasyonu sonucu elde edilen ekstre verimi %20 olarak hesaplanmıştır (319). Literatür taraması sonucunda *L. nobilis* yapraklarının metanol ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstre verimi %15,50 (1,5 kg örnekten 232,4 g ekstre) olarak ortaya konmuştur (320). Yapılan bir çalışmada defne yapraklarının %35 etanol ile ve geri akıtma yöntemiyle ekstraksiyonu sonucu %10,34 ekstre verimi elde edilmiştir (321).

Sonuçlarımız literatür ile kıyaslandığında saf defne yaprakları için elde ettiğimiz ekstre verimlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Farklılıklar defnenin coğrafi konumu, kurutma yöntemi, ekstraksiyon yöntemi gibi faktörler ile ilişkilidir. Çalışmamızda defne yaprakları standardize bir biçimde yerli bir üreticiden elde edilmiştir.

İncirin ve defnenin aksine, çınar yaprakları üzerine yapılmış güncel çalışmaların sayısı daha düşüktür. Ancak çalışmamıza çok benzer şekilde %96 etanol ve soxhlet düzeneği ile gerçekleştirilen *P. orientalis* yaprak ekstraksiyonu sonucunda %19,16 ekstre verimi elde edilmiştir (322). Yine soxhlet ve %95 etanol ile ekstrakte edilen *P. orientalis* yaprak örneklerinin ekstre verimi %16,43 olarak hesaplanmıştır (286).

P. orientalis yapraklarının %70 etanol ile maserasyon sonucunda ise %17,4 ekstre verimi elde edilmiştir (285). Tezimizde *P. orientalis* yaprağı etanol ekstresi verimi literatürdeki çalışmalara benzer olarak %17,90 olarak elde edilmiştir. *P. orientalis* yapraklarının su ile ekstraksiyonu için literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup güncel olarak çalışmamızda bu soncu %23,80 olarak ortaya koymuş bulunmaktayız.

İncir, defne ve çınar bitkilerinden oluşan karışımların verimleri incelendiğinde ise farklılıklar görülebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, deney tasarımı yoluyla *Coriandrum sativum* L., *Petroselinum crispum* M. ve *Apium graveolens* L. bitkilerinden oluşan karışımların verimleri ortaya konmuştur (323). Burada ekstre verimleri birbirlerine yakın olup genel bir trendin olmadığı ortaya çıkmıştır. Karışımlar üzerine yapılan diğer çalışmalarda verim üzerine bir yorum yapılmamış olup bu anlamda literatürde bir açık söz konusudur. Çalışmamızda etanol ekstreleri açısından bakıldığında verim değerleri

birbirlerine nispeten yakındır. Defne ekstresi en yüksek verime (%54,50) sahipken en fazla defne miktarını içeren karışım 2, ikinci en yüksek verime sahiptir (%35,17). Su ekstreleri arasında en düşük verim %23,80 ile çınarda, en yüksek verim ise %77 ile karışım 2'de görülmektedir. Karışım 2 aynı zamanda en yüksek defne miktarını içeren karışımdır.

5.2. FİTOKİMYASAL İÇERİK VE BİYOLOJİK AKTİVİTE

Doğal ürünlerin biyolojik aktivite çalışmalarının bütüncül bir şekilde değerlendirilebilmeleri için fitokimyasal içerik analizleri gerçekleştirilmektedir. Fitokimyasal içerik, kullanılan bitkinin türü, coğrafi çevresi (324), kurutma yöntemi, ekstraksiyon şartları ve çözücüsü gibi birçok faktörden dolayı değişkenlik gösterebilir. Çoğu aktivite çalışmasında, aktivite-içerik arasındaki bağlantıyı ortaya koymak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır ve kantitatif ile kalitatif olarak içerik tayini yapılmaktadır. Yaptığımız içerik analizinde *F. carica* yaprak etanol ekstresi için kuersetin ve rutin elde edilmiştir. Kuersetin miktarı 39,62 mg/g ekstre, rutin 2,69 mg/g ekstre olarak elde edilmiştir.

Kalitatif olarak yapılmış bir çalışmada, *F. carica* yaprakları %70 etanol çözücüsü ile ekstrakte edilmiştir. RP–UHPLC–DAD-QTOF–MS yöntemi kullanılarak içerik analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak bunun antioksidan aktivite ile bağlantısı ortaya konmuştur. Sonuçlara bakıldığında ise negatif iyonizasyon modunda 91 fenolik bileşik elde edilirken pozitif iyonizasyon modunda ek olarak 18 farklı fenolik bileşik tespit edilmiştir. Yapraklarda meyvelere kıyasla daha yüksek miktarda olacak şekilde kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asit türevlerinden oluşan toplam 24 hidroksisinnamik asit bulunmuştur. Çalışmada ayrıca flavonollardan kuersetin 3-*O*-(6'-malonyl) glukozit ve ilk defa tespit edilen kuersetin di-deoxyheksosit heksosit elde edilmiştir. Flavonlardan luteolin-7-*O*-glukozit, luteolin ve apigenin, flavanonlardan eriodictyol di-heksosit, isoflavanoidlardan genistein, flavanollardan (+)-kateşin ve flavanonollardan dihydrokuersetin tespit edilmiştir. Antosiyanin olarak ise siyanidin 3,5- diglukosit ve cyanidin 3-rutinosit pozitif iyonizasyon modu ile saptanmıştır. Bu maddelere ek olarak 7-hidroksikumarin ve 14 ayrı furanokumarin de bulunmuştur (305). Yine farklı ekstraksiyon yöntemlerini kıyaslamak için yapılan bir çalışmada, örneklerin fenolik içerikleri HPLC-DAD ve LC-ESI-MS/MS ile analiz edilerek klorojenik asit, rutin ve psoralen saptanmıştır (325).

Bir çalışmada %70 etanol ile ekstraksiyonu yapılan *F. carica* yapraklarının HPLC yöntemi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Sonucunda kuersetin (631 mg/ kg ekstre) ve luteolin (681 mg/ kg esktre) tespit edilmiştir (326). Çalışmamızda etanol ekstresinin aynı birim açısından miktarı 39620 mg/kg ekstre olup daha yüksektir. Bu fark ekstraksiyon yönteminden kaynaklanabilmektedir. Soxhlet ekstraksiyon sisteminde çözücünün geri dönüşü ile bitki yaprak örneklerindeki tüm maddeler kesin bir şekilde elde edilebilmektedir.

Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, *F. carica* yaprak etanol (%70) ekstreleri elde edilmiştir. Rutin ve kuersetin miktarları sırasıyla 16,82 mg/g ekstre ve 0,001 mg/g ekstre olarak hesaplanmıştır (327). Çalışmamızda elde ettiğimiz rutin miktarı bu çalışmaya kıyasla daha düşük (2,60 mg/g esktre) ancak kuersetin miktarımız daha yüksektir (39,62 mg/g ekstre). Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi soxhlete kıyasla daha ileri teknolojik bir yöntem olduğu için daha yüksek miktarlarda madde elde etmek mümkündür.

Metanol çözücüsü kullanılarak hazırlanan *F. carica* yaprak ekstrelerinde rutin miktarı 4,20 mg/g bitki olarak bulunmuştur, bu da çalışmamızdaki miktardan (ekstre verimi baz alınarak hesaplanan değer = 0,65 mg/kg bitki) yüksektir (328). Aynı çalışmada kuersetin türevlerinin miktarları da 0,09-0,28 mg/g bitki arası olup çalışmamızdaki miktardan (9,55 mg/kg bitki) yüksektir. Miktar farklılıkları çözücüye atfedilebilir. Rutin ve kuersetinin polar yapılarından dolayı daha polar olan metanol çözücüsü ile ekstraksiyonları daha etkili olabilmektedir. Nitekim flavonoit ve toplam fenolik bileşik miktarlarının ekstraksiyon için kullanılan çözücüye göre değiştiği literatürde bildirilmiştir (329). Bu çalışmaya göre en yüksek miktarlar yaprak su ekstrelerinde, sonra metanol ve çok farkla olmasa da en son etanol ekstrelerinde elde edilmiştir.

İncir yapraklarının su ekstreleri için kuersetin (5,81 mg/g ekstre) ve rutine (6,41 mg/g ekstre) ek olarak klorojenik asit (0,98 mg/g ekstre), ferulik asit (0,49 mg/g ekstre), kikorik asit (0,18 mg/g ekstre) ve düşük miktarda 4-hidroksibenzoik asit (0,02 mg/g ekstre) elde edilmiştir. Literatür tarandığında benzer şekilde bir çalışmada, iki türün yaprak dekoksiyonları sonucunda 14585,8 ve 17440,4 mg/kg ekstre rutin miktarı ile bir türde 11983,8 mg/kg ekstre ferulik asit miktarı elde edildiği görülmektedir (330). Çalışmamızda bu birim cinsinden su ekstremizde 6410 mg/kg ekstre rutin ile 490 mg/kg ekstre ferulik asit tespit edilmiştir. Bu çalışmada Portekiz incir türleri kullanılmıştır,

dolayısıyla fenolik bileşik miktar farklılıkları coğrafi ve çevresel faktörler ile açıklanabilmektedir.

Başka bir çalışmada HPLC ile içerik analizi sonucunda yaprakların su ekstrelerinde fumarik asit (0,448 mg/mL), ferulik asit (0,298 mg/mL), *p*-kumarik asit (0,013 mg/mL), malik asit (0,587 mg/mL) ve kaffeoylmalik asit (0,009 mg/mL) bulunmuştur (331). Su ekstremizde elde ettiğimiz ferulik asit miktarı 0,00049 mg/mL (HPLC cihazının verdiği sonuç) olup bu çalışmanın sonucuna kıyasla oldukça düşüktür. Çalışmamız ile bahsi geçen bu çalışma arasındaki tek fark ise, ekstraksiyon işlemi esnasında iki katı bir ısı miktarı kullanmamız olarak dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda incir yapraklarının yanı sıra karışım bileşiklerini oluşturan *L. nobilis* ve *P. orientalis* yapraklarının etanol ekstreleri de içerik bakımından incelenmiştir. Çalışmamızda *L. nobilis* yaprak etanol ekstrelerinde rutin (2,42 mg/g ekstre veya 1317,81 mg/kg bitki) ve kuersetine (0,13 mg/g ekstre veya 71,40 mg/kg bitki) ek olarak bir de 0,21 mg/g ekstre (veya 116,63 mg/kg bitki) ferulik asit tespit edilmiştir. Cezayir'de yapılan bir çalışmada defne yapraklarının su ve etanol ekstrelerinin içerik analizi sonucunda %80 ve %60 etanol ekstrelerinde kuersetin ve kamferol gibi flavonollar tespit edilmiştir (332).

Brahmi ve arkadaşlarının Cezayir'in Bejaia bölgesinde toplanan defne yaprakları üzerine yaptıkları çalışmada ultrasnonik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak %50 metanol ile ekstre elde edilmiştir. Bu ekstrenin H NMR analizi sonucunda içeriğinde kateşin, kamferol ve kuersetin fenolik bileşikleri tespit edilmiştir (333). Gürcistan ve Yunanistan'dan elde edilen defne yapraklarında hidroksisinamik asitlerden kafeik asit, klorojenik asit, *p*-kumarik asit, sinamik asit, sinapik asit ve ferulik asit bileşikleri 22,7-607 µg/g kuru bitki arasında miktarlarda saptanmıştır. Ek olarak kuersetin (48,9 ve 65,3 µg/g kuru bitki) ile rutin (217,4 µg/g kuru bitki) de tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada net bir şekilde ekstraksiyon çözücüsü ve yöntemi hakkında bilgi verilmemiştir (273).

Yapılan bir çalışmada, %50 etanol ile ekstrakte edilen defne yapraklarında 2,12 µg/g kuru bitki ferulik asit tespit edilmiş olup çalışmamızdaki miktara kıyaslanınca oldukça düşüktür. Aynı çalışmada kuersetin miktarı tespit edilemeyecek kadar düşük olduğu belirtilmiştir (334). Çalışmamızla bu çalışmadaki miktar farklılıkları kullanılan çözücü oranı ile ekstraksiyon şartlarına atfedilebilir.

Bir çalışmada defne yapraklarının %50 ve %70 etanol ile konvansiyonel geri akıtma (CRE) metodu (30 dakika ısıtarak) ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca aynı çözücü ile mikrodalga ve ultrasonik destekli ekstraksiyonlar da yapılmıştır (MAE ve UAE). Çalışma sonucunda ferulik asit (CRE: 9,44 mg/100 g örnek, MAE: 0,78 mg/100 g örnek, UAE: 1,10 mg/100 g örnek) ve rutin (CRE: 28,07 mg/100 g örnek, MAE: 98,21 mg/100 g örnek, UAE: 23,14 mg/100 g örnek) tespit edilmiştir (335). Çalışmamızdaki miktarlar ile kıyaslandığında üç yöntemle elde edilen ekstreler incelenecek olursa etanol ekstrelerine kıyasla daha fazla maddenin tespit edildiği görülmektedir.

Çalışmamızda defne yapraklarının su esktrelerinde ferulik asit (0,08 mg/g ekstre), rutin (0,86 mg/g ekstre) ve kuersetine (0,02 mg/g ekstre) ek olarak 0,09 mg/g ekstre kikorik asit, 0,02 mg/g ekstre gallik asit ve 1,12 mg/g ekstre epikateşin elde edilmiştir. Literatürde infüzyon yöntemi ile elde edilen ekstrelerde 0,18 – 1,55 mg/g ekstre rutin ile kıyaslandığında çalışmamızda elde edilen rutin miktarı ile örtüşmektedir. Ancak yaprak infüzyonlarındaki epikateşin miktarları 3-4 mg/g ekstre olup çalışmamıza kıyasla daha yüksektir (283). Defne yapraklarının su ekstrelerindeki flavonoit miktarlarının diğer çözücülere kıyasla daha düşük olduğu bir çalışmada ortaya konmuştur (336). Çalışmamızda ise rutin miktarı etanol ekstresinde daha yüksek iken, kuersetin miktarı su ekstresinde daha yüksek bulunmuştur.

Karışım bileşikleri arasındaki son bitki *P. orientalis* için etanol ekstresinin fenolik bileşik içeriği, daha düşük miktarlarda da olsa, defne ve incire kıyasla daha zengindir. Tespit edilen maddeler klorojenik asit (0,03 mg/g ekstre), ferulik asit (0,02 mg/g ekstre), rutin (15,80 mg/g ekstre), kuersetin (0,26 mg/g ekstre), gallik asit (0,16 mg/g ekstre), apigenin-7-*O*-glikozit (0,10 mg/g ekstre) ve epikateşin (0,12 mg/g ekstre) olarak sıralanabilir. Rutin miktarı incir ve defneye kıyasla oldukça yüksek iken, kuersetin miktarı incirden düşük, defneden yüksektir. Ferulik asit miktarı ise defneye kıyasla daha düşüktür.

Çınar yapraklarının su ekstrelerinde ise 0,40 mg/g ekstre klorojenik asit, 0,22 mg/g ekstre rutin, 0,04 mg/g ekstre kuersetin, 0,17 mg/g ekstre gallik asit, 0,06 mg/g ekstre apigenin-7-*O*-glikozit ve 0,23 mg/g ekstre epikateşin tespit edilmiştir.

Çınar yaprakları etanol ekstresinin etil asetat fraksiyonundan kamferol ve türevleri, kuersetin ve türevleri, rutin ve *p*-kumarik asit başta olmak üzere 12 fenolik

bileşik izole edilmiştir, ancak bu bileşiklerin kantitatif olarak tayinleri yapılmamıştır (337). Bu anlamda *P. orientalis* yaprak fenolik içeriklerinin kantitatif tayini üzerine literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bitkinin potansiyel kullanım alanlarının genişletilmesi için kapsamlı içerik tayin araştırmaları gerekmektedir.

Biyolojik aktivite çalışmaları arasında *in-vitro* incelemelerden antioksidan aktivite analiz yöntemleri, doğal ürün çalışmalarında çokça tercih edilen yöntemler arasındadır. Bitki etkinliklerinin bu basit, tekrarlanabilir ve düşük maliyetli yöntemler ile ön çalışmalarının yapılması, bitki potansiyelleri hakkında fikir vererek ileride yapılacak çalışmalara ışık tutmaktadır. Çoğu hastalığın temelinde reaktif türler/serbest radikaller kaynaklı hasarın yatması gerçeğiyle birlikte (300), antioksidan aktivitesi yüksek olan bitkilerin diğer *in-vitro* ve *in-vivo* biyolojik aktivite çalışmalarında da yüksek aktiviteye sahip olma olasılıkları yüksektir. Çalışmamızda reaktif türler ve serbest radikallerin çeşitli mekanizmalar ile giderilebileceği dört farklı yöntem kullanılarak örneklerimizin antioksidan aktiviteleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

5.2.1. DPPH

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH˙) inhibisyon aktivitesi yönteminde DPPH˙ hem ET ile indirgenmektedir hem de HAT ile etkisiz hale getirilmektedir. Dolayısıyla iki mekanizma ile ilerleyebilen kapsamlı bir test olarak düşünülür (167,338). DPPH˙, koyu mor renkte olan kararlı organik nitrojen radikalidir ve ticari olarak elde edilmesi kolay olan bir kimyasaldır. DPPH˙, radikal giderme kinetiğinin ölçümü için kullanılan çeşitli protokollerin geliştirildiği birçok araştırmanın konusu olmuştur (339,340).

Radikalin aromatik yapısından dolayı başlangıçta kararlı olması ve uzun zaman muhafaza edilebilmesi, ticari olarak direk radikal formunda elde edilip reaksiyon aracılığıyla oluşturulmasının gerekmemesi, basit UV-VIS spektroskopik yöntemler ile ölçülebilmesi ve kısa sürede (30 dakikalık inkübasyon süresi) radikalin giderilmesi ile antioksidan aktivitenin ölçülmesi bu testin bazı avantajları arasındadır. Ancak 517 nm'de yapılan ölçümlerde antioksidan örneğinin içinde olabilecek karotenoid veya antosiyanin gibi maddeler bu dalga boyunda absorbansa sahip olabilmekte ve testin sonuçlarını bulandırabilmektedir. Ayrıca DPPH˙ ufak bir molekül olmasından kaynaklı fizyolojik olarak anlamlı olan diğer ROT veya RNT'ini temsil etmemektedir; bu radikale karşı etkili olan örnekler fizyolojik ortamlarda etkili olmayabilir (164,167,168,341,342).

İncir, defne ve çınar yaprak etanol ve su ekstrelerimizin DPPH˙ giderme aktiviteleri, %50 DPPH˙ inhibisyonu sağlayan µg/mL doz olarak hesaplanmıştır (IC_{50}). Düşük doz değerleri daha yüksek DPPH˙ giderme aktivitesine işaret etmektedir. İncir etanol örneğimizin IC_{50} değeri 63,06 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer literatürdeki çalışmalarla tutarlı olup (343,344) bazılarına kıyasla daha etkilidir. Örneğin, yaprakların %70 etanol ile maserasyonları sonucunda farklı ısılar için 20,55 mg/mL (60°C), 3,78 mg/mL (45°C) ve 16,32 mg/mL (25°C) IC_{50} değerleri elde edilmiştir (345). Çalışmamız ile bu değerler arasındaki farklılığın belirleyici faktörü ekstraksiyon yöntemi olduğu düşünülmektedir. Analizlerimizde kullanılan soxhlet ektrasksiyonunda çözücü tekrarlı bir şekilde tüm fenolik bileşikleri ekstrakte ederek biyoaktivitesi daha yüksek bir ekstrenin elde edilmesini sağlayabilmektedir.

Fenolik bileşik içeriği ile bağlantılı olarak antioksidan aktivite, kullanılan çözücüye göre de değişmektedir. Örneğin %80 metanol kullanılarak ekstraksiyonu yapılan incir yapraklarının DPPH IC_{50} değerleri 212,84 ve 230,68 µg/mL olarak elde edilmiştir (346). Yine metanol ile ekstrakte edilen incir yapraklarının DPPH IC_{50} değeri 1,45 mg/mL olarak hesaplanmıştır (347). Bu örnekler çalışmamızdaki aktiviteye kıyasla daha az etkilidir.

İncir su ekstremizin IC_{50} değeri 87,55 µg/mL olup Portekiz incir türlerinin yaprak antioksidan aktivitelerinden daha düşük bir aktiviteye sahiptir; %25 inhibisyon sağlayacak doz tespit edilmiş olup Pingo del Mel yaprakları için 75,2 µg/mL, Branca Tradicional için ise 59,6 µg/mL olarak hesaplanmıştır (330). Portekiz incir türlerinin fitokimyasal içeriği de bu sonuçlar ile tutarlı olarak çalışmamızdaki değerlerden daha yüksektir. Ergül ve ark. çalışmasında ek olarak su ekstresinin aktivitesi de ölçülmüştür ve buradaki aktivite örneklerimizde elde ettiğimiz aktiviteye kıyasla daha düşüktür (347).

L. nobilis yaprakları etanol ve su ekstrelerimizin DPPH˙ için IC_{50} değerleri sırasıyla 40,49 ve 49,10 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değerler incir yapraklarının aktivitelerine kıyasla daha yüksek olup, standart olarak kullanılan troloxun aktivitesinden de yüksektir. Literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığında, ekstraksiyon yöntemi, şartları ve çözücüye bağlı olarak daha yüksek veya daha düşük aktivite elde edildiği görülmektedir. Defne yapraklarının etanol ve su ile tekrarlı maserasyonu sonucunda DPPH˙ IC_{50} değerleri sırasıyla 129,10 µg/mL ve 203,55 µg/mL olarak elde edilmiştir

(348). Bu değerler çalışmamızdaki değerlere kıyasla daha düşüktür ve ekstraksiyon yöntemindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Başka bir çalışmada, defne yapraklarının etanol ekstresi için deney tasarımı sonucunda fenolik içerik bakımından en yüksek ekstre seçilmiştir. %35 etanol ile ultrasonik ekstraksiyon sonucunda yaklaşık 20 µg/mL konsantrasyonda bir ekstrede %94,73 DPPH˙ inhibisyonu elde edilmiştir (349). Bu sonuç çalışmamızdaki aktivite ile kıyaslandığında oldukça yüksektir. Bunun sebebi ise çalışmada bir optimizasyon çalışmasının yapılmış olması, ve en yüksek fenolik bileşik içeren ekstrelerin seçilerek bunların aktivitesinin ölçülmesi olarak görülebilir. Dolayısıyla optimizasyon çalışmalarının önemi ortaya konmuştur.

Defne yaprak etanol maserasyonunda ekstrenin 60 µg/mL DPPH˙ inhibisyonu %92 olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada yaprakların dekoksiyonunda su ekstresinin 60 µg/mL DPPH˙ inhibisyonu %78 olarak elde edilmiştir (317). Çalışmalardan birinde yaprakların %70 etanol ekstresinin DPPH˙ IC_{50} değeri 25,30 µg/mL olup çalışmamızdaki değere kıyasla daha yüksek aktiviteye işaret etmektedir (350). Literatürde elde edilen bazı diğer IC_{50} değerleri ise %80 etanol maserasyonu için 257 µg/mL (319), infüzyonlar için 90 µg/mL ve 130 µg/mL (283), yaprakların geri akıtma yöntemi ile etanol ekstresi için 203,15 µg/mL ve su ekstresi için 398,12 µg/mL (351).

P. orientalis sonuçları incelendiğinde ise sırasıyla etanol ve su ekstrelerimizin DPPH˙ inhibisyonu için elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 26,73 ve 56,74 olup diğer örneklere ve literatürdeki diğer çalışmalara kıyasla oldukça etkilidir. Etanol (%96) çözücüsü ve soxhlet düzeneği ile ekstrakte edilen yaprakların böbrek taşları üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada DPPH˙ giderme aktivitesi de ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda DPPH˙ için 76,63 µg/ml IC_{50} elde edilmiştir (322).

Yine farklı bir çalışmada çınar yapraklarının etanol ekstresi soxhlet düzeneği ile elde edildikten sonra DPPH˙ giderme ve CUPRAC kapasiteleri ölçülmüştür. Ekstrenin farklı konsantrasyonlarında gerçekleştirilen ölçümlerde en yüksek DPPH˙ inhibisyonu 1 mg/mL ekstrede (%80 inhibisyon) elde edilmiştir (352).

5.2.2. ABTS

2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit ($ABTS^{\bullet+}$) katyon radikali inhibisyon aktivitesi yöntemi 734 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyona sahip olan

ve mavi-yeşil bir kromofor olan stabil katyon radikali ($ABTS^{\bullet+}$) giderme aktivitesine dayanmaktadır. DPPH inhibisyon aktivitesine benzer olarak burada da antioksidanlar ET mekanizması ile $ABTS^{\bullet+}$'ni indirgeyebilir veya HAT mekanizması ile radikali giderebilir. Güçlü bir antioksidan ile etkileşime giren katyon radikalinin renginin açılmasıyla birlikte indirgendiği veya giderildiği anlaşılmaktadır.

Testin avantajları arasında hızlı (30 dakika inkübasyon) ve basit bir yöntem olması yer almaktadır. Ayrıca $ABTS^{\bullet+}$ doğasından kaynaklı hem sulu hem de organik çözücülerde çözünerek bir çözeltinin iyonik gücünden etkilenmez ve hem lipofilik hem de hidrofilik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin incelenebileceği farklı ortamlarda kullanılabilir. En büyük dezavantajlarından biri ise katyon radikalinin oksidasyon yolu ile oluşumu 12-16 saatlik bir zaman almasıdır, bu da detaylı bir ön hazırlık ve ek kimyasalların gerekmesi anlamına gelir. $DPPH^{\bullet}$ ile benzer olarak fizyolojik ortamlarda bulunmayan sentetik bir radikal olmasından kaynaklı antioksidan örneğinin ortaya koyduğu etkinin farklı yöntemler ile doğrulanmasını gerektirmektedir (164,167,168,341,342).

İncir, defne ve çınar yaprak etanol ve su ekstrelerimizin $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri, %50 $ABTS^{\bullet+}$ inhibisyonu sağlayan μg/mL doz olarak hesaplanmıştır (IC_{50}). Düşük dozda değerler daha yüksek $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesine işaret etmektedir. Çalışmamızda incir yapraklarının etanol ve su ekstrelerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 2,83 ve 3,10 μg/mL olarak saptanmıştır. Bu değerler hem standart olarak kullanılan troloxun aktivitesine kıyasla daha yüksek hem de aynı örneklerin $DPPH^{\bullet}$ için IC_{50} sonuçlarına kıyasla çok daha etkilidir.

Yapılan bir çalışmada $ABTS^{\bullet+}$ giderme bakımından incir yaprakları metanol ve su ekstrelerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 559,39 ve 428,51 μg/mL olarak hesaplanmıştır. Burada miktar farklılığı kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile bağdaştırılabilir; oda sıcaklığında maserasyon (347). Yine farklı bir çalışmada yaprakların %80 metanolde sürekli karıştırılarak 40°C'de ekstraksiyonu gerçekleştirilmesi nisbeten daha düşük IC_{50} değerleri, dolayısıyla $ABTS^{\bullet+}$ giderme konusunda daha yüksek aktiviteyle sonuçlanmıştır (yaklaşık 300-350 μg/mL IC_{50}) (346). Çalışmamızda incir yaprak ekstrelerinin aktivitesi daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bunun sebeplerinden biri kullanılan soxhlet yöntemi olduğu düşünülmektedir.

L. nobilis yaprakları etanol ve su ekstrelerinin $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi bakımından IC_{50} değerleri sırasıyla 4,08 ve 2,36 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tekrarlı maserasyon ile elde edilen ekstrelerin $ABTS^{\bullet+}$ IC_{50} değerleri bir çalışmada etanol ekstresi için 43,74 µg/mL, su ekstresi için ise 99,75 µg/mL olarak saptanmıştır (348). Başka bir çalışmada yine maserasyon sonucu su ekstresi IC_{50} değeri 20,64, %60 etanol ekstresi IC_{50} değeri 18,68, %80 etanol ekstresi IC_{50} değeri 14,65, ve %100 etanol IC_{50} ekstresi 17,68 µg/mL olarak bulunmuştur (332). İki maserasyon yönteminin sonucunda belirgin farklılıklar olup çalışmalardan ilkinde ekstremizden daha düşük aktivite, ikincisinde ise daha yüksek aktivite olduğu görülmektedir.

Yaprakların metanol ekstresi ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile 1,1 µg/mL gibi bir değerle oldukça yüksek bir aktivite sergilemiştir (333). Yaprakların geri akıtma yöntemi ile etanol ekstresi için 203,15 µg/mL ve su ekstresi için 398,12 µg/mL IC_{50} değerleri tespit edilmiştir (351).

Çalışmamızda çınar yapraklarının hem su hem de etanol çözücüsü ile elde edilen ekstreleri en etkili ekstrelerdi. Etanol ve su ekstrelerimizin sırasıyla $ABTS^{\bullet+}$ IC_{50} değerleri 1,80 µg/mL ve 1,02 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Çınarın fenolik bileşik açısından içeriği de önceki bölümde tartışıldığı üzere daha zengin bir içeriğe sahipti. Literatüre bakıldığında çınar yaprakları için yapılan çalışmalarda $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi pek fazla rastlanan bir aktivite ölçüm yöntemi olmasa da etanol (%96) çözücüsü ve soxhlet düzeneği ile ekstrakte edilen yaprakların böbrek taşları üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada $ABTS^{\bullet+}$giderme aktivitesi de ölçülmüştür. Çalışmanın sonuçlarına göre $ABTS^{\bullet+}$ için 89,60 µg/ml IC_{50} değerleri ile yaprak ekstresi, askorbik asit ve trolox standartlarına kıyasla daha etkili olduğu ortaya konmuştur (322). Bu sonuçlar çalışmamızdaki sonuçlara kıyasla daha düşük bir aktivite ile ilişkilidir. Çalışmamızda ticari standardize ürün kullanılmıştır. Literatürdeki bu çalışmada ise toplanan yabani bitki yaprakları kullanılmıştır. Aktivite açısından farklılığın sebebi bu gibi görünmektedir.

5.2.3. FRAP

Demir (III) iyonu indirgeyici gücü (FRAP) antioksidan aktivite testi kapsamında antioksidan örneğinin indirgeyici gücü, yani ET-mekanizması ile "toplam" antioksidan kapasite ölçümü yapılmaktadır (353,354). Reaksiyon gereği ferrik iyonları (Fe^{3+}) demir iyonlarına (Fe^{2+}) bir renk değişimine bağlı olarak indirgenir. FRAP testi basit, hızlı (4

dakika inkübasyon süresi), standardize edilmiş ve otomasyona açık bir yöntemdir. Ancak diğer *in-vitro* testlerde olduğu gibi fizyolojik ortamlardaki şartları tam olarak temsil etmediği gibi ek olarak pH 3,6'da gerçekleştirilen deney fizyolojik ortamların pH'sından uzaktır. Örneklerde bulunan fenolik bileşik gibi maddelerin Fe^{3+} indirgeme kapasitesini ölçse de tiyol içeren antioksidanlar (sistein ve glutatyon) için uygun değildir. Burada sıkça rastlanılan problemlerden biri de test ortamlarının Fe^{2+} ile kontaminasyonundan kaynaklı başlangıçtaki sarı renk yerine yeşil-mavi renkte bir çözelti ile karşılaşma olasılığıdır (167,355).

Çalışmamızda incir örneklerinin FRAP kapasitesi diğer iki bitkiye kıyasla daha düşük iken en yüksek FRAP indirgeme kapasitesi defne yapraklarının ekstreleri tarafından sergilenmiştir. *F. carica* yapraklarının %70 etanol ekstresi için FRAP için 2,93 mmol Fe^{2+} eşdeğer/100 g örnek olarak hesaplanmıştır (305). Çalışmamızda ise incirin etanol yaprak ekstrelerinin FRAP kapasitesi 7,51 mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki ve su ekstrelerinin FRAP kapasitesi 10,27 mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki olarak hesaplanmış olup literatürdeki değerden daha düşüktür.

FRAP için çok fazla sayıda çalışmanın bulunmamasıyla birlikte standart bir deney föyü olmasına rağmen çalışmaların sonuçları farklı birimler ile verilmiştir. Farklı birimlerin kullanılması ise sonuçların kıyaslanmasını zorlaştırmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada aseton ekstrelerinin FRAP kapasite sonuçları mg trolox/100 g kuru bitki olarak verilmiştir (134-2015 arası değişmektedir), burada kullanılan standart föyde önerilen demir sülfat standardından farklı olduğu için verilen birim farklıdır ve kıyaslama için sağlıklı zemini ortadan kaldırmaktadır (356). Ergül ve arkadaşları ise çalışmanın sonucunu grafik olarak verip su ve metanol ekstresinin FRAP kapasitesi hakkında kıyaslama yapmıştır; metanol ekstresinde mM $FeSO_4$ eşdeğer miktar daha yüksektir (347).

L. nobilis yaprak ekstrelerinin sonuçları incelendiğinde oldukça yüksek FRAP kapasitesi elde ettiğimiz görülmektedir: etanol ekstresi için 21,69 mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki, su ekstresi için ise 35,53 mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki. Bir çalışmada yaprakların maserasyonla etanol ekstresinin 60 µg/mL konsantrasyonda FRAP indirgeme inhibisyonu %82, yaprakların dekoksiyon ile su ekstresinin 60 µg/mL konsantrasyonda FRAP indirgeme inhibisyonu %71 olarak elde edilmiştir (317). Çalışmamızdan farklı olarak burada etanol ekstresinin aktivitesi daha yüksek olarak hesaplanmıştır ve bu,

ekstraksiyon yöntemindeki farklılığa atfedilebilir. Geri akıtma yöntemi ile elde edilen etanol ve su ekstreleri için FRAP sonuçları µmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru ekstre olarak verilmiş olup etanol ekstresi için 593,70 ve su ekstresi için 609,33 olarak belirtilmiştir (351).

Bir başka çalışmada yine defne yapraklarının maserasyonu ile elde edilen su ekstresi IC_{50} değeri olarak verilmiş olup 171,74 µg/ml, %60 etanol için IC_{50} 94,43 µg/ml, %80 etanol için IC_{50} 85,47 µg/ml ve %100 etanol için IC_{50} 47,28 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada da etanol ekstrelerinin daha etkili olduğu ortaya konmuştur (332). *L. nobilis* yaprak infüzyonları (5 dakika kaynamış suda bekletme) FRAP aktivitesi de IC_{50} değeri olarak verilmiş olup ekili defne için 0,09 mg/mL, yabani defne için 0,12 mg/mL olarak hesaplanmıştır (283).

Son olarak *P. orientalis* sonuçları incelenecek olursa defneden daha düşük, incirden daha yüksek bir aktivite elde edilmiştir (etanol ekstresi için 15,34 mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki, su ekstresi için 13,44 mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki). Ucar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada su ekstresinin metanol ekstresine kıyasla daha yüksek FRAP aktivitesine sahip olduğu ortaya konmuştur (295). Literatürde çınar yaprakları için yapılan antioksidan çalışmaların sayısı yeterli değildir ve bu anlamda geliştirilmesi gereken bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır.

5.2.4. CUPRAC

Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (CUPRAC) metodu FRAP testinin bir varyasyonu olarak kabul edilir ve iki binli yıllarda geliştirilmiş olup (357) bakır(II) iyonunun (Cu^{2+}) bakır(I) iyonuna (Cu^{+}) indirgenmesini baz almaktadır. Cu^{2+}-neokuproin kompleksi antioksidanlar tarafından 450 nm'de maksimum absorpsiyona sahip bir kromofor olan Cu^{+}-neokuproine, ET-mekanizması ile indirgenmektedir. Benzer şekilde bir standardın (örneğin Trolox) eşdeğeri olarak hesaplanan sonuçlar µmol (std) eşdeğeri/g kuru bitki olarak verilebilmektedir.

Bakır, tiyol bileşikleri de dahil olmak üzere çok çeşitli antioksidanlarla yeterince hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmektedir. Ayrıca FRAP'a kıyasla asidik ortamlardan ziyade fizyolojik ortamların pH'sına yakın bir değerde etkisini gösterebilmektedir. Reaksiyonlar maksimum 30 dakika içinde tamamlanabildiği için ve spektroskopik cihazlar dışında bir ekipman gerektirmediği için basit ve hızlı bir yöntem olarak

görülmektedir. Dezavantajlarından birisi ise sadece ET-mekanizmasına göre giderilen radikalleri ölçebilmesidir. HAT-mekanizması ile etkisini gösteren antioksidanlar için bu mekanizmayı baz alan testler ile yapılması daha anlamlı sonuçlar verecektir. Ayrıca diğer tüm *in-vitro* testlerde olduğu gibi sentetik radikaller fizyolojik ortamlarda üretilen radikalleri temsil etmemektedir (164,358).

Literatürde antioksidan analiz çalışmalarının çoğunlukla DPPH$^{\bullet}$ giderme mekanizmasını baz aldığı görülmektedir. Bakır indirgeme kapasitesi de FRAP'a benzer şekilde net bir deney föyü olmasına rağmen halen çok yaygın bir şekilde uygulanmamaktadır. Çalışmamızda CUPRAC sonuçları açısından ekstrelerimiz arasında en yüksek aktivite defne yapraklarında (etanol ekstresi 0,53, su ekstresi 0,36 mmol trolox eşdeğer/g kuru bitki), orta derecede aktivite çınar yapraklarında (etanol ekstresi 0,19, su ekstresi 0,31 mmol trolox eşdeğer/g kuru bitki) ve en düşük aktivite incir yapraklarında (etanol ekstresi 0,18, su ekstresi 0,19 mmol trolox eşdeğer/g kuru bitki) olarak tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında bir çalışmada incir yapraklarının aseton ekstrelerinin CUPRAC kapasitesi 434-3893 mg trolox eşdeğer/100 g kuru bitki olarak değişmektedir (356). Birim açısından farklılık gösteren bu çalışmanın sonuçları ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların kıyaslanması zorludur. Ayrıca kullanılan çözcünün farklı olmasından kaynaklı sağlıklı bir kıyas zemini de oluşmamaktadır.

Defne için literatürde yapılan bir çalışmada yaprakların %80 etanol ile maserasyonu sonucunda CUPRAC kapasitesi 39,16 µmol trolox eşdeğer/g kuru bitki olarak verilmiştir (359). Bu sonuç, çalışmamızdaki değere kıyasla düşük olup farklılığın kaynağının kullanılan ekstraksiyon yöntemi olduğu düşünülmektedir.

Çınar yaprakları açısından bakıldığında, yapılan bir çalışmada çınar yapraklarının etanol ekstresi soxhlet düzeneği ile elde edildikten sonra CUPRAC aktivitesi hesaplanmıştır. Ekstrenin nispeten birbirine daha yakın olan 1,732 ve 1,772 absorbans değerleri ile en yüksek bakır indirgeme kapasitesi 0,8 mg/mL ile 1 mg/mL ekstre dozlarında tespit edilmiştir (352). Bu çalışmada da incir çalışmasına benzer şekilde sonuçlar sadece absorbans değeri olarak verilmiş, kıyaslayabileceğimiz tek parametre ise kullanılan konsantrasyondur. Çalışmamızda kullandığımız örnek konsantrasyonu 50 µg/mL'dir, bu da kıyasladığımız çalışmada kullanılan konsantrasyondan oldukça düşüktür. Elde ettiğimi absorbans değeri de daha düşüktür (0,899).

Aşağıda Tablo 5.2'de incir, defne ve çınar ile ilişkili ek biyolojik aktivite ve fitokimyasal içerik çalışmaları özetlenmiştir. Tabloda bitkilerin farklı kısımlarına ek olarak aynı türe ait bazı diğer bitkilerin de bilgilerine kıyas için yer verilmiştir. Tabloda görüldüğü üzere, incirin farklı türlerinde de çalışmalar oldukça yaygındır ancak çınar ve defne için antioksidan çalışmaları henüz sınırlıdır.

Tablo 5.2: Bitkiler ve çeşitli kısımlarının fitokimyasal içeriği ve biyolojik aktivitesi

Bitki (kısım[1])	**Çözücü (işlem[2])**	**İçerik analizi**	**Biyolojik aktivite**	**Kaynak**
F. carica L. (Y, M)	Metanol (M)	FTIR Fenolik bileşik Saponin	DPPH IC_{50} Meyve: 14,40 µg/mL Yaprak: 7,99 µg/mL	(360)
F. carica L. (Y)	Metanol (UDE) Etanol (UDE)	HPLC, LC-MS Docosenamide, (Z)- Ficusin	DPPH IC_{50} Metnaol: 93,12 µg/mL Etanol: 101,76 µg/mL	(361)
F. carica L. (M)	Metanol (su ve HCL ile) (M)		FRAP 3,9 – 16,1 mmol Fe^{2+}/kg taze ağırlık	(362)
L. azorica (Y)	Etanol	GC-MS Yağ asitleri Seskiterpen laktonlar Terpenler	DPPH IC_{50} 59,19 µg/mL ABTS IC_{50} 6,78 µg/mL	(363)
L. nobilis (Y)	Etanol (M) Etil asetat (F)	GC-MS 1,8-sineol α-Terpinil asetat Metil öjenol Sabinen	DPPH IC_{50} 0,024 mg(mL ABTS 0,222 mmol TEAC/g FRAP 0,116 mmol askorbik asit eşdeğer/g	(364)
L. nobilis *L. azorica* *L. novocanariensis* (Y)	Su (D) Etanol:Su (1:1) (D) Etanol (D)	HPLC-DAD Flavan-3-ol Kateşin Epikateşin	DPPH *L. nobilis* Su: %51,81 Sulu etanol: %76,11 Etanol: %82,63 *L. azorica* Su: %54,11 Sulu etanol: %75,07 Etanol: %84,18 *L. novocanariensis* Su: %23,65 Sulu etanol: %64,35 Etanol: %83,10	(365)
P. orientalis (Y)	Su (D)	HPLC Kamferol ve türevleri	Yok	(366)

[1]Y: yaprak, M: meyve; [2]M: maserasyon, F: fraksiyonlama, UDE: ultrasonik destekli ekstraksiyon, D: dekoksiyon

5.3. DENEY TASARIMI SONUÇLARI

Doğal ürün bileşikleri karmaşık olup biyolojik özelliklerini karakterize etmeye çalışmak zahmetli olabilmektedir. Bu bileşiklerin karmaşık ancak zengin kimyasal bileşimi, birçok hastalık için çok yönlü bir aktivite ortaya koymaktadır. Ancak, bu kompozisyon çeşitli dış faktörlere bağlıdır ve standardizasyonu zorlu olabilmektedir. Ayrıca, aynı tür içinde meydana gelen birçok kimotip bulunmaktadır ve bunlar ölçülen aktiviteleri de etkileyebilir. Bu değişkenler, doğal ürün ve bunların karışımlarının geliştirilmesinde, bileşikler arasındaki etkileşimleri öngörmek zor olduğunda ek olarak çoğalmaktadır.

Karışım deney tasarımının temelinde yatan Yüzey Yanıt Metodolojisi, polinom denklemin deneysel verilere uygunluğuna dayanan istatistiksel ve matematiksel tekniklerin derlemesidir. İstatistiksel tahminler yapmak amacıyla veri setinin davranışını iyi açıklar ve geleneksel olarak kullanılan tek parametreli optimizasyon yöntemlerine göre zaman, mekân ve hammadde kullanımını azalttığı için daha tercih edilebilirdir (367). Amaç, istenen özelliklere sahip etkili ve tekrarlanabilir bir modelin geliştirilmesi için en az sayıda deney yapmak, ancak bu süreçte maksimum miktarda veri elde etmektir.

Bu yönde yaptığımız çalışmalarda deney tasarımı ile üç bitkimizden oluşan karışımlar hazırlanmıştır ve dört antioksidan deneyin gerçekleştirilmesi ile toplamda sekiz model elde edilmiştir. Modellerimizi temsil eden denklemler sonuçlar kısmında verilmiştir; DPPH ile FRAP analizlerinin etanol ve su ekstreleri için karesel denklemler, ABTS etanol ve su ekstreleri için basitleştirilmiş özel kübik denklem, CUPRAC için ise etanol ekstrelerinde karesel denklem ve su ekstrelerinde basitleştirilmiş özel kübik denklem olarak elde edilmiştir.

Bu denklemlerin anlamı parametrelerin katsayılarında yatmaktadır. Sonuçlar kısmında Tablo 4.26 ve 4.27'de bulunan katsayı değerleri incelendiğinde, pozitif işaretli değerler ilgili parametrenin yanıt değişkenini artırma yeteneğini gösterirken, negatif işaretli değerler ise ilgili parametrenin yanıt değişkenini azaltma yeteneğini göstermektedir (300,368,369). DPPH ve ABTS çalışmaları IC_{50} değerleri olarak verilmektedir dolayısıyla yanıt değişkeninin düşük olması arzu edilen sonuçtur. FRAP ve CUPRAC için ise sonuçlar toplam kapasite olarak verildiği için yanıt değişkeni olabildiğince yüksek olmalıdır. Bu bağlamda aşağıdaki çıkarımları yapmak mümkündür:

- DPPH etanol ekstrelerinde yanıt değişkeni üzerine en yüksek etki BC (çınar-defne) parametresi (katsayı değeri: -74,96), en düşük etki ise AB (incir-çınar) parametresi (katsayı değeri: 86) tarafından ortaya konmuştur. Su ekstrelerinde ise en yüksek etkiye sahip parametre AB (incir-çınar) iken (katsayı değeri: -25,55) en düşük etkiye sahip parametre A (incir) olarak elde edilmiştir (katsayı değeri: 87,50).
- ABTS etanol ekstrelerinde yanıt değişkeni üzerine en yüksek etki ABC (incir-çınar-defne) parametresi (katsayı değeri: -34,48), en düşük etki ise AB (incir-çınar) parametresi (katsayı değeri: 6,97) tarafından ortaya konmuştur. Su ekstrelerinde ise en yüksek etkiye sahip parametre ABC (incir-defne) iken (katsayı değeri: -10,75) en düşük etkiye sahip parametre ABC (incir-çınar-defne) olarak elde edilmiştir (katsayı değeri: 28,14).
- FRAP etanol ekstrelerinde yanıt değişkeni üzerine en yüksek etki AC (incir-defne) parametresi (katsayı değeri: 23,62), en düşük etki ise AB (incir-çınar) parametresi (katsayı değeri: -35,72) tarafından ortaya konmuştur. Su ekstrelerinde ise en yüksek etkiye sahip parametre C (defne) iken (katsayı değeri: 35,53) en düşük etkiye sahip parametre AC (incir-defne) olarak elde edilmiştir (katsayı değeri: -69,44).
- CUPRAC etanol ekstrelerinde yanıt değişkeni üzerine en yüksek etki C (defne) parametresi (katsayı değeri: 0,53), en düşük etki ise AC (incir-defne) parametresi (katsayı değeri: -0,62) tarafından ortaya konmuştur. Su ekstrelerinde ise en yüksek etkiye sahip parametre BC (çınar-defne) iken (katsayı değeri: 5,12) en düşük etkiye sahip parametre ABC (incir-defne) olarak elde edilmiştir (katsayı değeri: -8,97).

Sonuçların geneli değerlendirildikten sonra optimum karışımlar elde edilmiştir. Sonuçlar kısmında verilen tablolara istinaden etanol ve su ekstreleri için optimum karışım oranları aşağıda belirtilmiştir:

1- Etanol ekstreleri = %1,59 incir + %19,43 çınar + %78,98 defne

2- Su ekstreleri = %2.27 incir + %8,10 çınar + 89,63 defne

Optimum karışımlar saf bitkilerin antioksidan sonuçları ile değerlendirildiğinde ise çınar ve defnenin incire kıyasla daha yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Bitkiler arasında en yüksek antioksidan aktiviteyi ortaya koyan defne yapraklarının yukarıdaki karışımlarda en yüksek orana sahip olduğu görülmektedir. Diğer iki bitkinin eklenmesi ile muhtemel sinerjik etkiden kaynaklı daha yüksek bir aktivite beklenmektedir. Bu anlamda sonuçlar kısmındaki Tablolar (4.30 ve 4.31) incelendiğinde defnenin yüksek oranda olduğu karışımda güçlü sinerjik etki olduğu görülmüştür. Etkileşimlern hesaplanması için referans kaynağı olarak kullanılan ilk çalışmada Hugo ve arkadaşları mango posasındaki fenolik bileşiklerin arasındaki etkileşimler incelenmiştir (303). Çalışmanın sonucunda 4 fenolik bileşiğin kombinasyonunda önemli sinerjik etki bulunrken bazı bileşikler arasında antagonistik etki de gözlemlenmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde bazı karışımlarda sinerjik etki hesaplanırken bazı karışımlarda antagonistik etki gözlemlenmiştir.

Rahim ve arkadaşlarının modifiye edilmiş hesaplama yöntemi ile gerçekleştirdikleri çalışmada ise *Cymbopogon citratus*, *Murrya koenigii*, *Curcuma longa* ve *Zingiber officinale* karışımlarının arasındaki etkileşimler belirlenmiştir (301). Çalışmanın sonucunda da benzer şekilde sinerjik etki görülürken, bazı karışımlarda ise antagonistik etkiye rastlanmıştır. Çalışmada bazı fenolik bileşikler arasındaki etkileşimlerin antagonistik olabileceğine dikkat çekilerek karışımlardaki antagonistik etkileşimlerin kaynağı olarak düşünülmüştür. Dolayısıyla fenolik içerik bakımından zengin olan bitki karışımları için optimizasyon çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir, zira her fenolik bileşik açısından zengin karışımı yüksek antioksidan aktiviteye sebep olmayabilir. Fenolik bileşikler arasındaki etkileşimlerin tabiatı araştırılmalıdır.

Sonuçların çoğunluğuna göre bitki karışımlarındaki antioksidan aktiviteler saf bitkilerin ortaya koyduğu aktiviteye kıyasla daha yüksektir. Geçmiş çalışmalar, bitkisel karışımların etkinliğinin, bireysel bitkilerin etkilerinden ziyade, tıbbi bitkiler arasındaki daha karmaşık etkileşimlerden kaynaklandığını göstermiştir (370). Fenolik bileşik içeriğindeki değişiklikler, bitki karışımlarının sinerjik etkilerine önemli bir katkıda bulunabilir. Karışımların antioksidan aktivite üzerindeki etkileri, karışımda bulunan fitokimyasal bileşiklerin kimyasal doğası ve reaktivitesinden kaynaklanabilir (371) Bireysel fenolik bileşikler, polimerizasyon ve/veya diğer kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanan yapısal değişikliklere uğrayabilir ve bu da nihai olarak antioksidan aktivitelerinde değişikliklere neden olabilir (372).

Fenolik bileşiklerin radikal süpürme kapasitesi, hidrojen bağışlama yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin içindeki hidroksil grubunun sayısı ve konumu, serbest radikallere karşı süpürme etkinliklerini etkileyebilir (370). Ayrıca, hidroksil grubunun kullanılabilirliği, kimyasal yapının ve uzamsal konformasyonun bağlı olduğu faktörlere bağlıdır ve bu, moleküllerin reaktivitesini değiştirebilir. Ancak, polimerizasyon derecesi kritik bir değeri aştığında, artan moleküler karmaşıklık, sterik engelden dolayı antioksidan kapasiteyi azaltabilir, bu da hidroksil gruplarının kullanılabilirliğini azaltır (372,373).

Genel olarak literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında kısıtlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Çoğunlukla uçucu yağların karışımları için optimizasyon çalışamaları yapılmış olup, yaprak ekstreleri ve diğer bitki kısımlarından oluşturulan karışımlar için çalışmaların sayısı artırılmalıdır. Yapılan bir çalışmada *Petroselinum crispum, Coriandrum sativum* L. ve *Apium graveolens* L. bitki yapraklarından oluşan karışımların %70 sulu etanol ile ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Design Expert programı aracılığıyla tasarlanan 23 karışım belirtilen oranlarda hazırlanmıştır. Karışımların fenolik içerik, toplam antioksidan kapasite ve DPPH˙ giderme aktiviteleri ölçülmüştür. ANOVA sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olan parametreler seçilerek model için uygun denklem seçilmiştir. Programın optimum olarak önerdiği karışım oranları tespit edilmiştir (323).

Bir başka çalışmada *Cnestis palala* sap, *Urceola micrantha* sap, *Marantodes pumilum* sap ve *Microporus xanthopus* sporokarp kısımlarından oluşan karışımlar, yaşlanma karşıtı etkilerini tespit etmek için hazırlanmıştır. Design Expert programı kullanılarak 24 karışım önerilmiştir ve bu karışımlar hazırlandıktan sonra DPPH ve ABTS radikali giderme aktiviteleri ile FRAP kapasiteleri ölçülmüştür. Benzer adımlarla sonuçlara göre uygun denklem ve istatistiksel olarak anlamlı parametrelerin katsayıları tespit edilip optimum bir karışım belirlenmiştir. Optimum formülasyon hazırlandıktan sonra yaşlanma üzerine etkisi, farklı enzim aktivite testleri ile tespit edilmiştir (300).

Origanum compactum L., *Origanum majorana* L. ve *Thymus serpyllum* L.'den elde edilen uçucu yağlarının, *Escherichia coli, Staphylococcus areus, Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerine karşı antibakteriyel etkileri bir çalışmada KDT ile gerçekleştirilmiştir (369). Çalışmada, bakterilere karşı optimal antibakteriyel etki, %28 *O. compactum*, %30 *O. majorana* ve %42 *T. serpyllum*'dan oluşan karışımda elde

edilmiştir. Antioksidan ve antibakteriyel etki üzerine yapılan bir başka çalışmada, *Cinnamomum cassia* L. J. Presl, *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Rosmarinus officinalis* L. ve *Ocimum basilicum* L. bitkilerinin uçucu yağlarından oluşan optimum karışım sırasıyla %51, %34, %15, %0'lık bir bileşen oranına sahipti (374).

5.4. COX İNHİBİSYONLARI

Çalışmamızda COX-1 inhibisyonu için değerler incelendiğinde incir yapraklarının etanol ekstrelerinin inhibisyonu su ekstrelerine kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. COX-2 inhibisyonu açısından ise etanol ekstresi su ekstresine kıyasla daha yüksektir. Genel anlamda incir yapraklarının su ekstresinin fenolik içerikleri etanol ekstrelerine kıyasla daha zengindir. Ayrıca ABTS ve DPPH aktivitesi anlamında su ekstreleri etanol ekstrelerine kıyasla daha düşük aktiviteye sahip olsa da FRAP ve CUPRAC kapasiteleri bakımından etanol ekstrelerine kıyasla daha aktiflerdi. COX-1 inhibisyonu bazı durumlarda tercih edilmemekte olup COX-2'yi selektif bir şekilde inhibe eden ilaçların kullanımı yaygınlaşmıştır.

Çınar yapraklarının COX-1 inhibisyon aktivitesi diğer tüm örneklere kıyasla oldukça yüksekti (%86,59 ve %76,25). Defne yapraklarının da aktivitesi (%68,97 ve %57,85) yüksek olduğu için bunların incir ile karışımlarının aktiviteleri saf incir örneklerinin aktivitesinden daha yüksekti. Karışım 1'de görülebileceği üzere, çoğunlukla incirden oluşmasına rağmen bu karışım aktivitesi en yüksek ikinci aktiviteydi. Bu bağlamda incir gibi kolay elde edilebilecek bir bitkinin yapraklarını tek başına kullanmak yerine, az da olsa diğer bitkilerin yaprakları ile karıştırılması daha yüksek biyolojik aktiviteye sebep olabilmektedir.

Çınar ve defne ekstrelerinin en yüksek COX-2 inhibisyon değerlei %50 civarında olup COX-1 inhibisyonuna kıyasla oldukça düşüktür. Ancak karışımlara bakıldığında karışım 2 ve karışım 3'ün etanol ekstreleri %70 civarındadır. Dolayısıyla saf bitki ekstresinin kullanımı yerine bitkilerin karışım olarak kullanımında daha yüksek inhibisyon değerleri elde edilebilmektedir.

Literatür incelendiğinde genellikle antienflamatuvar çalışmalar hücre üzerine veya *in-vivo* olarak gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda kullandığımız kite benzer fazla çalışmaya rastlamak mümkün olmamıştır. Bitki karışımları açısından

bakıldığında ise herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Kit kullanılarak daha kolay ve daha düşük bir maliyet ile ön çalışmalar yapılabilmektedir.

F. carica yaprak etil asetat ekstresinin COX-1 inhibisyonu için IC_{50} değeri 627,23 µg/mL olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada standart olarak kullanılan asetil salisilik asit (aspirin) için IC_{50} 557,58 µg/mL olarak hesaplanmıştır (307). Çalışmamızdaki COX-1 inhibisyon sonuçları ise 50 µg/mL konsantrasyon için elde ettiğimiz inhibisyon etanol ekstresi için %31,42, su ekstresi için ise %66,28, salisilik asit için ise %27,97. Kıyaslama yapılacak olursa su estrelerimizin COX-1 inhibisyonu aktivitesi daha yüksektir.

İncir yapraklarının antienflamatuvar aktivite çalışmalarına literatürde çok rastlanmamıştır. Ancak yapılan çalışmalar aktivitenin varlığını farklı metotlar ile ortaya koymuştur. Eteraf-Oskouei ve arkadaşlarının 2015'de yaptıkları çalışmada, *F. carica* yaprakları metanol ile soxhlet düzeneği kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ekstrenin anti-enflamatuvar ve anti-anjiyogenez etkilerinin mekanizmasını aydınlatmak için bir dizi proinflamatuar mediyatörün konsantrasyonları ölçülmüştür. Sonuçlar ekstrenin enflamatuvar eksüdatlarda PGE2, TNFα ve VEGF seviyelerini azalttığını açıkça göstermiş. Bu nedenle, proinflamatuar sitokinleri aşağı regüle etme kabiliyeti nedeniyle antiromatizmal etkiler gösterme potansiyeline de sahip olabileceği belirtilmiştir (344).

Avusturalya'da yapılan bir çalışmada, *F. carica* L. yapraklarının metanol, etanol ve etil asetat ekstrelerinin çeşitli biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. COX-2 inhibisyonu kısmında salisilik asit standardına kıyasla anlamlı bir inhibisyon sağladığı ortaya konmuştur (307). Yaprakların su ekstrelerinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarda yağ oranı yüksek olan bir diyetle desteklenen sıçanların plazmasındaki IL-6 (enflamasyon mediyatörü) seviyesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (308). Bu çalışmada furanokumarin içerik analizi sonuçları verilmemiştir ancak araştırmacılar etkiyi bu bileşikleri atfetmektedir.

Defne yapraklarının fenolik bileşik yönünden zengin içeriği üzerine yapılan antienflamatuvar çalışmalar, antioksidan çalışmalara kıyasla daha kısıtlı olup daha detaylı araştırmaların konusu olmayı beklemektedir. Tezimizin konusunu ilgilendiren COX inhibisyonu üzerine yapılan nitelikli çalışmalara rastlanmasa da diğer antienflamatuvar mediyatörler veya enzimlerin inhibisyonu veya COX enzimlerinin ekspresyonunun inhibisyonu bazı çalışmaların konusu olmuştur. Yapılan bir çalışmada defne yaprakları

DMSO çözücüsü ile hazırlanarak bazı antienflamatuvar parametreler üzerine etkisi ölçülmüştür. Çalışmada 500 µg/mL dozda ekstrenin COX-2 enziminin ekspresyonunu diğer bitkiler kıyasla en yüksek düzeyde inhibe ettiği ortaya konmuştur (375).

Su ve %96 etanol çözücüleri ile elde edilen yaprak ekstrelerinin karragenan kaynaklı arka pençe ödemi modeli üzerine yapılan bir çalışmada defne yapraklarının etanol ekstreleri en yüksek yüzde inhibisyon değeri ortaya koyarak en etkili üç antienflamatuvar bitki arasındaydı (376). COX-2 enzimi de dahil olmak üzere diğer enflamasyonda rol oynayan mediyatörlerin salınımı kontrol eden NF-κB molekülünün inhibisyonu bazı antienflamatuvar çalışmaların konusudur. Yapılan bir çalışmada defne yapraklarının metanol ekstresi ile başlayarak elde edilen diğer heksan, etil asetat, diklorometan ve n-butanol ekstrelerinin içerikleri NMR ve HPLC ile analiz edilmiştir. Tespit edilen seskiterpen laktonların yapılarındaki α,β-doymamış karbonil özelliklerinden dolayı NF-κB inhibisyonu gözlemlenmiştir (320).

Çınar yaprakları için de aynı literatür açığı bulunmaktadır. Özellikle antioksidan etki, fenolik içerik analizi ve bunların COX inhibisyonuna bağlı etkilerine dair çalışmalara rastlanmamıştır. Ancak çınarın 56,91 µg/ml değerinde bir IC_{50} ile LOX enziminin inhibisyonu için de indometazin standardına kıyasla nisbeten iyi bir *in-vitro* antienflamatuvar etkiye sahip olduğu görülmüşüdür (322).

Çınar yapraklarının etanol ile başlayarak farklı çözücü fraksiyonlarının elde edildiği bir çalışmada, ilk defa izole edilip tesit edilen bir açillenmiş flavonol glikozit ile bilinen 7 bileşiğin TNF-α'nın indüklediği NF-κB aktivitesi, nitrik oksit (NO) üretimi, aromataz ve kinon redüktaz 2 üzerindeki etkileri çalışılarak antikanser aktivitesi ortaya konmuştur (377).

Fenolik bileşiklerin antioksidan ve antienflamatuvar etkinlikleri yapıları ile bağlantılı olarak birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bu bağlamda bu üç bitki dışında da birçok bitkinin fenolik bileşik açısından zengin olan ekstreleri üzerine yapılan çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır. Tezimizdeki çalışmalara benzer şekilde, bitki ekstrelerinin hem antioksidan hem de antienflamatuvar etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur.

Bidens engleri ve *Boerhavia erecta* bitkilerinin soxhlet ile elde edilen heksan, diklorometan, asetonitril, etil asetat, metanol ve butanol fraksiyonları için DPPH ile ABTS radikallerini giderme, FRAP kapasitesi ve COX-1 ile COX-2 inhibisyon etkinlik

çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda *Bidens engleri* için butanol fraksiyonu yüksek DPPH ve ABTS aktivitesi ve FRAP indirgeme kapasitesine sahipken *Boerhavia erecta* için asetonitril fraksiyonu daha yüksek antioksidan etkinlik ortaya koymuştur. Antienflamatuvar aktivite çalışmasında 100 µg/mL *Bidens engleri* diklorometan ekstre konsantrasyonu %64,72 oranla en yüksek COX-2 inhibisyonu sağlarken %42,52 ile en yüksek COX-1 inhibisyonu etil asetat fraksiyonunda, %1,46 ile de en düşük COX-1 inhibisyonu metanol fraksiyonunda görülmüştür. *Boerhavia erecta* fraksiyonları ise COX-1 inhibisyonu açısından aktif değilken en yüksek COX-2 inhibisyonu %36,05 ile diklorometan ekstresinde tespit edilmiştir (378).

Herniaria polygama J. Gay ve *Herniaria incana* Lam. bitkisinin toprakaltı ve toprak üstü kısımlarının LC-MS analizleri sonucunda *H. Polygama*'da 72 bileşik, *H. incana*'da 63 bileşik tespit edilmiştir. Tanımlanan bileşiklerin çoğu sinnamik ve benzoik asit türevleriyken *H. incana* bitkisinin fenolik fraksiyonunda flavonoitler da bulunmuştur. Çalışmada fenolik bileşik içeren fraksiyonların antioksidan ve antienflamatuvar etkinlikleri de ortaya konmuştur (379). *Rosa* türlerinin FRAP antioksidan kapasiteleri, g kuru ağırlık başına askorbik asit eşdeğeri olarak ifade edilerek su ekstrelerinde bu miktar 123,8 mmol ile 314,4 mmol arasında değişmektedir. Kuşburnu etanolik ekstraktlarının FRAP değerleri 228,2 mmol ila 464,8 mmol AA eşdeğeri/g DW arasında değişmektedir (380).

Sarı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Scorzonera hieraciifolia* Hayek köklerinden elde edilen fraksiyonlardaki 9 fenolik bileşik tanımlandıktan sonra kit kullanarak COX enzim inhibisyonları ölçülmüştür. En yüksek antioksidan aktiviteye sahip etil asetat fraksiyonu da dahil olmak üzere COX enzim inhibisyon değerleri standart olarak kullanılan indometazinden daha düşüktü. Örnekler arasında en yüksek COX-1 ve COX-2 inhibisyonu sırasıyla %70,20 ve %67,59 ile kloroform ekstresinde tespit edildi (381).

Rheum emodi Wall bitkisinin etanol ekstresinin fraksiyonlanması ile elde edilen 5 farklı çözücü fraksiyonunun DPPH ve ABTS radikallerini giderme aktiviteleri ölçülmüştür. DPPH IC_{50} değerleri 21,52 – 2448,79 µg/mL arasındayken ABTS IC_{50} değerleri ise 90,25 – 1718,05 µg/mL arasındaydı. Çalışmada askorbik asit standart olarak kullanılmıştır. DPPH giderme için *n*-butanol, etil asetat ve su fraksiyonları askorbik

asitten daha etkili sonuç vermiştir, ABTS giderme için ise standarda kıyasla etil asetat fraksiyonu en yüksek aktiviteye sahipti (382).

Laportea decumana (Roxb). Wedd yaprak etanol ekstresi ve diğer çözücüler ile fraksiyonları üzerine yapılan çalışmada etil asetat fraksiyonu, COX-2 inhibisyonu için 19,25 µg/mL IC_{50} değerine sahipti (Standart olarak kullanılan celexocib IC_{50} değeri 18,48 µg/mL). Antioksidan aktivite bakımından ise DPPH radikalini giderme aktivite testinde su fraksiyonu daha etkiliydi (383).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doğal ürünlerin çağlar boyu çeşitli alanlarda kullanımı insanlık tarihinin ayrılmaz bir parçasıdır. Bu kullanımlar arasında tıp ve eczacılık alanlarının bir olduğu dönemlerdeki uygulamalarından, günümüzde ayrı alanlar olduğu dönemlerdeki uygulamalarına kadar devam etmiştir ve güncelliğini korumaktadır. Günümüzde doğal olana dönüşün ciddi bir trende dönüşmesi ile geleneksel yöntemler sağlık alanında da rağbet görmektedir. Devletler ve kurumlar geleneksel tıbbi uygulamaların güvenliğini ve gerekli standartları belirlemek için gerekli çabayı ortaya koymayı hedeflemektedir. Bu çabaların sorumluluğunun bir kısmı akademik çalışmaların yürütücülerine de düşmektedir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmada halk arasında kullanımı yaygın olan ve etnofarmkolojik çalışmaların konusu olmayı bekleyen reçetelerin bilimsel ve rasyonel bir zeminde incelenmesi hedeflenmiştir; bu, *akılcı fitoterapinin* yapı taşıdır.

Tezin çalışma kapsamı dahilinde halk arasında yaygın bir şekilde kullanılan ve ülkemiz ekonomisi ve üretimi açısından önem taşıyan incir bitkisinin diğer aktif iki bitki olan defne ve çınar bitkileri ile incelemesi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda öncelikle modern yöntemler ile ekstreler elde edilip antioksidan aktiviteleri ölçülmüştür. Bu aktiviteler halk arasında yaygın bir şekilde kullanılan dekoksiyon yöntemiyle elde edilen ekstrelerin etkinliği ile kıyaslanmıştır ve özetle sonuçlar aşağıda verilmiştir:

- DPPH aktivitesi bakımından tüm bitkilerde etanol ekstreleri daha aktif.
- ABTS aktivitesi bakımından incir etanol ekstresi daha etkiliyken diğer iki bitkinin su ekstreleri daha yüksek aktiviteye sahipti.
- FRAP kapasitesi incir ve defne su ekstrelerinde daha yüksekti, çınar yaprakları için ise etanol ekstresi FRAP anlamında daha etkiliydi.
- CUPRAC kapasitesi incir ve çınar su ekstrelerinde daha yüksekti, defne yaprakları için ise etanol ekstresi FRAP anlamında daha etkiliydi.

Antioksidan analizler sonucunda defne yapraklarının diğer iki bitkiyer kıyasla genel anlamda hem su hem etanol ekstreleri bakımından daha aktif olduğu ortaya çıkmıştır. Ardından bu aktivitelerin anlamlılığını aydınlatmak için HPLC ile içerik analizleri gerçekleştirilmiştir. Fitokimyasal içerik sonuçlarına göre su ekstreleri, daha düşük miktarlarda da olsa, daha zengin bir içerik bileşimine sahipti. Çınar yaprakları

düşük miktarlarda çok sayıda bileşiğe sahipken, aktivitesi çok sayıda çalışmada ortaya konan kuersetin en yüksek miktarda incir yapraklarında bulunmaktaydı. Defne yapraklarının hem içerik miktarları daha fazlaydı hem de bu miktarlar çınar yapraklarının aksine daha yüksek miktardaydı. Bu da defne yapraklarının yüksek antioksidan aktivitesini açıklamaktadır.

Bu çalışmaların ötesinde halk arasında yaygın bir şekilde benimsenen bitki karıştırma yaklaşımı akılcı fitoterapi mantığına sadık kalarak incelenmiştir. Bu bağlamda rastgele ve tüm olası karışımların hazırlanması yerine, teknolojik imkanlardan faydalanılmıştır. Design Expert® programının Karışım Deney Tasarımı (KDT) özelliğine başvurularak istatistiksel bir model oluşturulmuştur. Modelin antioksidan çalışmalarımızın sonuçları ile uyumluluğu incelenip uygun bir model denklemi seçilmiştir. Sonucunda model denkleminin önerdiği ve en yüksek antioksidan etkinliği ortaya koyacak optimum karışım oranları elde edilmiştir. Bu elde edilen son optimum karışım gelecekte yapılacak çalışmalar için bir ön çalışma niteliğinde olup, validasyonu sonrasında etkili bir ürünün geliştirilmesinde önemli rol oynayabilir.

Son olarak çalışmamızda hem saf bitki ekstrelerinin hem de hazırlanan karışımların bir de COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe etme potansiyelleri ölçülmüştür. Genel anlamda tüm bitki karışımlarında yüksek inhibisyon gözlemlense de inhibisyon sınırlarını dışında kalan (%100 üzeri ve eksi sonuçları) sonuçlardan dolayı sağlıklı bir çıkarımın yapılması uygun görülmemiştir. Çalışmamızdaki bitkilerin antienflamatuvar çalışmalarının literatürde de kısıtlı bir şekilde yer almasıyla birlikte daha fazla ve daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen sonuçlar ışığında geleneksel bir bilgi birikimine dayanan fitoterapi alanının modern bilimsel yöntemlerle arasında bir köprü kurulması gerektiği anlaşılmıştır. Nitekim literatüre bakıldığında ve tıbbi bitki sayısı düşünüldüğünde, alanda standardizasyona ve kaliteye uygun çalışma yapılmasının ne kadar zor olduğu görülmektedir. Design Expert gibi programların kullanımı sadece karışımların oranlarını optimize etmek için değil, yüksek sayıda bitki arasından tarama yapmak ve ekstraksiyon gibi işlemlerin şartlarını optimize etmek için de kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., Diederich, M., Dinkova-Kostova, A. T., Efferth, T., El Bairi, K., Arkells, N., Fan, T. P., Fiebich, B. L., Freissmuth, M., Georgiev, M. I., Gibbons, S., Godfrey, K. M., Gruber, C. W., Heer, J., Huber, L. A., Ibanez, E., Kijjoa, A., Kiss, A. K., Lu, A., Macias, F. A., Miller, M. J. S., Mocan, A., Müller, R., Nicoletti, F., Perry, G., Pittalà, V., Rastrelli, L., Ristow, M., Russo, G. L., Silva, A. S., Schuster, D., Sheridan, H., Skalicka-Woźniak, K., Skaltsounis, L., Sobarzo-Sánchez, E., Bredt, D. S., Stuppner, H., Sureda, A., Tzvetkov, N. T., Vacca, R. A., Aggarwal, B. B., Battino, M., Giampieri, F., Wink, M., Wolfender, J. L., Xiao, J., Yeung, A. W. K., Lizard, G., Popp, M. A., Heinrich, M., Berindan-Neagoe, I., Stadler, M., Daglia, M., Verpoorte, R., and Supuran, C. T. (2021) Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. **20**, 200–216
2. Heinrich, M. (2013) Ethnopharmacology and Drug Discovery. *Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 10.1016/B978-0-12-409547-2.02773-6.
3. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2020) Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **83**, 770–803
4. Pirintsos, S., Panagiotopoulos, A., Bariotakis, M., Daskalakis, V., Lionis, C., Sourvinos, G., Karakasiliotis, I., Kampa, M., and Castanas, E. (2022) From Traditional Ethnopharmacology to Modern Natural Drug Discovery: A Methodology Discussion and Specific Examples. *Molecules*. **27**, 1–18
5. Lamottke, K., Ripoll, C., and Walczak, R. (2011) The roots of innovation. *EBR - European Biopharmaceutical Review*
6. National Geographic Society (2022) Biodiversity. *National Geographic Magazine*
7. Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1830**, 3670–3695
8. Petrovska, B. B. (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*. **6**, 1–5
9. Gu, S., and Pei, J. (2017) Innovating Chinese herbal medicine: From traditional health practice to scientific drug discovery. *Frontiers Pharmacology*. 10.3389/fphar.2017.00381
10. Qazi Majaz, A., and Molvi Khurshid, I. (2016) Herbal medicine: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. **8**, 1–5
11. Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1830**, 3670–3695
12. Moe, T., Al Obaidly, F. A., Al Khoder, R., and Schmid, D. (2014) Folk medicine and integrative healing in West Asia: Analysis of historical and modern practice and perceptions. *Avicenna*. **2014**, 1–13
13. Amer, H. M., and Mohammad, A. A. (2022) Medicinal plants and their validation challenges in traditional Egyptian medicine. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **12**, 23–33
14. Lindberg, D. C., and Shank, M. H. (eds.) (2013) *The Cambridge History of Science Volume 2: Medieval Science*, Cambridge University Press, 10.1176/pn.39.2.0031b
15. Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., and Stuppner, H. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*. **33**, 1582–1614
16. Serturner, F. W. (1817) Analyse de l'Opium. *Annales de Chimie et de Phisique*. **4**, 21–42
17. Kaiser, H. (2008) Von der pflanze zur chemie - Die frühgeschichte der "rheumamittel." *Z Rheumatology*. **67**, 252–262
18. Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., and Ovidi, E. (2018) Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*. **32**, 1926–1950
19. Ortholand, J. Y., and Ganesan, A. (2004) Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*. **8**, 271–280
20. David, B., Wolfender, J. L., and Dias, D. A. (2015) The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*. **14**, 299–315

21. Erkens, R. H. J. (2011) What every chemist should know about plant names. *Natural Prouct Reports*. **28**, 11–14
22. Bucar, F., Wube, A., and Schmid, M. (2013) Natural product isolation-how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*. **30**, 525–545
23. Lautié, E., Russo, O., Ducrot, P., and Boutin, J. A. (2020) Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes. *Frontiers in Pharmacology*. **11**, 1–37
24. Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H., and Warrington, B. (2012) Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature Reviews Drug Discovery*. **11**, 191–200
25. Gurnani, N., Mehta, D., Gupta, M., and Mehta, B. K. (2014) Natural Products: Source of Potential Drugs. *African Journal of Basic & Applied Sciences*. **6**, 171–186
26. Jütte, R., Heinrich, M., Helmstädter, A., Langhorst, J., Meng, G., Niebling, W., Pommerening, T., and Trampisch, H. J. (2017) Herbal medicinal products – Evidence and tradition from a historical perspective. *Journal of Ethnopharmacology*. **207**, 220–225
27. Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği Taslağı
28. Dişli, M., & Yeşilada, E. (2019). Türkiye 'de Bitkisel Tıbbi Ürünler (Türkiye'de Bitkisel Ürünlerin Standardizasyonu, Üretimi Ve Tağşiş). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*. **3**, 13-21.
29. Ramazan, I., and Yeşilada, E. (eds.) (2019) *Fitoterapi: Etkinlik, Güvenilirlik ve Mevzuat*, Akademisyen kitabevi.
30. Heinrich, M., Barnes, J., Prieto-Garcia, J., Gibbons, S., and Williamson, E. M. (2017) *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy E-Book*, Elsevier Health Sciences.
31. Tu, Y. (2016) Artemisinin—A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*. **55**, 10210–10226
32. Heinrich, M., and Jäger, A. K. (eds.) (2015) *Ethnopharmacology*, John Wiley & Sons
33. Yeung, A. W. K., Heinrich, M., and Atanasov, A. G. (2018) Ethnopharmacology-A bibliometric analysis of a field of research meandering between medicine and food science? *Frontiers in Pharmacoogyl*.
34. Efron, D. H., Holmstedt, B., and Kline, N. S. (1967) Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs. *(No Title)*
35. Bruhn, J. G., and Helmstedt, B. (1981) Ethnopharmacology: objectives, principles and perspectives. *Natural products as medicinal agents*
36. Harshberger, J. W. (1896) The Purposes of Ethno-Botany. *Botanical Gazette*. **21**, 146–154
37. Albuquerque, U. P., Ramos, M. A., Júnior, W. S. F., and Medeiros, P. M. de (2017) *Ethnobotany for Beginners*, 10.1038/295471b0
38. Schultes Von Reis Siri, R. Evans. (1995) *Ethnobotany : evolution of a discipline*, Dioscorides Press, Portland, Or.
39. Heinrich, M. (2017) Phytotherapy. *Encyclopedia Britannica*
40. Tanker, M., and Tanker, N. (1991) *Farmakognozi (cilt 1)*, Ankara Üniversitesi Basımevi
41. *Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği* (2014)
42. Ege, M. (2021) The Hidden Danger in Phytopharmaceuticals: adulteration. in *Phytopharmaceuticals: Potential Therapeutic Applications*, pp. 77–98, Wiley Online Library
43. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., and Williamson, E. (2018) Importance of plants in modern pharmacy and medicine. in *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, pp. 4–12
44. Djordjevic, S. M. (2017) From Medicinal Plant Raw Material to Herbal Remedies. in *Aromatic and Medicinal Plants: Back to Nature*, pp. 269–288
45. Anderson, M. J., and Whitcomb, P. J. (2007) *DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation*, Taylor & Francis Group, LLC
46. Cornell, J. A. (2002) *Experiments with mixtures*, John Wiley & Sons, 10.18805/bkap112
47. Cornell, J. A. (2011) *A Primer on Experiments with Mixtures*, John Wiley & Sons
48. Scheffé, H. (1963) The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society*. **25**, 235–263
49. Güzel, G. (2008) *Ürün Formülasyonu İçin Optimum Karışım Deney Tasarımları – Altı Sigma İçin Tasarım Yaklaşımı-*. Ph.D. thesis, Yıldız Teknik Üniversitesi
50. Meinhart, A. D., Ferreira da Silveira, T. F., Rosa de Moraes, M., Petrarca, M. H., Silva, L. H., Oliveira, W. S., Wagner, R., André Bolini, H. M., Bruns, R. E., Filho, J. T., and Godoy, H. T. (2017) Optimization of frying oil composition rich in essential fatty acids by mixture design. *Lwt.* **84**, 795–803
51. Brito, I. L., de Souza, E. L., Felex, S. S. S., Madruga, M. S., Yamashita, F., and Magnani, M. (2015) Nutritional and sensory characteristics of gluten-free quinoa (Chenopodium quinoa Willd)-based

cookies development using an experimental mixture design. *Journal of Food Science and Technology*. **52**, 5866–5873
52. Rao, S., Barot, T., Rajesh, K. S., and Jha, L. L. (2016) Formulation, optimization and evaluation of microemulsion based gel of Butenafine Hydrochloride for topical delivery by using simplex lattice mixture design. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. **46**, 1–12
53. Ozturk, I., Karaman, S., Baslar, M., Cam, M., Caliskan, O., Sagdic, O., and Yalcin, H. (2014) Aroma, Sugar and Anthocyanin Profile of Fruit and Seed of Mahlab (Prunus mahaleb L.): Optimization of Bioactive Compounds Extraction by Simplex Lattice Mixture Design. *Food Analytical Methods*. **7**, 761–773
54. Fadil, M., Lebrazi, S., Aboulghazi, A., Guaouguaou, F. E., Rais, C., Slimani, C., and Es-safi, N. E. (2022) Multi-response optimization of extraction yield, total phenols-flavonoids contents, and antioxidant activity of extracts from moroccan Lavandula stoechas leaves: Predictive modeling using simplex-centroid design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **43**, 102430
55. DiCiaula, M. C., Lopes, G. C., Scarminio, I. S., and De Mello, J. C. P. (2014) Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of schinus terebinthifolius by a statistical mixture-design technique and development of a uv-vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. *Química Nova*. **37**, 158–163
56. Baj, T., Baryluk, A., and Sieniawska, E. (2018) Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from Ocimum basilicum L., Origanum majorana L. and Rosmarinus officinalis L. *Industrial Crops and Products*. **115**, 52–61
57. Caesar, L. K., and Cech, N. B. (2019) Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*. **36**, 869–888
58. Rather, M. A., Bhat, B. A., and Qurishi, M. A. (2013) Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model breaking down? *Phytomedicine*. **21**, 1–14
59. Wagner, H. (2011) Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*. **82**, 34–37
60. Roell, K. R., Reif, D. M., and Motsinger-Reif, A. A. (2017) An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology*. **8**, 1–11
61. Chou, T. C. (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*. **58**, 621–681
62. Zhang, L., Fang, X., Sun, J., Su, E., Cao, F., and Zhao, L. (2023) Study on Synergistic Anti-Inflammatory Effect of Typical Functional Components of Extracts of Ginkgo Biloba Leaves. *Molecules*. 10.3390/molecules28031377
63. Greco, W. R. (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews*. **47**, 331–385
64. Gennings, C., Carter, W. H., Campbell, E. D., Staniswalis, J. G., Martin, T. J., Martin, B. R., and White, K. L. (1990) Isobolographic characterization of drug interactions incorporating biological variability. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **252**, 208–217
65. Tallarida, R. J., Porreca, F., and Cowan, A. (1989) Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. *Life Sciences*. **45**, 947–961
66. Tallarida, R. J. (2006) An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **319**, 1–7
67. Tallarida, R. J. (2002) The interaction index: A measure of drug synergism. *Pain*. **98**, 163–168
68. Carter, W. H. (1995) Relating isobolograms to response surfaces. *Toxicology*. **105**, 181–188
69. Carter, W. H., Gennings, C., Staniswalis, J. G., Campbell, E. D., and White, K. L. (1988) A Statistical Approach to the Construction and Analysis of Isobolograms. *International Journal of Toxicol*. **7**, 963–973
70. Bliss, C. I. (1939) the Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Annals of Applied Biology*. **26**, 585–615
71. Tang, J., Wennerberg, K., and Aittokallio, T. (2015) What is synergy? The Saariselkï¿½ agreement revisited. *Frontiers in Pharmacology*. **6**, 1–5
72. Pemovska, T., Bigenzahn, J. W., and Superti-Furga, G. (2018) Recent advances in combinatorial drug screening and synergy scoring. *Current Opinions in Pharmacology*. **42**, 102–110
73. Lu, X., Huang, Y., Zhang, B., and Li, S. (2007) Application of mixture designs for detection and characterization of multi-drug synergism. *2007 1st International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE*. 10.1109/ICBBE.2007.108
74. Rehman, M. U., Abdullah, Khan, F., and Niaz, K. (2020) Introduction to natural products analysis. *Recent Advances in Natural Products Analysis*. 10.1016/B978-0-12-816455-6.00001-9

75. Saito, K., and Matsuda, F. (2010) Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual Reviews of Plant Biology*. **61**, 463–489
76. Schwender, J. (2009) *Plant Metabolic Networks*, 10.1007/978-0-387-78745-9
77. Crozier, A., Clifford, M. N., and Ashihara, H. (2006) *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet Edited by*, Blackwell Publishing
78. Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. (eds.) (2015) *Bichemistry and Molecular Biology of Plants*, John Wiley & Sons
79. Bone, K., and Mills, S. (2013) *Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine*, Elsevier Health Sciences, 10.1016/b978-0-443-06992-5.00001-3
80. Techen, N., Pan, Z., Scheffler, B. E., and Khan, I. A. (2009) Detection of illicium anisatum as adulterant of Illicium verum. *Planta Medica*. **75**, 392–395
81. Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., and Zheng, B. (2019) Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*. **24**, 1–22
82. Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. **3**, 2–20
83. Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejeryte, E., and Wangchuk, P. (2022) Plant Secondary Metabolites Produced in Response to Abiotic Product Development. *Molecules*. **27**, 313
84. Dai, J., and Mumper, R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. 10.3390/molecules15107313
85. Napagoda, M., and Jayasinghe, L. (eds.) (2022) *Chemistry of Natural Products: Phytochemistry and Pharmacognosy of Medicinal Plants.*, Walter de Gruyter GmbH
86. Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., and Iseki, K. (2011) In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Inernational Journal of Pharmaceutics*. **403**, 136–138
87. Khan, F. A., Maalik, A., and Murtaza, G. (2016) Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. *Journal of Food and Drug Analysis*. **24**, 695–702
88. Yan, Y., Liu, N., Hou, N., Dong, L., and Li, J. (2017) Chlorogenic acid inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **46**, 68–73
89. Rezaei-Seresht, H., Cheshomi, H., Falanji, F., Movahedi-Motlagh, F., Hashemian, M., and Mireskandari, E. (2019) Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. **9**, 574–586
90. Xie, Z., Guo, Z., Wang, Y., Lei, J., and Yu, J. (2018) Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. *Phytotherapy Research*. **32**, 2256–2263
91. Altinoz, M. A., Elmaci, I., Cengiz, S., Emekli-Alturfan, E., and Ozpinar, A. (2018) From epidemiology to treatment: Aspirin's prevention of brain and breast-cancer and cardioprotection may associate with its metabolite gentisic acid. *Chemico-Biological Interactions*. **291**, 29–39
92. Zhan, Y., Li, R., Feng, C., Li, X., Huang, S., Wang, L., Liu, Z., Jiang, J., and Han, Y. (2020) Chlorogenic acid inhibits esophageal squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo by downregulating the expression of BMI1 and SOX2. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 10.1016/j.biopha.2019.109602
93. Tessema, F. B., Gonfa, Y. H., Asfaw, T. B., Tadesse, T. G., Tadesse, M. G., Bachheti, A., Prasad Pandey, D., Wabaidur, S. M., Dahlous, K. A., Širic, I., Kumar, P., Kumar, V., Abou Fayssal, S., and Bachheti, R. K. (2023) Flavonoids and Phenolic Acids from Aerial Part of Ajugaintegrifolia (Buch.-Ham. Ex D. Don): Anti-Shigellosis Activity and In Silico Molecular Docking Studies. *Molecules*. **28**(3), 1111.
94. Ajiboye, T. O., Skiebe, E., and Wilharm, G. (2018) Phenolic acids potentiate colistin-mediated killing of Acinetobacter baumannii by inducing redox imbalance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **101**, 737–744
95. Su, M., Liu, F., Luo, Z., Wu, H., Zhang, X., Wang, D., Zhu, Y., Sun, Z., Xu, W., and Miao, Y. (2019) The Antibacterial Activity and Mechanism of Chlorogenic Acid against Foodborne Pathogen Pseudomonas aeruginosa. *Foodborne Pathogens and Disease*. **16**, 823–830
96. Chen, Z., Yuan, Y., Yang, D., Luo, M., Liang, Q., Li, Z., Lu, S., Sun, J., Deng, M., Liu, M., Liang, Z., and Liu, K. (2022) Antiviral activities of Polygonum perfoliatum L. extract and related phenolic acid constituents against hepatitis B virus. *Journal of Medical Viroogyl*. **94**, 5987–5999
97. Weng, J. R., Lin, C. S., Lai, H. C., Lin, Y. P., Wang, C. Y., Tsai, Y. C., Wu, K. C., Huang, S. H., and Lin, C. W. (2019) Antiviral activity of Sambucus FormosanaNakai ethanol extract and related phenolic acid constituents against human coronavirus NL63. *Virus Research*. 10.1016/j.virusres.2019.197767

98. Guo, Y., Zhang, Q., Zuo, Z., Chu, J., Xiao, H., Javed, M. T., and He, C. (2018) Protocatechuic acid (PCA) induced a better antiviral effect by immune enhancement in SPF chickens. *Microbial Pathogenesis*. **114**, 233–238
99. Yu, X. D., Zhang, D., Xiao, C. L., Zhou, Y., Li, X., Wang, L., He, Z., Reilly, J., Xiao, Z. Y., and Shu, X. (2022) P-Coumaric Acid Reverses Depression-Like Behavior and Memory Deficit Via Inhibiting AGE-RAGE-Mediated Neuroinflammation. *Cells*. 10.3390/cells11101594
100. Zheng, X., Cheng, Y., Chen, Y., Yue, Y., Li, Y., Xia, S., Li, Y., Deng, H., Zhang, J., and Cao, Y. (2019) Ferulic acid improves depressive-like behavior in prenatally-stressed offspring rats via anti-inflammatory activity and HPA axis. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**, 1–17
101. Shin, H. S., Satsu, H., Bae, M. J., Zhao, Z., Ogiwara, H., Totsuka, M., and Shimizu, M. (2015) Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chemistry*. **168**, 167–175
102. Lan, H., Zhang, L.-Y., He, W., Li, W.-Y., Zeng, Z., Qian, B., Wang, C., and Song, J.-L. (2021) Sinapic Acid Alleviated Inflammation-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Lipopolysaccharide- (LPS-) Treated Caco-2 Cells. *Mediators of Inflammations*. 10.1155/2021/5514075
103. Vinayagam, R., Jayachandran, M., and Xu, B. (2016) Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review. *Phytotherapy Research*. **30**, 184–199
104. Sabahi, Z., Khoshnoud, M. J., Hosseini, S., Khoshraftar, F., and Rashedinia, M. (2021) Syringic Acid Attenuates Cardiomyopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* 10.1155/2021/5018092
105. Obafemi, T. O., Jaiyesimi, K. F., Olomola, A. A., Olasehinde, O. R., Olaoye, O. A., Adewumi, F. D., Afolabi, B. A., Adewale, O. B., Akintayo, C. O., and Ojo, O. A. (2021) Combined effect of metformin and gallic acid on inflammation, antioxidant status, endoplasmic reticulum (ER) stress and glucose metabolism in fructose-fed streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicology Reports*. **8**, 1419–1427
106. Luo, X., Du, C., Cheng, H., Chen, J. hua, and Lin, C. (2017) Study on the anticoagulant or procoagulant activities of type II phenolic acid derivatives. *Molecules*. **22**, 1–16
107. Monteiro, Á. B., Kelly de Souza Rodrigues, C., Petícia do Nascimento, E., Sales, V. dos S., de Araújo Delmondes, G., Nogueira da Costa, M. H., Pereira de Oliveira, V. A., Pereira de Morais, L., Boligon, A. A., Barbosa, R., Martins da Costa, J. G., Alencar de Menezes, I. R., Bezerra Felipe, C. F., and Kerntopf, M. R. (2020) Anxiolytic and antidepressant-like effects of Annona coriacea (Mart.) and caffeic acid in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 10.1016/j.fct.2019.111049
108. Dalmagro, A. P., Camargo, A., Severo Rodrigues, A. L., and Zeni, A. L. B. (2019) Involvement of PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway in the antidepressant-like and neuroprotective effects of Morus nigra and its major phenolic, syringic acid. *Chemico-Biological Interactions*. **314**, 108843
109. Wu, J., Chen, H., Li, H., Tang, Y., Yang, L., Cao, S., and Qin, D. (2016) Antidepressant potential of chlorogenic acid-enriched extract from Eucommia ulmoides Oliver bark with neuron protection and promotion of serotonin release through enhancing synapsin I expression. *Molecules*. **21**, 1–17
110. Sur, B., Kwon, S., Hahm, D.-H., and Lee, B. (2022) The Anxiolytic-Like Effects of Protocatechuic Acid in an Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder. *Journal of Medicinal Food*. **25**, 495–502
111. Dong, X., and Huang, R. (2022) Ferulic acid: An extraordinarily neuroprotective phenolic acid with anti-depressive properties. *Phytomedicine*. **105**, 154355
112. Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., and Aluko, R. E. (2022) Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*. **46**, 1–24
113. Mammadov, R. (2014) *Tohumlu bitkilerde sekonder metobolitler*, Nobel Akademik Yayıncılık
114. Panche, A. N., Diwan, A. D., and Chandra, S. R. (2016) Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Sciences*. 10.1017/jns.2016.41
115. Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., and Jin, B. (2022) Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*. **383**, 132531
116. D'Mello, P., Gadhwal, M. K., Joshi, U., and Shetgiri, P. (2011) Modeling of COX-2 inhibotory activity of flavonoids. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **3**, 33–40
117. Huyut, Z., Beydemir, Ş., and Gülçin, I. (2017) Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochem Res Int*. 10.1155/2017/7616791
118. Liu, B., Feng, X., Zhang, J., Wei, Y., and Zhao, X. (2019) Preventive effect of anji white tea flavonoids on alcohol-induced gastric injury through their antioxidant effects in kunming mice. *Biomolecules*. **9**, 1–13

119. Wang, S., Fang, Y., Yu, X., Guo, L., Zhang, X., and Xia, D. (2019) The flavonoid-rich fraction from rhizomes of Smilax glabra Roxb. ameliorates renal oxidative stress and inflammation in uric acid nephropathy rats through promoting uric acid excretion. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **111**, 162–168
120. Wen, L., Zhao, Y., Jiang, Y., Yu, L., Zeng, X., Yang, J., Tian, M., Liu, H., and Yang, B. (2017) Identification of a flavonoid C-glycoside as potent antioxidant. *Free Radic Biol Med*. **110**, 92–101
121. Xiang, J., Zhang, M., Apea-Bah, F. B., and Beta, T. (2019) Hydroxycinnamic acid amide (HCAA)derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of foxtail millet. *Food Chemistry*. **295**, 214–223
122. Zaidun, N. H., Thent, Z. C., and Latiff, A. A. (2018) Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sciences*. **208**, 111–122
123. Zeng, Y., Song, J., Zhang, M., Wang, H., Zhang, Y., and Suo, H. (2020) Comparison of in vitro and in vivo antioxidant activities of six flavonoids with similar structures. *Antioxidants*. **9**, 1–14
124. Cherrak, S. A., Mokhtari-Soulimane, N., Berroukeche, F., Bensenane, B., Cherbonnel, A., Merzouk, H., and Elhabiri, M. (2016) In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PLoS One*. **11**, 1–21
125. Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., and Khan, Z. K. (2019) Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants*. **8**, 1–28
126. He, W., Li, Y., Liu, M., Yu, H., Chen, Q., Chen, Y., Ruan, J., Ding, Z., Zhang, Y., and Wang, T. (2018) Citrus aurantium l. And its flavonoids regulate tnbs-induced inflammatory bowel disease through anti-inflammation and suppressing isolated jejunum contraction. *International Journal of Molecular Sciences*. 10.3390/ijms19103057
127. Zhang, J., Wu, Y., Zhao, X., Luo, F., Li, X., Zhu, H., Sun, C., and Chen, K. (2014) Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (Citrus reticulata cv. Suavissima) fruit against cancer cell proliferation and migration. *Journal of Functional Foods*. **10**, 511–519
128. Montané, X., Kowalczyk, O., Reig-Vano, B., Bajek, A., Roszkowski, K., Tomczyk, R., Pawliszak, W., Giamberini, M., Mocek-Płóciniak, A., and Tylkowski, B. (2020) Current perspectives of the applications of polyphenols and flavonoids in cancer therapy. *Molecules*. 10.3390/molecules25153342
129. Singh, S., Raza, W., Parveen, S., Meena, A., and Luqman, S. (2021) Flavonoid display ability to target microRNAs in cancer pathogenesis. *Biochemical Pharmacology*. **189**, 114409
130. Arif, H., Sohail, A., Farhan, M., Rehman, A. A., Ahmad, A., and Hadi, S. M. (2018) Flavonoids-induced redox cycling of copper ions leads to generation of reactive oxygen species: A potential role in cancer chemoprevention. *International Journal of Biological Macromolecules*. **106**, 569–578
131. Adinew, G. M., Taka, E., Mendonca, P., Messeha, S. S., and Soliman, K. F. A. (2021) The anticancer effects of flavonoids through miRNAs modulations in triple-negative breast cancer. *Nutrients*. 10.3390/nu13041212
132. Flanagan, E., Müller, M., Hornberger, M., and Vauzour, D. (2018) Impact of Flavonoids on Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Age-Related Cognitive Decline and Neurodegeneration. *Current Nutrition Reports*. **7**, 49–57
133. Devi, S., Kumar, V., Singh, S. K., Dubey, A. K., and Kim, J. J. (2021) Flavonoids: Potential candidates for the treatment of neurodegenerative disorders. *Biomedicines*. **9**, 1–22
134. Sánchez, M., Romero, M., Gómez-Guzmán, M., Tamargo, J., Pérez-Vizcaino, F., and Duarte, J. (2018) Cardiovascular Effects of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*. **26**, 6991–7034
135. Janibekov, A. A., Youssef, F. S., Ashour, M. L., and Mamadalieva, N. Z. (2018) New flavonoid glycosides from two Astragalus species (Fabaceae) and validation of their antihyperglycaemic activity using molecular modelling and in vitro studies. *Industrial Crops Production*. **118**, 142–148
136. Li, W., Li, Y., Sun, R., Zhou, S., Li, M., Feng, M., and Xie, Y. (2017) Dual character of flavonoids in attenuating and aggravating ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*. **14**, 1307–1314
137. Grassi, D., Desideri, G., Giosia, P. D., Feo, M. D., Fellini, E., Cheli, P., Ferri, L., and Ferri, C. (2013) Tea, flavonoids, and cardiovascular health: Endothelial protection. *American Journal of Clinical Nutrition*. **98**, 1660–1666
138. Sarian, M. N., Ahmed, Q. U., Mat So'Ad, S. Z., Alhassan, A. M., Murugesu, S., Perumal, V., Syed Mohamad, S. N. A., Khatib, A., and Latip, J. (2017) Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: A structure-activity relationship based study. *BioMed Research International*. 10.1155/2017/8386065

139. Gentile, D., Fornai, M., Pellegrini, C., Colucci, R., Blandizzi, C., and Antonioli, L. (2018) Dietary flavonoids as a potential intervention to improve redox balance in obesity and related co-morbidities: A review. *Nutrition Research Reviews*. **31**, 239–247
140. Halliwell, B. (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*. **18**, 125–126
141. Nimse, S. B., and Pal, D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. **5**, 27986–28006
142. Sharma, G. N., Gupta, G., and Sharma, P. (2018) A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. **28**, 139–154
143. Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., and Khan, F. H. (2020) Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*. **44**, 1–13
144. Mittler, R. (2017) ROS Are Good. *Trends in Plant Sciences*. **22**, 11–19
145. Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. **16**, 33–50
146. Poljsak, B., Šuput, D., and Milisav, I. (2013) Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 10.1155/2013/956792
147. Cadenas, E., and Davies, K. J. A. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Mediicne*. **29**, 222–230
148. Tu, B. P., and Weissman, J. S. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *Journal of Cell Biology*. **164**, 341–346
149. Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*. **4**, 89–96
150. Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Reviews.* **82**, 47–95
151. Birben, E., Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (1997) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Science (1979)*. **22**, 161–168
152. Southorn, P. A., and Powis, G. (1988) Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Mayo Clin Proc*. **63**, 381–389
153. Pisoschi, A. M., and Pop, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **97**, 55–74
154. Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., and Victor, M. V. (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*
155. Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*. 10.1016/0002-9343(91)90279-7
156. Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin Miral. *Mutatation Research*. **275**, 331–342
157. Basu, T. K., Temple, N. J., and Garg, M. L. (eds.) (1999) *Antioxidants in Human Health and Disease*, CABI Publishing, 10.1146/annurev.nu.16.070196.000341
158. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Reviews*. **87**, 315–424
159. Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., and Pagnussat, G. (2003) Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annual Review of Plant Biology*. **54**, 109–136
160. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology-cell physiology*. **271**, C1424–C1437
161. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C. X., and De Menezes, S. L. (2002) Nitrogen Dioxide and Carbonate Radical Anion: Two Emerging Radicals in Biology. *Free Radical Biology and Medicine*. **32**, 841–859
162. Giles, G. I., and Jacob, C. (2002) Reactive sulfur species: An emerging concept in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. **383**, 375–388
163. Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W., and Jacob, C. (2017) The reactive sulfur species concept: 15 years on. *Antioxidants*. **6**, 1–29
164. Ivanova, A., Gerasimova, E., and Gazizullina, E. (2020) Study of Antioxidant Properties of Agents from the Perspective of Their Action Mechanisms. *Molecules*. 10.3390/molecules25184251
165. Leopoldini, M., Russo, N., and Toscano, M. (2011) The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **125**, 288–306

166. Sobhani, M., Farzaei, M. H., Kiani, S., and Khodarahmi, R. (2021) Immunomodulatory; Anti-inflammatory/antioxidant Effects of Polyphenols: A Comparative Review on the Parental Compounds and Their Metabolites. *Food Reviews International*. **37**, 759–811
167. Prior, R. L., Wu, X., and Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. **53**, 4290–4302
168. Shahidi, F., and Zhong, Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. **18**, 757–781
169. Park, M. J., Ryu, D. H., Cho, J. Y., Ha, I. J., Moon, J. S., and Kang, Y. H. (2018) Comparison of the antioxidant properties and flavonols in various parts of Korean red onions by multivariate data analysis. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. **59**, 919–927
170. Elmastaş, M., Keçeci, M., Genç, N., Beyatlı, A., Mısırlı, D., and Telci, İ. (2021) Determination of Phenolic Acids by HPLC and Antioxidant Capacity of Some Cultivated Turkish Mentha Species. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*. **24**, 488–494
171. Elmastas, M., Celik, S. M., Genc, N., Aksit, H., Erenler, R., and Gulcin, İ. (2018) Antioxidant activity of an anatolian herbal tea—origanum minutiflorum: Isolation and characterization of its secondary metabolites. *International Journal of Food Properties*. **21**, 374–384
172. Celsus, A. C. (1876) *De medicina*, G. Masson
173. Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S., and Girardin, S. E. (2007) Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation. *Clinical and Experimental Immunology*. **147**, 227–235
174. Gopi, S., Amalraj, A., Kunnumakkara, A., and Thomas, S. (eds.) (2021) *Inflammation and Natural Products*, Andre Gerhard Wolff
175. Xu, W., and Larbi, A. (2018) Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde. *Experimental Gerontology*. **107**, 98–101
176. Ashley, N. T., Weil, Z. M., and Nelson, R. J. (2012) Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **43**, 385–406
177. Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H. M., Hotchkiss, R., Joosten, L. A. B., Kastner, D. L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K. H. G., Nowak, K. L., O'Neill, L. A., Pickkers, P., Van Der Poll, T., Ridker, P. M., Schalkwijk, J., Schwartz, D. A., Siegmund, B., Steer, C. J., Tilg, H., Van Der Meer, J. W. M., Van De Veerdonk, F. L., and Dinarello, C. A. (2017) A guiding map for inflammation. *Nature Immunology*. **18**, 826–831
178. Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. **454**, 428–435
179. Medzhitov, R. (2010) Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. **140**, 771–776
180. Ricciotti, E., and Fitzgerald, G. A. (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **31**, 986–1000
181. Serhan, C. N., Ward, P. A., and Gilroy, D. W. (eds.) (2010) *Fundamentals of Inflammation*, Cambridge University Press
182. Libby, P. (2007) Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*. 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x
183. Rainsford, K. D. (2007) Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcellular Biochemistry*. **42**, 3–27
184. Mukhopadhyay, N., Shukla, A., Makhal, P. N., and Kaki, V. R. (2023) Natural product-driven dual COX-LOX inhibitors: Overview of recent studies on the development of novel anti-inflammatory agents. *Heliyon*. **9**, e14569
185. Lin, G. D., and Li, R. W. (2018) *Natural Products Targeting Inflammation Processes and Multiple Mediators*, Elsevier, 10.1016/B978-0-08-102081-4.00010-1
186. Bertolini, A., Ottani, A., and Sandrini, M. (2005) Selective COX-2 Inhibitors and Dual Acting Anti-inflammatory Drugs: Critical Remarks. *Frontiers in Medicinal Chemistry - Online*. **1**, 85–95
187. Meshram, M. A., Bhise, U. O., Makhal, P. N., and Kaki, V. R. (2021) Synthetically-tailored and nature-derived dual COX-2/5-LOX inhibitors: Structural aspects and SAR. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **225**, 113804
188. Attiq, A., Jalil, J., Husain, K., and Ahmad, W. (2018) Raging the war against inflammation with natural products. *Frontiers in Pharmacology*. **9**, 1–27
189. Sinha, S., Doble, M., and Manju, S. L. (2019) 5-Lipoxygenase as a drug target: A review on trends in inhibitors structural design, SAR and mechanism based approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **27**, 3745–3759

190. Kim, S. R., Seong, K. J., Kim, W. J., and Jung, J. Y. (2022) Epigallocatechin Gallate Protects against Hypoxia-Induced Inflammation in Microglia via NF-κB Suppression and Nrf-2/HO-1 Activation. *International Journal of Molecular Sciences*. 10.3390/ijms23074004
191. Kim, S. R., Jung, Y. R., Kim, D. H., An, H. J., Kim, M. K., Kim, N. D., and Chung, H. Y. (2014) Caffeic acid regulates LPS-induced NF-κB activation through NIK/IKK and c-Src/ERK signaling pathways in endothelial cells. *Archives of Pharmacal Research*. **37**, 539–547
192. Liu, Q., Chen, Y., Shen, C., Xiao, Y., Wang, Y., Liu, Z., and Liu, X. (2017) Chicoric acid supplementation prevents systemic inflammation-induced memory impairment and amyloidogenesis via inhibition of NF-κB. *FASEB Journal*. **31**, 1494–1507
193. Wang, J., Liu, Y. T., Xiao, L., Zhu, L., Wang, Q., and Yan, T. (2014) Anti-Inflammatory Effects of Apigenin in Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory in Acute Lung Injury by Suppressing COX-2 and NF-kB Pathway. *Inflammation*. **37**, 2085–2090
194. He, P., Yan, S., Wen, X., Zhang, S., Liu, Z., Liu, X., and Xiao, C. (2019) Eriodictyol alleviates lipopolysaccharide-triggered oxidative stress and synaptic dysfunctions in BV-2 microglial cells and mouse brain. *Journal of Cellular Biochemistry*. **120**, 14756–14770
195. Sunil, M. A., Sunitha, V. S., Santhakumaran, P., Mohan, M. C., Jose, M. S., Radhakrishnan, E. K., and Mathew, J. (2021) Protective effect of (+)–catechin against lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells through downregulation of NF-κB and p38 MAPK. *Inflammopharmacology*. **29**, 1139–1155
196. Sun, K., Luo, J., Jing, X., Xiang, W., Guo, J., Yao, X., Liang, S., Guo, F., and Xu, T. (2021) Hyperoside ameliorates the progression of osteoarthritis: An in vitro and in vivo study. *Phytomedicine*. **80**, 153387
197. Xie, T., Yuan, J., Mei, L., Li, P., and Pan, R. (2022) Hyperoside ameliorates TNFαinduced inflammation, ECM degradation and ER stressmediated apoptosis via the SIRT1/NFκB and Nrf2/ARE signaling pathways in vitro. *Molecular Medicine Reports*. **26**, 1–10
198. Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., and Yin, Y. (2016) Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*. **8**, 1–14
199. Choi, S. J., Tai, B. H., Cuong, N. M., Kim, Y. H., and Jang, H. D. (2012) Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (Cratoxylum formosum). *Food Science and Biotechnology*. **21**, 587–595
200. Zhang, Q. W., Lin, L. G., and Ye, W. C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*. **13**, 1–26
201. Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., and Li, H. Bin (2017) Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 20–31
202. Nn, A. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal Aromatic Plants (Los Angel)*. **04**, 3–8
203. Alara, O. R., Abdurahman, N. H., and Ukaegbu, C. I. (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. **4**, 200–214
204. Sticher, O. (2008) Natural product isolation. *Nat Prod Rep*. **25**, 517–554
205. Seidel, V. (2012) Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Natural products isolation*
206. Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., and Suleria, H. A. R. (2022) Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*. **29**, 81112–81129
207. Kislev, M. E., Hartmann, A., and Bar-Yosef, O. (2006) Early Domesticated Fig in the Jordan Valley. *Science (1979)*. **312**, 1372–1374
208. Herre, E. A., Jandér, K. C., and Machado, C. A. (2008) Evolutionary Ecology of Figs and Their Associates: Recent Progress and Outstanding Puzzles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **39**, 439–458
209. GBIF (2020) Ficus. Erişim Tarihi (12.12.2020). Erişim Site Adı (https://www.gbif.org/occurrence/search?offset=140&q=ficus&country=TR)
210. Tuzlacı, E. (2016) *Türkiye Bitkileri Geleneksel İlaç Rehberi*, İstanbul Tıp Kitabevleri, Istanbul
211. FAO (2021) FAO Fig Statistics
212. Küden, A. B., Yeşiloğlu, T., and Küden, A. (2020) Meyve üretiminde mevcut durum ve gelecek. in *Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1*, pp. 577–584, Ankara
213. Uzundumlu, A. S., Oksuz, M. E., and Kurtoglu, S. (2018) Future of Fig Production in Turkey. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*. **15**, 138–146
214. El-Seedi, H. R., Khalifa, S. A. M., Yosri, N., Khatib, A., Chen, L., Saeed, A., Efferth, T., and Verpoorte, R. (2019) Plants mentioned in the Islamic Scriptures (Holy Qur'ân and Ahadith):

Traditional uses and medicinal importance in contemporary times. *Journal of Ethnopharmacology*. **243**, 112007
215. Malamas, M., and Marselos, M. (1992) The tradition of medicinal plants in Zagori, Epirus (northwestern Greece). *Journal of Ethnopharmacology*. **37**, 197–203
216. Guarrera, P. M. (2005) Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*. **76**, 1–25
217. Crisosto, H., Ferguson, L., Bremer, V., Stover, E., and Colelli, G. (2011) *Fig (Ficus carica L.)*, Woodhead Publishing Limited, 10.1016/b978-0-12-818162-1.00032-8
218. Ameri, A., Heydarirad, G., Jafari, J. M., Ghobadi, A., Rezaeizadeh, H., and Choopani, R. (2015) Medicinal plants contain mucilage used in traditional Persian medicine (TPM). *Pharmaceutical Biology*. **53**, 615–623
219. Ahmed, S., Hasan, M. M., and Mahmood, Z. A. (2016) Urolithiasis management and treatment: Exploring historical vistas of Greco-arabic contribution. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **5**, 167–178
220. Abbasi, A. M., Khan, M. A., and Zafar, M. (2013) Ethno-medicinal assessment of some selected wild edible fruits and vegetables of Lesser-Himalayas, Pakistan. *Pakisatn Journal of Botany*. **45**, 215–222
221. Barolo, M. I., Ruiz Mostacero, N., and López, S. N. (2014) Ficus carica L. (Moraceae): An ancient source of food and health. *Food Chemistry*. **164**, 119–127
222. Martínez, G. J. (2008) Farmacopea natural y tratamiento de afecciones de la piel en la medicina tradicional de los campesinos de las sierras de Córdoba. *Dominguezia*. **24**, 27–46
223. Badgujar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H., and Mahajan, R. T. (2014) Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Ficus carica: A review. *Pharmaceutical Biology*. **52**, 1487–1503
224. Idolo, M., Motti, R., and Mazzoleni, S. (2010) Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines). Journal of *Ethnopharmacoogyl*. **127**, 379–395
225. Ecevit Genç, G., and Özhatay, N. (2006) An ethnobotanical study in Çatalca (European part of Istanbul) II. *Turkish Journal Pharmaceutical Sciences*. **3**, 73–89
226. Ugulu, I., Baslar, S., Yorek, N., and Dogan, Y. (2009) The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*. **3**, 345–367
227. Ugulu, I. (2011) Traditional ethnobotanical knowledge about medicinal plants used for external therapies in Alasehir, Turkey. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. **1**, 101–106
228. Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., and Takaishi, Y. (1995) Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*. **46**, 133–152
229. Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., and Takeda, Y. (1997) Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in east Anatolia; Erzurum, Erzincan, Agri, Kars, Igdir provinces. *Economic Botany*. **51**, 195–211
230. Akaydin, G., Şimşek, I., Arituluk, Z. C., and Yeşilada, E. (2013) An ethnobotanical survey in selected towns of the mediterranean subregion (Turkey). *Turkish Journal of Biology*. **37**, 230–247
231. Bulut, G., and Tuzlaci, E. (2013) An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa - Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. **149**, 633–647
232. Polat, R., and Satil, F. (2012) An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balikesir - Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. **139**, 626–641
233. Tuzlacı, E., and Aymaz, P. E. (2001) Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia*. **72**, 323–343
234. Güzel, Y., Güzelşemme, M., and Miski, M. (2015) Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. **174**, 118–152
235. Zeller Figs. Erişim Tarihi (21.04.2020). Erişim Site Adı (https://zellerag.ch/en/phytotherapy/dictionary-of-medicinal-plants/figs/)
236. Atkinson, F. S., Villar, A., Mul, A., Zangara, A., Risco, E., Smidt, C. R., Hontecillas, R., Leber, A., and Bassaganya-riera, J. (2019) Abscisic Acid Standardized Fig (Ficus carica) Extracts Ameliorate Postprandial Glycemic and Insulinemic Responses in Healthy Adults
237. Zangara, A. (2018) Effect of a Novel Ficus Carica (Fig) Fruit Extract Standardized in Abscisic Acid on the Glycemic and Insulinemic Responses in Healthy Human Subjects

238. Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H. E., Altman, A., Kerem, Z., and Flaishman, M. A. (2006) Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (Ficus carica L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 7717–7723
239. Arvaniti, O. S., Samaras, Y., Gatidou, G., Thomaidis, N. S., and Stasinakis, A. S. (2019) Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. *Food Research International*. **119**, 244–267
240. Mawa, S., Husain, K., and Jantan, I. (2013) Ficus carica L. (Moraceae): Phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 10.1155/2013/974256
241. Lansky, E. P., and Paavilainen, H. M. (2010) *Figs: the genus Ficus*, CRC Press
242. Oliveira, A. P., Silva, L. R., Andrade, P. B., Valentão, P., Silva, B. M., Gonçalves, R. F., Pereira, J. A., and Pinho, P. G. De (2010) Further Insight into the Latex Metabolite Profile of Ficus carica. *Journal of Agriculturs l and Food Chemistry*. **58**, 10855–10863
243. De Amorin, A., Borba, H. R., Carauta, J. P. P., Lopes, D., and Kaplan, M. A. C. (1999) Anthelmintic activity of the latex of Ficus species. *Journal of Ethnopharmacology*. **64**, 255–258
244. Mavlonov, G. T., Ubaidullaeva, K. A., Rakhmanov, M. I., Abdurakhmonov, I. Y., and Abdukarimov, A. (2008) Chitin-binding antifungal protein from Ficus carica latex. *Chemistry of Natural Compounds*. **44**, 216–219
245. Lansky, E. P., Paavilainen, H. M., Pawlus, A. D., and Newman, R. A. (2008) Ficus spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*. **119**, 195–213
246. Rubnov, S., Kashman, Y., Rabinowitz, R., Schlesinger, M., and Mechoulam, R. (2001) Suppressors of cancer cell proliferation from fig (Ficus carica) resin: Isolation and structure elucidation. *Journal of Natural Products*. **64**, 993–996
247. Wang, J., Wang, X., Jiang, S., Lin, P., Zhang, J., Lu, Y., Wang, Q., Xiong, Z., Wu, Y., Ren, J., and Yang, H. (2008) Cytotoxicity of fig fruit latex against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. **46**, 1025–1033
248. Pèrez, C., Canal, J. R., and Torres, M. D. (2003) Experimental diabetes treated with ficus carica extract: Effect on oxidative stress parameters. *Acta Diabetol*. **40**, 3–8
249. Batool, S., Khera, R. A., Hanif, M. A., and Ayub, M. A. (2019) Bay Leaf. *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery*. 10.1016/B978-0-08-102659-5.00005-7
250. Anzano, A., de Falco, B., Grauso, L., Motti, R., and Lanzotti, V. (2022) *Laurel, Laurus nobilis L.: a review of its botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology*, Springer Netherlands, 10.1007/s11101-021-09791-z
251. Yılmaz, B., and Deniz, İ. (2017) The Effects of Cultivation Area and Altitude Variation on the Composition of Essential Oil of Laurus nobilis l. Grown in Eastern, Western and Central Karadeniz Region. *International Journal of Secondary Metabolite*. **4**, 187–195
252. Yılmaz, A., and Çiftçi, V. (2021) Türkiye'de Defne (Laurus nobilis L.) Bitkisinin Durumu. *European Journal of Science and Technology*. 10.31590/ejosat.856195
253. Yücel, E., Önen, F., and Yücel, D. (2019) Investigation of Medicinal Plant Production and Trade Potential in Turkey. **2**, 199–203
254. Baytop, T. (1984) *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (geçmişte ve bugün).*
255. Motti, R., Antignani, V., and Idolo, M. (2009) Traditional plant use in the Phlegraean Fields Regional Park (Campania, Southern Italy). *Human Ecology*. **37**, 775–782
256. Passalacqua, N. G., Guarrera, P. M., and De Fine, G. (2007) Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*. **78**, 52–68
257. Guarrera, P. M., Salerno, G., and Caneva, G. (2005) Folk phytotherapeutical plants from Maratea area (Basilicata, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*. **99**, 367–378
258. Blanco, E., Macía, M. J., and Morales, R. (1999) Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia, northwest Spain). *Journal of Ethnopharmacology*. **65**, 113–124
259. Carrió, E., and Vallès, J. (2012) Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *Journal of Ethnopharmacology*. **141**, 1021–1040
260. Hanlidou, E., Karousou, R., Kleftoyanni, V., and Kokkini, S. (2004) The herbal market of Thessaloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. *Journal of Ethnopharmacology*. **91**, 281–299
261. Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., and Molero Mesa, J. (2000) Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). *Fitoterapia*. **71**, 278–307

262. Hilgert, N. I. (2001) Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. **76**, 11–34
263. Torres-León, C., Rebolledo Ramírez, F., Aguirre-Joya, J. A., Ramírez-Moreno, A., Chávez-González, M. L., Aguillón-Gutierrez, D. R., Camacho-Guerra, L., Ramírez-Guzmán, N., Hernández Vélez, S., and Aguilar, C. N. (2023) Medicinal plants used by rural communities in the arid zone of Viesca and Parras Coahuila in northeast Mexico. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **31**, 21–28
264. Gürdal, B., and Kültür, Ş. (2013) An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. **146**, 113–126
265. Polat, R., Cakilcioglu, U., Kaltalioɬlu, K., Ulusan, M. D., and Türkmen, Z. (2015) An ethnobotanical study on medicinal plants in Espiye and its surrounding (Giresun-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. **163**, 1–11
266. Karaköse, M. (2022) An ethnobotanical study of medicinal plants in Güce district, north-eastern Turkey. *Plant Diversity*. **44**, 577–597
267. Wong, C. P., Kobayashi, Y., and Yang, J. (2023) Safety studies of LAURESH® a standardized *Laurus nobilis* leaf extract. *Fundamental Toxicological Sciences*. **10**, 143–156
268. Demirezer, L., Ersöz, T., Saraçoğlu, İ., Şener, B., Köroğlu, A., and Yalçın, F. (2017) *FFD Monografları-Bitkiler ve Etkileri*, Nobel Yayın Dağıtım
269. Özcan, M., and Chaichat, J. C. (2005) Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of Laurel (Laurus nobilis L.) leaves growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food*. **8**, 408–411
270. Saraiva, C. R. N., de Fatima Alves Nonato, C., Camilo, C. J., de Araújo, A. C. J., Rodrigues, F. F. G., Coutinho, H. D. M., and da Costa, J. G. M. (2021) Chemical profile and inhibition of MDR bacteria by the essential oil of Laurus nobilis L. and its major compound 1,8-cineol. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 10.1016/j.bcab.2021.102148
271. Nabila, B., Piras, A., Fouzia, B., Falconieri, D., Kheira, G., Fedoul, F. F., and Majda, S. R. (2022) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Laurus nobilis leaves. *Nat Prod Res*. **36**, 989–993
272. Yakoubi, R., Megateli, S., Hadj Sadok, T., Bensouici, C., and Bağci, E. (2021) A synergistic interactions of Algerian essential oils of Laurus nobilis L., Lavandula stoechas L. and Mentha pulegium L. on anticholinesterase and antioxidant activities. *Biocatal Agric Biotechnol*. 10.1016/j.bcab.2020.101891
273. Stefanova, G., Girova, T., Gochev, V., Stoyanova, M., Petkova, Z., Stoyanova, A., and Zheljazkov, V. D. (2020) Comparative study on the chemical composition of laurel (Laurus nobilis L.) leaves from Greece and Georgia and the antibacterial activity of their essential oil. *Heliyon*. **6**, 4–9
274. Chahal, K., Kaur, M., Bhardwaj, U., Singla, N., and Kaur, A. (2017) A review on chemistry and biological activities of Laurus nobilis L. essential oil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*. **6**, 1153–1161
275. Paparella, A., Nawade, B., Shaltiel-Harpaz, L., and Ibdah, M. (2022) A Review of the Botany, Volatile Composition, Biochemical and Molecular Aspects, and Traditional Uses of Laurus nobilis. *Plants*. **11**, 1–24
276. Mercier, B., Prost, J., and Prost, M. (2009) The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α-and β-pinenes): a review. *Int J Occup Med Environ Health*. **22**, 331–342
277. Nenadis, N., Papapostolou, M., and Tsimidou, M. Z. (2021) Suggestions on the contribution of methyl eugenol and eugenol to bay laurel (Laurus nobilis l.) essential oil preservative activity through radical scavenging. *Molecules*. 10.3390/molecules26082342
278. Olmedo, R. H., Asensio, C. M., and Grosso, N. R. (2015) Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. *Ind Crops Prod*. **69**, 21–28
279. Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Custódio, L., Vitalini, S., Iriti, M., and Hassani, L. (2020) A comparative study of the in vitro antimicrobial and synergistic effect of essential oils from laurus nobilis l. And prunus armeniaca l. from Morocco with antimicrobial drugs: New approach for health promoting products. *Antibiotics*. 10.3390/antibiotics9040140
280. Basak, S. S., and Candan, F. (2013) Effect of Laurus nobilis L. essential oil and its main components on α-glucosidase and reactive oxygen species scavenging activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **12**, 367–379
281. Yilmaz, E. S., Timur, M., and Aslim, B. (2013) Antimicrobial, Antioxidant Activity of the Essential Oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. **16**, 108–116

282. Tomar, O., Akarca, G., Gök, V., and Ramadan, M. F. (2020) Composition and Antibacterial Effects of Laurel (Laurus nobilis L.) Leaves Essential Oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. **23**, 414–421
283. Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. F. R. (2014) Nutritional and antioxidant contributions of Laurus nobilis L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food Chem*. **156**, 339–346
284. Kaytanlıoğlu, E. H. T., Fakir, H., and Dönmez, İ. E. (2022) Doğu çınarı (Platanus orientalis L.) yapraklarının uçucu bileşenleri. *Türkiye Ormancılık Dergisi*. **23**, 141–145
285. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., and Mousavi, S. (2011) Antinociceptive study of extracts of Platanus orientalis leaves in mice. *Res Pharm Sci*. **6**, 123–128
286. Haider, S., Nazreen, S., Alam, M. M., Hamid, H., and Alam, M. S. (2012) Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of Platanus orientalis Linn. and its ulcerogenic risk evaluation. *J Ethnopharmacol*. **143**, 236–240
287. Haq, F., Ahmad, H., and Alam, M. (2011) Traditional uses of medicinal plants of Nandiar Khuwarr catchment (District Battagram), Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**, 39–48
288. Murad, W., Ahmad, A., Gilani, S. A., and Khan, M. A. (2011) Indigenous knowledge and folk use of medicinal plants by the tribal communities of Hazar Nao forest, Malakand district, North Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**, 1072–1086
289. Amiri, M. S., and Joharchi, M. R. (2013) Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. *Avicenna J Phytomed*. **3**, 254–71
290. Asadbeigi, M., Mohammadi, T., Rafieian-Kopaei, M., Saki, K., Bahmani, M., and Delfan, M. (2014) Traditional effects of medicinal plants in the treatment of respiratory diseases and disorders: An ethnobotanical study in the Urmia. *Asian Pac J Trop Med*. **7**, S364–S368
291. Menale, B., and Muoio, R. (2014) Use of medicinal plants in the South-Eastern area of the Partenio Regional Park (Campania, Southern Italy). *J Ethnopharmacol*. **153**, 297–307
292. Tetik, F., Civelek, S., and Cakilcioglu, U. (2013) Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). *J Ethnopharmacol*. **146**, 331–346
293. Paksoy, M. Y., Selvi, S., and Savran, A. (2016) Ethnopharmacological survey of medicinal plants in UlukIşla (Niğde-Turkey). *J Herb Med*. **6**, 42–48
294. Khan, I., Sangwan, P. L., Dar, A. A., Rafiq, R. A., Farrukh, M. R., Dhar, J. K., Tasduq, S. A., and Koul, S. (2013) A validated high-performance thin-layer chromatography method for the identification and simultaneous quantification of six markers from Platanus orientalis and their cytotoxic profiles against skin cancer cell lines. *J Sep Sci*. **36**, 2602–2610
295. Ucar, E., Eruygur, N., Atas, M., Ergul, M., Ergul, M., and Sozmen, F. (2018) Determination of inhibitory activities of enzymes, related to Alzheimer's disease and diabetes mellitus of plane tree (Platanus orientalis L.) extracts and their antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. *Cell Mol Biol*. **64**, 13–19
296. Blois, M. S. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. **181**, 1199–1200
297. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. **84**, 407–412
298. Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*. 10.1006/abio.1996.0292
299. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., and Erçğ, E. (2006) The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr*. 10.1080/09637480600798132
300. Ranneh, Y., Abu Bakar, M. F., Ismail, N. A., Kormin, F., Mohamed, M., Md Akim, A., and Isha, A. (2021) Anti-aging and antioxidant of four traditional malaysian plants using simplex centroid mixture design approach. *Saudi J Biol Sci*. **28**, 6711–6720
301. Rahim, N. F. A., Muhammad, N., Abdullah, N., Talip, B. A., and Poh, K. H. (2020) The interaction effect and optimal formulation of selected polyherbal extracts towards antioxidant activity. *Food Res*. **4**, 2042–2048
302. Vera Candioti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S., and Goicoechea, H. C. (2014) Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. **124**, 123–138
303. Hugo, P. C., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R. R., Namiesnik, J., Gorinstein, S., and González-Aguilar, G. A. (2012) Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in

"Ataulfo" mango pulp: Chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules*. **17**, 12657–12664

304. Copeland, R. A., Williams, J. M., Giannaras, J., Nurnberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S., and Trzaskos, J. M. (1994) Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 11202–11206
305. Sonda Ammar, Contreras, M. del M., Belguith-Hadrich, O., Bouaziz, M., and Segura-Carretero, A. (2015) New insights into the qualitative phenolic profile of Ficus carica L. fruits and leaves from Tunisia using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and their antioxidant activity. *RSC Adv*. **5**, 20035–20050
306. Mustafa, K., Yu, S., Zhang, W., Mohamed, H., Naz, T., Xiao, H., Liu, Y., Nazir, Y., Fazili, A. B. A., Nosheen, S., Bai, X., and Song, Y. (2021) Screening, characterization, and in vitro-ROS dependent cytotoxic potential of extract from Ficus carica against hepatocellular (HepG2) carcinoma cells. *South African Journal of Botany*. **138**, 217–226
307. Agatonovic-Kustrin, S., Wong, S., Dolzhenko, A. V., Gegechkori, V., Ku, H., Tucci, J., and Morton, D. W. (2023) Evaluation of bioactive compounds from Ficus carica L. leaf extracts via high-performance thin-layer chromatography combined with effect-directed analysis. *J Chromatogr A*. **1706**, 464241
308. Joerin, L., Kauschka, M., Bonnländer, B., Pischel, I., Benedek, B., and Butterweck, V. (2014) Ficus carica leaf extract modulates the lipid profile of rats fed with a high-fat diet through an increase of HDL-C. *Phytotherapy Research*. **28**, 261–267
309. Farsi, E., Ahmad, M., Hor, S. Y., Ahamed, M. B. K., Yam, M. F., and Asmawi, M. Z. (2014) Standardized extract of Ficus deltoidea stimulates insulin secretion and blocks hepatic glucose production by regulating the expression of glucose-metabolic genes in streptozitocin-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*. **14**, 1–13
310. Adam, Z., Khamis, S., Ismail, A., and Hamid, M. (2012) Ficus deltoidea : A Potential Alternative Medicine for Diabetes Mellitus. 10.1155/2012/632763
311. Norra, I. (2011) Free radical scavenging activity and phenolic content of Ficus deltoidea accessions MFD4 and MFD6 leaves. **39**, 1–8
312. Sumengen Ozdenefe, M., Tanoglu, F., Suer, K., Guler, E., and Mercimek Takci, H. A. (2020) Antioxidant and antimicrobial activity of ficus sycomorus fruit and leaf extracts. *Marmara Medical Journal*. **33**, 133–140
313. Bwalya, A. G. (2014) *Evaluation Of The In Vitro Bioloıcal Activities And Phytochemical Profiling Of Eight Ficus Species Collected In Zambia*. Ph.D. thesis, University College London
314. Bafor, E. E. (2014) *Isolation, Identification and Pharmacological Evaluation of the Uterine Actives of Ficus exasperata Vahl (Moraceae) and the Development and Application of Metabolomic Techniques in Drug Discovery*. Ph.D. thesis, University of Strathclyde
315. Flayyh, A. H. Z. A., Nencu, I., Costea, T., Gîrd, C. E., Stoicescu, C. S., Anghel, A. I., Ancuceanu, R. V., Dinu, M., Ionică, F. E., Şeremet, O. C., and Negreş, S. (2019) Chemical composition and antioxidant activity of Ficus elastica roxb. Ex hornem and Raphanus sativus l. selective dry extracts with potential antidiabetic activity. *Farmacia*. **67**, 764–771
316. Dobroslavić, E., Repajić, M., Dragović-Uzelac, V., and Garofulić, I. E. (2022) Isolation of Laurus nobilis Leaf Polyphenols: A Review on Current Techniques and Future Perspectives. *Foods*. 10.3390/foods11020235
317. Elmastaş, M., Gülçin, I., Işıldak, Ö., Küfrevioğlu, Ö. İ., İbaoğlu, K., and Aboul-Enein, H. Y. (2006) Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts. *Journal of the Iran Chemical Society*. **3**, 258–266
318. Kivçak, B., and Mert, T. (2002) Preliminary evaluation of cytotoxic properties of Laurus nobilis leaf extracts. *Fitoterapia*. **73**, 242–243
319. Fernández, N. J., Damiani, N., Podaza, E. A., Martucci, J. F., Fasce, D., Quiroz, F., Meretta, P. E., Quintana, S., Eguaras, M. J., and Gende, L. B. (2019) Laurus nobilis L. Extracts against Paenibacillus larvae: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi J Biol Sci*. **26**, 906–912
320. Turk, A., Ahn, J. H., Jo, Y. H., Song, J. Y., Khalife, H. K., Gali-Muhtasib, H., Kim, Y., Hwang, B. Y., and Lee, M. K. (2019) NF-κB inhibitory sesquiterpene lactones from Lebanese Laurus nobilis. *Phytochem Lett*. **30**, 120–123
321. Muñiz-Márquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N. (2018) Bioactive compounds from bay leaves (Laurus nobilis) extracted by microwave technology. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. **73**, 401–407

322. Ayaz Adakul, B., Şen, A., Şener, T. E., Erdoğan, Ö., Çevik, Ö., Eker, P., Çetinel, Ş., Bölükbaşi, F., Şenkardeş, İ., Ertaş, B., and Şener, G. (2022) Platanus orientalis (Plane Tree) Extract Protects Against Hyperoxaluria Induced Kidney Damage. *Journal of Research in Pharmacy*. **26**, 311–324
323. Nouioura, G., Tourabi, M., Ghouizi, A. El, Kara, M., Assouguem, A., Saleh, A., Kamaly, O. Al, Ouadrhiri, F. El, Lyoussi, B., and Derwich, E. H. (2023) Optimization of a New Antioxidant Formulation Using a Simplex Lattice Mixture Design of Apium graveolens L .,. *Plants Journal*. **12**, 1–15
324. Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., and Boras, M. (2007) The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chem*. **102**, 966–975
325. Teixeira, D. M., Patão, R. F., Coelho, A. V., and Da Costa, C. T. (2006) Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from Ficus carica leaves. *J Chromatogr A*. **1103**, 22–28
326. Vaya, J., and Mahmood, S. (2006) Vaya - 2006 - Flavonoid content in leaf extracts of the fig (Ficus carica L.),carob(Ceratonia siliqua L.) andpistachio(Pistacia lentiscus L.).pdf. **28**, 169–175
327. AlShaal, S., Daghestani, M., and Karabet, F. (2020) Determination of Contents of Rutin and Quercetin Isolated from Syrian Ficus carica L. Leaf Extracts. **7**, 197–206
328. Petruccelli, R., Ieri, F., Ciaccheri, L., and Bonetti, A. (2018) Polyphenolic profiling and chemometric analysis of leaves from Italian Ficus carica L. Varieties. Polyphenol compounds in common fig. *Eur J Hortic Sci*. **83**, 94–103
329. Konyalioğlu, S., Sağlam, H., and Kivçak, B. (2005) α-tocopherol, flavonoid, and phenol contents and antioxidant activity of Ficus carica leaves. *Pharm Biol*. **43**, 683–686
330. Oliveira, A. P., Valentão, P., Pereira, J. A., Silva, B. M., Tavares, F., and Andrade, P. B. (2009) Ficus carica L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*. **47**, 2841–2846
331. Turkoglu, M., Pekmezci, E., Kilic, S., Dundar, C., and Sevinc, H. (2017) Effect of Ficus carica leaf extract on the gene expression of selected factors in HaCaT cells. *J Cosmet Dermatol*. **16**, e54–e58
332. Oudjedi, K., Manso, S., Nerin, C., Hassissen, N., and Zaidi, F. (2019) New active antioxidant multilayer food packaging films containing Algerian Sage and Bay leaves extracts and their application for oxidative stability of fried potatoes. *Food Control*. **98**, 216–226
333. Brahmi, N., Scognamiglio, M., Pacifico, S., Mekhoukhe, A., Madani, K., Fiorentino, A., and Monaco, P. (2015) 1H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties. *Food Research International*. **76**, 334–341
334. Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Rinaldi Alvarenga, J. F., Leal, L. N., and Lamuela-Raventos, R. M. (2014) A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem*. **154**, 299–307
335. Dobroslavić, E., Garofulić, I. E., Zorić, Z., Pedisić, S., and Dragović-Uzelac, V. (2021) Polyphenolic characterization and antioxidant capacity of laurus nobilis l. Leaf extracts obtained by green and conventional extraction techniques. *Processes*. 10.3390/pr9101840
336. Kaurinovic, B., Popovic, M., and Vlaisavljevic, S. (2010) In vitro and in vivo effects of Laurus nobilis L. leaf extracts. *Molecules*. **15**, 3378–3390
337. El-Alfy, T. S., El-Gohary, H. M. A., Sokkar, N. M., Sleem, A. A., and Al-Mahdy, D. A. (2008) Phenolic Constituents of Platanus orientalis L. Leaves. *Nat Prod Commun*. **3**, 199–203
338. Sun, Y., Yang, C., and Tsao, R. (2018) Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays. in *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications* (Apak, R., Capanoglu, E., and Shahidi, F. eds), pp. 1–19, Wiley Online Library
339. Hogg, J. S., Lohmann, D. H., and Russell, K. E. (1961) the Kinetics of Reaction of 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl with Phenols. *Can J Chem*. **39**, 1588–1594
340. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. **28**, 25–30
341. Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., and Hernández-Carlos, B. (2019) *Antioxidant Compounds and their Antioxidant Mechanism*, London
342. Apak, R., Capanoglu, E., and Shahidi, F. (eds.) (2018) *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*, John Wiley & Sons
343. Weli, A. M., Al-Blushi, A. A. M., and Hossain, M. A. (2015) Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of different leaves crude extracts of Omani Ficus carica against food borne pathogenic bacteria. *Asian Pac J Trop Dis*. **5**, 13–16

344. Eteraf-Oskouei, T., Allahyari, S., Akbarzadeh-Atashkhosrow, A., Delazar, A., Pashaii, M., Gan, S. H., and Najafi, M. (2015) Methanolic extract of Ficus carica Linn. leaves exerts antiangiogenesis effects based on the rat air pouch model of inflammation. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 10.1155/2015/760405
345. Bahrin, N., Muhammad, N., Abdullah, N., A Talip, B. H., Jusoh, S., and Theng, S. W. (2018) Effect of Processing Temperature on Antioxidant Activity of Ficus carica Leaves Extract. *Journal of Science and Technology*. **10**, 99–103
346. Boukhalfa, F., Kadri, N., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Serteyn, D., and Madani, K. (2019) Antioxidant capacity and anti-inflammatory potential of two extracts of Ficus carica leaves dried in the shade and in the oven. *Med J Nutrition Metab*. **12**, 365–376
347. Ergül, M., Ergül, M., Eruygur, N., Ataş, M., and Uçar, E. (2019) In vitro evaluation of the chemical composition and various biological activities of ficus carica leaf extracts. *Turk J Pharm Sci*. **16**, 401–409
348. Kıvrak, Ş., Göktürk, T., and Kıvrak, İ. (2017) Assessment of Volatile Oil Composition, Phenolics and Antioxidant Activity of Bay (Laurus nobilis) Leaf and Usage in Cosmetic Applications. *International Journal of Secondary Metabolite*. **4**, 148–148
349. Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N. (2013) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Laurus nobilis L. and their antioxidant activity. *Ultrason Sonochem*. **20**, 1149–1154
350. Emam, A. M., Mohamed, M. A., Diab, Y. M., and Megally, N. Y. (2010) Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of Laurus nobilis and Emex spinosus. *Drug Discov Ther*. **4**, 202–207
351. Ying, L., Ying, D., Liu-juan, Z., and Xian-jin, L. (2015) Antioxidant Activities of Nine Selected Culinary Spices from China. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*. **22**, 50–57
352. Selamoglu, Z., Dusgun, C., Akgul, H., and Gulhan, M. F. (2017) In-vitro antioxidant activities of the ethanolic extracts of some contained-allantoin plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **16**, 92–98
353. Benzie, I. F. F. (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem*. **29**, 111–116
354. Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "'Antioxidant Power"': The FRAP Assay. *Anal Biochem*
355. Benzie, I. F. F., and Devaki, M. (2018) The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. in *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (Apak, R., Capanoglu, E., and Shahidi, F. eds), pp. 77–106, John Wiley & Sons, 10.1002/9781119135388.ch5
356. Elshaafi, I. M., Musa, K. H., and Abdullah Sani, N. (2020) Effect of oven and freeze drying on antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of fig (Ficus carica L.) leaves. *Food Res*. **4**, 2114–2121
357. Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., and Karademir, S. E. (2004) 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*. **52**, 7970–81
358. Apak, R. (2018) Electron transfer-based antioxidant capacity assays and the cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay. in *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (Apak, R., Capanoglu, E., and Shahidi, F. eds), pp. 57–75, John Wiley & Sons, 10.1002/9781119135388.ch4
359. Pașca, C., Matei, I. A., Diaconeasa, Z., Rotaru, A., Erler, S., and Dezmirean, D. S. (2021) Biologically active extracts from different medicinal plants tested as potential additives against bee pathogens. *Antibiotics*. **10**, 1–16
360. Purnamasari, R., Winarni, D., Permanasari, A. A., Agustina, E., Hayaza, S., and Darmanto, W. (2019) Anticancer Activity of Methanol Extract of Ficus carica Leaves and Fruits Against Proliferation, Apoptosis, and Necrosis in Huh7it Cells. *Cancer Inform*. **18**, 0–6
361. Javaid, A., Anwar, S., Ali, Z., and Naseem, S. (2021) Chromatographic and Spectroscopic Fingerprinting of Ficus carica and Evaluation of In Vitro Antioxidant Activity. *Int J Agric Biol*. **25**, 677–682
362. Çalişkan, O., and Aytekin Polat, A. (2011) Phytochemical and antioxidant properties of selected fig (Ficus carica L.) accessions from the eastern Mediterranean region of Turkey. *Sci Hortic*. **128**, 473–478

363. Viveiros, M. M., Barreto, M. C., and Seca, A. M. L. (2022) Laurus azorica: Valorization through Its Phytochemical Study and Biological Activities. *Separations*. **9**, 1–15
364. Guenane, H., Gherib, A., Carbonell-Barrachina, Cano-Lamadrid, M., Krika, F., Berrabah, M., Maatallah, M., and Bakchiche, B. (2016) Minerals analysis, antioxidant and chemical composition of extracts of laurus nobilis from southern algeri. *Journal of Materials and Environmental Science*. **7**, 4253–4261
365. Vinha, A. F., Guido, L. F., Costa, A. S. G., Alves, R. C., and Oliveira, M. B. P. P. (2015) Monomeric and oligomeric flavan-3-ols and antioxidant activity of leaves from different Laurus sp. *Food Funct*. **6**, 1944–1949
366. Dogan, A., and Anuk, O. O. (2019) Investigation of the phytochemical composition and antioxidant properties of chinar (Platanus orientalis L.) leaf infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep*. **46**, 3049–3061
367. Anderson, M. J., Whitcomb, P. J., and Bezener, M. A. (2018) *Formulation simplified: Finding the sweet spot through design and analysis of experiments with mixtures.*, Taylor & Francis Group, LLC, 10.4324/9781315165578
368. De Castro, R. J. S., and Sato, H. H. (2013) Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α-amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. *Ind Crops Prod*. **49**, 813–821
369. Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F. O., Taleb, M., and Greche, H. (2016) Mixture design of Origanum compactum, Origanum majorana and Thymus serpyllum essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Ind Crops Prod*. **89**, 1–9
370. Yang, W. J., Li, D. P., Li, J. K., Li, M. H., Chen, Y. L., and Zhang, P. Z. (2009) Synergistic antioxidant activities of eight traditional Chinese herb pairs. *Biol Pharm Bull*. **32**, 1021–1026
371. Kurin, E., Mučaji, P., and Nagy, M. (2012) In vitro antioxidant activities of three red wine polyphenols and their mixtures: An interaction study. *Molecules*. **17**, 14336–14348
372. Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., and Nicoli, M. C. (2004) Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem*. **52**, 1177–1180
373. Queirós, B., Barreira, J. C. M., Sarmento, A. C., and Ferreira, I. C. F. R. (2009) In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. *Int J Food Sci Nutr*. **60**, 160–172
374. Ribeiro-Santos, R., Sanches-Silva, A., Motta, J. F. G., Andrade, M., Neves, I. de A., Teófilo, R. F., Carvalho, M. G. de, and Melo, N. R. de (2017) Combined use of essential oils applied to protein base active food packaging: Study in vitro and in a food simulant. *Eur Polym J*. **93**, 75–86
375. Mueller, M., Hobiger, S., and Jungbauer, A. (2010) Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem*. **122**, 987–996
376. Kupeli, E., Orhan, I., and Yesilada, E. (2007) Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine for their anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Pharm Biol*. **45**, 547–555
377. Tantry, M. A., Akbar, S., Dar, J. A., Irtiza, S., Galal, A., Khuroo, M. A., and Ghazanfar, K. (2012) Acylated flavonol glycoside from Platanus orientalis. *Fitoterapia*. **83**, 281–285
378. Compaore, M., Bakasso, S., Meda, R. N. T. M., and Nacoulma, O. G. (2018) Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Fractions from Bidens engleri O.E. Schulz (Asteraceae) and Boerhavia erecta L. (Nyctaginaceae). *Medicines*. **5**, 53
379. Kolodziejczyk-Czepas, J., Kozachok, S., Pecio, Ł., Marchyshyn, S., and Oleszek, W. (2021) Determination of phenolic profiles of Herniaria polygama and Herniaria incana fractions and their in vitro antioxidant and anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*. 10.1016/j.phytochem.2021.112861
380. Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É., and Ombódi, A. (2018) Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some Rosa Species. *Medicines*. **5**, 84
381. Sarı, A., Şahin, H., Özsoy, N., and Özbek Çelik, B. (2019) Phenolic compounds and in vitro antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activities of Scorzonera hieraciifolia Hayek roots. *South African Journal of Botany*. **125**, 116–119
382. Park, S. K., and Lee, Y. K. (2021) Antioxidant activity in rheum emodi wall (Himalayan rhubarb). *Molecules*. **26**, 1–9
383. La Basy, L., Hertiani, T., Murwanti, R., and Damayanti, E. (2024) Investigation of Cox-2 inhibition of Laportea decumana (Roxb). Wedd extract to support its analgesic potential. *J Ethnopharmacol*. **318**, 116857

EKLER

EK-1.BİTKİSEL İLAÇLAR

Ek-1A.Onaylanan bitkisel ilaçlar listesi

Yaygın adı	Ticari adı	Endikasyon	Yıl	Doğal ürün kaynağı
Serenoa repens	Permixon	Benign prostat hipertrofisi	1982	NB (lipit-sterol ekstresi)
Meglutol	Lipoglutaren	Hipolipidemi	1983	N (*Crotalaria dura* ve *C. globifera*'da bulunur)
Podophyllotoxin	Condyline	Genital siğiller	1985	N (*Podophyllum* türlerinin köklerinden ve rizomlarından ekstrakte edilen alkaloit olmayan toksin lignin)
Dronabinol	Marinol Syndros Reduvo Adversa	HIV/AIDS kaynaklı anoreksi ve kemoterapi kaynaklı bulantı ve kusma	1986	N (*Cannabis* türlerinden elde edilen sentetik tetrahidrokannabinol)
Artemisinin	Artemisin	Parazit enfeksiyonu	1987	N (*Artemisia annua*'dan elde edilir)
Guglipid	Guglip	Lipoprotein bozuklukları	1987	N (*Commiphora muku* ağacının reçinesinden elde edilir)
Hidrosmin	Venosmil	Kardiyovasküler hastalıklar	1987	ND (*Citrus aurantium* L.'de bulunan diosmin flavonoit'unun yarı sentetik türevi)
Metergolin	Liserdol Contralac	Hiperprolaktinemi	1987	ND (*Turbina corymbosa* ve *Ipomoea tricolor* gibi bitkilerde ve mantarlarda bulunan ergolin alkaloit türevi)
Plaunotol	Kelnac	Ülser	1987	N (*Croton stellatopilosus* H.Ohba'da bulunan asiklik diterpen)
Gamolenic acid	Epogam	Alerji	1988	N (tohum yağlarında bulunur. İlk olarak O*enothera* türlerinden elde edildi)
İpriflavone	Osten	Osteoartrit	1989	ND (soyadan elde edilen daidzein izoflavondan sentezlenir)
Solamargine	Curaderm	Kanser	1989	NB (Solanaceae familyasından elde edilen glikoalkaloit)
Docataxel	Taxotere	Kanser	1995	ND (paclitaxel'in yarı sentetik analogu)
Galanthamine HBr	Nivalin	Azheimer hastalığı	1995	N (N*arcissus* türleri ve Amaryllidaceae familyasındaki diğer türlerden elde edilen alkaolid)
Betain anhydrous	Cystadane	Homosistinüri	1996	N (ilk olarak *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*'den elde edilen, birçok bitkide bulunan amino asit)
Topotecan HCl	Hycamptin	Kanser	1996	ND (ilk olarak *Camptotheca acuminata*'nın kabuk ve gövdesinden izole edilen monoterpen indol alkaloit kamptotesinin sentetik, suda çözünür formu)
Arglabin	-	Kanser	1999	N (*Artemisia glabella* türünden elde edilen seskiterpen lakton)
Arteether	Artemotil	Parazit enfeksiyonu	2000	N (*Artemisia annua*'dan elde edilen artemisininin yarı sentetik türevi)

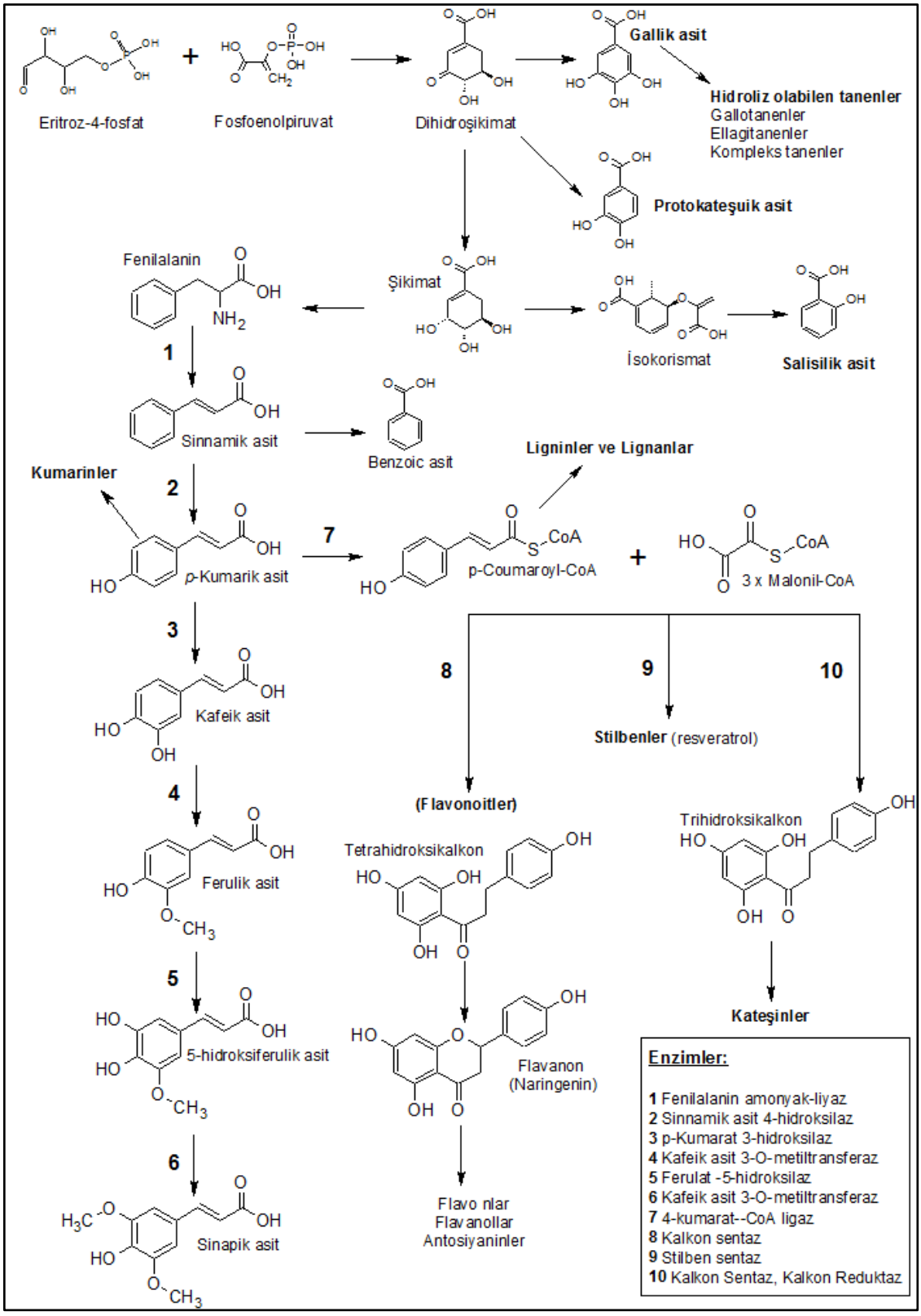
Ek-1A.(devam)

Cannabis sativa L. ekstresi	Sativex	Nöropatik ağrı	2005	NB
Kunecatechins	Veregen	Genital siğiller	2006	NB (kateşin ve diğer yeşil çay bileşiklerinin karışımı)
NIX-0699	Hemoxin Nicosan	Anemi, orak hücre	2006	NB (*Piper guineense* tohumları, *Pterocarpus osum* sapı, *Eugenia caryophyllus* meyvesi ve *Sorghum bicolor* yapraklarının etanol/su ekstresi)
Varenicline	Chantix Champix	Nikotin bağımlılığı	2006	ND (Fabaceae familyasından *Laburnum* ve *Cytisus* türlerinde bulunan cytisine alkaloit analodu)
-	Citrofen	Artrit	2007	N (portakal kabuğu ve tescilli *Phellodendron ağaç* kabuğu esktresi)
-	Curemisinin	Sıtma	2007	NB (*Artemesia*, zerdeçal ve kınakına kabuğu karışımı)
-	Oralair	Alerjik rinit	2008	NB (*Phleum pratense*, *Anthoxanthum odoratum*,*Dactylis glomerata*, *Lolium perenne ve Poa pratensis* karışımı)
Nalfurafine	Remitch	Kaşıntı (pruritus)	2009	ND (morfin türevi)
Vinflunine	Javlor	Kanser	2010	ND (*Catharanthus roseus* başta olmak üzere V*inca* türlerinde bulunan vinca alkaloit türevi)
Zucapsaicin	Civanex	Osteoartrit	2010	ND (*Capsicum* türlerinden bulunan capsaicinin cis-isomeri, Fenol ve metoksibenzen ailesinden)
Crofelemer	Fulyzaq	Diyare	2012	NB (*Croton lechleri* lateksinden elde edilen saflaştırılmış oligomerik proantosiyanidin)
Homoharringtonine	Ceflatonin	Kanser	2012	N (*Cephalotaxus fortunei*'den elde edilen alkaloit)
Ingenol mebutate	Picato	Kanser	2012	N (*Euphorbia peplus*'den elde edilen diterpen ingenol ve angelic asidi esteri)
PG-201	Layla	Artrit	2012	NB (14 fitokimyasalda oluşan karışım)
Dapagliflozin	Forxiga	Tip 2 diyabeti	2012	ND (armut, elma gibi meyve ağaçlarının kabuklarında bulunan ve dihidrokalkon olan floretinin glukozidi florizinin türevi)
Japon sedir poleni	Cedartolen	Alerji	2014	NB
Ambrosia polen ekstresi	Ragwitek	Alerji	2014	NB (*Ambrosia artemisiifolia* ekstresi)
Huş kabuğu ekstresi	Episalvan	Yara	2016	NB (*Betulae* kabuğu ekstresi)
Cannabidiol	Epidiolex	Epilepsi	2018	N (*Cannabis* türlerinden elde edilir)

N: değiştirilmemiş doğal ürün; NB: belirlenmiş karışımı olan "Botanik" ürün; ND: doğal bir üründen türetilmiş genellikle yarı sentetik bir modifikasyon.

EK-2.FİTOKİMYASALLAR

Ek-2A.Fenilpropanoid biyosentez yolağı



EK-3.ANTİOKSİDANLAR HAM VERİLER

Ek-3A.Etanol ekstreleri DPPH˙ inhibisyonu (IC_{50})

Örnek	IC_{50} (µg/mL)			Ortalama IC_{50} ± Standart Sapma (µg/mL)
	IC_{50}-1	IC_{50}-2	IC_{50}-3	
Trolox	35,63	37,58	35,63	36,28 ± 1,12
Kuersetin	11,92	11,41	11,31	11,55 ± 0,33
İncir	64,37	62,06	62,75	63,06 ± 1,18
Defne	40,09	39,49	41,88	40,49 ± 1,25
Çınar	27,33	26,22	26,63	26,73 ± 0,56
Karışım 1	55,74	53,21	53,49	54,15 ± 1,39
Karışım 2	29,85	28,52	29,99	29,45 ± 0,81
Karışım 3	40,52	39,67	40,21	40,13 ± 3,78
Karışım 4	34,33	33,41	34,70	34,15 ± 0,67

Ek-3B.Su ekstreleri DPPH˙ inhibisyonu (IC_{50})

Örnek	IC_{50} (µg/mL)			Ortalama IC_{50}± Standart Sapma (µg/mL)
	IC_{50}-1	IC_{50}-2	IC_{50}-3	
Trolox	35,63	37,58	35,63	36,28 ± 1,12
Kuersetin	11,92	11,41	11,31	11,55 ± 0,33
İncir	88,47	86,56	87,55	87,58 ± 0,96
Defne	49,46	48,67	49,16	49,10 ± 0,40
Çınar	50,91	50,49	50,51	50,51 ± 0,24
Karışım 1	70,66	73,63	70,10	71,47 ± 1,90
Karışım 2	54,76	53,69	53,60	54,02 ± 0,64
Karışım 3	59,88	60,53	59,17	59,86 ± 0,39
Karışım 4	52,52	53,21	53,13	52,95 ± 0,38

Ek-3C.Etanol ekstreleri $ABTS^{\cdot+}$ inhibisyonu (IC_{50})

Örnek	IC_{50} (µg/mL)			Ortalama IC_{50}± Standart Sapma (µg/mL)
	IC_{50}-1	IC_{50}-2	IC_{50}-3	
Trolox	4,14	4,20	4,26	4,20 ± 0,06
İncir	2,79	2,81	2,88	2,83 ± 0,05
Defne	4,11	4,06	4,08	4,08 ± 0,02
Çınar	1,82	1,79	1,77	1,80 ± 0,03
Karışım 1	2,82	2,81	2,76	2,80 ± 0,03
Karışım 2	2,35	2,34	2,32	2,34 ± 0,01
Karışım 3	4,42	4,38	4,40	4,40 ± 0,02
Karışım 4	1,79	1,79	1,87	1,82 ± 0,04

Ek-3D.Su ekstreleri $ABTS^{\cdot+}$ inhibisyonu (IC_{50})

Örnek	IC_{50} (µg/mL)			Ortalama IC_{50} ± Standart Sapma (µg/mL)
	IC50-1	IC50-2	IC50-3	
Trolox	4,14	4,20	4,26	4,20 ± 0,06
İncir	3,27	2,96	3,08	3,10 ± 0,16
Defne	2,32	2,42	2,33	2,36 ± 0,05
Çınar	0,97	1,20	0,90	1,02 ± 0,16
Karışım 1	2,51	2,43	2,66	2,54 ± 0,12
Karışım 2	1,54	1,78	1,42	1,58 ± 0,18
Karışım 3	2,32	2,86	2,65	2,61 ± 0,13
Karışım 4	2,22	2,23	2,17	2,20 ± 0,03

Ek-3E.Etanol ekstreleri FRAP sonuçları

Örnek	FRAP aktivitesi mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki			Ortalama aktivite
	Aktivite-1	Aktivite-2	Aktivite-3	
İncir	6,93	7,57	8,02	7,51 ± 0,55
Defne	19,87	22,21	22,99	21,69 ± 1,63
Çınar	14,02	15,77	16,23	15,34 ± 1,16
Karışım 1	7,75	8,40	8,42	8,19 ± 0,38
Karışım 2	14,22	15,70	16,10	15,34 ± 0,99
Karışım 3	10,08	11,23	11,55	10,95 ± 0,78
Karışım 4	6,04	7,73	7,88	7,22 ± 1,02

Ek-3F.Su ekstreleri FRAP sonuçları

Örnek	FRAP Aktivite mmol Fe^{2+} eşdeğer/g kuru bitki			Ortalama Aktivite
	Aktivite-1	Aktivite-2	Aktivite-3	
İncir	10,59	9,99	10,22	10,27 ± 0,30
Defne	34,78	35,79	36,01	35,53 ± 0,66
Çınar	13,26	13,41	13,66	13,44 ± 0,20
Karışım 1	8,18	8,16	8,35	8,23 ± 0,11
Karışım 2	17,97	17,65	17,94	17,85 ± 0,18
Karışım 3	10,45	10,24	10,59	10,42 ± 0,18
Karışım 4	13,78	13,34	13,88	13,67 ± 0,29

Ek-3G.Etanol ekstreleri için CUPRAC sonuçları

Örnek	CUPRAC aktivite mmol Troloks eşdeğer/g kuru bitki			Ortalama aktivite
	Aktivite-1	Aktivite-2	Aktivite-3	
İncir	0,17	0,18	0,18	0,18 ± 0,002
Defne	0,50	0,55	0,54	0,53 ± 0,03
Çınar	0,18	0,20	0,20	0,19 ± 0,02
Karışım 1	0,21	0,23	0,23	0,22 ± 0,01
Karışım 2	0,34	0,35	0,34	0,34 ± 0,01
Karışım 3	0,22	0,25	0,25	0,24 ± 0,02
Karışım 4	0,24	0,27	0,26	0,26 ± 0,01

Ek-3H.Su ekstreleri için CUPRAC sonuçları

Örnek	CUPRAC aktivite mmol Troloks eşdeğer/g kuru bitki			Ortalama aktivite
	Aktivite-1	Aktivite-2	Aktivite-3	
İncir	0,19	0,19	0,19	0,19 ± 0,004
Defne	0,34	0,37	0,36	0,36 ± 0,02
Çınar	0,30	0,31	0,31	0,31 ± 0,01
Karışım 1	0,17	0,17	0,17	0,17 ± 0,003
Karışım 2	0,67	0,67	0,66	0,67 ± 0,01
Karışım 3	0,37	0,39	0,37	0,38 ± 0,01
Karışım 4	0,68	0,70	0,71	0,70 ± 0,02