T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FURİN PROTEAZ ENZİM İNHİBİSYONU ÜZERİNE LAMİACEAE VE ASTERACEAE FAMİLYALARINA AİT BAZI TIBBİ BİTKİ EKSTRELERİNİN ETKİSİ

FATİME BETÜL ÜZER

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MAHFUZ ELMASTAŞ

FİTOTERAPİ ANA BİLİM DALI
FİTOTERAPİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORATEZİ
HAZİRAN/2025

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü ……Ana Bilim Dalı…… Programında ……..tarafından hazırlanan …….başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/Başkan: Unvanı Adı SOYADI — İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Unvanı Adı SOYADI — İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Unvanı Adı SOYADI — İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Unvanı Adı SOYADI — İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Üye: Unvanı Adı SOYADI — İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum ……..

Tez Savunma Sınavı Tarihi: ...../……/……

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)

Fatime Betül ÜZER

…… (25.06.2025)

İTHAF

"Bu çalışmayı rahmetli anneannem Emineana Yanar'a, rahmetli dedem Ömer Lütfi Antalyalı'ya ve rahmetli babam Mustafa Antalyalı'ya ithaf ediyorum"

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim ve tez çalışmam boyunca bana her türlü desteği sunan kıymetli danışmanım sayın Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a derin teşekkürlerimi sunarım. Onun rehberliği olmadan bu çalışmayı tamamlamak mümkün olmazdı.

Doktora sürecimde beni yetiştiren değerli hocalarım Doç. Dr Zafer Ömer ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Mehmet Evren OKUR'a

Tez çalışmamda gerekli olan bitkisel ürünlerin temininde her türlü yardımı sağlayan, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi öğretim üyesi sayın Prof. Dr. İsa TELCİ'ye

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Nazlı HELVACI ve Dr. Öğr. Üyesi Duygu MISIRLI'ya

Eğitim hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim annem Ayten Antalyalı ve kardeşim Dr. Hande Nur ANTALYALI'ya

Doktora çalışma sürecimde desteklerini esirgemeyen işverenim Erkan AKKAŞ'a

Doktora çalışmasına başlamam için beni teşvik eden ve süreç boyunca yanımda olan eşim Musa ÜZER ve kızım Ayşe Elif ÜZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada proje ekipmanları için destek sunan (Proje No: 2024/032) SBÜ-BAP koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ iix
RESİMLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER ..... …5
2.1. FURİN PROTEAZ ENZİMİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ……..5
2.2 PROPROTEİN KONVERTAZ AİLESİ…….5
2.3 MEMELİ FURİN SUBSTRATLARI…….6
2.3.1. Tümör Gelişimi ve İlerlemesinde Furinin Rolü……..6
2.3.2. Furinin Bakteriyel Ekzotoksinlerin Aktivasyonu Üzerindeki Rolü……7
2.3.3. Viral Protein İşlenmesinde ve Patojenitesinde Furinin Rolü……..8
2.4. LAMİACEAE AİLESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ……..8
2.5. *THYMUS VULGARİS* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ…….9
2.5.1. *Thymus vulgaris* Bitkisinin Biyolojik Aktiviteleri ve Antikanser Özellikleri9
2.5.2.*Thymus vulgaris* Bitkisinin Antimikrobiyal ,Antioksidan, Antienflamatuar Özellikleri……10
2.6. *ORİGANUM VULGARE* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ……...10
2.7. *SALVİA OFFİCİNALİS* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ……11
2.7.1. *Salvia officinalis* Bitkisinin Antimikrobiyal Özellikleri……...12
2.7.2 *Salvia officinalis* Bitkisinin Antidiyabetik ve Antikanser Özellikleri……...12
2.8. *MENTHA PİPERİTA* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ……13
2.8.1 *Mentha piperita* Bitkisinin Antioksidan Özellikleri……..13
2.8.2 *Mentha piperita* Bitkisinin Terapötik Özellikleri……..14
2.8.3 *Mentha piperita* Bitkisinin Terapötik Özellikleri……..14
2.9. *MENTHA SPİCATA* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ …….15
2.9.1. *Mentha spicata* Bitkisinin Metabolik Hastalıklar Üzerindeki Etkisi …….16
2.9.2*Mentha spicata* Bitkisinin Metabolik Hastalıklar Üzerindeki Etkisi ……16
2.10. *ASTRACEAE* AİLESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ……18
2.10.1. *Silybum marianum* Bitkisinin Genel Özellikleri……19

2.10.2. *Silybum marianum* Bitkisinin Karaciğer Üzerindeki Etkileri……..19
2.10.3. *Silybum marianum* Bitkisinin Böbrek Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi….20
2.10.4. *Silybum marianum* Bitkisinin Antidiabetik Etkisi……21
2.10.5. *Silybum marianum* Bitkisinin Antimikrobiyal Özellikleri……21
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 22
3.1. BİTKİSEL MATERYAL…….22
3.2. KİMYASAL MALZEMELER ……...25
3.2.1 Kullanılan Çözücü ve Kimyasal Maddeler..... 25
3.2.2 Fenolik Bileşik Standartları 25
3.2.3. Kullanılan Alet ve Gereçler..... 26
3.3. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR…….26
3.3.1. Ekstrelerin Hazırlanması..... 26
3.3.2. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiklerin Kantitatif Analizi…….....27
3.3.3 Spektrofotometre ile Bitki Ekstrelerinin İnhibisyon Yüzdelerinin Değerlendirilmesi……27
3.4. İSTATİKSEL ANALİZ……29
4. BULGULAR..... 30
4.1. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR……30
4. 2. FURİN PROTEAZ İNHİBİSYON BULGULARI……..33
4.3. FURİN PROTEAZ İNHİBİSYONU VE FENOLİK BİLEŞİK İLİŞKİSİ……34
4.3.1 Çözücülerin Fenolik Bileşik Ekstraksiyonundaki Rolü..... 40
4.3.2. Farklı Çözücülerin Etkinliği ..... …. 41
4.3.3. Çözücü Polaritesinin Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu Üzerine Etkisi 42
5. TARTIŞMA..... 47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 55
KAYNAKLAR……58
EKLER..... 70

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Farklı çözücülerle elde edilen bitki ekstrelerinin verimleri……..... 30

Tablo 4.2: Bitki ekstreleri numune ağırlıkları…….....31

Tablo 4.3: Bitki ekstreleri fenolik bileşik içerikleri…….....32

Tablo 4.4: Bitki ekstreleri furin inhibisyon oranları…….33

Tablo 4.5: Farklı kombinasyon türlerinde bitki ekstrelerinin furin inhibisyon yüzdeleri ve bileşen içerikleri……..…….....35

Tablo 4.6: Fenolik bileşik kombinasyonlarının ortalama furin inhibisyon yüzdeleri.……..36

Tablo 4.7: Fenolik bileşiklerin furin inhibisyon korelasyonları……..…… .37

Tablo 4.8: Farklı çözücülerin fenolik çeşitlilik ve inhibisyon üzerine etkilerinin istatistiksel karşılaştırması ……40

Tablo 4.9: Farklı çözücülerin furin inhibisyon yüzdesine etkilerinin istatistiksel karşılaştırması…… 41

Tablo 4.10: Çözücü türlerine göre ekstrakte edilen fenolik bileşik profili ve ilgili bitki türleri……... 45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Furin proteaz enziminin biyolojik süreçlerdeki etkileri……...…….....6

Şekil 3.1: BPS bioscience furin proteaz analiz kiti protokolün klorometilketon furin aktivite grafiği……...….……...28

Şekil 4.1: Bitki ekstrelerine göre ortalama inhibisyon yüzdeleri…….33

Şekil 4.2: Bitki ekstrelerine göre ortalama inhibisyon yüzdeleri.....…..……. 36

Şekil 4.3: Furin inhibisyonu ile fenolik bileşikler arasındaki korelasyon……..……..… 38

Şekil 4.4: Bitki ekstrelerinin fenolik bileşik konsantrasyonları ve furin inhibisyon yüzdeleri…….....…39

Şekil 4.5: Çözücü türleri göre ortalama furin inhibisyon yüzdeleri…….....45

Şekil 4.6: Çözücü türlerine göre bitki ekstrelerinin fenolik bileşik varlık matrisi……...46

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Çalışmada kullanılan bitki görselleri……..……24

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT : Alanin Aminotransferaz

ANOVA : Analysis of Variance (Varyans Analizi)

AST : Aspartat Aminotransferaz

BAP : Bilimsel Araştırma Projesi

BLISS : Bliss Bağımsızlık Modeli

Ca^{2+} : Kalsiyum İyonu

CD_{50} : 50% Sitotoksik Doz (Cytotoxic Dose 50)

CI : Combination Index (Kombinasyon Endeksi)

COVID-19 : Coronavirus Disease 2019

CXCL10 : C-X-C Motif Ligand 10

DPPH : 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil

ER : Endoplazmik Retikulum

FDA : U.S. Food and Drug Administration

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

GETAT : Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp

GHRH : Growth Hormone-Releasing Hormone

HAT : Human Airway Trypsin-like Protease

HBV : Hepatit B Virüsü

HDL : High-Density Lipoprotein

HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor-1

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HPV : Human Papillomavirus

HPAIV : High Pathogenic Avian Influenza Virus

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HSV : Herpes Simplex Virus

IBM SPSS : IBM Statistical Package for the Social Sciences

IC_{50} : Inhibitory Concentration 50

IFNγ : Interferon Gamma

IGF : Insulin-like Growth Factor

K^+ : Potasyum İyonu

LDL : Low-Density Lipoprotein

LD_{50} : Lethal Dose 50

MANN-WHITNEY U: Mann–Whitney U Testi

MBC : Minimal Bakterisidal Konsantrasyon

MİK : Minimal İnhibitör Konsantrasyon

MMP : Matrix Metalloproteinase

NDV : Newcastle Disease Virus

NF-E2 : Nükleer Faktör Eritroid 2

NGF : Nerve Growth Factor

PDA : Photodiode Array Detector

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PCSK : Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin

RAAS : Renin–Angiotensin–Aldosterone System

ROS : Reactive Oxygen Species

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein

SPSS : Statistical Package for the Social Sciences

T.C. : Türkiye Cumhuriyeti

TGN : Trans-Golgi Network

TGFβ : Transforming Growth Factor Beta

TMPRSS2 : Transmembrane Protease Serine 2

TRH : Thyrotropin-Releasing Hormone

TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

UY : Uçucu Yağ

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL : Very Low-Density Lipoprotein

FURİN PROTEAZ ENZİM İNHİBİSYONU ÜZERİNE LAMİACEAE VE ASTERACEAE FAMİLYALARINA AİT BAZI TIBBİ BİTKİ EKSTRELERİNİN ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, furin proteaz enziminin inhibisyonunda doğal kaynaklı fenolik bileşiklerin potansiyelini değerlendirmek amacıyla, *Lamiaceae* ve *Asteraceae* familyalarına ait seçili bitki türlerinin farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerinin etkinliğini araştırmayı hedeflemiştir.

Gereç ve Yöntem: *Origanum vulgare, Thymus vulgaris, Mentha piperita, Mentha spicata, Salvia officinalis ve Silybum marianum* türleri; hekzan, kloroform ve etil asetat çözücüleriyle ekstrakte edildi. Ekstrelerin fenolik bileşik içerikleri HPLC ile kantitatif olarak belirlendi. Furin inhibisyonu, spektrofotometrik yöntemle ve % inhibisyon formülü ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ANOVA, Pearson korelasyon ve çoklu regresyon analizleri ile istatistiksel olarak incelendi.

Bulgular: *Origanum vulgare* (kloroform), *Salvia officinalis* (kloroform), *Mentha spicata* (etilasetat) ekstreleri %97,44 ile en yüksek inhibisyonu gösterdi. Epikateşin ve rutin kombinasyonu sinerjik etki oluştururken, naringenin inhibitör etkiyi istatistiksel olarak düşürdü ($p<0,05$). Çözücü polaritesi, ekstrakte edilen fenolik çeşitliliği ve biyolojik aktivite üzerinde anlamlı fark oluşturdu. Üçlü fenolik kombinasyonlar tekli yapılara göre ortalama %33 daha yüksek inhibisyon sağladı.

Sonuç: Furin hedefli tedavi yaklaşımlarında bitkisel fenolik bileşiklerin kombinasyonları, etkinlik ve sinerji açısından dikkate değer bir strateji sunmaktadır. Özellikle kloroform gibi orta polar çözücüler, biyoaktif madde ekstraksiyonunda üstün başarı sağlamış, fenolik çeşitliliğin biyolojik etkinliği doğrudan etkilediği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bitki Ekstresi, Fenolik Bileşik, Furin Proteaz, Kombinasyon Endeksi, Sinerji

THE EFFECT OF CERTAIN MEDICINAL PLANT EXTRACTS FROM THE LAMIACEAE AND ASTERACEAE FAMILIES ON FURIN PROTEASE ENZYME INHIBITION

ABSTRACT

Aim: This study aimed to evaluate the inhibitory potential of phenolic-rich extracts from selected medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* and *Asteraceae* families against the furin protease enzyme, a key target in viral and oncogenic pathways.

Materials and Methods: Extracts of *Origanum vulgare, Thymus vulgaris, Mentha piperita, Mentha spicata, Salvia officinalis*, and *Silybum marianum* were prepared using hexane, chloroform, and ethyl acetate. Phenolic contents were quantified by HPLC. Furin inhibition was measured spectrophotometrically and statistically analyzed using ANOVA, Pearson correlation, and multiple regression.

Results: Chloroform extracts of *Origanum vulgare*, Chloroform extracts of *Salvia officinalis* and ethyl acetate extracts of *Mentha spicata* showed the highest inhibition (97.44%). Epicatechin and rutin displayed significant synergistic effects, while naringenin negatively affected inhibition ($p<0.05$). Solvent polarity significantly influenced both phenolic diversity and biological activity. Ternary combinations showed on average 33% higher inhibition than single compounds.

Conclusion: Phenolic compound combinations offer promising natural alternatives for furin-targeted inhibition. Solvent choice critically determines extraction efficiency and bioactivity. Chloroform, in particular, extracted a broader phenolic spectrum and yielded superior biological outcomes.

Keywords: Combination Index, Furin Protease, Plant Extract, Phenolic Compounds, Synergy

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Furin insanlarda proteaz grubuna ait anahtar bir enzimdir. Golgi cisimciği ve birçok hücrenin yüzeyinde, memeliler dahil birçok canlıda, hücre zarına bağlı ya da salgılanmış halde bulunur. Furin, normal insan fizyolojisinde 100'den fazla proprotein ve peptit grubunu parçalar ve aktive eder. Diğer risk gruplarından bağımsız olarak furin, artmış diyabet riski, hiperinsulinemi, hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite ve tüm nedenlere bağlı ölüm riski ile ilişkilidir (1,2).

Furin, Sars-Cov2'nin hücre içine girişi ve replikasyonu için gerekli olmasının yanında, normal insan fizyolojisinde gerekli, COVID-19 patogenezini etkileyen birçok peptidin aktive edilmesinden de sorumlu bir enzimdir. Furin, vazokonstriktör anjiyotensin oluşumuna aracılık eden pro-renin reseptörünü aktive ederek renin anjiyotensin aldosteron sistemini (RAAS) modüle eder (3,4). Furin, von Willebrand faktörü ve pıhtılaşma faktörü VIII ile ilişkili koagülopati süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Faktör VIII'in aktivasyonu için furin gereklidir. Ayrıca, furin ekspresyonunun hipoksi koşulları altında arttığı bilinmektedir. (5,6).

Yetişkin farelerde furin eksikliğinin etkilerini incelemek amacıyla, Roebroek ve arkadaşları indüklenebilir ve karaciğere özgü bir *Furin* knockout fare modeli geliştirmiştir. Bu çalışma sonucunda, belirli bir süre boyunca ilaçla gerçekleştirilen furin inhibisyonunun ciddi yan etkilere yol açmadığı belirlenmiştir. (7). 1989 yılında Furin, ilk insan proteazı olarak tanımlanmış ve kısa süre sonra aktivitesi tespit edilmiştir (8,9).

Bazı kanser türlerinde Furin üretiminin arttığı tespit edilmiş, furin inhibisyonuna yönelik aşı çalışmaları yapılmaya başlanmıştır (10).

Birçok bakteri ve virüs, konak hücreye girişte veya toksin aktivasyonunda furin proteazını kullanmaktadır . "Şarbon etkeni *Bacillus anthracis* hücre içine girmek için furini kullanır (11). Gazlı gangren etkeni *Clostridium septicum* α-Toxin Furin tarafından aktive edilir (12) . *Pseudomonas aeruginosa*-Exotoxin A, Shiga-Toxin ve Difteri Toxini de endozomal Furin sayesinde aktif hale geçen enfeksiyon etkenleridir (13). Paramyxovirüsler, HIV-1 Virus, Ebolavirus, Herpes-simplex-Virus-1 gibi birçok virüs Furin proteaz ile aktif hale geçer (14–22).

Furin, sayısız patolojik süreçteki çeşitli işlevleri nedeniyle ilaç geliştirme çalışmaları için önemli bir hedeftir. Uzun süreli furin inhibisyonu yan etkilere yol açabilse de furine bağlı enfeksiyonların kısa ya da orta vadeli inhibisyonu düşünülebilir.

Bugüne kadar furin inhibisyonunu hedefleyen birçok molekül geliştirilmiştir. Bu amaçla; α_1-Antitripsin Portland, Inter-α-inhibitör proteini gibi makromoleküller; klorometilketon, ketometilen ve aminometilketon türevleri gibi reaktif küçük moleküller; poli-L-arjinin ve poli-D-arjinin gibi peptit ve peptit türevleri ile amidinohidrazon, metal şelat kompleksleri ve andrografolid gibi peptit yapısında olmayan bileşikler kullanılmıştır. Ancak bu moleküller arasında protein yapıdaki makromoleküller, yüksek molekül ağırlıkları ve düşük stabiliteleri nedeniyle furin inhibisyonu açısından uygun değildir. Klormetilketon türevleri ise sitotoksik etkileri ve kimyasal kararsızlıkları nedeniyle klinik kullanım açısından elverişli değildir. Peptit yapısında olmayan küçük moleküller, etken madde üretimi açısından daha uygun bir seçenek oluşturmaktadır. Ne var ki, bugüne kadar peptit yapıda olmayan çok az sayıda etkili furin inhibitörü tanımlanabilmiştir. *Andrographis paniculata* bitkisinden elde edilen bir diterpenoid olan andrografolid, yalnızca zayıf düzeyde furin inhibisyonu göstermektedir. (23).

Sentetik ürünlerin insan sağlığında ortaya çıkardığı sorunlar nedeniyle, gıda, ilaç sanayi, kozmetik ve temizlik ürünleri başta olmak üzere birçok alanda kullanılan doğal ve bitkisel ürünlerin önemi giderek artmaktadır. Son yıllarda bitki sekonder metabolitleri ve bunlara yönelik bilimsel ve endüstriyel çalışmalar ivme kazanmaktadır. İçerdikleri fonksiyonel bileşikler nedeniyle bitkiler, multidisipliner bir araştırma alanı olan fitoterapi ile sağlık alanına da hızla girmektedir. Bu bağlamda, bitkilerde bulunan değerli bileşiklerin tespit edilmesi, kimyasal yapılarının aydınlatılması, benzer içeriğe sahip bitkilerin taranması, bitki ve bileşiklerinin biyolojik ve farmakolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve etkinliği tespit edilen tıbbi bitkilerin iyi tarım uygulamaları ile yetiştirilmesi giderek önem kazanmaktadır.

Ülkemizin Akdeniz Bitki Alanı (Akdeniz ve Ege Bölgeleri), Avrupa-Sibirya Bitki Alanı (Karadeniz ve Marmara bölgeleri) ve İran-Turan Bitki Alanı'nın (İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgeleri) kesişme noktasında yer alması, kısa mesafelerde mikrokilima çeşitliliği ve toprak değişkenliği zengin bitki çeşitliliğine yol açmaktadır. Türkiye'de 3500'ü endemik olmak üzere, yaklaşık 10000 bitki türü ve tür altı birimlerle 12000 takson doğal yayılış göstermektedir. Endemik bitki türleri açısından Türkiye'nin en zengin

familyası *Asteracea* (447 tür), *Fabaceae* (406 tür), *Lamiaceae*'dır (257 tür). Etnobotanik çalışmalar ülkemizde yetişen birçok bitkinin hastalıkların tedavisinde etkin bir biçimde kullanıldığını ortaya koymaktadır (24–27). Ancak bu bitkilerin modern tedavi yöntemlerine dahil edilmesi, etkili maddelerin tanımlanması, biyolojik aktiviteleri ve ilaca yönelik çalışmalar araştırıcıların gündeminde olan ve devam eden çalışmalardır. Ekstre düzeyinde ürünlerin değişken olması, sürdürülebilir stabilitesinin zorluğu, sinerjik etki mekanizmasının bilinmemesi ilaç olarak kullanımını sınırlayan faktörlerdir.

İnsanlık tarihi boyunca bitkiler ve doğal ürünler, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve/veya tedavisinde önemli bir rol oynamıştır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve ekstreler, zengin biyoaktif metabolit içerikleri nedeniyle değerli doğal kaynaklar arasında yer almaktadır. Doğal ürünler, sahip oldukları biyoaktivite sayesinde ilaç endüstrisinde ve etnobotanik uygulamalarda yaygın biçimde kullanılmakta; özellikle inflamasyon, kanser ve viral enfeksiyonların tedavisinde etkili olmaktadır. Nitekim, Deng virüsü, Koronavirüs, Enterovirüs, Hepatit B, İnfluenza virüsü ve HIV'e karşı etkili olduğu belirlenen çeşitli antiviral doğal ürünler halihazırda tanımlanmıştır. Bu bağlamda doğal ürünler, COVID-19 gibi viral enfeksiyonların tedavisinde de potansiyel birer terapötik ajan olarak değerlendirilmektedir.(28).

Geleneksel ve tamamlayıcı tıpta (GETAT) kullanılan bitkilerin modern tıpta kullanımlarının bilimsel yönden değerlendirilmesine yönelik çalışmalar son zamanlarda ivme kazanmıştır. Bu çalışmalar yan etki profili düşük, etkili ilaç moleküllerinin sağlık sistemine kazandırılması ile ülke ekonomisine de katkı sağlama potansiyeline sahiptir. Bitki sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi ve yapılarının aydınlatılması oldukça önemli araştırma konuları arasında yer almaktadır.

18. ve 19. yüzyıllardan itibaren bitkilerden biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve bu bileşiklerin kimyasal yapılarının belirlenmesi ile ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Bitkilerden elde edilen "sekonder metabolit" olarak adlandırılan biyoaktif maddeler, birçok ilacın elde edilmesinde önemli doğal hammaddeler olarak günümüze kadar kullanılagelmiştir. Bitkilerin çeşitli sebeplerle temin edilememesi (29), kimyasal sentez tekniğinin daha kolay olması (30), bitki türlerinden bazılarının tükenme tehdidi altında olması (31–33) gibi nedenlerden dolayı doğal kaynaklı bileşiklerin kimyasal sentezi tercih edilmiş ve çok sayıda sentetik ilacın gelişmesine katkılar sağlanmıştır. Ancak bazen doğal kökenli biyoaktif bileşiğin sentetik eşdeğeri aynı dozda olsa bile doğalı ile eşit

oranda farmakolojik cevap oluşturamamakta, hatta bazen farklı farmakokinetik özellikler veya farklı biyoyararlanım oranları gösterebilmektedir (31,34). Yapılan bazı bilimsel çalışmalarda izole edilen bileşiklerin biyolojik aktiviteleri, bileşiği içeren bitkinin standardize formuna kıyasla daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu olay bileşikler arasındaki sinerjik etki mekanizması ile açıklanan aktivite üstünlüğünü ortaya çıkarmaktadır (35).

Bu çalışmada, birçok patolojik süreçte anahtar rol oynayan Furin proteaz enzimini inhibe edebilecek bitkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, literatürde bugüne kadar yapılmış molecular docking (moleküler kenetlenme), in siliko ve *in vitro* çalışmalar doğrultusunda Furin proteaz enzimini inhibe etme potansiyeli gösterdiği belirlenen sekonder metabolitleri içeren ve Türkiye coğrafyasında yaygın olarak kullanılan tıbbi bitkiler dahil edilmiştir. Bu kapsamda kekik (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*), nane (*Mentha piperita*, *Mentha spicata*), adaçayı (*Salvia officinalis*) ve deve dikeni (*Silybum marianum*) bitkileri seçilmiştir. Söz konusu bitkilerin toprak üstü kısımlarının farklı polaritelere sahip çözücülerle (hekzan, kloroform, etil asetat) elde edilen ekstrelerinin Furin proteaz enzimine karşı inhibisyon etkileri *in vitro* koşullarda değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FURİN PROTEAZ ENZİMİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

İnsan genomu, fizyolojik süreçlerde kilit rol oynayan 550'den fazla proteazı kodlamaktadır. Bu "moleküler makaslar"; protein sindirimi, protein yıkımı, hücresel sinyal taşıma ve aktivasyon gibi işlevlerde görev alır. Proteolitik bölünme, en önemli translasyon sonrası modifikasyonlardan biri olup, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve inflamasyon süreçlerinde biyoaktif protein ve peptid üretimini düzenler. Dolayısıyla, proteazlardaki mutasyonlar veya düzensiz aktivite, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve otoimmün bozukluklarla ilişkilidir (36). Birçok virüs, proteinlerinin olgunlaşması için konak proteazlarına bağımlıdır; benzer biçimde bazı bakteriyel toksinler de konak proteazlarının özgül bölünmeleriyle aktive olur. Son yıllarda, proteazların modülasyonu bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıkların tedavisinde potansiyel bir strateji olarak öne çıkmıştır. Bu bağlamda, furin özellikle önemli bir hedef olarak dikkat çekmektedir. Furin, aralarında viral zarf glikoproteinleri, bakteriyel toksinler ve tümör gelişimiyle ilişkili çeşitli hücresel faktörlerin de bulunduğu 150'den fazla substratın işlenmesinde görev alır (37).

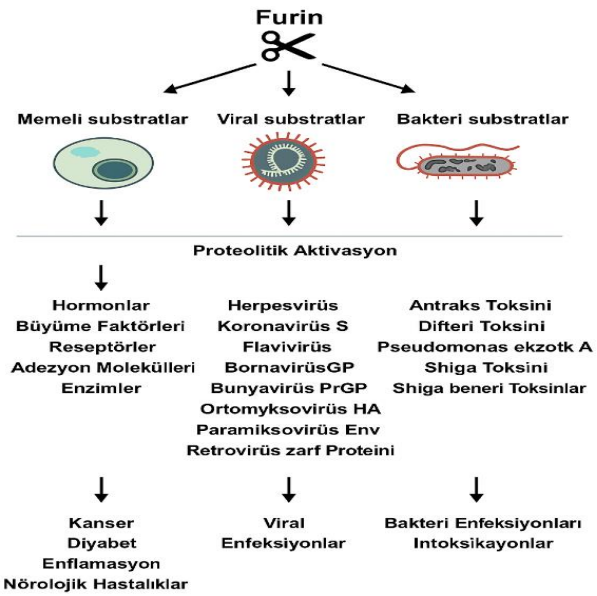
2.2 PROPROTEİN KONVERTAZ AİLESİ

Furin, proprotein konvertazlar (PCSK'lar) ailesinin bir üyesidir ve PCSK3 olarak da adlandırılır. Bu enzim ailesi, bakteriyel subtilisin ve maya keksin proteazlarına yapısal ve işlevsel benzerliklerinden dolayı PCSK (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin tipi) adını almıştır. İnsan genomunda PCSK1–9 olarak bilinen dokuz farklı proteaz tanımlanmıştır. PCSK'lar, inaktif proproteinleri biyolojik olarak aktif moleküllere dönüştürerek önemli fizyolojik işlevler üstlenirler (38–40). Furin, memelilerde tanımlanan ilk proprotein konvertaz olarak kabul edilir. Bugüne kadar PCSK'lara ait 200'den fazla substrat belirlenmiş olup; bunlar arasında hormonlar, reseptörler, büyüme faktörleri ve adezyon molekülleri yer alır (41). PCSK1–7 genellikle bazik amino asit kalıntılarının ardından substratlarını keserken, PCSK8 bazik olmayan bölgeleri hedef alır ve özellikle sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) üzerinden etki gösterir (41,42). PCSK9 ise proteolitik aktivite göstermeden LDL reseptörlerine bağlanarak

kolesterol metabolizmasını düzenler. Hiperkolesterolemi tedavisinde FDA onaylı inhibitörlere sahip olması, PCSK9'u klinik başarıya ulaşmış bir proteaz hedefi haline getirmiştir (41,43).

2.3 MEMELİ FURİN SUBSTRATLARI

Furin'in kanonik kesim motifinin R-X-K/R-R↓ şeklinde olduğu bilinmektedir; ancak kesim spesifitesi, bu çekirdek dizilimin çevresindeki yaklaşık 20 amino asitlik bölge ve translasyon sonrası modifikasyonlarla şekillenmektedir (44). Biyoenformatik ve fonksiyonel çalışmalar, memeli proteinlerinde 100'ün üzerinde furin substratı tanımlamıştır. Bu substratlar arasında büyüme faktörleri (IGF1, IGF2, TGF-β, PDGFα/β, VEGF-C), sitokinler (CXCL10), hormonlar (PTH, TRH, GHRH), adezyon molekülleri (integrinler, vitronektin), kolajenler, MMP'ler, pıhtılaşma faktörleri, reseptörler ve iyon kanalları yer almaktadır. Furin aracılığıyla bu proteinlerin çoğu aktif hale gelirken, bazı proteinler (örneğin PCSK9 ve endotel lipaz) inaktive edilebilmektedir (37). Bu durum, furinin hücresel fizyoloji ve patofizyoloji üzerindeki geniş etkisini yansıtmaktadır. Furin proteaz enziminin biyolojik süreçlerdeki etkileri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Furin proteaz enziminin biyolojik süreçlerdeki etkileri **(**6)

2.3.1. Tümör Gelişimi ve İlerlemesinde Furinin Rolü

Furin, malignitelerin gelişimi ve progresyonunda merkezi rol oynayan bir proprotein konvertaz olarak tanımlanmıştır. Kolon karsinomu, rabdomiyosarkom, baş-boyun, akciğer, cilt ve beyin tümörlerinde anormal furin ekspresyonunun; hücre proliferasyonu, anjiyogenez, invazyon ve metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir (45,46). Bu etkiler, IGF, PDGF, VEGF-C/D gibi büyüme faktörleri ve MMP14 gibi matriks metalloproteinazların furin aracılığıyla aktive edilmesiyle ilişkilidir (46). Hipoksi altında furin ekspresyonunun artışı, FUR gen promotörlerindeki HIF-1 bağlanma bölgelerine bağlanmaktadır (47). Ayrıca furinin hücre yüzeyine yeniden lokalizasyonu, hücre dışı substratların etkin işlenmesini kolaylaştırır (48). Furin, TGF-β'nın aktivasyonu yoluyla Treg hücrelerini artırarak antitümör bağışıklık yanıtını baskılar (49). TGF-β ve IFN-γ'nın furin ekspresyonunu artırarak pozitif geri bildirim döngüleri oluşturduğu gösterilmiştir (50). IFN-γ, tümör baskılayıcı etkilerine rağmen bazı durumlarda tümör destekleyici rol üstlenebilir (51). Sonuç olarak furin, tümör büyümesi, vaskülarizasyon, metastaz ve immün baskılanma gibi pek çok onkolojik süreci etkileyen çok yönlü bir hedef olarak dikkat çekmektedir. Ancak, furin substratlarının ve diğer PCSK üyelerinin bu süreçlerdeki katkıları hâlâ netleşmemiştir (45).

2.3.2. Furinin Bakteriyel Ekzotoksinlerin Aktivasyonu Üzerindeki Rolü

Furin proteazı, endojen proteinlerin olgunlaştırılmasının yanı sıra birçok bakteriyel ekzotoksinin aktivasyonunda da temel rol oynamaktadır. Bu toksinler genellikle A (enzimatik) ve B (bağlanma) alt birimlerinden oluşur ve etkilerini gösterebilmeleri için furin aracılığıyla proteolitik olarak bölünmeleri gerekmektedir. Örneğin, difteri toksini (R-V-R-R↓) ve Pseudomonas ekzotoksin A (R-Q-P-R↓), endozomda furin tarafından işlenerek konak hücrede protein sentezini durdurur (44, 52, 53). Shiga ve Shiga-benzeri toksinler de furinle kesilebilse de bu bölünme etkinlikleri için zorunlu değildir (54). Şarbon toksininin koruyucu antijen (PA) bileşeni, furin tarafından aktive edilerek ödem faktörü (EF) ve öldürücü faktörün (LF) hücre yüzeyine bağlanmasını sağlar (11). Bu mekanizmalar enfeksiyonun yayılmasını, bağışıklık sisteminin baskılanmasını ve doku invazyonunu kolaylaştırır. Bazı ekzotoksinlerin bakteriyofaj kökenli olması nedeniyle, bunlar için “viral ekzotoksin” tanımı daha uygun

olabilir. Bu çerçevede, furin aracılı proteolitik aktivasyon hem bakterilere hem de onları taşıyan fajlara evrimsel avantaj sağlamaktadır (55).

2.3.3. Viral Protein İşlenmesinde ve Patojenitesinde Furinin Rolü

Viral zarf glikoproteinlerinin büyük bölümü, konak hücrelere başarılı giriş yapabilmek için proteolitik olarak işlenmeye ihtiyaç duyar. Bu işlev çoğunlukla konak hücre proteazları aracılığıyla gerçekleştirilir. Virüsler temel olarak iki endoproteaz tipinden faydalanır: tripsin benzeri ve subtilisin benzeri proteazlar. Subtilisin benzeri bir proteaz olan furin, polibazik dizileri tanıyarak bu bölgelerde kesim yapar. Bu özelliği, furini çok sayıda virüs türünün proteinlerini aktive edebilen geniş etkili bir enzim hâline getirir. Öte yandan, tripsin benzeri proteazlar yalnızca tek bir bazik amino asidin ardından kesim yaptıkları için daha sınırlı bir aktivasyon yetisine sahiptir. Virüslerin spesifik proteaz bağımlılıkları, onların doku tropizmini ve yayılım kapasitesini belirleyebilir. Örneğin, Newcastle hastalığı virüsünün düşük virülanslı suşları sadece solunum epiteline özgü proteazlarla aktive olurken, yüksek virülanslı suşları furin aracılığıyla sistemik enfeksiyona yol açabilir. Benzer şekilde, yüksek patojenik kuş gribi A virüslerinin hemaglutinin (HA) proteinleri de furin tarafından aktive edilerek yaygın doku tutulumu oluşturabilir (56). Bu bağlamda, furinin varlığı ve aktivitesi yalnızca viral giriş mekanizmasını değil, aynı zamanda virüsün patojenitesi ve yayılma potansiyelini de doğrudan belirleyen kritik bir etmendir (57).

2.4. *LAMİACEAE* AİLESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Lamiaceae özellikle etnomedikal kullanım açısından son derece yaygın bir bitki grubudur. Tıbbi özelliklerinin gücü, ihtiva ettikleri yüksek uçucu yağ konsantrasyonuna atfedilir. Lamiaceae ailesi, güçlü kokular yayan, çok sayıda türü kapsayan en geniş dikotiledon ailelerinden biridir. Bu özel yağların önemi ilaçlar, tatlandırıcılar, pestisitler, koku, parfümeri ve kozmetikler gibi çeşitli endüstrilerde dikkate değerdir. Tarihsel olarak, Verbenaceae ailesiyle yakın bir ilişki içinde oldukları kabul edilmiştir. Genellikle *Mentha* olarak bilinen Lamiaceae ailesi, taksonomik olarak farklı çiçek açan bitkilerden oluşur. Yoğun kokulu, tüylü saplı, yeşil ve mor yapraklı, birçok dalı olan çalılardır. Yapraklar saplı, oval ve 5 cm'ye kadar uzunluktadır (58). Lamiaceae ailesi *Origanum, Hyssopus, Lavandula, Mentha* ve *Thymus* gibi birçok bitki türünü kapsar. Antidiyabetik, antikanser, antimikrobiyal, analjezik, hepatoprotektif ve kardiyoprotektif aktivitelere

sahip oldukları rapor edilmiştir (59). Lamiaceae ailesi yaklaşık 236 farklı cinsten oluşmaktadır ve 6900-7200 civarında farklı türü kapsamaktadır (60,61).

2.5. *THYMUS VULGARİS* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Thymus vulgaris (*Lamiaceae*), Akdeniz kökenli, çok yıllık ve aromatik bir bitki olup, tarihsel olarak Avrupa, Kuzey Afrika ve Asya'nın ılıman bölgelerinde hem gıda hem de geleneksel tıp amacıyla kullanılmıştır (62,63). Günümüzde küresel ölçekte yetiştirilmektedir (64). Bitkinin mor ya da beyaz renkli çiçekleri ilkbahar sonu-yaz başında açar; yaprakları yeşilimsi gri renkte, küçük ve sivri uçludur. Ticari açıdan kurutulmuş yaprak, uçucu yağ ve oleoresin üretimi için kültivasyonu yaygınlaşmıştır (63). Ilıman ve güneşli iklimlerde, 10–30 °C sıcaklık aralığında ve deniz seviyesinden 800 m üzerindeki kireçli topraklarda iyi gelişme gösterir (65). Genetik varyasyonlar ve çevresel faktörler, uçucu yağ verimi ve kimyasal içeriğini önemli ölçüde etkilemektedir (66,67). *Thymus vulgaris* uçucu yağları terpenoidlerce zengindir. Başlıca bileşenleri arasında timol, karvakrol, 1,8-sineol, linalool, α-terpineol, borneol, geraniol ve karyofillen yer alır. Ayrıca, fenolik bileşikler yönünden de oldukça zengindir. Tanımlanan bileşikler arasında kafeik asit türevleri, eriodiktiol, apigenin, rozmarinik asit, salviyanolik asitler, sirsimaritin ve sirsilineol öne çıkar. Yapraklardan elde edilen alkolde çözünmeyen fraksiyon, %37 toplam şeker (%8'i üronik asit) ve %7 protein içeriğiyle dikkate değerdir. Fraksiyon; galakturonik ve glukuronik asitler yanında, ksiloz, arabinoz, glukoz, galaktoz ve ramnoz gibi şeker birimlerini; ayrıca az miktarda mannoz ve fukoz içermektedir (68).

2.5.1. *Thymus vulgaris* Bitkisinin Biyolojik Aktiviteleri ve Antikanser Özellikleri

Thymus vulgaris L., geleneksel tıpta uzun süredir kullanılan, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip aromatik bir bitkidir. Solunum yolu enfeksiyonları, sindirim sistemi rahatsızlıkları ve hipertansiyon gibi durumların destekleyici tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (69). Bitkinin antikanser etkileri hem *in vitro* hem de in vivo çalışmalarda ortaya konmuştur. Örneğin, *T. vulgaris*'in meme kanseri modellerinde kemopreventif ve terapötik etkiler gösterdiği, timol bileşeninin ise apoptoz yolunu aktive ettiği bildirilmiştir (70). Ayrıca, *T. vulgaris*'in floresan özellik gösteren akridin turuncusu boyası ile insan papilloma virüsü kaynaklı lezyonlara karşı terapötik potansiyel gösterdiği

raporlanmıştır (71). Kekik yağı, PC3, A549 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı etkili bulunmuş; bu etkinin özellikle karvakrol ve timol gibi bileşenlere atfedildiği belirtilmiştir (72). Ancak, bu bileşenlerin etkisinin bağımsız mı yoksa sinerjik mi olduğu henüz netleşmemiştir. Ayrıca, toksik olmayan dozlarda *T. vulgaris* ekstresinin DNA onarımını artıran antimutajen özellik gösterdiği (73) ve uçucu yağının güçlü antioksidan ve antibiyotik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (74).

2.5.2. *Thymus vulgaris* Bitkisinin Antimikrobiyal, Antioksidan, Antienflamatuar Özellikleri

Oliveira ve arkadaşlarının araştırmasında, *Thymus vulgaris* ekstresinin çeşitli biyofilm oluşturan mikroorganizmalara karşı anlamlı antimikrobiyal etki gösterdiği, TNF-α ve IL-1β düzeylerini modüle ederek antienflamatuar potansiyel sunduğu, ayrıca genotoksik etki oluşturmadığı belirtilmiştir (75). Butt ve arkadaşları (2019), *T. vulgaris* ve *Nigella sativa* uçucu yağlarından izole edilen timokinonun antiproliferatif ve antioksidan aktivitelerini incelemiş, *T. vulgaris*'in timokinon açısından güçlü bir kaynak olduğunu rapor etmiştir (76). Fournomiti ve ekibi (2015), *T. vulgaris* uçucu yağının çoklu ilaca dirençli *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ve *K. pneumoniae* klinik izolatlarına karşı güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmiştir (77). Assiri ve arkadaşları (2016), bu uçucu yağın *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Candida albicans* gibi mikroorganizmalara karşı belirgin aktivite gösterdiğini, soğuk pres yöntemiyle elde edilen yağın hem bakteri hem de mantar suşlarına karşı güçlü antioksidan ve antimikrobiyal etkiler sunduğunu açıklamıştır (78). Galovičová ve ekibi (2021), *T. vulgaris* uçucu yağının 9,89–22,44 mm arasında değişen inhibisyon zonlarıyla orta ila çok güçlü düzeyde antimikrobiyal aktivite sergilediğini; en düşük minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ve *S. aureus* suşlarına karşı elde edildiğini belirtmiştir. Ayrıca, *Penicillium* cinsi mikroskobik mantarların büyümesini baskıladığı da vurgulanmıştır (79).

2.6. *ORİGANUM VULGARE* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Origanum vulgare, *Lamiaceae* familyasına ait, Akdeniz kökenli otsu bir bitki olup; uçucu yağlar (karvakrol, timol, linalool, *p*-simen), flavonoidler, fenolik asitler, triterpenoidler ve steroller gibi pek çok biyoaktif bileşen içermektedir (80–82).

Geleneksel tıpta kramp, şişkinlik, öksürük ve adet düzensizliklerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmış; karminatif, midevi ve balgam söktürücü etkileriyle dikkat çekmiştir (82,83).

Farmakolojik açıdan, *O. vulgare*'nin antimikrobiyal (84), antiviral (85), antioksidan (85), antiinflamatuar (82), antispazmodik (83), antiürolitik (86), antiproliferatif (82,87) ve nöroprotektif (88) etkileri rapor edilmiştir. Özellikle yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde, 16–19 mm inhibisyon çapları ile bakteriyel suşlara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir.

Antifungal ve antiviral potansiyeli de çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiş; *Aspergillus niger* üzerinde 19 mm inhibisyon zonu ile belirgin antifungal etki göstermiştir (89). Ayrıca, uçucu yağının sarı humma virüsüne karşı doğrudan virüs inaktivasyonu yoluyla antiviral etki gösterdiği; bu etkinin CC_{50} < 100 µg/mL ve MIC 3,7 µg/mL düzeylerinde olduğu rapor edilmiştir (90). Ek olarak, fare norovirüsü ve kedi calici virüsü üzerinde sırasıyla 1,62 ve 3,75 log inaktivasyon sağladığı da bildirilmiştir (91). Bu bulgular, *O. vulgare* uçucu yağının hem fungal hem de viral patojenlere karşı önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir.

2.7. *SALVİA OFFİCİNALİS* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Salvia officinalis L., *Lamiaceae* familyasının *Nepetoideae* alt familyasına, *Mentheae* kabilesine ve *Salvia* cinsine ait çok yıllık, çalı formunda bir bitkidir (92). Yaklaşık 1000 türle *Lamiaceae* ailesinin en büyük cinsi olan *Salvia*, başta Akdeniz çevresi olmak üzere Avrupa, Güneydoğu Asya, Orta ve Güney Amerika'da doğal olarak yayılım gösterir (93).

Salvia officinalis, 60 cm'ye kadar boylanabilir; buruşuk yapraklı, tüylü gövde ve dallara sahip olup, Mart–Temmuz ayları arasında çiçeklenir (94). Tarihsel olarak "Kurtuluş Bitkisi" olarak anılan adaçayı, Latince *salvarem* ("iyileştirmek") kökünden türemiştir. Geleneksel tıpta ise aşırı terlemeyi azaltma, boğaz ağrısı tedavisi, adet düzenlenmesi, menopoz belirtilerinin hafifletilmesi, gastrointestinal enfeksiyonlarla mücadele, karaciğer fonksiyonlarını destekleme ve bilişsel kapasiteyi artırma gibi çok çeşitli amaçlarla kullanılmıştır (94).

2.7.1. *Salvia officinalis* Bitkisinin Antimikrobiyal Özellikleri

Salvia officinalis'in %20 etanol ekstresinin, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda *Herpes Simplex Virus-1*'e (HSV-1) karşı antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (95). Abou Baker ve arkadaşları, *S. officinalis* ekstresinin *H5N1 influenza* virüsüne karşı $IC_{50} = 0.41 \pm 0.02$ μg/mL düzeyinde antiviral aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir (96).

Delamare ve ekibi tarafından yürütülen bir çalışmada, *S. officinalis* uçucu yağının *Bacillus cereus, B. megatherium, B. subtilis, Aeromonas hydrophila, A. sobria* ve *Klebsiella oxytoca* suşlarının çoğalmasını etkin biçimde inhibe ettiği; buna karşılık *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde sınırlı etki gösterdiği tespit edilmiştir (97).

2.7.2 *Salvia officinalis* Bitkisinin Antidiyabetik ve Antikanser Özellikleri

Eidi ve arkadaşlarının çalışmasında, streptozotosin (STZ) ile diyabet modeli oluşturulan sıçanlara uygulanan *Salvia officinalis* metanol ekstresinin belirgin hipoglisemik etki gösterdiği rapor edilmiştir (98).

Bir diğer çalışmada, *S. officinalis* propilen glikol ekstresinde rosmarinik, protokateşuik ve salisilik asitler ile ursolik ve oleanolik asit gibi triterpenoidler tespit edilmiş; yüksek doz uygulamanın tümör nekrozunu ve alanını %46 oranında azalttığı, tümör latentlik süresini uzattığı ve karsinom oranlarını iyileştirdiği belirlenmiştir.

Moleküler analizlerde, kaspaz-3 ekspresyonu ve Bax/Bcl-2 oranı artarken, MDA, ALDH1 ve EpCAM düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca, *S. officinalis* uygulaması TGF-β düzeylerini düşürmüş, H3K4me3 metilasyonu azaltmış ve H4K16ac asetilasyonunu artırmıştır. Onkojenik miR-21 ile tümör baskılayıcı miR-145'in ekspresyonu azalırken, diğer mikroRNA'larda anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.

Plazma metabolomik analizlerde BCAA türevli ketoasit düzeylerinde azalma kaydedilmiş, *in vitro* olarak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre canlılığında azalma, kaspaz-3/7 aktivitesi artışı ve mitokondriyal membran bozulması gibi antikanser etkiler gözlemlenmiştir (99).

2.8. *MENTHA PİPERİTA* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Nane (*Mentha piperita*), *Mentha spicata* ile *Mentha aquatica*'nın doğal melezi olup ilk kez 1696'da İngiltere'de tanımlanmış ve günümüzde yaygın olarak yetiştirilmektedir. En bilinen varyeteleri *M. piperita var. officinalis* (beyaz nane) ve *M. piperita var. vulgaris* (kara nane) olup, karakteristik kare gövdeleri ve mızrak yapraklarıyla tanınırlar.

Farmasötik olarak en değerli kısmı, çiçeklenme döneminde toplanan toprak üstü kısımlardan elde edilen uçucu yağıdır. Bu yağ genellikle %0,3–0,4 oranında bulunur ve temel bileşenleri mentol (%28–29), menton (%20–31) ve mentil asetattır (%3–10). Gaz kromatografisi analizleri, yağda 40'tan fazla terpenoid yapılı bileşik tespit etmiştir. Bileşen oranları iklim ve gelişim evresine bağlı olarak değişebilir.

Uçucu yağın yanı sıra, *M. piperita* %19 polifenol, %12 flavonoid, tokoferol, karoten, betain ve kolin gibi çeşitli biyoaktif maddeler içerir. Geleneksel tıpta hazımsızlık, kolik, soğuk algınlığı, ateş ve baş ağrısı tedavisinde yaygın olarak kullanılan bitki; farmakolojik olarak karminatif, antispazmodik, koleretik, analjezik ve dekonjestan özellikleriyle tanınır (100).

2.8.1. *Mentha piperita* Bitkisinin Antimikrobiyal Özellikleri

Mentha piperita'nın antimikrobiyal özellikleri birçok çalışmada ortaya konmuştur. Shalayel ve arkadaşları, bitkiden elde edilen etanol, metanol, etil asetat ve kloroform ekstrelerini değerlendirmiş; en güçlü antibakteriyel etkinin etil asetat ekstresinde görüldüğünü bildirmiştir. Bu ekstre, özellikle çoklu ilaca dirençli *Streptococcus pyogenes* (MIC: 1,25 mg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) ve *Enterococcus faecalis* (MIC: 2,5 mg/mL) gibi suşlara karşı yüksek aktivite göstermiştir (101).

Samie ve arkadaşları, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *E. faecalis* için MBC değerlerini 3,50–>7,50 mg/mL aralığında bildirmiştir (102). Arıdoğan ve ekibi, *M. piperita*'nın yalnızca *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu, *E. coli* üzerinde ise etkisiz olduğunu raporlamıştır (103). Thosar ve Castillo-Juárez'in çalışmaları da MBC ve MIC değerleri bakımından geniş bir etki aralığı ortaya koymuştur (104). Ayrıca, Sujana ve arkadaşları *M. piperita*'dan elde edilen bileşiklerin güçlü antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (105).

2.8.2 *Mentha piperita* Bitkisinin Antioksidan Özellikleri

Sadece gıdalarda değil, aynı zamanda tıbbi bileşiklerde de sentetik antioksidanların yerine kullanılmak üzere doğal antioksidanları kullanmaya yönelik artan bir ilgi vardır (106). Bitki materyallerinin antioksidan aktivitesi, fenolik bileşiklerin miktarıyla pozitif olarak ilişkilendirilmiştir (107). *Mentha piperita* yaprak ekstreleri arasındaki antioksidan aktivite DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testi kullanılarak değerlendirildiğinde, kloroform ekstresinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu (~%91,8), sulu ekstrenin ise en düşük aktiviteye sahip olduğu (~%70) görülmüştür (108). *Mentha piperita* uçucu yağının antioksidan aktivitesinin, başta 1,8-sineol, rotundifolon, mentofuran, pulegon ve mentol olmak üzere yüksek oksijenli monoterpen bileşenlerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (109,110).

Singh ve arkadaşları (2015), *M. piperita*'nın çeşitli ekstrelerinde %70–93 arasında değişen inhibisyon oranları bildirmiş; en yüksek aktivite uçucu yağ ve kloroform ekstresinde kaydedilmiştir (108). Wu ve ekibi, *M. piperita, M. spicata* ve *M. gracilis* türlerinden elde edilen uçucu yağların Fe^{3+} indirgeme ve hücresel antioksidan aktivite (CAA) düzeylerini karşılaştırmıştır. *M. piperita* uçucu yağı, 5 µg/mL ile en yüksek hücresel antioksidan etkiyi gösterirken; diğer türlerde bu değer 100 µg/mL olarak saptanmıştır (111). Uçucu yağın ana bileşenleri arasında mentol (%38), L-mentol (%22), 1,8-sineol (%6) ve neo-mentol (%4) yer almaktadır.

2.8.3 *Mentha piperita* Bitkisinin Terapötik Özellikleri

Mentha piperita'nın terapötik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, bitkinin çeşitli klinik durumlarda potansiyel faydalar sunduğunu göstermektedir. Ardakani ve arkadaşlarının çalışmasında, *M. piperita* içeren bitkisel gargaranın, hematopoietik kök hücre nakli sonrası gelişen oral mukozit üzerinde olumlu etkiler sağladığı, semptomları azalttığı ve destek tedavi ihtiyacını düşürdüğü bildirilmiştir (112). Diş çürüklerine neden olan *Streptococcus mutans*'a karşı, *M. piperita* uçucu yağının (MpUY) kitosan bazlı nanojellerle uygulanması, biyofilm oluşumunu engellemiştir (113). Ayrıca, *M. piperita*, inflamasyon ve fibrozisi azaltarak kutanöz protothecosis tedavisinde etkili bulunmuştur (114).

MpUY'ların *Aspergillus flavus* üzerine antifungal etkisi gösterilmiş ve kapsüllenmiş yağların MİK değeri 500 ppm, serbest formun ise 2100 ppm olarak bildirilmiştir (115). *Rickettsia slovaca* üzerine yapılan bir çalışmada ise MpUY'lar,

enfeksiyondan sonraki 4. günde bakteri seviyesini %0,05'e kadar düşürmüştür (116). Ayrıca *Giardia lamblia* trofozoitlerine karşı antiparazitik etki göstererek yapısal bozulmalara ve yapışma kapasitesinde azalmaya neden olmuş; toksisite göstermemiştir (117).

Hem insan hem de hayvan modellerinde MpUY'ların bağışıklık hücre yanıtlarını artırdığı, trakeada ise prostaglandin ve NO sentaz yolları üzerinden antispazmodik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (118–120). Sinir sistemine yönelik olarak, MpUY'ların asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu yoluyla Alzheimer hastalığı tedavisinde potansiyel taşıdığı, özellikle öjenolün en güçlü inhibitör bileşik olduğu bildirilmiştir (121). IC_{50} değeri 63,916 µg/mL olarak ölçülmüş ve mentol, pulegon, mentofuran gibi monoterpenlerin de AChE inhibitör aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (122). Ayrıca, *M. piperita*'dan sentezlenen gümüş nanopartiküller de anlamlı AChE inhibisyonu göstermiştir (123). Son olarak, bitkinin sulu ekstresi, fluoksetin ve imipramin gibi antidepresanlarla birlikte kullanıldığında bu ilaçların etkilerini artırarak depresyon tedavisinde tamamlayıcı rol üstlenebileceğini göstermiştir (124).

2.9. *MENTHA SPİCATA* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mentha spicata, 30 ila 100 cm yüksekliğe kadar büyüyen çok yıllık bir rizomatöz bitkidir. Sapları dik, dört köşeli, dallı ve tüysüzdür. Yaprakları oval ila lankolat, 2-7 cm uzunluğunda ve dişli kenarlıdır. Çiçek salkımları yoğun, terminal, 3 ila 12 cm uzunluğunda ve 5 ila 10 mm genişliğindedir. İnce başaklardaki pedicellat çiçekler kesik, pembe veya beyazdır (125). *M. spicata*, dünya çapında gıda ve ilaçlara tat vermek için ticari olarak yetiştirilmektedir (126).

Mentha spicata L. (bahçe nanesi), çok yıllık ve dünya genelinde ticari olarak yetiştirilen bir bitki türüdür. Bu bitkinin taze ve kurutulmuş yaprakları, genellikle çay üretiminde ve aromatik madde olarak çeşitli gıda, içecek ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır. (127). *Mentha spicata* gastrointestinal rahatsızlıklar, solunum yolu rahatsızlıkları, karminatif amaçlı, antispazmodik, diüretik ve yatıştırıcı olarak kullanılır. Geleneksel İran tıbbında (128) farklı hazırlama yöntemleri ile (kaynatma, tentür ve tabletler) flatulans tedavisinde kullanılmıştır. Geleneksel İran ilaçlarında bahçe nanesi yaprakları mideyi güçlendirmek için kullanılır ve dispepsi semptomlarına yardımcı olur (129). *Mentha spicata* yağı sakız, kozmetik ve diş macunu hazırlanmasında kullanılan bir tatlandırıcıdır (130).

*M. spicata'*nın kimyasal bileşiminde farklı kemotiplerin varlığını bildirilmiştir. Spicata, doğal olarak yetiştiği gibi, dünya çapında da yetişir ve uçucu yağı esas olarak karvon, karvakrol, trans-karveol, piperiton oksit, limonen, 1,8-sineol, kamfen, p-simen, dihidrokarvon, pulegone, β-karyofilen, germakren D, menton, α-pinen ve linalool'den oluşur. Karvon, *M. spicata* uçucu yağının mutlak baskın bileşeni olarak belirtilir ve ayrıca *M. spicata* uçucu yağında linalool, piperiton, piperiton oksit, menton, izomenton ve pulegone gibi monoterpenler de bulunur (131–134).

2.9.1. *Mentha spicata* Bitkisinin Antimikrobiyal Özellikleri

Zaidi ve Dahiya (2015), *Mentha spicata* yapraklarından elde edilen uçucu yağın antifungal etkisini *Aspergillus niger, Aspergillus spp., Candida albicans* ve *Rhizopus nigricans* türleri üzerinde değerlendirmiştir. En yüksek inhibisyon zonu *A. niger* suşuna karşı (15,7 ± 0,09 mm) gözlemlenirken, *C. albicans* (11,8 ± 0,10 mm) ve *Aspergillus spp.* (13 ± 0,13 mm) türlerine karşı da etkili bulunmuştur. Buna karşın, *R. nigricans* üzerinde anlamlı bir etki saptanmamıştır (135). Benzer şekilde Mkaddem ve ark. (2009), *Mentha spp.*'den elde edilen uçucu yağların geniş spektrumlu antifungal etki gösterdiğini bildirmiştir (136).

Hussain ve arkadaşları, *M. spicata* uçucu yağının test edilen mikroorganizmalara karşı farklı düzeylerde antimikrobiyal aktivite sergilediğini rapor etmiştir. *Staphylococcus aureus* (26,0 mm) ve *Bacillus subtilis* (27,1 mm) en duyarlı bakteriler olarak belirlenmiş; bu suşlar sırasıyla 0,07 ve 0,05 mg/mL'lik MIC değerleri ile en düşük eşiklere sahip olmuştur. En düşük aktivite ise *Escherichia coli*'de gözlemlenmiş (20,3 mm; MIC: 0,21 mg/mL) (137).

Uçucu yağın başlıca bileşenlerinden *karvon* ve *cis-karveol*, sırasıyla 17,5–24,9 mm ve 13,5–30,0 mm inhibisyon zonları ile güçlü antibakteriyel etki göstermiştir. MIC değerleri *karvon* için 0,16–0,33 mg/mL, *cis-karveol* için ise 0,10–0,52 mg/mL arasında değişmiştir. Elde edilen sonuçlar, *M. spicata* yağının Gram-pozitif bakterilere karşı daha yüksek etkinliğe sahip olduğunu ve bu etkinin özellikle yüksek *karvon* ve *cis-karveol* içeriğiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (138).

2.9.2. *Mentha spicata* Bitkisinin Metabolik Hastalıklar Üzerindeki Etkisi

Al-Fartosi ve arkadaşları (2014), *Mentha spicata* yapraklarından elde edilen fenolik bileşiklerin diyabetik sıçanlar üzerindeki etkilerini incelemiş; 14 günlük tedavi

süresince kan glukozu, trigliserit, toplam kolesterol, LDL ve VLDL düzeylerinde düşüş; HDL seviyelerinde ise artış gözlemlenmiştir (139). Bu sonuçlar, *M. spicata*'nın diyabet ve ilişkili komplikasyonlara karşı terapötik potansiyel taşıdığını göstermiştir.

Benzer şekilde, Mushtaq ve arkadaşları (140) ile Bayani ve ekibi (141), farklı dozlarda uygulanan *M. spicata* yaprak ekstrelerinin metabolik parametreleri iyileştirdiğini raporlamıştır. Rakebizadeh ve arkadaşları ise, *M. spicata* köklerinden elde edilen bütanol ekstresinin diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda kan şekeri düzeyini düşürdüğünü ve vücut ağırlığını artırdığını bildirmiştir (142). Ayrıca, *M. spicata* yaprak uçucu yağının, α-amilaz (IC_{50} = 101.72 ± 1.86 µg/mL) ve α-glukozidaz (IC_{50} = 86.93 ± 2.43 µg/mL) enzimleri üzerinde inhibitör etki gösterdiği, bu enzimlerin baskılanmasının karbohidrat sindirimi ve glukoz emilimini azaltarak antidiyabetik etki sağlayabileceği belirtilmiştir (143).

Bu veriler, *Mentha spicata*'nın potansiyel bir doğal antidiyabetik ajan olarak değerlendirilebileceğini; ancak klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

2.9.3. *Mentha spicata* Bitkisinin Antioxidan Özellikleri

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) mitokondriyal solunum zinciri gibi hücresel yapılara zarar vermesiyle ortaya çıkan bir durumdur. Bu süreç, prooksidanlar ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişir. *Mentha spicata*'nın antioksidan kapasitesi çeşitli çalışmalarda DPPH, ABTS ve deoksiriboz bozunma gibi testlerle değerlendirilmiştir (137,144).

Getahun ve arkadaşları (2008), *M. spicata* yapraklarından elde edilen uçucu yağların DPPH (IC_{50} = 5,96 µL/mL) ve deoksiriboz bozunma testlerinde (IC_{50} = 0,57 µL/mL) yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmiştir (144). Nickavar ve arkadaşları (2008), *M. spicata* etanolik ekstresinin DPPH ve ABTS analizlerinde sırasıyla 87,89 µg/mL ve 173,80 µg/mL'lik IC_{50} değerleriyle anlamlı aktivite sergilediğini raporlamıştır (145).

Ebrahimzadeh ve çalışma arkadaşları (2010) ise sekiz farklı *in vitro* yöntemle *M. spicata*'nın antioksidan aktivitesini incelemiş; en yüksek aktivitenin DPPH (IC_{50} = 105.8 ± 3.98 µg/mL), ardından nitrik oksit giderme (IC_{50} = 210.6 ± 7.7 µg/mL) ve

hidrojen peroksit giderme (IC_{50} = 631.1 ± 26.0 µg/mL) yöntemleriyle saptandığını belirtmiştir (146).

2.10. *ASTERACEAE* AİLESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Asteraceae (ayçiçeğigiller) familyası, 1600'ün üzerinde cins ve 25.000'i aşkın tür ile dünyanın en büyük çiçekli bitki ailelerinden biridir (147). Tıbbi açıdan önemli birçok türü bünyesinde barındıran bu familya, geleneksel tıpta geniş bir kullanım geçmişine sahiptir. Örneğin, *Carduus* türleri antihemorroidal ve kardiyotonik; *Onopordum tauricum* karaciğer hastalıklarında; *Onopordum acanthium* ise antipiretik ve diüretik olarak değerlendirilmiştir. Türkiye'de *Centaurea solstitalis* mide ve soğuk algınlığı gibi rahatsızlıklarda, *Tanacetum parthenium* ise baş ağrısı ve romatizma tedavisinde kullanılmaktadır (148,149). Bunun yanında *Bidens pilosa, Carthamus tinctorius* ve *Emilia sonchifolia* gibi türler Asya'da çeşitli enfeksiyon ve enflamatuar hastalıklarda halk hekimliğinde yer bulmuştur (150,151). *Cichorium intybus* (hindiba) ise hem karaciğer rahatsızlıkları hem de Ayurveda'da splenomegali ve ateş tedavisinde kullanılan önemli bir bitkidir (152,153). Familya üyeleri ağaç, çalı ve otsu formda olup morfolojik çeşitlilik sergiler; çiçekleri genellikle küçük ve kümelenmiş yapıdadır (151,154,155). Türkiye'de geleneksel olarak kullanılan türler arasında *Achillea aleppica, Achillea biebersteinii, Chrysophthalmum montanum, Matricaria aurea* ve *Notobasis syriaca* yer almaktadır. Bu türler çeşitli şekillerde çay, lapa veya doğrudan tüketim yoluyla karın ağrısı, bronşit, boğaz enfeksiyonları ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (156). *Asteraceae* üyeleri, uçucu yağlar, fenolik asitler, flavonoidler, saponinler ve polisakkaritler açısından zengin fitokimyasal içeriklere sahiptir. Bu bileşenler sayesinde antioksidan, antiinflamatuar, antimikrobiyal, diüretik ve yara iyileştirici özellikler sergilerler (148). Özellikle *Cirsium, Onopordum, Centaurea* ve *Carduus* türlerinde yüksek düzeyde fenolik ve flavonoid içerik saptanmıştır. *Taraxacum* ve *Cichorium* gibi cinslerde ise kafeik, klorojenik ve askorbik asit ile birlikte triterpen bileşikler (örn. taraksasterol, α- ve β-amirin) bulunmaktadır (157,158). Bu bileşenler, serbest radikal giderici etkileriyle hücresel koruma sağlarken, birçok *Asteraceae* türü ayrıca prebiyotik özellik gösteren inülin içeriğiyle de dikkat çekmektedir (159).

2.10.1. *Silybum marianum* Bitkisinin Genel Özellikleri

Silybum marianum, 200 cm'ye kadar uzayabilen, dikenli yapraklara ve kırmızı-mor çiçek başlarına sahip iki yıllık bir bitkidir. Süt beyazı damarlarla bezenmiş yaprakları ve pamuksu gövdesi ile karakterizedir. Avrupa, Asya ve Amerika'da yaygın olarak yetişmektedir (160). Tohumları, başta *silybin* (silibinin A ve B), *silikristin, silidianin* ve *apigenin* olmak üzere çeşitli flavonolignan bileşikleri içermektedir. Bu bileşikler %4 oranına kadar *silymarin* kompleksini oluşturur. Ayrıca tohumlar, terapötik etkisi bulunmayan yaklaşık %20 oranında sabit yağ da içermektedir (160–162). Silymarin gastrointestinal sistemden kolayca emilir, 2–4 saat içinde plazmada pik seviyeye ulaşır ve yaklaşık 6 saatlik biyolojik yarı ömre sahiptir. Vücuttan %80 oranında safra ile atılır. Kompleksin en etkili bileşeni olan *silibin*, safra içerisindeki konsantrasyon bakımından diğer bileşenlerden yaklaşık 60 kat daha fazladır (163). Farmakolojik olarak *S. marianum*; hepatoprotektif, renoprotektif, hipolipidemik, anti-aterosklerotik, kardiyovasküler koruyucu, anti-kanser ve anti-Alzheimer etkiler göstermektedir. Ayrıca sirozlu hastalarda insülin direncini azaltıcı etkileri bildirilmiştir. Geleneksel tıpta özellikle Avrupa'da, karaciğer hastalıklarının destekleyici tedavisinde sıkça kullanılmaktadır (164,165).

2.10.2. *Silybum marianum* Bitkisinin Karaciğer Üzerindeki Etkileri

Silybum marianum, geleneksel tıpta yaygın olarak karaciğer rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmakta olup, bu kullanım alanı deneysel çalışmalarla da desteklenmiştir. Bitkinin hepatoprotektif etkisi, farklı modellerde yapılan araştırmalarda açıkça ortaya konmuştur.

Valenzuela ve arkadaşları, 200 mg/kg dozunda intraperitoneal uygulanan silymarin ekstresinin glutatyon düzeylerini artırarak karaciğer dokusunu koruduğunu bildirmiştir (166). Daha yüksek dozda (800 mg/kg) uygulama ise hepatosit nekrozunu, lipid peroksidasyonunu ve bilirubin düzeylerini anlamlı şekilde azaltmıştır (167). Muriel ve Mourelle, silymarinin karbon tetraklorür kaynaklı hasarı serbest radikal zincir reaksiyonlarını engelleyerek önlediğini göstermiştir (168).

Mereish ve arkadaşları, silymarin kompleksinin lipojenik serum enzimlerinin inhibisyonu yoluyla karaciğer hasarını azalttığını belirtmiştir (169). Muriel ve ekibi ile Mukherjee ve arkadaşları da parasetamol kaynaklı hepatotoksisiteye karşı silymarinin koruyucu etkilerini doğrulamıştır (170,174).

Wu ve arkadaşları, silymarinin iskemik karaciğer hasarını histolojik ve biyokimyasal düzeyde azalttığını ortaya koymuştur (171). Gupta ve meslektaşları ise pirogallol kaynaklı toksisiteye karşı serum ve doku düzeylerinde oksidatif stres belirteçlerinde iyileşme sağlandığını raporlamıştır (172).

Etanol ve doksorubisin gibi toksinlere karşı da koruyucu etkiler saptanmıştır (173,175). Bilgin ve arkadaşları kolestatik karaciğer hasarına karşı, Kelany ve Abdallah ketoprofen kaynaklı hepatotoksisiteye karşı, Jalali ve arkadaşları ise kurşunla indüklenen karaciğer hasarına karşı anlamlı hepatoprotektif etkiler bildirmiştir (176–178).

2.10.3. *Silybum marianum* Bitkisinin Böbrek Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi

Silybum marianum ve başlıca bileşenleri olan silymarin ile silibin, çeşitli nefrotoksisite modellerinde anlamlı renoprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiş doğal bileşiklerdir. Karimi ve arkadaşları, bitkinin metanolik tohum ekstresinin sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarında 50 mg/kg dozda belirgin koruyucu etki sağladığını raporlamıştır (179). Oral yolla verilen 60 mg/kg silymarin, sisplatin ile indüklenen tübüler nekroz ve biyokimyasal bozulmaları doza bağımlı olarak azaltmıştır.

Gentamisin (180), doksorubisin (181) ve böbrek iskemisi (182) modellerinde silymarin; serum kreatinin, üre ve malondialdehit (MDA) düzeylerini azaltarak nefroprotektif etkiler sergilemiştir. Baradaran ve Rafieian-Kopaei, silymarinin bu parametrelerde sağladığı iyileşmelerin böbrek fonksiyonları üzerinde anlamlı bir düzelme sağladığını belirtmiştir (183).

Silibin özelinde, gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede serum albümin düzeylerini artırdığı ve kreatinin ile üre düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (184). Kurşun ve TNF-α ile oluşturulan nefrotoksisite modellerinde de silymarin önemli koruyucu etkiler göstermiştir (185,186). Diklofenak toksisitesine karşı da benzer faydalar gözlenmiştir (187).

Silibin, siklosporin kaynaklı hasarda 5 mg/kg dozda uygulanarak kreatinin düzeylerini düşürmüş ve lipid peroksidasyonunu baskılamıştır (188). Ayrıca, Bokemeyer, Gaedeke ve Khazim gibi araştırmacılar tarafından cisplatin toksisitesine karşı gösterdiği koruyucu etkiler doğrulanmıştır (189–191).

Tüm bu bulgular, silymarin ve türevlerinin nefrotoksisiteye karşı potansiyel renoprotektif ajanlar olarak değerlendirilebileceğini ve böbrek hastalıklarının destekleyici tedavisinde fayda sağlayabileceğini göstermektedir.

2.10.4. *Silybum marianum* Bitkisinin Antidiabetik Etkisi

Çeşitli çalışmalar, *Silybum marianum*'un silymarin içeriği sayesinde anti-hiperglisemik ve hipolipidemik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, 20 mg/kg dozunda uygulanan sulu ekstre, kan glukoz düzeylerinde anlamlı düşüş sağlamıştır (192). Etanolik ekstre ise glukoz, ALT, AST, kreatinin, üre ve lipid profili gibi biyokimyasal parametreleri iyileştirmiştir (193).

Villiger ve arkadaşları, bitki meyvesinden elde edilen etanolik ekstrenin 100 µg/mL konsantrasyonda α-glukozidaz enzimini %80 oranında inhibe ettiğini ve bu etkinin standart inhibitör akarbozla karşılaştırılabilir olduğunu bildirmiştir (194). Vessal ve arkadaşları, 1,2 g/kg dozundaki çekirdek ekstresinin serum glukoz, kreatinin, üre ve lipid peroksidasyon düzeylerini azalttığını belirtmiştir (195). Shakeel ve çalışma arkadaşları, tohum ve yaprak ekstrelerinin antidiyabetik etkilerini hayvan modellerinde doğrulamıştır (196).

Normoglisemik sıçanlarda silymarinli tohum ekstresi, gemfibrozile kıyasla glukoz ve lipoprotein düzeylerini düşürmüş; toplam antioksidan kapasiteyi artırmıştır (197,198). Ayrıca, Tuorkey'in çalışmasında 120 mg/mL dozundaki kronik tedavinin AST, ALT, glukoz, kolesterol ve trigliserit seviyelerini anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (199). S. marianum özlerinden izole edilen 16 bileşikten bazıları α-glukozidaz ve PTP1B enzimlerini inhibe etmiş; flavonoidlerin insülin sinyal yolunu düzenleyerek antidiyabetik etki gösterebileceği belirlenmiştir (200).

2.10.5. *Silybum marianum* Bitkisinin Antimikrobiyal Özellikleri

Silybum marianum özlerinin antimikrobiyal potansiyeli, farklı patojenik bakteri ve mantar türleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Silibin, *Bacillus subtilis* (IC_{50} = 11,8 µg/mL) ve *Staphylococcus epidermidis* (IC_{50} = 15,7 µg/mL) gibi Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör etki göstermiştir (201). Hekzan ekstresi ise *Pantoea gaviniae*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter ludwigii* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite sergilemiştir (202). Silymarin ve silibinin *Escherichia coli* (MIC = 512 µg/mL ve 64 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 1024 µg/mL) ve

Staphylococcus aureus (MIC = 1025 µg/mL) gibi suşlar üzerinde etkili bulunmuştur (203).

Antifungal etkiler açısından, silymarin ve silibininin *Candida albicans* üzerinde anlamlı aktivite gösterdiği; bu etkinin hem membran geçirgenliğini artırma hem de hücre içi iyon dengesini bozarak apoptozu tetikleme yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir (204). Ayrıca, silibin bileşiği *Herpes simpleks virüs* tip 2 (HSV-2) üzerine antiviral etkisiyle dikkat çekmiş; IC_{50} değeri 5 µg/mL ve düşük sitotoksisite düzeyi (CD_{50} = 378 µg/mL) ile potansiyel bir antiviral ajan olarak değerlendirilmiştir (205).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda furin proteaz enzimini inhibe etme potansiyeline sahip *Lamiacae* ve *Asteraceae* ailesine ait *Origanum vulgare, Thymus vulgaris, Mentha piperita, Mentha spicata, Salvia officinalis* ve *Silybum marianum* bitki türlerinin hekzan, kloroform, etil asetat ekstreleri hazırlanarak elde edilen ekstrelerin fenolik bileşik içerikleri HPLC ile tespit edilmiştir (Ek 2-14). Ardından, ekstrelerin Furin proteaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisi, Furin Proteaz Enzim Kiti aracılığıyla spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

3.1. BİTKİSEL MATERYAL

Çalışmada *Lamiacae* ailesinden *Origanum vulgare, Thymus vulgaris, Mentha piperita, Mentha spicata, Salvia officinalis, Asteraceae* ailesinden *Silybum marianum* kullanılmıştır. *Silybum Marianum* aktardan temin edilmiştir. *Origanum vulgare, Thymus vulgaris, Mentha piperita, Mentha spicata, Salvia officinalis* Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme alanlarında TÜBİTAK 120 O 511 nolu proje kapsamında yetiştirilen örneklerden temin edilmiştir. Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi olan Prof. Dr. İsa Telci, bu bitkilerin tescilli çeşitlerinden kontrollü bir şekilde yetiştiriciliğini yaptığını ve temin edilen bitki türlerinin, tür sertifika bilgilerinin üniversite envanterinde kayıtlı olduğunu bldirmiştir.

Bitkiler 2022 yılının Ağustos-Eylül aylarında hasat edilmiş. Daha sonra gölgede kurutma tekniği ile Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesinde kurutularak toplanmıştır. Laboratuvar çalışmalarının yapılabilmesi için SBÜ DETUAM (Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi) Validebağ Araştırma Parkına getirilmiş. Burada ileri analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bitki görselleri Resim 3.1'de verilmiştir.

Thymus vulgaris *Origanum vulgare*



Salvia oficinalis *Mentha piperita*



Mentha spicata *Silybum marianum*



Resim 3.1: Çalışmada kullanılan bitki görselleri (206)

3.2. KİMYASAL MALZEMELER

3.2.1 Kullanılan Çözücü ve Kimyasal Maddeler

- Etanol (Ethanol, CAS Number: 64-17-5) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Hekzan (Hexane, CAS Number: 110-54-3) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Etil asetat (Ethyl acetate, CAS Number: 141-78-6) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- HCl (Hydrochloric acid, CAS Number: 7647-01-0) (Sigma-Aldrich, Almanya)

3.2.2 Fenolik Bileşik Standartları

- Gallic acid, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 149-91-7, Product No. PHL89198
- 4-hydroxybenzoic acid, 99.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 99-96-7,Product No. PHL83051
- Chlorogenic acid, ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 327-97-9,Product No. PHL89175
- Vanilic acid, ≥97.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 121-34-6, ProductNo. 94770
- Caffeic acid, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 331-39-5, ProductNo. C0625
- Epikateşin, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 490-46-0, ProductNo. E4018
- p-Kumarik Asit, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 501-98-4,Product No. C9008
- Ferulic acid, ≥99.0% (HPLC), Supelco CAS Number: 1135-24-6, Product No.90034
- Salicylic acid, ≥99.0%, Sigma Aldrich CAS Number: 69-72-7, Product No.PHL80529
- Rutin ≥94.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 207671-50-9, Product No.R5143
- Chicoric acid, ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 6537-80-0, ProductNo. C7243

- Apigenin-*7*-*O*-glucoside, ≥97.0% (HPLC), Supelco CAS Number: 578-74-5, Product No. 44692
- Sinnamik asit, ≥99.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 140-10-3, Product No. 8.00235
- Kuersetin, ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 117-39-5, Product No.Q4951
- Naringenin, ≥95.0%(HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 67604-48-2, Product No. PHL89738

3.2.3. Kullanılan Alet ve Gereçler

- Rotary Evoporator (Buchi, İsviçre)
- Manyetik karıştırıcı: (Isaolab, Almanya)
- Orbital çalkalayıcı: (Onilab, ABD)
- Ultrasound Sonikatör: (Isolab, İstanbul, Türkiye)
- Spektrofotometre mikroplak okuyucu: (BioTek Synergy NEO2, ABD)
- Derin Dondurucu (-86 ºC): (PHCbi, Japonya)
- HPLC: Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus HPLC ve PDA Dedektör (Shimadzu, Kyoto, Japonya)
- HPLC Kolonu: Phenylhexyl 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP) C18 Kolon (GL Sciences Inter Sustain, Japan
- Buzdolabı: (Bosch, Türkiye)

3.3. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

3.3.1. Ekstrelerin Hazırlanması

Her bitki çeşidinin kurutulmuş herbaları öğütücü ile toz haline getirildi. Elde edilecek bitki ekstreleri için erlenmayerlere 20'şer gr öğütülmüş kuru bitki üzerine 350'şer mL hekzan, kloroform, etil asetat eklendi ve orbital çalkalayıcıda 2 saat karıştırıldı. Daha sonra ekstrelerin verimini artırmak için ekstreler 24 saat bekletildi, 24 saat sonra erlen kabına süzülen ekstre çözeltilerinden filtre kağıdı ile katı kalıntıların ayrışması sağlandı. Sonrasında rotary evaporatör cihazı ile düşük basınç altında çözücülerin uzaklaştırılması sağlandı (Ek 1).

HPLC için elde edilen ekstrelerden 5 mg alınıp 1 mL asetonitril, 4 mL distile su kullanılarak 1mg/mL olacak şekilde stok çözelti hazırlanıp HPLC analizleri yapıldı.

3.3.2. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiklerin Kantitatif Analizi

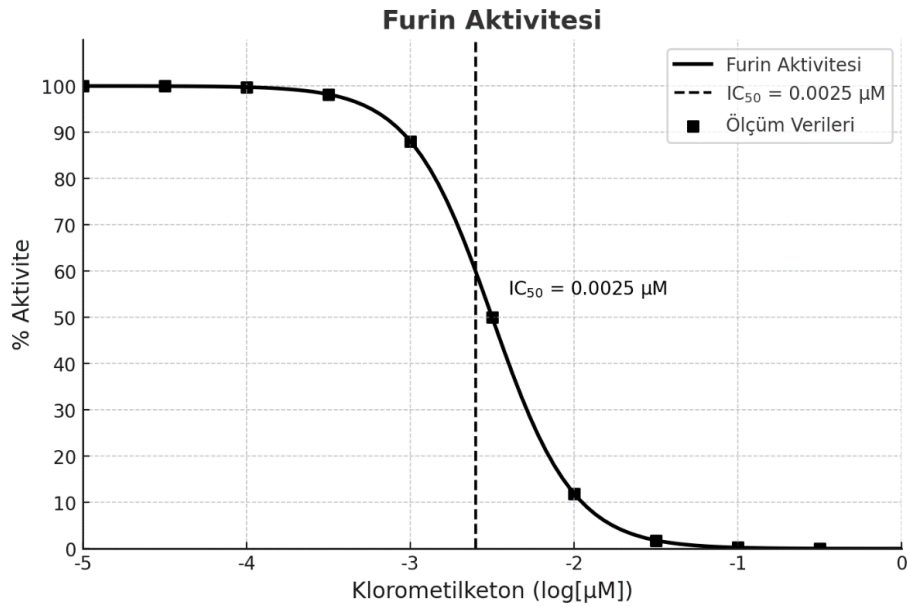
Fenolik bileşiklerin bitki ekstrelerindeki miktarlarını belirlemek için Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus model HPLC cihazı kullanıldı, dedektör olarak fotodiyot detektörü (PDA) tercih edildi. Analizde, GL Sciences InterSustain marka Fenilheksil 3 µm, 4,6 mm x 150 mm boyutlarında C6 ters faz kolonu kullanıldı. Mobil faz olarak asetonitril (Mobil faz B) ve su (%0,1 formik asit) (Mobil faz A) kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlandı ve mobil faz akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlandı. Her bitki ekstresi ve standart için 1 mg/mL stok çözeltiler hazırlandı. Standart bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerle kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Ekstrelerin içerdiği fenolik bileşik miktarları bu kalibrasyon grafikleri kullanılarak kantitatif olarak belirlendi. Çalışmada 16 farklı fenolik bileşik kullanıldı, bunlar; 4-Hidroksibenzoik asit, rutin, kuersetin, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kikorik asit, *p*-kumarik asit, sinnamik asit, vanilik asit, apigenin-*7-O*- glikozit, salisilik asit, epikateşin, naringenin ve eriositrin. Her bir fenolik bileşik, maksimum absorbans verdiği dalga boyunda (nm) değerlendirilerek kantitatif hesaplamalar yapıldı. Her ekstre için değerlendirilen fenolik bileşiklerin miktarı mg/g ekstre olarak hesaplanarak verilmiştir.

3.3.3. Spektrofotometre ile Bitki Ekstrelerinin İnhibisyon Yüzdelerinin Değerlendirilmesi

Bitki ekstrelerinin Furin Proteaz İnhibisyon yüzdelerinin değerlendirilmesi için BioTek Synergy NEO2, ABD model λexc/λem=380 nm/460 nm dalga boyu okuyabilen Spektrofotometre kullanıldı. BPS Bioscience Furin Proteaz Analiz Kiti (Şekil 3.1) kullanılarak spektrofotometre öncesi hazırlık yapıldı. Kit 96 kuyucuklu mikropalet, 3 µg Rekombinant İnsan Furin Proteini, 50 µl Furin Proteaz substratı, 25 mL Furin Analiz Tamponu, 20 µL Klorometilketon (inhibitör kontrol) içermekteydi. Furin Proteaz enzimi, analiz tamponu ile 0,5 ng/µL (her reaksiyon için 25 ng) olacak şekilde seyreltildi. 50 µL seyreltilmiş Furin enzim solüsyonu "Pozitif Kontrol", "İnhibitör Kontrol" ve "Test Örneği" olarak ayarlanmış kuyucuklara ilave edildi. 100 µM Klorometilketon 0,5 µM

olacak şekilde seyreltildi. 10 µL Klorometilketon (0,5 µM), "İnhibitör Kontrol" olarak seçilmiş kuyucuğa ilave edildi. Bitki ekstreleri son hacim 100 µL olacak şekilde 10 µL tampon çözeltisi eklenerek 0,05 µM final konsantrasyona getirildi ve 10'ar µL "Test Örneği, "Blank" ve "Pozitif Kontrol" kuyucuklarına eklendi. 500 µM Furin Proteaz substratı, tampon çözelti ile 5 µM solüsyona seyreltildi. Tüm kuyucuklara 40 µL substrat solüsyonu ilave edildi. Çözeltilerin eklendiği mikropalet oda sıcaklığında 30 dakika inkubasyona bırakıldı. 380 nm dalga boyunda uyarı ve 460 nm dalga boyunda emisyon yapabilen bir mikropalet okuma florimetresinde floresan yoğunluğunu ölçüldü. Blank değeri diğer tüm değerlerden çıkarıldı. Farklı test örnekleri için Furin Proteaz Enziminin % inhibisyon değeri:

% İnhibisyon = [AKontrol - AÖrnek / AKontrol] x 100 (**A**: Absorbans) formülü ile hesaplandı.



Şekil 3.1: BPS Bioscience furin proteaz analiz kiti klorometilketon furin aktivite grafiği

3.4. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiki analizler IBM SPSS Statistics 25 ve GraphPad Prism 9 ile yapıldı. % 95 güven aralığı (CI) kullanıldı. Tüm testlerde $\alpha = 0,05$ kabul edildi. p Değerleri: $p < 0,05$ "anlamlı", $p < 0,01$ "yüksek anlamlı", $p < 0,001$ "çok yüksek anlamlı" olarak raporlandı. Shapiro-Wilk testi ile verilerin normal dağılıma uygunluğu değerlendirildi. Levene Testi ile gruplar arası varyans homojenliği kontrol edildi. Normallik veya homojenlik sağlanmadığı durumlarda Kruskal-Wallis H Testi ve Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Çözücü türleri ve kombinasyon grupları arasındaki inhibisyon farklılıklarını test etmek için Tek Yönlü Anova Testi kullanıldı. Anova sonucu anlamlı çıktığında ($p < 0,05$), Tukey HSD testi ile grup içi ikili karşılaştırmalar yapıldı. Aynı bitkinin farklı çözücülerle karşılaştırılması için Bağımsız Örneklem t-Testi uygulandı. Fenolik Bileşik konsantrasyonları ile inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkiyi ölçmek için Pearson Korelasyon Testi uygulandı. Bileşenlerin inhibisyon üzerindeki etkileşimlerini modellemek için Çoklu Lineer Regresyon Testi yapıldı:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \beta 0 + \beta 1X1 + \beta 2X2 + \beta 3X1X2 + \epsilon$$

Burada $X1$ ve $X2$, etkileşime giren bileşenlerin konsantrasyonlarını, β ise regresyon katsayılarını temsil eder.

Fenolik bileşik kombinasyonlarının etkileşimini test etmek için Etkileşimli Anova Testi ($İnhibisyon \sim Bileşik\ A \times Bileşik\ B \times Bileşik\ C$), Bliss Bağımsızlık Modeli ($Beklenen\ Etki = E_a + E_\beta - E_a \times E_\beta \qquad Sinerji\ İndeksi = Gözlenen\ Etki - Beklenen\ Etki$) kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında kullanılan bitkilerin (*Origanum vulgare, Thymus vulgaris, Mentha piperita, Mentha spicata, Salvia officinalis, Silybum marianum, Origanum vulgare*) ekstreleri hazırlandı. Elde edilen ekstre miktarları ve ham ekstre verimleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Farklı çözücülerle elde edilen bitki ekstrelerinin verimleri

Bitki Türü	**Kullanılan çözücü türü ve miktarı (mL)**	**Kullanılan Bitki miktarı (g)**	**Ekstre miktarı (g)**	**Verim %**
Origanum vulgare	350 mL Hekzan	20	1,18	5,9
Origanum vulgare	350 mL Kloroform	20	0,51	2,55
Thymus Vulgaris	350 mL Etilasetat	20	0,617	3,085
Thymus Vulgaris	350 mL Kloroform	20	0,42	2,1
Mentha Piperita	350 mL Hekzan	20	0,31	1,55
Mentha Piperita	350 mL Kloroform	20	0,41	2,05
Mentha Spicata	350 mL Hekzan	20	1,82	9,1
Mentha Spicata	350 mL Etilasetat	20	0,43	2,15
Mentha Spicata	350 mL Kloroform	20	0,33	1,65
Salvia Oficinalis	350 mL Hekzan	20	0,2	1
Salvia Oficinalis	350 mL Etilasetat	20	0,42	2,1
Salvia Oficinalis	350 mL Kloroform	20	0,665	3,325
Silybum Marianum	350 mL Hekzan	20	0,43	2,15

4.1. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR

Her bitki ekstresinden Tablo 4.2'de gösterilen kadar tartılarak numuneler için 1 mg/mL stok çözeltiler hazırlandı. Standart bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Böylece, ekstrelerin içerdiği fenolik bileşik miktarları kantitatif olarak belirlendi. 16 farklı fenolik bileşik çalışıldı, bunlar; 4- Hidroksibenzoik asit, rutin, kuersetin, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kikorik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit, vanilik asit, apigenin-7-O- glikozit, salisilik asit, epikateşin, naringenin ve eriositrin. Her bir fenolik bileşiğin absorbansının en yüksek olduğu dalga boyu (nm) dikkate alınarak kantitatif hesaplamalar yapılmıştır. HPLC analizinde bazı fenolik bileşikler her ekstre ve bitki türü için tespit

edilemediğinden bu bileşikler değerlendirme dışı bırakılmıştır. Tablo 4.3'de HPLC analizinin sonuçlarını verilmiştir.

Tablo 4.2: Bitki ekstreleri numune ağırlıkları

Bitki Ekstreleri	**Ekstre numarası**	**Numune ağırlığı**
Origanum vulgare (Hekzan)	1	10,3 mg
Origanum vulgare (Kloroform)	2	10,4 mg
Mentha piperita (Hekzan)	3	13,1 mg
Mentha piperita (Kloroform)	4	16,1 mg
Mentha spicata (Hekzan)	5	6,8 mg
Mentha spicata (Kloroform)	6	12,1 mg
Mentha spicata (Etil asetat)	7	13,4 mg
Salvia oficinalis (Hekzan)	8	17,3 mg
Salvia oficinalis (Kloroform)	9	11 mg
Salvia oficinalis (Etil asetat)	10	13,4 mg
Thymus vulgaris (Kloroform)	11	12,7 mg
Thymus vulgaris (Etil asetat)	12	14 mg
Silybum marianum (Hekzan)	13	40,3 mg

Tablo 4.3: Bitki ekstreleri fenolik bileşik içerikleri

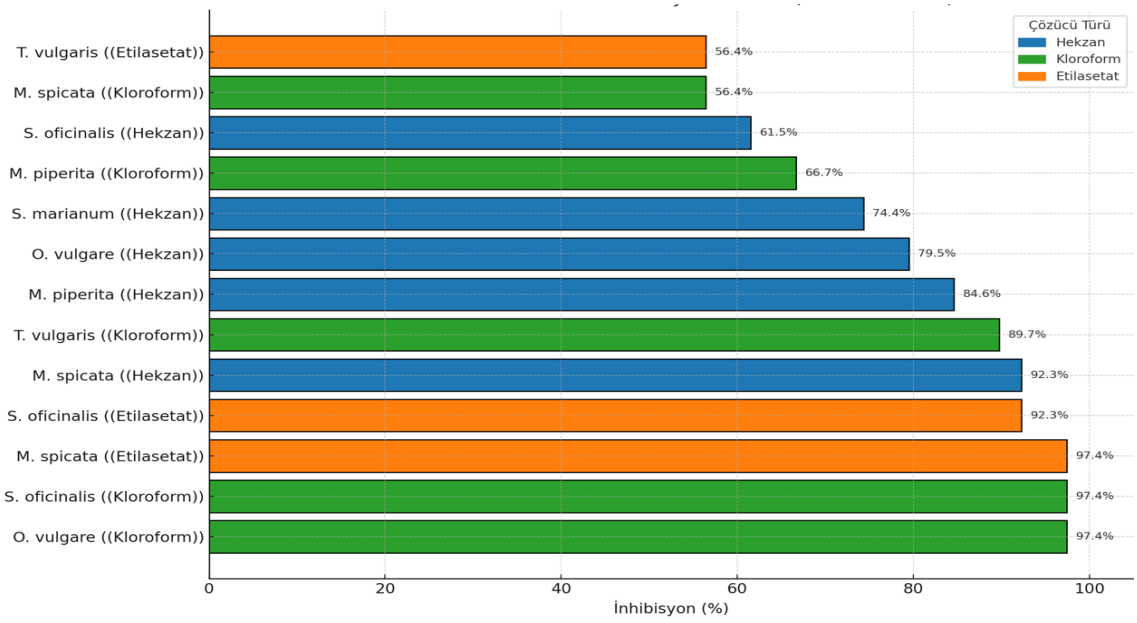
Bitki Ekstreleri	**Kuersetin mg/g ekstre**	**Rutin mg/g ekstre**	**Epikateşin mg/g ekstre**	**Sinnamik Asit mg/g ekstre**	**Naringenin mg/g ekstre**	**Apigenin-7-O-glukozit mg/g ekstre**	**P-kumarik Asit mg/g ekstre**	**Toplam mg/g ekstre**
Origanum vulgare (Hekzan)	0,568	0	0	0	0	0	0	0,568
Origanum vulgare (Kloroform)	0	0,051	2,277	0,023	0	0	0	2,351
Mentha piperita (Hekzan)	0,344	0	0	0,089	0	0	0	0,433
Mentha piperita (Kloroform)	0	0,413	0	0,07	8,58	0	0	9,063
Mentha spicata (Hekzan)	0,233	0	0	0,066	0	0	0	0,299
Mentha spicata (Kloroform)	0,061	0	0	0	16,292	0	0	16,353
Mentha spicata (Etilasetat)	0,07	1,555	0	2,509	5,315	0	0	9,449
Salvia oficinalis (Hekzan)	0,084	0	0	0	0	0	0	0,084
Salvia oficinalis (Kloroform)	0	0,225	0	0,021	0	0	0	0,246
Salvia oficinalis (Etilasetat)	0	0	0	0	0	0,457	0,055	0,512
Thymus vulgaris (Kloroform)	2,71	0	0	0,52	0	0	0	3,23
Thymus vulgaris (Etilasetat)	0,289	0	0	0,558	0	0,049	0	0,896
Silybum marianum (Hekzan)	0,165	0	0	0	0	0	0	0,165

4. 2. FURİN PROTEAZ İNHİBİSYON BULGULARI

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda elde edilen furin yüzde inhibisyon oranları Tablo 4.4'de verilmiştir. Bitki ekstrelerinin furin inhibisyon yüzdeleri çubuk grafikler görselleştirilmiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.4: Bitki ekstreleri furin inhibisyon oranları

Bitki Ekstreleri	**% İnhibisyon**
Origanum vulgare Kloroform	97,43
Salvia officinalis Kloroform	97,43
Mentha spicata Etilasetat	97,43
Salvia officinalis Etilasetat	92,30
Mentha spicata Hekzan	92,3
Thymus vulgaris Kloroform	89,74
Mentha piperita Hekzan	84,61
Origanum vulgare Hekzan	79,48
Silybum marianum Hekzan	74,36
Mentha piperita Kloroform	66,66
Salvia officinalis Hekzan	61,53
Mentha spicata Kloroform	56,41
Thymus vulgaris Etilasetat	56,41



Şekil 4.1: Bitki ekstrelerine göre ortalama inhibisyon yüzdeleri

4.3. FURİN PROTEAZ İNHİBİSYONU VE FENOLİK BİLEŞİK İLİŞKİSİ

Bu çalışmada, bitki ekstrelerinin inhibisyon yüzdeleri ve fenolik bileşik içerikleri incelenmiş olup, elde edilen sonuçlar istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD post-hoc testi, normal olmayan veriler için Kruskal-Wallis H testi ve Mann-Whitney U testi uygulandı. Fenolik bileşiklerin inhibisyon üzerindeki etkileri Pearson korelasyon analizi ve çoklu lineer regresyon ile modellendi. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi $\alpha = 0,05$ olarak kabul edildi. En Yüksek İnhibisyon Gösteren Ekstreler *Origanum vulgare* (kloroform) ve *Mentha spicata* (etilasetat) olarak tespit edildi. *Origanum vulgare* (Kloroform) %97,44 ± 0,12 inhibisyon gösterdi (ANOVA: $F(2, 9) = 45,6$, $p < 0,001$). *Origanum vulgare* (Kloroform) Epikateşin (2,277 mg/L) ve Rutin (0,051 mg/L) kombinasyonu ile en yüksek aktiviteye sahip ekstrelerden biri oldu. *Mentha spicata* (Etilasetat) %97,44 ± 0,08 inhibisyon gösterdi (ANOVA: $F(2, 9) = 38,9$, $p < 0,001$). *Mentha spicata* (Etilasetat) Kuersetin, rutin, Sinnamik asit ve Naringenin fenolik bileşiklerini içeriyordu. En Düşük inhibisyon gösteren ekstreler naringenin içeren *Thymus vulgaris* (Etilasetat) (%56,41 ± 1,2 inhibisyon)ve *Mentha piperita* (Kloroform) (%66,66 ± 0,9 inhibisyon) oldu . Tek yönlü ANOVA Testi ile bitki ekstrelerinin içerdiği fenolik bileşik kombinasyonları (tekli, ikili, üçlü, dörtlü) analiz edildi. Çalışmada, fenolik bileşiklerin kombinasyonlarına göre sınıflandırılması yapılmıştır. Tekli kombinasyonlar, yalnızca bir bileşiğin >0 mg/L konsantrasyonda bulunduğu ve diğer tüm bileşiklerin 0 mg/L olduğu örnekleri kapsamaktadır. İkili kombinasyonlar, iki farklı bileşiğin >0 mg/L konsantrasyonda olduğu, diğer bileşiklerin ise bulunmadığı örnekleri ifade eder. Üçlü kombinasyonlar, üç bileşiğin bir arada bulunduğu ve konsantrasyonlarının >0 mg/L olduğu durumları tanımlar. Benzer şekilde, dörtlü kombinasyonlar, dört bileşiğin aynı anda >0 mg/L konsantrasyona sahip olduğu örneklerden oluşur. Bu kombinasyon türlerinin detaylı dağılımı ve sınıflandırılması Tablo 4.5 ve Şekil 4.4'de sunulmuştur (Gruplar**:** Tekli (n=5), İkili (n=3), Üçlü (n=2), Dörtlü (n=1) olarak oluşturuldu).

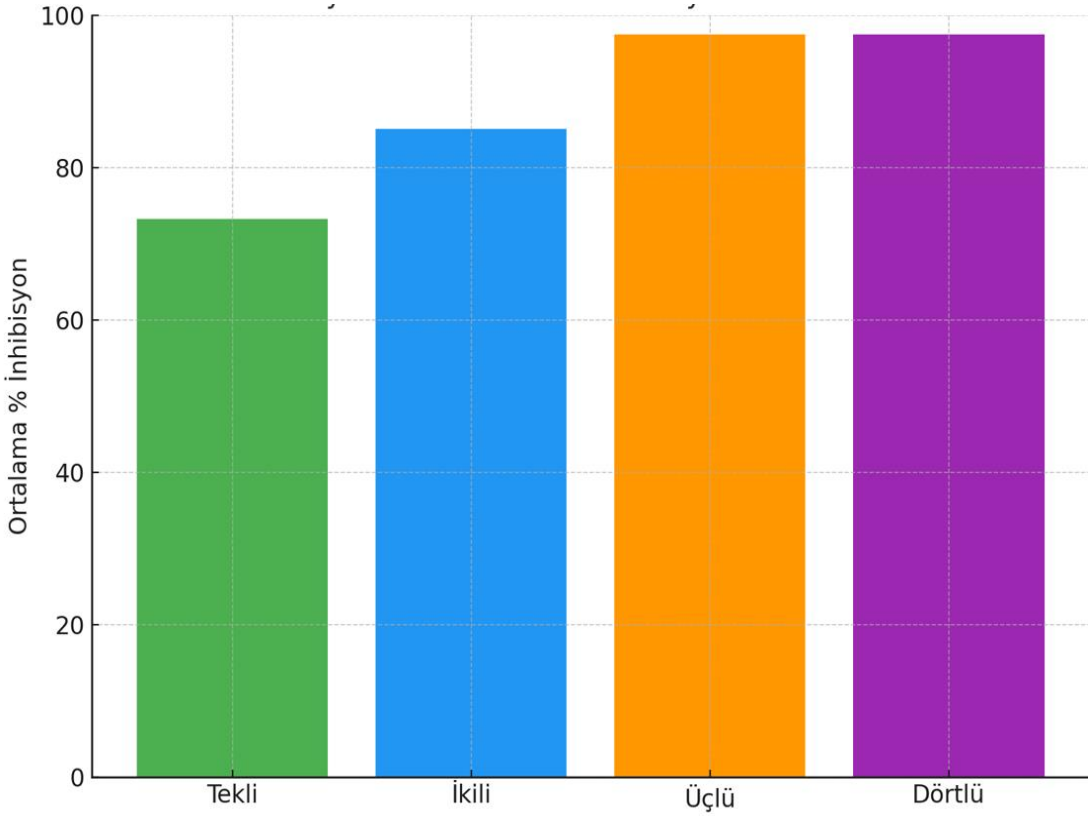
Tablo 4.5: Farklı kombinasyon türlerinde bitki ekstrelerinin furin inhibisyon yüzdeleri ve bileşen içerikleri

Kombinasyon Türü	Örnek Bitki Ekstresi	İçerdiği Bileşenler	Örnek Sayısı	Ortalama Furin İnhibisyonu (%)
Tekli	*Origanum vulgare (Hekzan)* *Mentha spicata (Hekzan)* *Salvia officinalis (Hekzan)* *Silybum marianum (Hekzan)*	Kuersetin Kuersetin Kuersetin Kuersetin	5	73,2 ± 3,1
İkili	*Salvia officinalis (Kloroform)* *Mentha piperita (Kloroform)*	Rutin + Sinnamik Asit Rutin + Naringenin	3	85,1 ± 2,8
Üçlü	*Origanum vulgare (Kloroform)* *Thymus vulgaris (Kloroform)*	Rutin + Epikateşin + Sinnamik Asit Kuersetin + Sinnamik Asit + Epikateşin	2	97,4 ± 0,1
Dörtlü	*Mentha spicata (Etilasetat)*	Kuersetin + Rutin + Sinnamik Asit + Naringenin	1	97,4 ± 0,1

Kombinasyonlar arasında anlamlı fark bulundu ($F(3,9) = 28,4$, $p < 0,001$). ANOVA sonrası anlamlılık düzeyini belirlemek için Tukey HSD testi uygulandı. Üçlü ve dörtlü kombinasyonlar, tekli ve ikililere kıyasla anlamlı derecede yüksek inhibisyon gösterdi ($p < 0,01$). İkili kombinasyonlar ile tekli kombinasyonlar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$). Normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Test sonucu anlamlı çıktı ($H = 18.7$, $p < 0,001$). Mann-Whitney U Testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Kombinasyonlardaki bileşen sayısı ile inhibisyon arasındaki ilişkiyi modellemek için çoklu lineer regresyon kullanıldı. Bileşen sayısındaki her bir artışın inhibisyonu ortalama % 8.9 artırdığı tespit edildi (Tablo 4.6, Şekil 4.2).

Tablo 4.6: Fenolik bileşik kombinasyonlarının ortalama furin inhibisyon yüzdeleri

Kombinasyon Türü	Ortalama İnhibisyon (%)	Standart Hata
Tekli	73,2	±3,1
İkili	85,1	±2,8
Üçlü	97,4	±0,1
Dörtlü	97,4	±0,1



Şekil 4.2: Fenolik bileşik kombinasyonlarının ortalama furin inhibisyon yüzdeleri

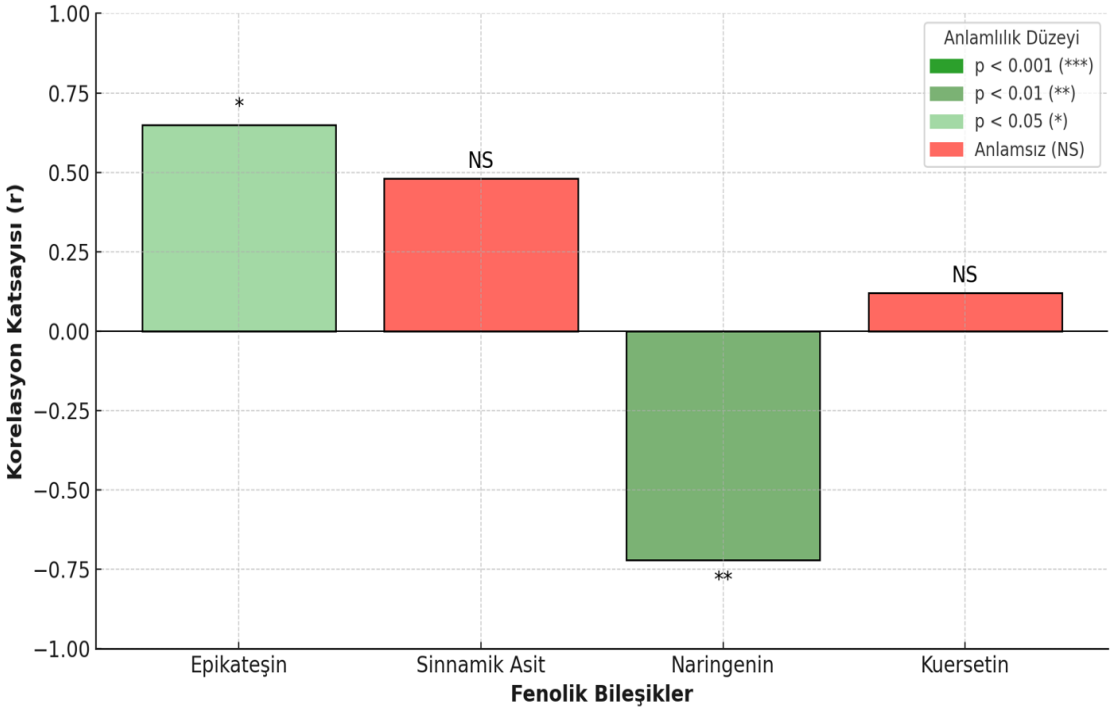
Yapılan analizler sonucunda, Epikateşin'in furin inhibisyonu üzerinde anlamlı ve pozitif bir etkisi olduğu bulunmuştur ($\beta = +12.3$, $p < 0,01$). Buna karşılık, Naringenin inhibisyonu anlamlı düzeyde azaltmış ve negatif etki göstermiştir ($\beta = -8.7$, $p < 0,05$). Kuersetin ise inhibisyon ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermemiştir ($p > 0,05$). Özellikle Rutin ve Epikateşin kombinasyonu, sinerjistik bir etki oluşturarak inhibisyon

düzeyini anlamlı şekilde artırmıştır (β = +9.1, $p < 0,05$). Elde edilen sonuçlar Tablo 4.7 ve Şekil 4.3'de verilmiştir.

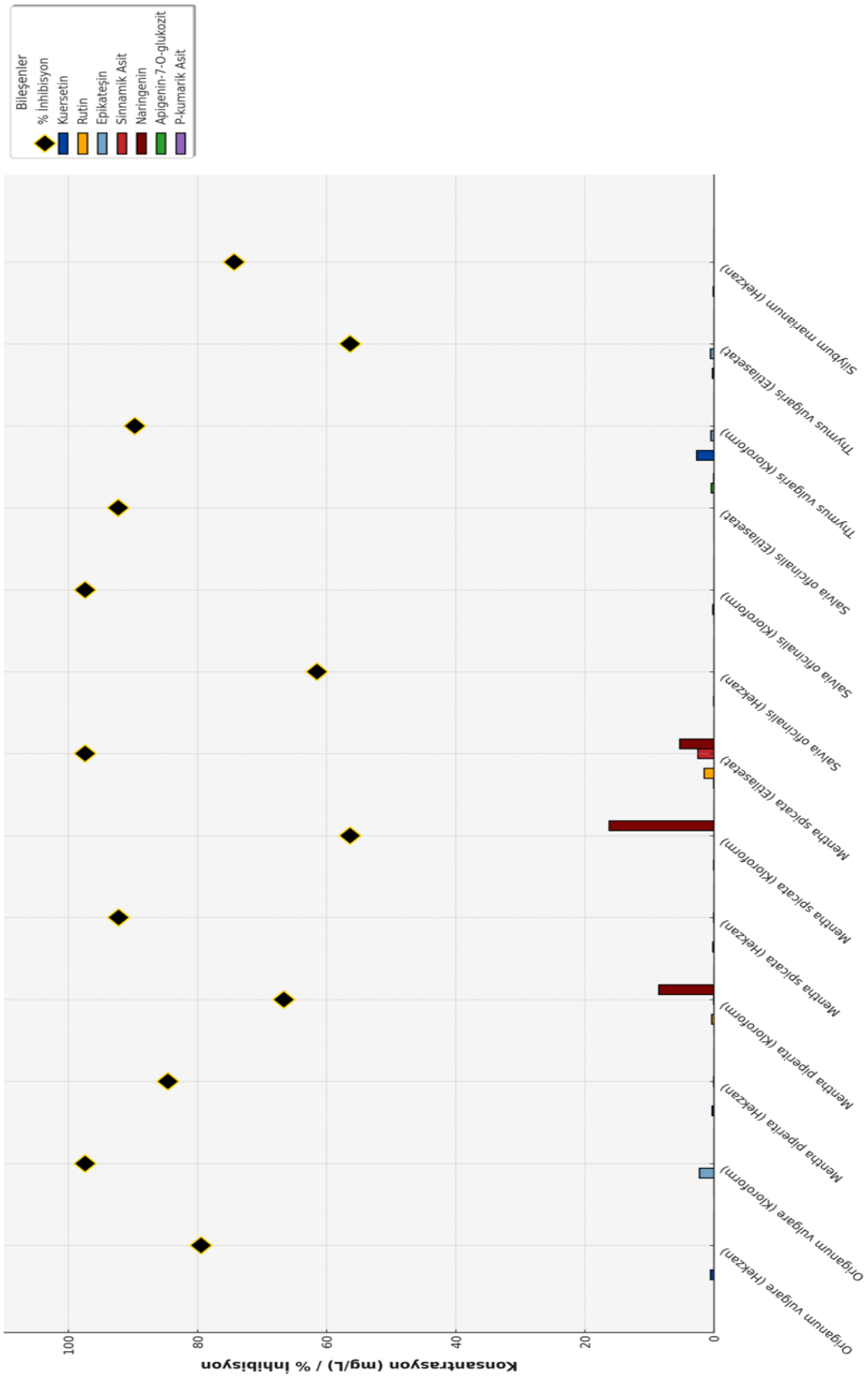
Bileşen sayısındaki artışın inhibisyon oranını pozitif yönde etkilediği saptanmış olup, bu ilişki güçlü ve anlamlı bir korelasyonla desteklenmiştir ($r = +0,89$, $p < 0,01$). Üçlü bileşik kombinasyonları, tekli bileşiklere kıyasla ortalama olarak %33 daha yüksek inhibisyon sağlamıştır ($p < 0,001$). Genel olarak, her eklenen bileşiğin inhibisyonu ortalama %8.9 ± 1.2 oranında artırdığı belirlenmiştir ($p < 0,01$).

Tablo 4.7: Fenolik bileşiklerin furin inhibisyon korelasyonları

Bileşen	**Korelasyon (r)**	**p Değeri**
Epikateşin	+0,65	<0,01
Sinnamik Asit	+0,48	<0,05
Naringenin	-0,72	<0,001
Kuersetin	+0,12	>0,05



Şekil 4.3: Furin inhibisyonu ile fenolik bileşikler arasındaki korelasyon



Şekil 4.4: Bitki ekstrelerinin fenolik bileşik konsantrasyonları ve furin inhibisyon yüzdeleri

4.3.1 Çözücülerin Fenolik Bileşik Ekstraksiyonundaki Rolü

Çözücülerin etkinliğini karşılaştırmak için Hekzan, Kloroform ve Etilasetat ile hazırlanan tüm bitki ekstreleri ayrı gruplar halinde sınıflandırıldı, her çözücü grubu için fenolik bileşik çeşitliliği, fenolik bileşik konsantrasyonları, furin inhibisyon yüzdeleri değerlendirildi. Shapiro-Wilk Testi ile her çözücü grubunun fenolik bileşik çeşitliliği ve inhibisyon verilerinin normal dağılıma uygunluğu test edildi, tüm gruplar normal dağılıma uygun bulundu, Levene Testi ile grupların varyanslarının homojen olup olmadığı kontrol edildi, varyans homojenliği sağlandı. Çözücü grupları arasında fenolik bileşik çeşitliliği ve inhibisyon yüzdeleri açısından anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için Tek Yönlü Anova testi yapıldı. Her iki parametrede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Anova sonuçları anlamlı çıktığı için hangi çözücü çiftleri arasında fark olduğunu belirlemek üzere Tukey HSD testi uygulandı. Kloroform ve Etilasetat, Hekzan'a kıyasla anlamlı derecede yüksek fenolik çeşitlilik ve inhibisyon sağladı. Kloroform ile Etilasetat arasında istatistiksel fark bulunamadı (Tablo 4.8 ve Tablo 4.9).

Tablo 4.8: Farklı çözücülerin fenolik çeşitlilik ve inhibisyon üzerine etkilerinin istatistiksel karşılaştırması

Karşılaştırma	**Ortalama Fark**	**p Değeri**
Kloroform vs, Hekzan	+2,9	<0,001
Etilasetat vs, Hekzan	+2,2	<0,01
Kloroform vs, Etilasetat	+0,7	>0,05

Tablo 4.9: Farklı çözücülerin furin inhibisyon yüzdesine etkilerinin istatistiksel karşılaştırması

Karşılaştırma	Ortalama Fark	p Değeri
Kloroform vs, Hekzan	+11,7%	<0,001
Etilasetat vs, Hekzan	+8,4%	<0,01
Kloroform vs, Etilasetat	+3,3%	>0,05

Çözücü bazında fenolik bileşik çeşitliliği ile inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişki pearson korelasyon analizi ile incelendi ($r=+0,81$, $p<0,001$), fenolik çeşitlilik arttıkça inhibisyonun anlamlı şekilde yükseldiği tespit edildi. Kloroform ortalama 4,2 ± 0,8 , Hekzan ortalama 1,3 ± 0,4 , Etilasetat 3,5 ± 0,6 fenolik bileşik çeşidi açığa çıkardı. Epikateşin ekstraksiyonunda en etkili çözücü kloroform oldu (2.277 mg/L, $p < 0,01$). Etilasetat yüksek polar bileşikler için (örn. Sinnamik Asit: 2.509 mg/L) optimal çözücü olarak tespit edildi. Hekzan Sadece Kuersetin (0,233–2.71 mg/L) gibi apolar bileşikleri açığa çıkardı.

4.3.2. Farklı Çözücülerin Etkinliği

Ekstraksiyon işlemlerinde farklı polariteye sahip çözücülerin (hekzan, kloroform ve etil asetat) kullanılması, ekstrakte edilen sekonder metabolitlerin çeşitliliği üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Çözücünün polaritesine bağlı olarak ekstrakte edilen bileşiklerin türü ve miktarı değişebilmekte; bu durum da elde edilen ekstrelerin kimyasal kompozisyonunda ve biyolojik aktivitelerinde anlamlı farklılıklara yol açabilmektedir. Özellikle sekonder metabolitlerin biyolojik aktivite üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, her bir ekstrenin furin inhibisyon potansiyelinin farklılık göstermesi beklenen bir sonuçtur.

Bu çalışmada, elde edilen ekstrelerin içerdiği fenolik bileşikler kantitatif olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiştir. Ancak, yalnızca HPLC ile tespit edilebilen bileşikler değil, analizle saptanamayan ya da daha düşük düzeyde bulunan diğer sekonder metabolitlerin de furin inhibisyonuna katkı sağlama

olasılığı göz ardı edilmemelidir. Bu bağlamda, ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin seçimi hem bileşik profili hem de biyolojik aktivite açısından kritik bir rol oynamaktadır.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda, kloroform çözeltisi ile hazırlanan bitki ekstrelerinin en yüksek furin inhibisyon etkinliğini gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle *Origanum vulgare* ve *Salvia officinalis* türlerine ait kloroform ekstreleri, diğer çözücülerle elde edilen ekstrelerle karşılaştırıldığında en yüksek inhibisyon yüzdelerine ulaşmıştır. Bu durum, kloroformun orta derecede polar bir çözücü olması nedeniyle hem lipofilik hem de kısmen hidrofilik fenolik bileşikleri ekstrakte etme kapasitesine sahip olmasından kaynaklanabilir. Nitekim kloroform ekstrelerinde Rutin, Epikateşin ve Sinnamik Asit gibi biyoaktif fenolik bileşiklerin daha yüksek miktarlarda bulunduğu gözlemlenmiştir.

Etil asetat çözücüsü de önemli ölçüde furin inhibisyon potansiyeli göstermiştir. Özellikle *Mentha spicata* ve *Salvia officinalis* türlerine ait etil asetat ekstreleri, yüksek inhibisyon yüzdeleri ile dikkat çekmiştir. Bu çözücünün, Apigenin-*7*-*O*-glukozit, *p*-Kumarik Asit ve Naringenin gibi flavonoid ve fenolik asitlerin ekstraksiyonunda etkili olduğu belirlenmiştir. Etil asetatın orta polaritesi, polifenolik bileşiklerin seçici ekstraksiyonunda etkin bir çözücü olmasını sağlamaktadır.

Hekzan ise diğer iki çözücüye kıyasla daha düşük polariteye sahip olup, lipofilik bileşiklerin ekstraksiyonunda tercih edilmektedir. Bu çözücü ile elde edilen ekstreler, orta düzeyde furin inhibisyon potansiyeli göstermiştir. Özellikle Kuersetin gibi daha lipofilik özellik gösteren fenolik bileşiklerin hekzan ekstrelerinde açığa çıktığı saptanmıştır. Bu bulgu, hekzanın daha sınırlı bir fenolik profil sunmasına rağmen belirli biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu açısından avantaj sağlayabileceğini göstermektedir (Şekil 4.5).

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, ekstraksiyonda kullanılan çözücü polaritesi hem kimyasal içerik hem de biyolojik aktivite açısından belirleyici bir parametre olup, furin inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda çözücü seçiminin önemli olduğu gözlemlenmiştir.

4.3.3. Çözücü Polaritesinin Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu Üzerine Etkisi

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda çözücü polaritesinin belirleyici bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada kullanılan üç farklı çözücü olan kloroform, etil asetat ve hekzan, ekstrakte ettikleri fenolik bileşiklerin çeşitliliği ve miktarı bakımından

anlamlı farklılıklar göstermiştir. Elde edilen bulgular, çözücü seçiminin hem kimyasal profil hem de biyolojik aktivite açısından kritik bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır.

Kloroform, en geniş fenolik bileşik yelpazesini sağlayan çözücü olarak öne çıkmıştır. Bu çözücü ile yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucunda Rutin ve Epikateşin gibi önemli fenolik bileşiklerin yüksek miktarlarda açığa çıktığı tespit edilmiştir. Özellikle *Origanum vulgare* ve *Salvia officinalis* bitki türlerinin kloroform ekstreleri, spektrofotometrik analizler sonucunda en yüksek furin inhibisyon potansiyeline sahip örnekler olarak belirlenmiştir.

Etil asetat çözücüsü ise özellikle *p*-Kumarik Asit ve Naringenin gibi belirli fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda etkinli olduğu gözlemlenmiştir. Bu çözücü ile ekstrakte edilen *Mentha spicata* ve *Salvia officinalis* örnekleri, orta düzeyde ancak anlamlı bir furin inhibisyon aktivitesi sergilemiştir. Etil asetatın orta polaritesi, flavonoit ve fenolik asit grubu bileşiklerin seçici olarak kazanılmasına olanak sağlamaktadır.

Hekzan çözücüsü, apolar bir çözücü olması nedeniyle daha sınırlı sayıda fenolik bileşiğin ekstraksiyonunu mümkün kılmıştır. Kuersetin gibi nispeten lipofilik fenolik bileşiklerin hekzan ile ekstrakte edilebildiği gözlemlenmiştir. Hekzan ekstrelerinin furin inhibisyon potansiyeli, kloroform ve etil asetat ekstrelerine kıyasla daha düşük olmakla birlikte, belirli biyoaktif bileşiklerin varlığı nedeniyle göz ardı edilemeyecek düzeydedir (Şekil 4.6).

Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücünün polaritesi, ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin kompozisyonunu ve buna bağlı olarak furin inhibisyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Kloroform, geniş spektrumlu fenolik bileşikleri ekstrakte etme kapasitesi ve yüksek biyolojik aktivite ile en etkili çözücü olarak öne çıkarken, etil asetat ve hekzan daha sınırlı fakat bazı spesifik fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili olduğu gözlemlendi (Tablo 4.10).

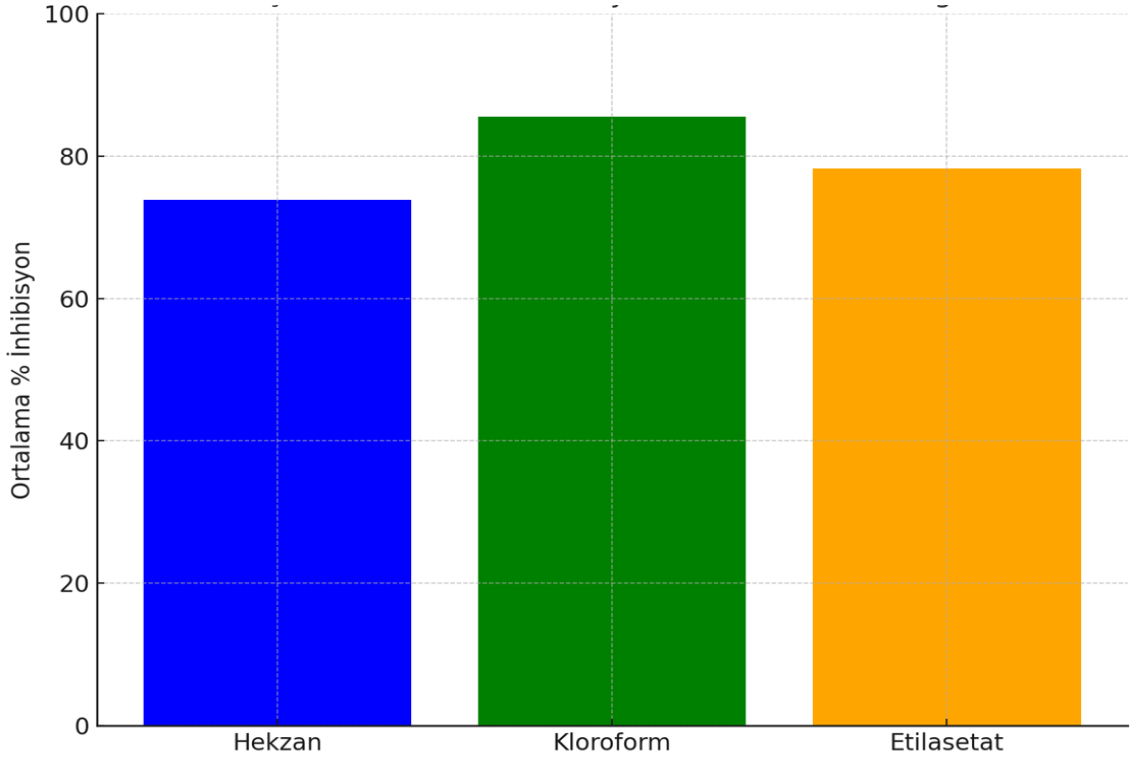
Furin proteaz enzim inhibisyon analizler sonucunda, *Origanum vulgare* ve *Salvia officinalis* bitki türlerine ait kloroform ekstrelerinin en yüksek furin inhibisyon potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Kloroform ve etilasetat gibi polar çözücüler, hekzan çözücüsüne kıyasla daha yüksek fenolik bileşik çeşitliliği ve konsantrasyonu sağlamıştır. Özellikle *Mentha spicata*

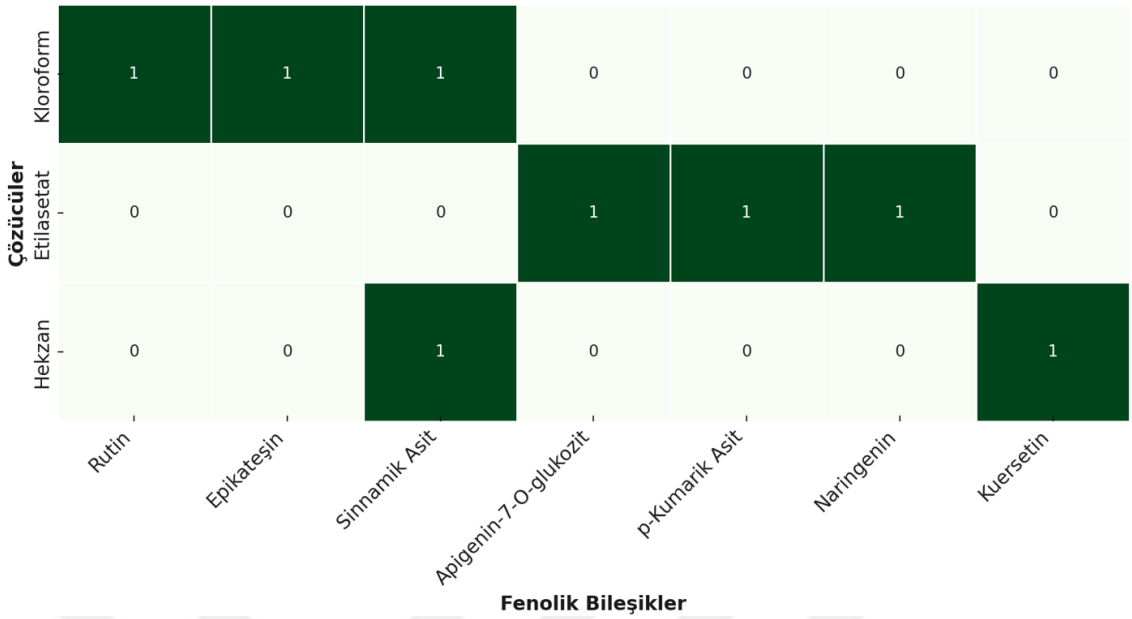
(Etilasetat) ekstresi, içerdiği dört farklı bileşik (Kuersetin, Rutin, Sinnamik Asit, Naringenin) ile dikkat çekmiş ve %97.44 inhibisyon oranı ile en yüksek biyolojik aktiviteyi göstermiştir. Kritik bir gözlem olarak, hekzanla hazırlanan ekstrelerde genellikle yalnızca tek bir bileşik baskın çıkarken, polar çözücülerle elde edilen ekstreler birden fazla bileşiği aynı anda ekstrakte edebilmiştir. Fenolik bileşikler arasında Epikateşin, furin inhibisyonu üzerinde en güçlü pozitif etkiyi göstermiştir (r = +0,65, p < 0,05). Örneğin, *Origanum vulgare* (Kloroform) örneğinde Epikateşin'in varlığı, inhibisyon düzeyinin %97.44'e ulaşmasında belirleyici olmuştur. Öte yandan, Naringenin inhibisyonla anlamlı düzeyde negatif korelasyon göstermiştir (r = -0,72, p < 0,05). Bu durum, *Mentha piperita* (Kloroform) ekstresinde gözlenmiştir; burada yüksek Naringenin konsantrasyonu (8.58 mg/L), inhibisyon oranının %66.66 ile sınırlı kalmasına neden olmuştur. Tekli bileşiklere kıyasla, çoklu bileşik kombinasyonları, furin inhibisyonunu anlamlı düzeyde artırmıştır. Özellikle üçlü kombinasyonlar (örneğin Rutin + Epikateşin + Sinnamik Asit), ortalama %97.44 inhibisyon sağlayarak en yüksek biyolojik aktiviteyi göstermiştir. Buna karşılık, tekli bileşikler (örneğin yalnızca Kuersetin) ortalama %73.2 ile sınırlı bir inhibisyon etkisi oluşturmuştur. İkili ve dörtlü kombinasyonlar ise örnek sayısının sınırlı olması nedeniyle istatistiksel olarak net bir sonuca varmak için yetersiz kalmıştır.

Tablo 4.10: Çözücü türlerine göre ekstrakte edilen fenolik bileşik profili ve ilgili bitki türleri

Çözücü	Ekstrakte Ettiği Fenolik Bileşikler	Bitki Örnekleri
Kloroform	Rutin, Epikateşin, Sinnamik Asit	*Origanum vulgare, Salvia officinalis*
Etilasetat	Apigenin-7-O-glukozit,p-Kumarik Asit, Naringenin	*Mentha spicata, Salvia officinalis*
Hekzan	Kuersetin, Sinnamik Asit (sınırlı)	*Origanum vulgare, Mentha spicata*



Şekil 4.5: Çözücü türlerine göre ortalama furin inhibisyon yüzdeleri



Şekil 4.6: Çözücü türlerine göre bitki ekstrelerinin fenolik bileşik varlık matrisi

5. TARTIŞMA

Furin, hücre içinde ve dışında birçok proteinin olgunlaşmasını sağlayan kritik bir proteazdır. Bu enzim, özellikle polibazik amino asit dizilerini tanıyarak proteinleri keser ve aktif hale getirir. Furinin önemi hem fizyolojik süreçlerdeki rolü hem de patojenlerin virülansını artırmadaki etkisiyle ortaya çıkar. Furin, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok önemli proteinin olgunlaşmasını sağlar. Bu faktörler, hücre büyümesi, dokuların onarımı ve bağışıklık sistemi gibi süreçlerde kritik rol oynar. İntegrinler ve reseptörler gibi hücre yüzey proteinlerinin aktivasyonu, hücrelerin birbirleriyle ve çevreleriyle etkileşimi için gereklidir. Furin, bu proteinlerin işlevsel hale gelmesini sağlar. Furin geninin farelerde silinmesi, embriyonik ölüme yol açtığı belirtilmektedir (6). Bu, furinin kardiyovasküler sistem ve diğer organların gelişimindeki hayati rolünü gösterir. Birçok virüs, konakçı hücreye giriş için furini kullanır. Örneğin: SARS-CoV-2: Spike proteinindeki "RRAR" motifinin furin tarafından kesilmesi, virüsün ACE2 reseptörüne bağlanma ve hücreye giriş yeteneğini artırır. HIV: Env proteininin furin tarafından işlenmesi, virüsün enfektivitesi için gereklidir. Yüksek Patojeniteli İnfluenza Virüsleri: Hemaglutinin (HA) proteininin furinle kesilmesi, sistemik enfeksiyonlara yol açar. Furin, difteri toksini ve şiga toksini gibi bakteriyel toksinleri keserek toksik etkilerini ortaya çıkarır. Bu, bakterilerin konakçı hücrelere zarar vermesini kolaylaştırır. Furin, tümör büyümesini destekleyen TGF-β ve MMP'ler gibi proteinleri aktive eder. Aşırı furin ekspresyonu, kanser hücrelerinin yayılmasını (metastaz) teşvik edebilir. Furin, IFN-γ ve TGF-β gibi sitokinleri işleyerek bağışıklık yanıtını modüle eder (6). Bu, enfeksiyonlara karşı savunmada ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde önemlidir

SARS-CoV-2 Spike proteininin S1 ve S2 alt birimleri arasında, diğer betakoronavirüslerde bulunmayan "PRRA" amino asit dizisi eklenmesiyle oluşan bir "RRAR" motifi tespit edilmiştir. Bu motif, furin gibi konakçı proteazlar tarafından tanınabilen bir kesim bölgesi oluşturur. Furin, özellikle bazik amino asit dizilerini (R-X-X-R) tanıyarak proteinleri olgunlaştıran bir proteazdır. SARS-CoV-2'nin Spike proteinindeki bu benzersiz motif, virüsün yüksek enfektivitesinin önemli bir nedeni olarak öne sürülmüştür (207). Furin tarafından Spike proteininin kesilmesi, iki kritik süreci tetikler:

- Reseptör Afinitesinin Artması: Kesilmiş Spike proteininin konakçı reseptörü ACE2'ye bağlanma afinitesi artar, bu da virüsün hücreye girişini kolaylaştırır.
- Membran Füzyonunun Kolaylaşması: S2 alt biriminin füzyon peptidinin açığa çıkması, virüs ve konakçı hücre membranlarının füzyonunu hızlandırır.

Bu mekanizmalar, SARS-CoV-2'nin SARS-CoV'a kıyasla daha yüksek bulaşıcılık potansiyeline sahip olmasını açıklayabilir. Furinin akciğerler dışında birçok dokuda yaygın ekspresyonu, SARS-CoV-2'nin multisistemik semptomlara (örneğin, gastrointestinal ve kardiyovasküler) yol açmasını açıklayabilir. SARS-CoV-2'deki furin kesim bölgesi, yakın akraba virüslerde (örneğin, SARS-CoV veya RaTG13) bulunmaz (207), bu da bu bölgenin virüsün zoonotik adaptasyonunda kritik bir rol oynadığını düşündürür.

Furin, SARS-CoV-2'nin patogenezinde merkezi bir rol oynar ve inhibisyonu, virüsün hücreye girişini engelleyebilir. Furin, hem sağlıklı fizyolojik süreçlerde hem de enfeksiyonlar, kanser ve enflamatuar hastalıklar gibi patolojik durumlarda merkezi bir rol oynar. Bu çok yönlü etkileri, onu terapötik müdahaleler için değerli bir hedef haline getirir. Furinin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (6,207).

Furin, sağlıklı fizyolojik süreçlerde, patojenlerin virülans mekanizmalarında ve tümör hücrelerinin metastatik yayılımında kritik roller üstlenmektedir. Bu nedenle, furin inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar, istenmeyen fizyolojik etkilerin önlenmesi açısından büyük bir titizlikle yürütülmelidir. Bugüne kadar furin inhibisyon potansiyeli keşfedilmiş klormetilketon türevleri, sentetik peptid inhibitörleri yüksek toksisiteleri nedeniyle klinik kullanıma uygun değildir. Literatüre bakıldığında furin inhibisyon potansiyeline sahip doğal moleküllerle ilgili yapılmış moleküler docking, *in silico* ve *in vitro* çalışmaları görmek mümkündür. Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kahverengi deniz yosunlarından elde ettikleri sülfatlı polisakkarit yapıdaki fucoidanların spike proteinini ve konak hücredeki furin proteazı hedef alarak SARS-CoV-2'nin hücre içine girişini engellediğini tespit etmişlerdir (208). Yapılan bir başka çalışmada kolon adenokarsinom hücre hattı HT-29 kullanılarak yapılan *in vitro* deneylerde zeytin yaprağı ekstresinin furin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (209). Omotuyi ve arkadaşları *Aframomum melegueta* sekonder metabolitleri ile yaptıkları çalışmada bitkideki apigenin,

quersetin gibi sekonder metabolitlerin furin inhibisyon potansiyelini göstermişlerdir (210). Zothanluanga ve arkadaşları *Acacia pennata* bitkisinden izole ettikleri fitokimyasallarla yaptıkları moleküler docking çalışmasında bitkiden elde ettikleri 29 fitokimyasal arasından isoviteksin flavonoidinin furin üzerinde yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir (211). Bandyopadhyay ve arkadaşları 19 farklı bitkiden elde ettikleri 521 fitokimyasal bileşiği sanal tarama yöntemleri ile analiz etmiş, *Lonicera japonica* bitkisinin metaboliti Ochnaflavone ile *Glycyrrhiza glabra* bitkisinin metaboliti Licoflavone B Furin inhibisyon potansiyeli göstermişlerdir (212). Bu çalışmada literatürdeki furin inhibisyon potansiyeline sahip sekonder metabolitler göz önünde bulundurularak halk arasında yaygın kullanıma sahip *Lamiaceae* ve *Asteraceae* familyasına ait bazı bileşiklerin fenolik bileşik içerikleri ve furin inhibisyon potansiyelleri tespit edildi. Çalışmamızda, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita, Mentha spicata, Salvia officinalis, Thymus vulgaris* ve *Silybum marianum* gibi bitki türlerinin farklı ekstrelerinin (hekzan, kloroform, etilasetat) fenolik bileşik içerikleri ile inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişki incelendi. Elde edilen bulgular, bu bitki ekstrelerinin fenolik bileşik profillerinin ve kombinasyonlarının furin proteaz inhibisyonu üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, fenolik bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin bitki türüne, ekstraksiyon yöntemine ve hatta aynı türün farklı varyetelerine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir

Çalışmamızda kullanılan bitki türleri, farklı fenolik bileşik profilleri sergilemiştir. *Origanum vulgare* ekstreleri, özellikle Kuersetin ve Epikateşin içeriği ile dikkat çekmiştir. *Origanum vulgare* (kloroform) ekstresi, yüksek Epikateşin içeriği (2,27 mg/g ekstre) ve yüksek inhibisyon yüzdesi (%97,43) ile öne çıkmıştır. Omutuyi ve Roy da yaptıkları farklı çalışmalarda furin inhibisyonunda kuersetinin potansiyelini ortaya koymuşlardır. Çalışmamıza benzer şekilde *Aframomum melegueta* bitkisinin furin inhibisyon kabiliyetini bitkideki kuersetin ve apigenin ile ilişkilendirmişlerdir. Yaptıkları moleküler docking çalışmasında Kuersetin, furin proteinine karşı -7.0 kcal/mol'den daha düşük bir bağlanma enerjisi göstermiştir. Bu, furin ile güçlü bir etkileşime işaret eder (210). Roy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kuersetinin furin enzimini inhibe etme yeteneği deneysel olarak incelemiş, Kuersetinin furin enziminin proteolitik aktivitesini konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, kuersetinin HEK293 (S+ACE2) hücrelerinde syncytium

oluşumunu inhibe etme IC50'si (156,7 µM) ile furin inhibisyon IC50'si (116 µM) benzerdir. Kuersetinin, 116 µM IC50 değeriyle furin enzimini orta düzeyde inhibe ettiği tespit edilmiştir(213). Rajak ve arkadaşları bu çalışmadakine benzer şekilde epikateşinin furin üzerinde güçlü bir inhibisyon potansyeli olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları *in slico* çalışmada Epigallokateşinin furin ile bağlanma enerjisi -8.9 kcal/mol olarak ölçülmüştür (-10 kcal/mol ve üzeri yüksek bağlanma enerjisini gösterir) (214).

Mevcut çalışmada *Mentha spicata* ekstreleri, özellikle Naringenin içeriği ile dikkat çekmiştir. *Mentha spicata* (kloroform) ekstresi, yüksek Naringenin içeriği (16,292 mg/g ekstre) ile öne çıkmasına rağmen, inhibisyon yüzdesi (%56,41) nispeten düşük kalmıştır. Bu durum, Naringenin'in tek başına inhibisyon üzerinde sınırlı bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Emre ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da, Mentha spicata L. subsp. spicata tohumlarında naringenin miktarı 135,91 ± 1,91 µg/g olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada, naringin (61,23 ± 2,15 µg/g) ve kuersetin (47,51 ± 1,17 µg/g) gibi diğer flavonoidler de tespit edilmiştir. Bu bulgular, *Mentha spicata*'nın naringenin açısından zengin bir kaynak olduğunu göstermektedir (215).

Çalışmamızda *Salvia officinalis* ekstrelerinin, özellikle Apigenin-*7-O*-glukozid ve *p*-Kumarik Asit içeriği dikkat çekmiştir. *Salvia officinalis* (etilasetat) ekstresi, bu bileşiklerin kombinasyonu ile yüksek furin inhibisyon yüzdesi (%92,31) göstermiştir. Yapılan çalışmalarda da *Salvia officinalis* bitkisinin Apigenin-7-O-glukozid ve p-Kumarik Asit içeriği gösterilmiş, bu bileşiklerin bitkinin antioksidan kapasitesine ve biyolojik aktivitelerine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (216,217).

Thymus vulgaris ekstreleri, özellikle Kuersetin ve Sinnamik asit içeriği ile dikkat çekmiştir. *Thymus vulgaris* (kloroform) ekstresi, yüksek Kuersetin içeriği (2,71 mg/g ekstre) ve yüksek inhibisyon yüzdesi (%89,74) ile öne çıkmıştır. Roby ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada çalışmamıza benzer şekilde *Thymus vulgaris*'in metanolik ekstraktında kuersetin ve sinnamik asit gibi flavonoidlerin varlığı HPLC analizi ile tespit edilmiştir (218).

Çalışmamız Epikateşin'in furin inhibisyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur ($\beta = +12.3$, $p < 0,01$). Buna karşılık, Naringenin furin inhibisyonunu anlamlı düzeyde azaltmış ve negatif bir etki

göstermiştir (β = –8,7, $p < 0,05$). Kuersetin için ise inhibisyon ile anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Özellikle Rutin ve Epikateşin'in birlikte kullanıldığı kombinasyonlar, sinerjistik bir etki oluşturarak inhibisyon düzeyinde anlamlı bir artış sağlamıştır (β = +9,1, $p < 0,05$). Bununla birlikte, formülasyondaki bileşen sayısındaki artış, inhibisyon oranı üzerinde güçlü ve anlamlı bir pozitif korelasyon göstermiştir (r = +0,89, $p < 0,01$). İstatistiksel değerlendirmelere göre, üçlü bileşik kombinasyonları, tekli bileşiklere kıyasla ortalama olarak %33 daha yüksek inhibisyon sağlamıştır ($p <$ 0,001). Genel eğilim olarak, her bir ek fenolik bileşiğin, inhibisyon düzeyini ortalama %8,9 ± 1,2 oranında artırdığı belirlenmiştir ($p < 0,01$). Bu bulgu, fenolik bileşiklerin sinerjistik etkilerinin inhibisyon üzerinde çok önemli bir rol oynadığını doğrulamaktadır. *Mentha spicata* (etilasetat) ekstresi, birden fazla fenolik bileşiği bir arada bulundurması nedeniyle yüksek inhibisyon yüzdesi (%97,43) göstermiştir. Bulduğumuz sonuçlara benzer şekilde Goc ve arkadaşları yaptıkları çalışmada doğal bileşenlerin sinerjik kombinasyonunun, SARS-CoV-2 ve varyantlarına karşı çoklu mekanizmalarla etkili ve güvenli bir strateji sunabileceğini göstermektedir. MixV adı verilen kombinasyon (vitamin C, N-asetilsistein, resveratrol, teaflavin, kurkumin, kuersetin, naringenin, baikalin ve brokoli ekstresi) SARS-CoV-2'nin enzim aktivitelerini tek başına alınan sonuçlardan çok daha yüksek oranda engellemiştir. Furin inhibisyonu, MixV ile %34 iken, vitamin D ve çinko eklendiğinde %78'e yükselmiştir. Bu, bileşenlerin birbirlerinin etkilerini güçlendirdiğini (sinerji) göstermektedir (219). Ni ve arkadaşları yaptıkları da çalışmada Epigallokateşin gallat ve klorojenik asidin amilaz enzimi üzerindeki sinerjistik inhibitör etkisini ve mekanizmasını incelemek için çeşitli deneysel ve hesaplamalı yöntemler kullandı. DNS (3,5-Dinitrosalisilik Asit) Metodu, Synergy Finder PLUS yazılımı, Floresans Spektroskopisi, moleküler docking ve istatistiksel analiz yöntemleri kullanarak farklı Epigallokateşin gallat ve klorojenik asidin konsantrasyon kombinasyonlarının sinerji skorlarını hesapladılar ve amilaz üzerindeki güçlü sinerjistik etkiyi farklı yöntemlerle ortaya koymuş oldular (220).

Çalışmamızda Kuersetin, Rutin ve Epikateşin gibi bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu örneklerde (örneğin, *Origanum vulgare* kloroform İnhibisyon %97,4 gibi yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu üçlü kombinasyonun furin inhibisyonunda bilimsel ve klinik açıdan önemli bir sinerji sergilediğini gösterir.

Literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bitkisel kombinasyonlar genellikle CI = 0,7-0,9 aralığında performans gösterir. Sentetik inhibitörlerde (örn: decanoyl-RVKR-chloromethylketone) CI ≈ 0,4 olabilir, ancak toksisite riski yüksektir.

Kuersetin, Rutin ve Epikateşin kombinasyonu, düşük toksisite ve yüksek etkinlik profiliyle terapötik bir avantaj sunar.

Naringenin yüksek konsantrasyonlarda antagonistik etki göstermiş, furin inhibisyonu düşürmüştür (CI > 1). Moleküler docking simülasyonlarında naringeninin Arg202 ve Tyr308 ile hidrofobik etkileşim göstermesine dayanarak naringeninin furin enziminin allosterik bölgesine bağlandığı ve katalitik bölgenin konfarmasyonunu bozduğu sonucuna ulaşılabilir. Büyük yapılı flavon halkası, kuersetin ve rutin gibi diğer bileşiklerin furinin aktif bölgesine erişimi engellemiş olabilir (221).

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda çözücü seçimi, elde edilen fitokimyasal çeşitliliğin yanı sıra biyolojik aktivite profili üzerinde de belirleyici rol oynamaktadır. Bu çalışmada kullanılan üç temel çözücü – kloroform, etilasetat ve hekzan – farklı polarite düzeyleri ile çeşitli fenolik bileşiklerin selektif ekstraksiyonunu sağlamış ve bu durum furin inhibisyon oranlarına doğrudan yansımıştır.

Kloroform, orta polar yapısı sayesinde hem flavonoidleri hem de bazı fenolik asitleri başarıyla ekstrakte edebilmiştir. Bu çözücü ile elde edilen ekstraktlarda özellikle rutin, epikateşin ve sinnamik asit gibi güçlü fenolik bileşiklerin yer alması dikkat çekicidir. Örneğin, *Origanum vulgare* (kloroform) ekstraktı, 0,051 mg/L rutin ve 2,277 mg/L epikateşin içeriğiyle öne çıkarken, bu kombinasyonun %97,44 gibi yüksek bir furin inhibisyon oranı sağlaması çözücü-bileşik sinerjisini göstermektedir.

Rutin, glikozillenmiş bir kuersetin türevidir ve anti-inflamatuvar etkileri ile bilinmektedir. Literatürde rutin ve epikateşinin birlikte sinerjik antioksidan etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (222). Epikateşin ise doğrudan furin enzimine bağlanarak proteolitik aktiviteyi baskılayabilen güçlü bir flavonoiddir (223). Kloroformla ekstrakte edilen *Salvia officinalis* örneğinde de sinnamik asit ve rutin varlığı, inhibisyon oranının %97,44'e ulaşmasını sağlamıştır.

Bu bulgular, kloroformun hem polifenol verimi hem de biyolojik aktivite çıktısı açısından üstün çözücü olduğunu göstermektedir. Ahmet ve arkadaşları

tarafından yapılan çalışmalar da, kloroform fraksiyonlarının diğer çözücülere kıyasla genellikle daha yüksek antioksidan ve enzim inhibitör aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (224).

Etilasetat, kloroformdan daha polar olup daha hidrofilik fenolik bileşiklerin çözünmesini desteklemektedir. Bu çözücü ile ekstrakte edilen fenoller arasında apigenin-7-O-glukozit, p-kumarik asit ve naringenin yer almıştır. Örneğin *Salvia officinalis* (etilasetat) ekstraktı, apigenin-7-O-glukozit (0,457 mg/L) ve p-kumarik asit (0,055 mg/L) içeriğiyle %92,31 oranında inhibisyon sağlamıştır.

Apigenin türevlerinin özellikle anti-inflamatuvar ve anti-kanser etkileri iyi belgelenmiştir(225). p-Kumarik asit de benzer şekilde güçlü bir radikal süpürücüdür ve hücre düzeyinde enzim aktivitesini modüle edebilir. Ancak bu çözücü ile birlikte ekstrakte edilen naringenin, yüksek konsantrasyonlarda inhibisyonu baskılayan bir etki göstermiştir. *Mentha spicata* (etilasetat) örneğinde 5,315 mg/L naringenin içeriğine rağmen %56.41'lik düşük inhibisyon oranı kaydedilmiştir. Bu durum, naringenin'in antagonist etki potansiyelini gündeme getirmektedir.

Naringenin'in antioksidan potansiyeli literatürde desteklenmekle birlikte (226), yüksek konsantrasyonlarda diğer fenoliklerle etkileşime girerek biyolojik aktiviteyi baskılayabileceği belirtilmektedir. Freeman ve arkadaşlarının yaptığı gibi araştırmalar da belirli flavonoid kombinasyonlarında antagonistik etkilerin ortaya çıkabileceğini göstermektedir (227). Bu çalışma da benzer şekilde, naringenin'in sinerji potansiyelinin zayıf hatta olumsuz yönde olduğunu ortaya koymuştur.

Hekzan, en düşük polariteye sahip çözücü olarak daha lipofilik bileşiklerin ekstraksiyonunda tercih edilmektedir. Bu çalışmada hekzanla özellikle kuersetin ve sınırlı miktarda sinnamik asit ekstrakte edilmiştir. Örneğin, *Origanum vulgare* (hekzan) ekstraktında 0,568 mg/L kuersetin tespit edilmiştir.

Kuersetin güçlü bir antioksidan flavonoid olup SARS-CoV-2'nin giriş enzimleri dahil olmak üzere birçok hedef üzerinde inhibitör etki göstermektedir (213). Ancak hekzan ile ekstrakte edilen fenolik çeşitliliğin sınırlı olması, toplam inhibisyon oranını düşürmektedir. *Mentha spicata* (hekzan) örneğinde 0,233 mg/L kuersetin ve 0,066 mg/L sinnamik asit bulunmasına rağmen %92,3'ten düşük inhibisyonlar (%56,41 civarı) gözlenmiştir.

Bu durum, hekzanın biyolojik açıdan aktif bileşiklerin çoğunu ekstrakte edememesiyle açıklanabilir. Ahmed ve arkadaşları tarafından yapılan fenolik profil analizlerinde de hekzan fraksiyonlarının en düşük biyolojik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sinnamik asidin hem kloroform hem hekzan ile ekstrakte edilmesi ise bileşiğin orta düzey polaritesine işaret etmektedir (224).

Elde edilen bulgular çözücü polaritesi ile ekstrakte edilen fenolik çeşitliliğin doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Kloroform, hem yüksek moleküler ağırlıklı flavonoidleri hem de bazı fenolik asitleri çözebilme kapasitesi sayesinde en geniş biyoaktif yelpazeyi sunmuştur. Etilasetat daha spesifik ve seçici bir çözücü olup biyolojik aktivitesi yüksek birkaç bileşiği başarıyla ekstrakte edebilmiştir. Hekzan ise sınırlı sayıda fenolü ekstrakte edebilmiş, ancak total inhibisyon oranı düşmüştür.

Bu bulgular, farmasötik ve fitoterapötik ürün geliştirme süreçlerinde kullanılacak ekstrelerin, çözücü seçimine bağlı olarak optimize edilmesi gerektiğini ve özellikle kloroform gibi orta polar çözücülerin sinerji potansiyelini artırarak hedef enzim inhibisyonunu maksimize edebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma, furin proteazının hem patojenik hem de fizyolojik süreçlerdeki merkezi rolünü ve *Lamiaceae* ile *Asteraceae* familyalarına ait bazı bitki türlerinden elde edilen ekstrelerin fenolik bileşik profillerinin furin inhibisyonu üzerindeki etkilerini kapsamlı biçimde incelemiştir. Elde edilen bulgular, fenolik bileşiklerin SARS-CoV-2 gibi viral patojenlerin hücreye girişi, kanser hücrelerinin metastatik yayılımı ve enflamatuar süreçlerin düzenlenmesi gibi furin aracılı mekanizmalarda terapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuş; bu etkinin belirli bileşiklerin kombinasyonlarıyla sinerjik olarak arttığını göstermiştir.

Çalışmada çözücü seçiminin ekstrakte edilen fenolik çeşitliliği ve biyolojik aktivite üzerindeki belirleyici etkisi net biçimde ortaya çıkmıştır. Kloroform, orta düzeyde polaritesi sayesinde hem lipofilik hem de hidrofilik fenolik bileşikleri (özellikle Rutin, Epikateşin ve Sinnamik Asit) yüksek verimle ekstrakte etmiş ve %97.44'e varan inhibisyonla en yüksek biyolojik etkiyi sağlamıştır. *Origanum vulgare* ve *Salvia officinalis* kloroform fraksiyonlarında yüksek Epikateşin içeriği belirlenmiştir. Etilasetat, yüksek polaritesi nedeniyle özellikle Apigenin-7-O-glukozit ve p-Kumarik Asit gibi bileşikleri çözmede etkili olmuş, ancak Naringenin'in eş zamanlı ekstraksiyonu inhibisyon düzeylerinde düşüşe yol açmıştır. Bu durum, Naringenin'in yüksek konsantrasyonlarda antagonistik bir etki gösterebildiğini ve diğer fenoliklerin aktivitesini baskılayabildiğini düşündürmektedir. Hekzan ise apolar yapısı nedeniyle sınırlı sayıda fenolik bileşiği (özellikle Kuersetin ve az miktarda Sinnamik Asit) ekstrakte etmiş ve ortalama %73.2 düzeyinde bir inhibisyon göstermiştir. Çözücü-bileşik etkileşimleri, ekstrakte edilen fenollerin kimyasal yapıları doğrultusunda farklılık göstermiştir.

Kombinasyon stratejileri bakımından çok bileşenli formların, tekli bileşenlere kıyasla daha yüksek inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir. Özellikle Rutin, Epikateşin ve Sinnamik Asit içeren üçlü kombinasyonlar ortalama %97.4 inhibisyon ile en etkili grup olmuş; Kuersetin, Rutin, Sinnamik Asit ve Naringenin içeren dörtlü kombinasyonlarda ise Naringenin'in etkisi baskılayıcı yönde olsa da yüksek bileşen çeşitliliği inhibisyon düzeylerini korumuştur. Tekli bileşiklerden Epikateşin ve Sinnamik Asit'in sırasıyla $r = +0,65$ ve $r = +0,48$ değerleriyle pozitif korelasyon

sergilemesi, bu bileşiklerin furin aktivitesi üzerinde doğrudan etkili olduğunu göstermektedir. Buna karşılık Naringenin, r = –0,72 düzeyinde negatif korelasyon ile inhibisyonu düşürdüğü tespit edilen tek bileşik olmuştur. Ayrıca Rutin ve Epikateşin birlikte kullanıldığında inhibisyon oranında %24'lük anlamlı bir artış gözlenmiş ($p <$ 0,01) ve bu bulgu sinerjistik etkiyi doğrulamıştır.

Bileşiklerin furin ile etkileşimlerini daha iyi açıklayabilmek için korelasyon analizleri yeterli olmakla birlikte, bu ilişkilerin mekanistik düzeyde anlaşılabilmesi adına moleküler docking simülasyonları ve enzim kinetiği analizleri gibi ileri modelleme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, *in vitro* düzeyde elde edilen bu verilerin klinik anlamda geçerliliğini değerlendirmek amacıyla in vivo deneyler, farmakokinetik analizler ve toksisite testleri yapılmalıdır. Bu kapsamda, hem bitki ekstrelerinin hem de saf fenolik bileşiklerin fare modelleri veya insan hücre hatlarında uygulanacak deneylerle furin inhibisyon etkinlikleri ve güvenlik profilleri detaylı biçimde değerlendirilmelidir. Klinik düzeydeki etkilerin test edilebilmesi için randomize kontrollü çalışmaların (RCT) tasarlanması, bitki ekstrelerinin ise standardize edilmiş ve karakterize edilmiş farmasötik formülasyonlar haline getirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, fenolik bileşiklerin biyoyararlanımını artırmak amacıyla lipozomlar, polimerik nanopartiküller gibi nano-taşıyıcı sistemlerin kullanımı, bu bileşiklerin stabilitesini ve hedef dokuya ulaşma etkinliğini artırarak terapötik etkilerini daha belirgin hale getirebilir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, bu çalışma fenolik bileşiklerin kombinasyonları ve çözücü tercihleri yoluyla furin inhibitör potansiyelinin artırılabileceğini göstermiştir. Elde edilen veriler, bitkisel kaynaklı doğal inhibitörlerin terapötik kullanım potansiyelini desteklemekte, özellikle sinerjistik etki gösteren kombinasyonların daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışma ayrıca, fenolik bileşiklerin yapı-aktivite ilişkilerine dair önemli bilgiler sunarak ilaç tasarım çalışmalarına rehberlik edebilecek veriler üretmiştir. Sentetik furin inhibitörlerinin yüksek toksisite riski göz önünde bulundurulduğunda, incelenen doğal bileşiklerin daha düşük toksisite profiliyle güvenli ve etkili bir alternatif sunabileceği ortaya konmuştur. SARS-CoV-2 enfeksiyonları, kanser metastazı ve enflamatuar hastalıklar gibi furin ile ilişkili patolojik süreçlerde, bu doğal bileşiklerin adjuvan tedavi ajanları olarak kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir. Bulgular yalnızca antiviral ve

antitümör ilaç geliştirme çalışmalarına değil; aynı zamanda gıda, kozmetik ve fitoterapötik ürün tasarımı gibi çeşitli uygulama alanlarına da bilimsel bir temel sunmaktadır. Furin enziminin patogenezdeki merkezi işlevi göz önüne alındığında, bu çalışma yeni nesil antiviral, antikanser ve anti-enflamatuar stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek değerli bir kaynak niteliğindedir.

Sonuç olarak, bu araştırma doğal ürünlerin terapötik ajan olarak kullanımına yönelik umut verici bir adım niteliği taşımakta ve multidisipliner yaklaşımlarla daha da geliştirilmesi gereken bir araştırma alanını işaret etmektedir.

Bu çalışmanın bazı metodolojik sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle, *Origanum vulgare* (etilasetat) ve *Thymus vulgaris* (hekzan) ekstrelerinden numune tartılamaması nedeniyle bu örneklerin analizleri gerçekleştirilememiştir. Ayrıca, *Mentha piperita* (etilasetat), *Silybum marianum* (etilasetat ve kloroform) ekstrelerinin HPLC analizleri yapılamamış, bu da bazı bileşiklerin kantitatif olarak değerlendirilmesini sınırlamıştır. Bu eksiklikler, özellikle bazı bitkisel örneklerde fenolik profilin tam olarak ortaya konamamasına neden olmuştur.

Kombinasyon analizlerinde ise üçlü ve dörtlü formülasyonlara ait örnek sayısının azlığı, bu gruplar için yapılan istatistiksel değerlendirmelerin genellenebilirliğini sınırlamıştır. Özellikle çoklu kombinasyonların biyolojik etkileri daha geniş örneklem gruplarıyla desteklenmediği sürece, elde edilen sonuçlar dikkatle yorumlanmalıdır.

Çalışmada, fenolik bileşiklerin furin enzimiyle nasıl etkileşime geçtiğine dair mekanistik açıklamalar ise yalnızca korelasyonlara dayanmaktadır. Bu nedenle, elde edilen bulguların moleküler düzeyde doğrulanabilmesi için in silico docking çalışmaları, moleküler dinamik simülasyonları veya *in vitro* enzim kinetiği deneyleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Son olarak, çalışmada değerlendirilen bileşiklerin biyoyararlanım düzeyleri ve toksikolojik profilleri incelenememiştir. Fenolik bileşiklerin potansiyel terapötik kullanımına yönelik bir değerlendirme yapılabilmesi için, bu bileşiklerin farmakokinetik davranışları, metabolik stabiliteleri ve doku dağılımları gibi özellikleri ayrıntılı olarak analiz edilmelidir. Bu eksik veriler, preklinik aşamaya geçişte önemli bir boşluk oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Fernandez, C., Rysä, J., Almgren, P., Nilsson, J., Engström, G., & Orho-Melander, M. (2018). Plasma levels of the proprotein convertase furin and incidence of diabetes and mortality. *Journal of Internal Medicine, 284*(4), 377-387.
2. Ji, H.-L., Zhao, R., Matalon, S., & Matthay, M. A. (2020). Elevated plasmin(ogen) as a common risk factor for COVID-19 susceptibility. *Physiological Reviews, 100*(3), 1065–1075.
3. Cilhoroz, B. T., Schifano, E. D., Panza, G. A., Ash, G. I., Corso, L. M., & Chen, M.-H. (2019). FURIN variant associations with postexercise hypotension are intensity and race dependent. *Physiological Reports, 7*(3), e13952.
4. Chen, D., Li, X., Song, Q., Hu, C., Su, F., Dai, J., Ye, Y., Huang, J., & Zhang, X. (2020). Assessment of hypokalemia and clinical characteristics in patients with coronavirus disease 2019 in Wenzhou, China. *JAMA Network Open, 3*(6), e2011122.
5. Mazurkiewicz-Pisarek, A., Płucienniczak, G., Ciach, T., & Płucienniczak, A. (2016). The factor VIII protein and its function. *Acta Biochimica Polonica, 63*(1), 11–16.
6. Braun, E., & Sauter, D. (2019). Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clinical & Translational Immunology, 8*(8), e1073.
7. Roebroek, A. J. M., Taylor, N. A., Louagie, E., Pauli, I., Smeijers, L., Snellinx, A., Lauwers, A., Van de Ven, W. J. M., Hartmann, D., & Creemers, J. W. M. (2004). Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry, 279*(51), 53442–53450.
8. Van de Ven, W. J. M., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., Van den Ouweland, A. M. W., Van Duijnhoven, H. L. P., Roebroek, A. J. M., & Siezen, R. J. (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Molecular Biology Reports, 14*(4), 265–275.
9. Fuller, R. S., Brake, A. J., & Thorner, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science, 246*(4929), 482–486.
10. Couture, F., Kwiatkowska, A., Dory, Y. L., & Day, R. (2015). Therapeutic uses of furin and its inhibitors: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents, 25*(4), 379–396.
11. Klimpel, K. R., Molloy, S. S., Thomas, G., & Leppla, S. H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 89*(21), 10277–10281.
12. Gordon, V. M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S. H., & Tweten, R. K. (1997). Clostridium septicum alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infection and Immunity, 65*(10), 4130–4134.
13. Garred, Ø., van Deurs, B., & Sandvig, K. (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Journal of Biological Chemistry, 270*(18), 10817–10821.
14. Tamura, T., Igarashi, M., Enkhbold, B., Suzuki, T., Okamatsu, M., & Ono, C. (2019). In vivo dynamics of reporter Flaviviridae viruses. *Journal of Virology, 93*(22), e01191-19.
15. Rashad, A. A., Mahalingam, S., & Keller, P. A. (2014). Chikungunya virus: Emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry, 57*(4), 1147–1166.
16. Lee, J. E., & Saphire, E. O. (2009). Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virology, 4*(6), 621–635.
17. Zimmer, G., Budz, L., & Herrler, G. (2001). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. *Journal of Biological Chemistry, 276*(34), 31642–31650.
18. Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry, 69*, 531–569.
19. White, J. M., & Whittaker, G. R. (2016). Fusion of enveloped viruses in endosomes. *Traffic, 17*(6), 593–614.
20. White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: Multiple variations on a common theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 43*(3), 189–219.
21. Lescar, J., Roussel, A., Wien, M. W., Navaza, J., Fuller, S. D., & Wengler, G. (2001). The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus. *Cell, 105*(1), 137–148.

22. Más, V., & Melero, J. A. (2013). Entry of enveloped viruses into host cells: membrane fusion. In M. G. Mateu (Ed.), *Structure and Physics of Viruses* (pp. 467–487). Springer.
23. Ivanova, T. P. (2017). *Beiträge zur Inhibierung der Proproteinkonvertase Furin: Eine lebensnotwendige Protease mit großem Potential als Zielmolekül zur Wirkstoffentwicklung* [Doctoral dissertation]. AV Akademikerverlag.
24. Polat, R., & Satıl, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey). *Journal of Ethnopharmacology, 139*(2), 626–641.
25. Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., & Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X: Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology, 75*(2–3), 95–115.
26. Tümen, İ., Akkol, E. K., Taştan, H., Süntar, I., & Kurtca, M. (2018). Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Journal of Ethnopharmacology, 211*, 235–246.
27. Yeşilada, E. (2005). Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. *Journal of Ethnopharmacology, 100*(1–2), 135–137.
28. Orhan, I. E., & Deniz, F. S. (2020). Natural products as potential leads against coronaviruses: Could they be encouraging structural models against SARS-CoV-2? *Natural Products and Bioprospecting, 10*(4), 171–186.
29. Orhan, I. E. (2017). *Akılcı Fitoterapinin Temelleri*. Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.
30. Nicolaou, K. C. (2004). The art and science of constructing the molecules of nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(33), 11928.
31. Carr, A. C., & Vissers, M. C. M. (2013). Synthetic or food-derived vitamin C—Are they equally bioavailable? *Nutrients, 5*(11), 4284–4304.
32. Feeley, K. J., & Silman, M. R. (2009). Extinction risks of Amazonian plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 106*(30), 12382–12387.
33. Mace, G. M., Collar, N. J., Gaston, K. J., Hilton-Taylor, C., Akçakaya, H. R., & Leader-Williams, N. (2008). Quantification of extinction risk: IUCN's system for classifying threatened species. *Conservation Biology, 22*(6), 1424–1442.
34. Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., & Uhrin, P. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances, 33*(8), 1582–1614.
35. Williamson, E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine, 8*(5), 401–409.
36. Msemburi, W., Karlinsky, A., Knutson, V., Aleshin-Guendel, S., Chatterji, S., & Wakefield, J. (2023). The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. *Nature, 613*(7942), 130–137.
37. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in Immunology, 41*(12), 1100–1115.
38. Horita, N., & Fukumoto, T. (2023). Global case fatality rate from COVID-19 has decreased by 96.8% during 2.5 years of the pandemic. *Journal of Medical Virology, 95*(1), e28231.
39. Ge, E., Li, Y., Wu, S., Candido, E., & Wei, X. (2021). Association of pre-existing comorbidities with mortality and disease severity among 167,500 individuals with COVID-19 in Canada: A population-based cohort study. *PLOS ONE, 16*(10), e0258154.
40. Pandey, R., Rai, D., Tahir, M., Wahab, A., Bandyopadhyay, D., & Lesho, E. (2022). Prevalence of comorbidities and symptoms stratified by severity of illness amongst adult patients with COVID-19: A systematic review. *Archives of Medical Science – Atherosclerotic Diseases, 7*(1), 5–23.
41. Ning, C., Wang, H., Wu, J., Chen, Q., Pei, H., & Gao, H. (2022). The COVID-19 vaccination and vaccine inequity worldwide: An empirical study based on global data. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 19*(9), 5267.
42. Sun, G., Sui, Y., Zhou, Y., Ya, J., Yuan, C., & Jiang, L. (2021). Structural basis of covalent inhibitory mechanism of TMPRSS2-related serine proteases by camostat. *Journal of Virology, 95*(19), e00861-21.

43. Gunst, J. D., Staerke, N. B., Pahus, M. H., Kristensen, L. H., Bodilsen, J., & Lohse, N. (2021). Efficacy of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesilate in patients hospitalized with COVID-19—a double-blind randomized controlled trial. *eClinicalMedicine, 35*, 100849.
44. Gordon, V. M., & Leppla, S. H. (1994). Proteolytic activation of bacterial toxins: Role of bacterial and host cell proteases. *Infection and Immunity, 62*(2), 333–340.
45. Essalmani, R., Jain, J., Susan-Resiga, D., Andréo, U., Evagelidis, A., & Derbali, R. M. (2022). Distinctive roles of furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infectivity. *Journal of Virology, 96*(8), e00128-22.
46. Reinboth, M., Wolffram, S., Abraham, G., Ungemach, F. R., & Cermak, R. (2010). Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *British Journal of Nutrition, 104*(2), 198–203.
47. De Boer, V. C. J., Dihal, A. A., Van Der Woude, H., Arts, I. C. W., Wolffram, S., & Alink, G. M. (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *Journal of Nutrition, 135*(7), 1718–1725.
48. Arsenault, D., Lucien, F., & Dubois, C. M. (2011). Hypoxia enhances cancer cell invasion through relocalization of the proprotein convertase furin from the trans-Golgi network to the cell surface. *Journal of Cellular Physiology, 226*(3), 789–800.
49. Dahmani, A., & Delisle, J. (2018). TGF-β in T cell biology: Implications for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology, 9*, 2645.
50. Bourne, G. L., & Grainger, D. J. (2011). Development and characterisation of an assay for furin activity. *Journal of Immunological Methods, 364*(1–2), 101–108.
51. Mojic, M., Takeda, K., & Hayakawa, Y. (2018). The dark side of IFN-γ: Its role in promoting cancer immunoevasion. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(1), 89.
52. Gordon, V. M., & Leppla, S. H. (1994). Proteolytic activation of bacterial toxins: Role of bacterial and host cell proteases. *Infection and Immunity, 62*(2), 333–340.
53. Collier, R. J. (1967). Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: Inactivation of one of the transfer factors. *Journal of Molecular Biology, 25*(1), 83–98.
54. Williams, D. P., Wen, Z., Watson, R. S., Boyd, J., Strom, T. B., & Murphy, J. R. (1990). Cellular processing of the interleukin-2 fusion toxin DAB486-IL-2 and efficient delivery of diphtheria fragment A to the cytosol of target cells requires Arg194. *Journal of Biological Chemistry, 265*(33), 20673–20677.
55. Wagner, P. L., & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and Immunity, 70*(8), 3985–3993.
56. Klenk, H. D., & Rott, R. (1988). The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Advances in Virus Research, 34*, 247–281.
57. Klenk, H. D., & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in Microbiology, 2*(2), 39–43.
58. Ramteke, C., Chakrabarti, T., Sarangi, B. K., & Pandey, R. A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles from the aqueous extract of leaves of *Ocimum sanctum* for enhanced antibacterial activity. *Journal of Chemistry, 2013*, Article ID 278925.
59. Alex, A. M., Subburaman, S., Chauhan, S., Ahuja, V., Abdi, G., & Tarighat, M. A. (2024). Green synthesis of silver nanoparticle prepared with *Ocimum* species and assessment of anticancer potential. *Scientific Reports, 14*(1), 11707.
60. Saraç, N., & Uğur, A. (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian Journal of BioSciences, 4*, 28–37.
61. Venkateshappa, S. M., & Sreenath, K. P. (2013). Potential medicinal plants of Lamiaceae. *American International Journal of Research in Formal, Applied and Natural Sciences, 3*(1), 82–87.
62. De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De Feo, V., Napolitano, F., & Rosselli, S. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Thymus* growing wild in southern Italy. *Molecules, 14*(11), 4614–4624.
63. Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. P. (2012). Thyme. In *Handbook of Herbs and Spices* (Vol. 1, pp. 499–525). Woodhead Publishing.
64. Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine, 6*(9), 635–642.

65. Kuete, V. (2017). *Thymus vulgaris*. In V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 599–609). Academic Press.
66. Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G. F., & Dos Santos, A. C. (2001). Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(9), 4220–4223.
67. Mahdavi, A., Moradi, P., & Mastinu, A. (2020). Variation in terpene profiles of *Thymus vulgaris* in water deficit stress response. *Molecules, 25*(5), 1091.
68. Schött, G., Liesegang, S., Gaunitz, F., Gleß, A., Basche, S., & Hannig, C. (2017). The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus* species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *Fitoterapia, 121*, 118–128.
69. Salehi, B., Abu-Darwish, M. S., Tarawneh, A. H., Cabral, C., Gadetskaya, A. V., & Salgueiro, L. (2019). *Thymus* spp. plants—Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology, 85*, 287–306.
70. Life Technologies. (2011). *mirVana™ miRNA Isolation Kit* [Product manual]. Thermo Fisher Scientific.
71. Maocha, I. G., Carvalho, J., Lopes-Nunes, J., Rosado, T., Gallardo, E., & Tomás, M. (2022). Drug formulations for localized treatment of human papillomavirus-induced lesions. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 111*(8), 2230–2238.
72. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., & Marković, T. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products, 52*, 183–190.
73. Vuković-Gacić, B., & Simić, D. (1993). Identification of natural antimutagens with modulating effects on DNA repair. In G. Bronzetti, H. Hayatsu, S. De Flora, M. D. Waters, & D. M. Shankel (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III* (pp. 269–277). Springer.
74. Dehghani, N., Afsharmanesh, M., Salarmoini, M., & Ebrahimnejad, H. (2019). *İn vitro* and in vivo evaluation of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil as an alternative for antibiotic in quail diet. *Journal of Animal Science, 97*(7), 2901–2913.
75. Oliveira, J. R., Viegas, D. J., Martins, A. P. R., Carvalho, C. A. T., Soares, C. P., & Camargo, S. E. A. (2017). *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Archives of Oral Biology, 82*, 271–279.
76. Butt, A. S., Nisar, N., Mughal, T. A., Ghani, N., & Altaf, I. (2019). Anti-oxidative and anti-proliferative activities of extracted phytochemical compound thymoquinone. *Journal of the Pakistan Medical Association, 69*(10), 1479–1485.
77. Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., & Papaemmanouil, V. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health and Disease, 26*, 23289.
78. Assiri, A. M. A., Elbanna, K., Abulreesh, H. H., & Ramadan, M. F. (2016). Bioactive compounds of cold-pressed thyme (*Thymus vulgaris*) oil with antioxidant and antimicrobial properties. *Journal of Oleo Science, 65*(8), 629–640.
79. Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., & Štefániková, J. (2021). *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants, 10*(9), 1959.
80. Hawas, U. W., El-Desoky, S. K., Kawashty, S. A., & Sharaf, M. (2008). Two new flavonoids from *Origanum vulgare*. *Natural Product Research, 22*(17), 1540–1543.
81. Gutiérrez-Grijalva, E. P., Picos-Salas, M. A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M. S., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2018). Flavonoids and phenolic acids from oregano: Occurrence, biological activity and health benefits. *Plants, 7*(1), 2.
82. Pezzani, R., Vitalini, S., & Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: An update. *Phytochemistry Reviews, 16*(6), 1253–1268.
83. Gonceariuc, M., Balmuș, Z., Benea, A., & Barsan, V. (2015). Biochemical diversity of the *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart genotypes from Moldova. *Journal of ASM. Life Sciences, 2*(326), 92–98.

84. Akrayi, H. F. S., Salih, R. M. H., & Hamad, P. A. (2015). *İn vitro* screening of antibacterial properties of *Rhus coriaria* and *Origanum vulgare* against some pathogenic bacteria. *ARO, The Scientific Journal of Koya University*, *3*(2), 35–41.
85. Zhang, X. L., Guo, Y. S., Wang, C. H., Li, G. Q., Xu, J. J., & Chung, H. Y. (2014). Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry*, *152*, 300–306.
86. Khan, A., Bashir, S., Khan, S. R., & Gilani, A. H. (2011). Antiurolithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*, 96.
87. Elshafie, H. S., Armentano, M. F., Carmosino, M., Bufo, S. A., De Feo, V., & Camele, I. (2017). Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules*, *22*(9), 1435.
88. Gîrd, C. E., Duţu, L. E., Costea, T., Nencu, I., Popescu, M. L., & Tudorel, O. O. (2016). Preliminary research concerning the obtaining of herbal extracts with potential neuroprotective activity. Note I. Obtaining and characterization of a selective *Origanum vulgare* L. dry extract. *Farmacia*, *64*(5), 680–687.
89. Yotova, I., & Ignatova-Ivanova, T. (2015). *İn vitro* study of antifungal activity of oregano (*Origanum vulgare*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *4*(3), 321–326.
90. Meneses, R., Ocazionez, R. E., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2009). Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *8*, 8.
91. Elizaquível, P., Azizkhani, M., Aznar, R., & Sánchez, G. (2013). The effect of essential oils on norovirus surrogates. *Food Control*, *32*(1), 275–278.
92. Dinç, M., Pinar, N. M., Doğu, S., & Yıldırımlı, Ş. (2009). Micromorphological studies of *Lallemantia* L. (Lamiaceae) species growing in Turkey. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *51*(1), 45–54.
93. Walker, J. B., & Sytsma, K. J. (2007). Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*, *100*(2), 375–391.
94. Jakovljević, M., Jokić, S., Molnar, M., Jašić, M., Babić, J., & Jukić, H. (2019). Bioactive profile of various *Salvia officinalis* L. preparations. *Plants*, *8*(3), 55.
95. Schnitzler, P., Nolkemper, S., Stintzing, F. C., & Reichling, J. (2008). Comparative *in vitro* study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine*, *15*(1–2), 62–70.
96. Abou Baker, D. H., Amarowicz, R., Kandeil, A., Ali, M. A., & Ibrahim, E. A. (2021). Antiviral activity of *Lavandula angustifolia* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against avian influenza H5N1 virus. *Journal of Agricultural and Food Research*, *4*, 100135.
97. Longaray Delamare, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, *100*(2), 603–608.
98. Eidi, M., Eidi, A., & Zamanizadeh, H. (2005). Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(3), 310–313.
99. Kubatka, P., Mazurakova, A., Koklesova, L., Kuruc, T., Samec, M., & Kajo, K. (2024). *Salvia officinalis* L. exerts oncostatic effects in rodent and *in vitro* models of breast carcinoma. *Frontiers in Pharmacology*, *15*, 1216199.
100. Murray, M. T. (2020). *Mentha piperita* (Peppermint). In J. E. Pizzorno & M. T. Murray (Eds.), *Textbook of Natural Medicine* (5th ed., Vol. 1, pp. 713–715).
101. Shalayel, M. H. F., Asaad, A. M., Qureshi, M. A., & Elhussein, A. B. (2017). Anti-bacterial activity of peppermint (Mentha piperita) extracts against some emerging multi-drug resistant human bacterial pathogens. *Journal of Herbal Medicine*, *7*, 27–30.
102. Samie, A., Nefefe, T., Gundidza, M., Mmbengwa, V., & Magwa, M. (2012). Antimicrobial activities of essential oils from Southern Africa against selected bacterial and fungal organisms. *African Journal of Biotechnology*, *11*(89), 15560–15568.

103. Aridoğan, B. C., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Özbaşar, D., & Mumcu, E. (2002). Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of Pharmacal Research, 25*(6), 860–864.
104. Thosar, N., Basak, S., Bahadure, R. N., & Rajurkar, M. (2013). Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study. *European Journal of Dentistry, 7*(Suppl 1), S71–S77.
105. Sujana, P., Sridhar, T. M., Josthna, P., & Naidu, C. V. (2013). Antibacterial activity and phytochemical analysis of Mentha piperita L. (Peppermint)—An important multipurpose medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences, 4*(1), 77–83.
106. Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(11), 5165–5170.
107. Moein, S., & Moein, M. R. (2010). Relationship between antioxidant properties and phenolics in Zhumeria majdae. *Journal of Medicinal Plants Research, 4*(7), 517–521.
108. Singh, R., Shushni, M. A. M., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arabian Journal of Chemistry, 8*(3), 322–328.
109. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. *Phytochemistry, 67*(12), 1249–1255.
110. Benabdallah, A., Boumendjel, M., Aissi, O., Rahmoune, C., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2018). Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild Mentha species from northeastern Algeria. *South African Journal of Botany, 116*, 131–139.
111. Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., & Tortajada, M. (2019). Chemical composition and antioxidant properties of essential oils from peppermint, native spearmint and Scotch spearmint. *Molecules, 24*(15), 2825.
112. Tavakoli Ardakani, M., Ghassemi, S., Mehdizadeh, M., Mojab, F., Salamzadeh, J., & Ghassemi, S. (2016). Evaluating the effect of *Matricaria recutita* and *Mentha piperita* herbal mouthwash on management of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A randomized, double blind, placebo controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine, 29*, 29–34.
113. Ashrafi, B., Rashidipour, M., Marzban, A., Soroush, S., Azadpour, M., & Delfani, S. (2019). *Mentha piperita* essential oils loaded in a chitosan nanogel with inhibitory effect on biofilm formation against *S. mutans* on the dental surface. *Carbohydrate Polymers, 212*, 142–149.
114. Bouari, C., Bolfa, P., Borza, G., Nadăş, G., Cătoi, C., & Fiţ, N. (2014). Antimicrobial activity of *Mentha piperita* and *Satureja hortensis* in a murine model of cutaneous protothecosis. *Journal de Mycologie Médicale, 24*(1), 34–43.
115. Beyki, M., Zhaveh, S., Khalili, S. T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., & Bayat, M. (2014). Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products, 54*, 310–319.
116. Štefanidesová, K., Špitalská, E., Csicsay, F., Friedländerová, V., Šáner, A., & Škultéty, Ľ. (2019). Evaluation of the possible use of genus *Mentha* derived essential oils in the prevention of SENLAT syndrome caused by *Rickettsia slovaca*. *Journal of Ethnopharmacology, 232*, 55–61.
117. Vidal, F., Vidal, J. C., Gadelha, A. P. R., Lopes, C. S., Coelho, M. G. P., & Monteiro-Leal, L. H. (2007). *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Experimental Parasitology, 115*(1), 25–31.
118. Cosentino, M., Bombelli, R., Conti, A., Colombo, M. L., Azzetti, A., & Bergamaschi, A. (2009). Antioxidant properties and *in vitro* immunomodulatory effects of peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oils in human leukocytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 1*(3), 33–38.
119. Roozbeh, F., Kiani, A., & Azarfar, A. (2013). Effect of artichoke leaves meal and *Mentha* extract (*Mentha piperita*) on immune cells and blood biochemical parameters of broilers. *Global Veterinaria, 10*(1), 99–102.
120. de Sousa, A. A. S., Soares, P. M. G., de Almeida, A. N. S., Maia, A. R., de Souza, E. P., & Assreuy, A. M. S. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of Ethnopharmacology, 130*(2), 433–436.

121. Dohi, S., Terasaki, M., & Makino, M. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(10), 4313–4318.
122. de Sousa Barros, A., de Morais, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., & Fontenelle, R. O. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from Mentha species. *Industrial Crops and Products*, *76*, 557–564.
123. Khatoon, A., Khan, F., Ahmad, N., Shaikh, S., Rizvi, S. M. D., & Shakil, S. (2018). Silver nanoparticles from leaf extract of Mentha piperita: Eco-friendly synthesis and effect on acetylcholinesterase activity. *Life Sciences, 209*, 430–434.
124. Abbasi-Maleki, S., Bakhtiarian, A., & Nikoui, V. (2017). Involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the crude extract of Mentha piperita (Lamiaceae) in the forced swimming test in mice. *Synergy, 5*, 21–28.
125. Mahendran, G., Verma, S. K., & Rahman, L. U. (2021). The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (Mentha spicata L.): A review. *Journal of Ethnopharmacology, 278*, 114266.
126. Abbaszadeh, B., Farahani, H. A., Valadabadi, S. A., & Moaveni, P. (2009). Investigation of variations of the morphological values and flowering shoot yield in different mint species at Iran. *Journal of Horticulture and Forestry, 1*(7), 109–112.
127. Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Abu-Zaitoun, S. Y., Khasati, A. I., & Kalbouneh, S. R. (2019). Biological properties and bioactive components of Mentha spicata L. essential oil: Focus on potential benefits in the treatment of obesity, Alzheimer's disease, dermatophytosis, and drug-resistant infections. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019*, 3834265.
128. Mahboubi, M. (2021). Mentha spicata L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine, 11*(2), 75–81.
129. Babaeian, M., Naseri, M., Kamalinejad, M., Ghaffari, F., Emadi, F., & Feizi, A. (2015). Herbal remedies for functional dyspepsia and traditional Iranian medicine perspective. *Iranian Red Crescent Medical Journal, 17*(11), e20741.
130. Mahboubi, M. (2021). Mentha spicata L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine, 11*(2), 75–81.
131. Pavela, R., Kaffková, K., & Kumšta, M. (2014). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from different *Mentha* L. and *Pulegium* species against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Plant Protection Science*, 50(1), 36–42.
132. Bardaweel, S. K., Bakchiche, B., ALSalamat, H. A., Rezzoug, M., Gherib, A., & Flamini, G. (2018). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–7.
133. Zekri, N., Elazzouzi, H., El Makhoukhi, F., Alaoui El Belghiti, M., & Zair, T. (2019). Drying effect on yields and chemical composition of essential oils extracted from the Moroccan *Mentha spicata* (L.) aerial parts. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(3), 789–798.
134. Bensabah, F., Houbairi, S., Essahli, M., Lamiri, A., & Naja, J. (2013). Chemical composition and inhibitory effect of the essential oil from *Mentha spicata* irrigated by wastewater on the corrosion of aluminum in 1 molar hydrochloric acid. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 31(4), 195–206.
135. Zaidi, S., & Dahiya, P. (2015). *İn vitro* antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*. *International Food Research Journal*, 22(6), 2440–2445.
136. Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., & Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *Journal of Food Science*, 74(7), M358–M363.
137. Hussain, A. I., Anwar, F., Shahid, M., Ashraf, M., & Przybylski, R. (2010). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*, 22(1), 78–84.
138. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1995). Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2384–2388.

139. Al-Fartosi, K. G., Radi, H., & Al-Rekabi, E. A. (2014). Lipid profile of diabetic male rats treated with phenolic compounds of leaves extracts from *Mentha longifolia* and *Mentha spicata*. *International Journal of Pharmacy*, 3(2), 26–31.
140. Mushtaq, A., Iqbal, N., Jamil, M., Khawaja, N. R., Gohar, U. F., & Mehmood, M. A. (2017). Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic action of aqueous ethanolic extracts of *Mentha spicata* (leaves), *Plumeria alba* (leaves) and *Nymphaea alba* (flowers and rhizomes). *International Journal of Biological, Pharmaceutical and Allied Sciences*, 6(1), 108–124.
141. Bayani, M., Ahmadi-Hamedani, M., & Jebelli Javan, A. (2017). Study of hypoglycemic, hypocholesterolemic and antioxidant activities of Iranian *Mentha spicata* leaves aqueous extract in diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(Suppl), 75–82.
142. Rakebizadeh, M., Zahedizadeh, M., & Edalatpanah, Y. (2018). Supplemental effect of zinc oxide nanoparticles and *Mentha spicata* butanol extract on blood glucose of diabetic Wistar rats. *UCT Journal of Research in Science, Engineering and Technology*, 6(3), 1–5.
143. Bouyahya, A., Lagrouh, F., El Omari, N., Bourais, I., El Jemli, M., & Marmouzi, I. (2020). Essential oils of *Mentha viridis* rich in phenolic compounds show important antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective, antidermatophyte and antibacterial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101471.
144. Getahun, Z., Asres, K., Mazumder, A., & Bucar, F. (2008). Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activities of *Mentha aquatica* growing in Ethiopia. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, 26(1), 9–16.
145. Nickavar, B., Alinaghi, A., & Kamalinejad, M. (2008). Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 203–209.
146. Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., & Nabavi, S. F. (2010). Biological activities of *Mentha spicata* L. *Pharmacologyonline*, 1, 841–848.
147. Nikolić, M., & Stevović, S. (2015). Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban Forestry & Urban Greening*, 14(4), 782–789.
148. Koç, S., Işgör, B. S., Işgör, Y. G., Shomali Moghaddam, N., & Yıldırım, O. (2015). The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical Biology*, 53(5), 746–751.
149. Amorim, M. H. R., Gil da Costa, R. M., Lopes, C., & Bastos, M. M. S. M. (2013). Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(7), 559–579.
150. Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615.
151. Kroll, D. J., Shaw, H. S., & Oberlies, N. H. (2007). Milk thistle nomenclature: Why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integrative Cancer Therapies, 6*(2), 110–119. https://doi.org/10.1177/1534735407301754
152. Wu, C. H., Huang, S. M., & Yen, G. C. (2011). Silymarin: A novel antioxidant with antiglycation and antiinflammatory properties *in vitro* and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling, 14*(3), 353–366. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3303
153. Hsu, L. K. G. (1991). [Review of the book *Behavior modification: What it is and how to do it*]. *Behavior Modification, 15*(1), 119–120.
154. Urata, N. M., Urakami, K. M., Zawa, Y. O., Inoshita, N. K., Rie, K. I., & Shirasawa, T. (2010). Silymarin attenuated the amyloid β plaque burden and improved behavioral abnormalities in an Alzheimer's disease mouse model. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74*(11), 2299–2306. https://doi.org/10.1271/bbb.100394
155. Lu, P., Mamiya, T., Lu, L. L., Mouri, A., Zou, L. B., & Nagai, T. (2009). Silibinin prevents amyloid β peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *British Journal of Pharmacology, 157*(7), 1270–1277. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x
156. Indies, W., House, W., West, H. R., Jackson, J. R., James, S. P., & Price, J. H. (1990). Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation intoxication in the rat induced by acute ethanol. *Biochemical Pharmacology, 39*(12), 2027–2034.

157. Lettéron, P., Labbe, G., Degott, C., Berson, A., Fromenty, B., & Delaforge, M. (1990). Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice: Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochemical Pharmacology, 39*(12), 2027–2034.
158. Muriel, P., & Mourelle, M. (1990). Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl_4 liver damage. *Journal of Applied Toxicology, 10*(4), 275–278.
159. Mereish, K. A., Bunner, D. L., Ragland, D. R., & Creasia, D. A. (1991). Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by silymarin: Biochemistry, histopathology, and lethality. *Pharmaceutical Research, 8*(3), 273–277.
160. Muriel, P., Garciapiña, T., Perez-Alvarez, V., & Mourelle, M. (1992). Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *Journal of Applied Toxicology, 12*(6), 439–442. https://doi.org/10.1002/jat.2550120607
161. Wu, C. G., Chamuleau, R. A. F. M., Bosch, K. S., & Frederiks, W. M. (1993). Protective effect of silymarin on rat liver injury induced by ischemia. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology, 64*(1), 259–263.
162. Gupta, Y. K., Sharma, M., & Chaudhary, G. (2002). Pyrogallol-induced hepatotoxicity in rats: A model to evaluate antioxidant hepatoprotective agents. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 24*(8), 497–500.
163. Das, S. K., & Vasudevan, D. M. (2006). Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybum marianum*) derivative on ethanol-induced oxidative stress in liver. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 43*(5), 306–311.
164. Das, S., Roy, P., Auddy, R. G., & Mukherjee, A. (2011). Silymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity. *International Journal of Nanomedicine, 6*, 1291–1301.
165. Ghaffari, A. R., Noshad, H., Ostadi, A., Ghojazadeh, M., & Asadi, P. (2011). The effects of milk thistle on hepatic fibrosis due to methotrexate in rat. *Hepatitis Monthly, 11*(6), 464–468.
166. Bilgin, B. Ç., Tokgöz, S., Çetinkünar, S., Aziret, M., Erdem, H., & Aktimur, R. (2015). The protective effect of silymarin on cholestatic liver injury. *Acta Medica Mediterranea, 31*(5), 953–959.
167. Kelany, M. E., & Abdallah, M. A. (2016). Protective effects of combined β-caryophyllene and silymarin against ketoprofen-induced hepatotoxicity in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 94*(7), 739–744.
168. Jalali, S. M., Najafzadeh, H., & Bahmei, S. (2017). Protective role of silymarin and D-penicillamine against lead-induced liver toxicity and oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health, 33*(6), 512–518.
169. Karimi, G., Ramezani, M., & Tahoonian, Z. (2005). Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2*(3), 383–386.
170. Varzi, H. N., Esmailzadeh, S., Morovvati, H., Avizeh, R., Shahriari, A., & Givi, M. E. (2007). Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin-induced nephrotoxicity in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 30*(5), 477–481.
171. El-Shitany, N. A., El-Haggar, S., & El-Desoky, K. (2008). Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology, 46*(7), 2422–2428. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.014
172. Turgut, F., Bayrak, O., Catal, F., Bayrak, R., Atmaca, A. F., & Koc, A. (2008). Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. *International Urology and Nephrology, 40*(2), 453–460. https://doi.org/10.1007/s11255-007-9229-7
173. Baradaran, A., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Re: Protective role of silymarin and deferoxamine against iron dextran-induced renal iron deposition in male rats. *International Journal of Preventive Medicine, 5*(2), 245–246.
174. Sofian-Azirun, M., Sing, K. W., Kamarudin, M. S., & Juling, J. (2014). Nephroprotective potential of *Rosa damascena* Mill flowers, *Cichorium intybus* Linn roots and their mixtures on gentamicin-induced toxicity in albino rabbits. *Advances in Environmental Biology, 8*(2), 85–92. *(Dergi ismi yanlış yazılmış olabilir. "Animals" dergisi yerine bu kaynak görünmektedir.)*

175. Alcaraz-Contreras, Y., Mendoza-Lozano, R. P., Martínez-Alcaraz, E. R., Martínez-Alfaro, M., Gallegos-Corona, M. A., & Ramírez-Morales, M. A. (2016). Silymarin and dimercaptosuccinic acid ameliorate lead-induced nephrotoxicity and genotoxicity in rats. *Human & Experimental Toxicology, 35*(4), 398–403. https://doi.org/10.1177/0960327115584471
176. Cengiz, M., Ayhanci, A., Kutlu, H. M., & Musmul, A. (2016). Potential therapeutic effects of silymarin and silymarin-loaded solid lipid nanoparticles on experimental kidney damage in BALB/c mice: Biochemical and histopathological evaluation. *Turkish Journal of Biology, 40*(4), 807–814. https://doi.org/10.3906/biy-1511-58
177. Amin, M. M., & Arbid, M. S. (2015). Estimation of the novel antipyretic, anti-inflammatory, antinociceptive and antihyperlipidemic effects of silymarin in albino rats and mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5*(8), 619–623. https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.021
178. Zima, T., Kameníková, L., Janebová, M., Buchar, E., & Tesar, V. (1998). The effect of silibinin on experimental cyclosporine nephrotoxicity. *Renal Failure, 20*(3), 471–479. https://doi.org/10.3109/08860229809045189
179. Bokemeyer, C., Fels, L. M., Dunn, T., Voigt, W., Gaedeke, J., & Schmoll, H. J. (1996). Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. *British Journal of Cancer, 74*(12), 2036–2041. https://doi.org/10.1038/bjc.1996.652
180. Gaedeke, J., Fels, L. M., Bokemeyer, C., Mengs, U., Stolte, H., & Lentzen, H. (1996). Cisplatin nephrotoxicity and protection by silibinin. *Nephrology Dialysis Transplantation, 11*(1), 55–62.
181. El-Shitany, N. A., El-Haggar, S., & El-Desoky, K. (2008). Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology, 46*(7), 2422–2428.
182. Turgut, F., Bayrak, O., Catal, F., Bayrak, R., Atmaca, A. F., & Koc, A. (2008). Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. *International Urology and Nephrology, 40*(2), 453–460.
183. Baradaran, A., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Re: Protective role of Silymarin and deferoxamine against iron dextran-induced renal iron deposition in male rats. *International Journal of Preventive Medicine, 5*(2), 245–246.
184. Sofian-Azirun, M., Sing, K. W., Kamarudin, M. S., & Jeyaraj, J. W. (2014). Nephroprotective potential of Rosa damascena Mill flowers, Cichorium intybus Linn roots and their mixtures on gentamicin-induced toxicity in albino rabbits. *Animals, 2*, 85–92.
185. Alcaraz-Contreras, Y., Mendoza-Lozano, R. P., Martínez-Alcaraz, E. R., Martínez-Alfaro, M., Gallegos-Corona, M. A., & Ramírez-Morales, M. A. (2016). Silymarin and dimercaptosuccinic acid ameliorate lead-induced nephrotoxicity and genotoxicity in rats. *Human & Experimental Toxicology, 35*(4), 398–403.
186. Cengiz, M., Ayhanci, A., Kutlu, H. M., & Musmul, A. (2016). Potential therapeutic effects of silymarin and silymarin-loaded solid lipid nanoparticles on experimental kidney damage in BALB/c mice: Biochemical and histopathological evaluation. *Turkish Journal of Biology, 40*(4), 807–814.
187. Amin, M. M., & Arbid, M. S. (2015). Estimation of the novel antipyretic, anti-inflammatory, antinociceptive and antihyperlipidemic effects of silymarin in albino rats and mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5*(8), 619–623.
188. Zima, T., Kameníková, L., Janebová, M., Buchar, E., & Tesar, V. (1998). The effect of silibinin on experimental cyclosporine nephrotoxicity. *Renal Failure, 20*(3), 471–479.
189. Bokemeyer, C., Fels, L. M., Dunn, T., Voigt, W., Gaedeke, J., & Schmoll, H. J. (1996). Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. *British Journal of Cancer, 74*(12), 2036–2041.
190. Gaedeke, J., Fels, L. M., Bokemeyer, C., Mengs, U., Stolte, H., & Lentzen, H. (1996). Cisplatin nephrotoxicity and protection by silibinin. *Nephrology Dialysis Transplantation, 11*(1), 55–62.
191. Khazim, K., Gorin, Y., Cavaglieri, R. C., Abboud, H. E., & Fanti, P. (2013). The antioxidant silybin prevents high glucose-induced oxidative stress and podocyte injury *in vitro* and in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology, 305*(5), F691–F700.
192. Maghrani, M., Zeggwagh, N. A., Lemhadri, A., El Amraoui, M., Michel, J. B., & Eddouks, M. (2004). Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology, 91*(2–3), 309–316.

193. Abu-zaiton, A. S. (2013). Evaluating the effect of *Silybum marianum* extract on blood glucose, liver and kidney functions in diabetic rats. *Advances in Studies in Biology, 5*(10), 447–454.
194. Villiger, A., Sala, F., Suter, A., & Butterweck, V. (2015). *İn vitro* inhibitory potential of *Cynara scolymus*, *Silybum marianum*, *Taraxacum officinale*, and *Peumus boldus* on key enzymes relevant to metabolic syndrome. *Phytomedicine, 22*(1), 138–144.
195. Vessal, G., Akmali, M., Najafi, P., Moein, M. R., & Sagheb, M. M. (2010). Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal Failure, 32*(6), 733–739.
196. Bangsa, I. K., & YNR. (2018). Effect of milk thistle (*Silybum marianum*) plant parts (seeds and leaves) to control the alloxan induced diabetes in rabbits. *Archives of Anesthesiology and Critical Care, 4*(4), 527–534.
197. Škottová, N., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Večeřa, R., Sobolová, L., & Ulrichová, J. (2004). Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacological Research, 50*(2), 123–130.
198. Malekinejad, H., Rezabakhsh, A., Rahmani, F., & Hobbenaghi, R. (2012). Silymarin regulates the cytochrome P450 3A2 and glutathione peroxides in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine, 19*(7), 583–590.
199. Tuorkey, M. J. (2015). Cancer therapy with phytochemicals: Present and future perspectives. *Biomedical and Environmental Sciences, 28*(11), 808–819.
200. Qin, N. B., Jia, C. C., Xu, J., Li, D. H., Xu, F. X., Bai, J., & Hua, H. M. (2017). New amides from seeds of *Silybum marianum* with potential antioxidant and antidiabetic activities. *Fitoterapia, 119*, 83–89.
201. Leporatti, M. L., & Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology, 87*(2–3), 123–142.
202. Khulood, A. K., & Wasfi, D. A. A. (2015). *İn vitro* evaluation of antibacterial activity of *Silybum marianum* seeds oil, ethanolic extract and antibiotics against isolated bacteria. *International Journal of Humanities and Medical Sciences*, 3(12), 43–48.
203. de Oliveira, D. R., Tintino, S. R., Braga, M. F., Boligon, A. A., Athayde, M. L., & Coutinho, H. D. (2015). *İn vitro* antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 292797.
204. Yun, D. G., & Lee, D. G. (2017). Assessment of silibinin as a potential antifungal agent and investigation of its mechanism of action. *IUBMB Life*, 69(8), 631–637.
205. Cardile, A. P., & Mbuy, G. K. N. (2013). Anti-herpes virus activity of silibinin, the primary active component of *Silybum marianum*. *Journal of Herbal Medicine*, 3(4), 132–136.
206. Jekka's (2025). *Jekka's Herbs*. Erişim 18.04.2025 https://www.jekkas.com/collections/jekkapedia?_=pf&pf_t_available_as=Plant&pf_t_popular=Jekka%27s%20Herb
207. Wu, C., Zheng, M., Yang, Y., Gu, X., Yang, K., & Li, M. (2020). Furin: A potential therapeutic target for COVID-19. *iScience*, 23(10), 101642.
208. Yang, C. W., Hsu, H. Y., Lee, Y. Z., Jan, J. T., Chang, S. Y., & Lin, Y. L. (2023). Natural fucoidans inhibit coronaviruses by targeting viral spike protein and host cell furin. *Biochemical Pharmacology*, 215, 115688.
209. Kocyigit, A., Kanımdan, E., Yenigun, V. B., Ozman, Z., Balıbey, F. B., & Durmuş, E. (2024). Olive leaf extract downregulates the protein expression of key SARS-CoV-2 entry enzymes ACE-2, TMPRSS2, and furin. *Chemistry & Biodiversity*, 21(8), e202400717.
210. Omotuyi, I. O., Nash, O., Ajiboye, B. O., Olumekun, V. O., Oyinloye, B. E., & Osuntokun, O. T. (2021). Aframomum melegueta secondary metabolites exhibit polypharmacology against SARS-CoV-2 drug targets: *İn vitro* validation of furin inhibition. *Phytotherapy Research*, 35(2), 908–919.
211. Zothantluanga, J. H., Gogoi, N., Shakya, A., Chetia, D., & Lalthanzara, H. (2021). Computational guided identification of potential leads from *Acacia pennata* (L.) Willd. as inhibitors for cellular entry and viral replication of SARS-CoV-2. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 7*(1), 201.

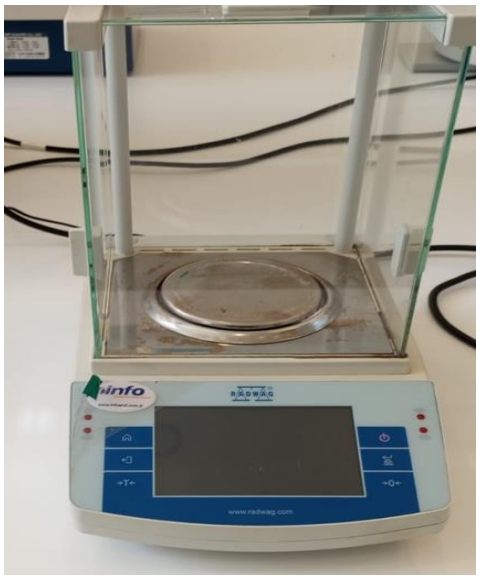
212. Bandyopadhyay, S., Abiodun, O. A., Ogboo, B. C., Kola-Mustapha, A. T., Attah, E. I., & Edemhanria, L. (2022). Polypharmacology of some medicinal plant metabolites against SARS-CoV-2 and host targets: Molecular dynamics evaluation of NSP9 RNA binding protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 40*(22), 11467–11483.
213. Roy, A. V., Chan, M., Banadyga, L., He, S., Zhu, W., & Chrétien, M. (2024). Quercetin inhibits SARS-CoV-2 infection and prevents syncytium formation by cells co-expressing the viral spike protein and human ACE2. *Virology Journal, 21*(1), 29.
214. Rajak, P., & Ganguly, A. (2023). In silico study unfolds inhibitory potential of epicatechin gallate against SARS-CoV-2 entry and replication within the host cell. *Mechanobiology in Medicine, 1*(2), 100015.
215. Emre, İ., Kurşat, M., & Yılmaz, Ö. (2021). Chemical compositions, radical scavenging capacities and antimicrobial activities in seeds of *Satureja hortensis* L. and *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* from Turkey. *Brazilian Journal of Biology, 81*(1), 144–153.
216. Đorđević, S., Cakić, M., & Amr, S. (2000). The extraction of apigenin and luteolin from the sage *Salvia officinalis* L. from Jordan. *Facta Universitatis, Series: Working and Living Environmental Protection, 1*(5), 87–93.
217. Anagnostou, M., Tomou, E. M., Krigas, N., & Skaltsa, H. (2025). Phenolic constituents of Greek native *Salvia* species: A comprehensive review. *Phytochemistry Reviews*.
218. Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products, 43*(1), 827–831.
219. Goc, A., Niedzwiecki, A., Ivanov, V., Ivanova, S., & Rath, M. (2022). Inhibitory effects of specific combination of natural compounds against SARS-CoV-2 and its Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa, and Mu variants. *European Journal of Microbiology and Immunology, 11*(4), 87–94.
220. Ni, J., Wen, X., Wang, S., Zhou, X., & Wang, H. X. (2023). Investigation of the inhibitory combined effect and mechanism of (−)-epigallocatechin gallate and chlorogenic acid on amylase: Evidence of synergistic interaction. *Food Bioscience, 56*, 103013.
221. Lakhani, K. G., Hamid, R., Gupta, S., Prajapati, P., Prabha, R., & Patel, S. (2024). Exploring the therapeutic mechanisms of millet in obesity through molecular docking, pharmacokinetics, and dynamic simulation. *Frontiers in Nutrition, 11*, 1453819.
222. Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis, 21*(8), 589–598.
223. Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., & Wang, Y. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 10*(5), 766–788.
224. Ahmed, D., Fatima, K., & Saeed, R. (2014). Analysis of phenolic and flavonoid contents, and the anti-oxidative potential and lipid peroxidation inhibitory activity of methanolic extract of *Carissa opaca* roots and its fractions in different solvents. *Antioxidants, 3*(4), 671–683.
225. Cvetanović, A. (2021). Apigenin. In M. Mushtaq & F. Anwar (Eds.), *A Centum of Valuable Plant Bioactives* (pp. 545–562).
226. Moretti, E., Mazzi, L., Terzuoli, G., Bonechi, C., Iacoponi, F., & Martini, S. (2012). Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reproductive Toxicology, 34*(4), 651–657.
227. Freeman, B. L., Eggett, D. L., & Parker, T. L. (2010). Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *Journal of Food Science, 75*(6), C570–C576.

EKLER

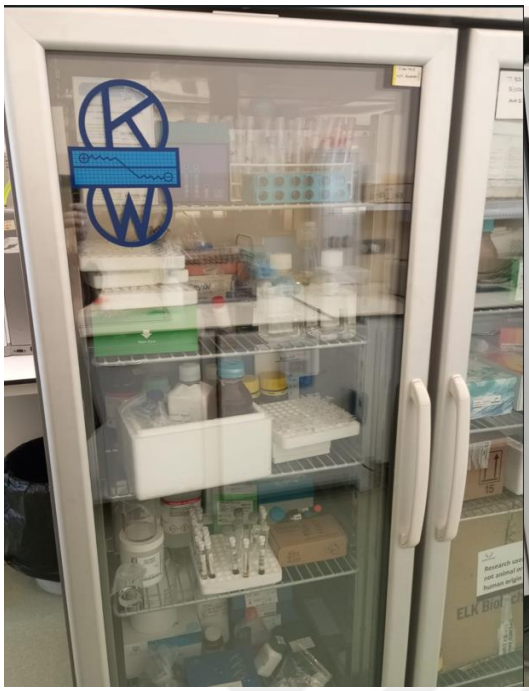
EK-1.Deneyle İlgili Fotoğraflar





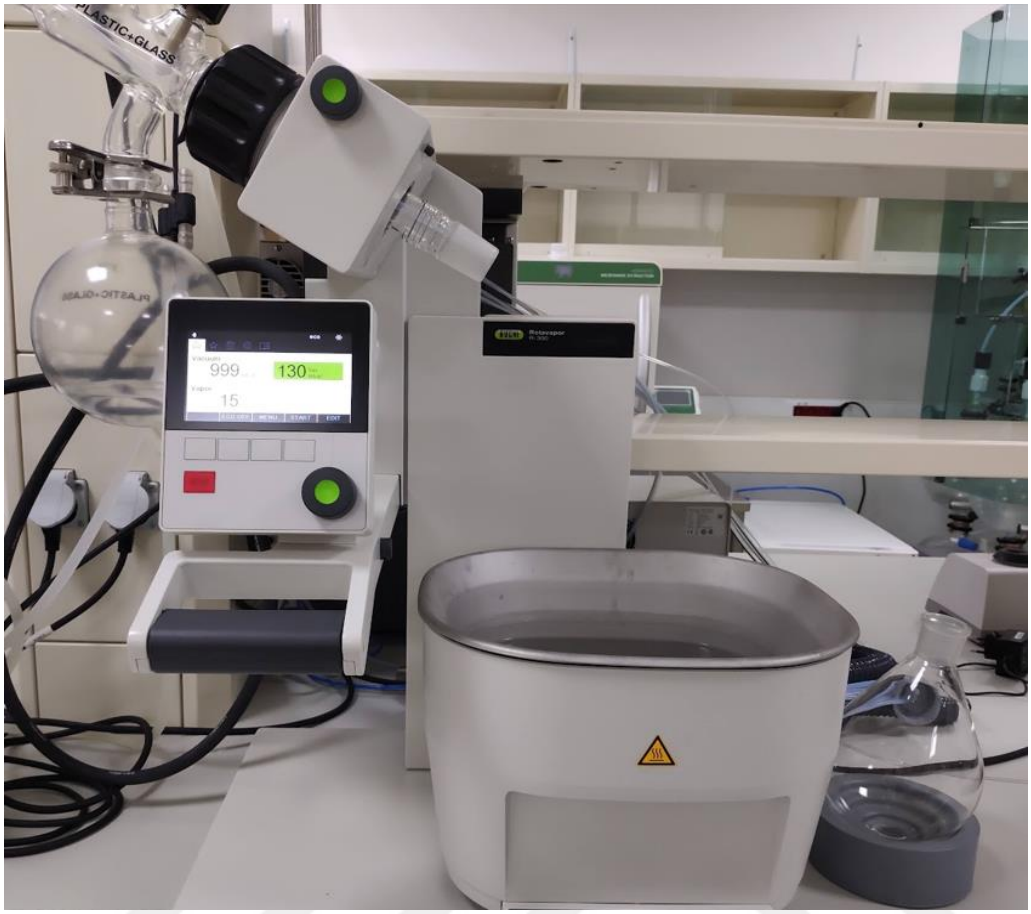







Thermo
SCIENTIFIC
25.0
HERATHERM




PLASTIC+GLASS
Vacuum
999
130
Vapor
15
MENU
START
EDIT
Rotavapor



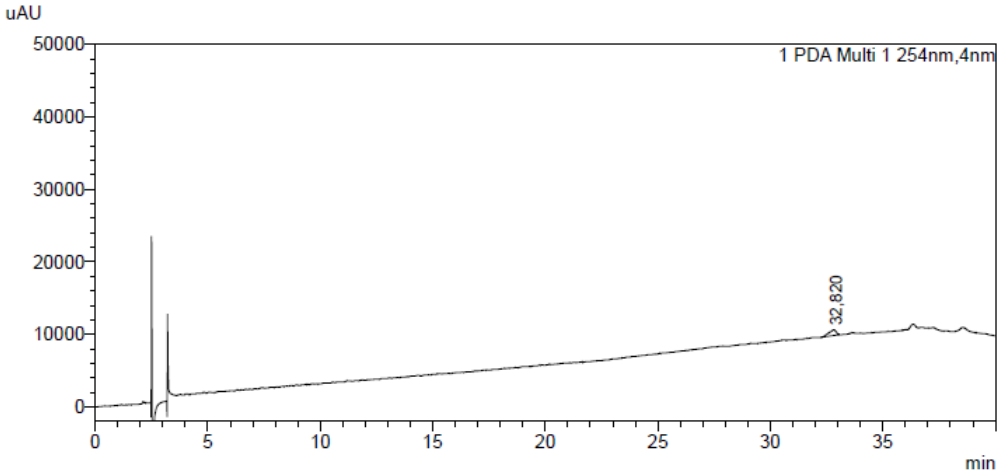
EK-2.*Origanum Vulgare* Hekzan HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 1_2000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 1_2000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 6 örnek.lcb		
Vial #	: 3-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 1.10.2024 12:22:02	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 13:07:54	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	32,820	17638	778	0,568	mg/L		Quercetin
Total		17638	778				

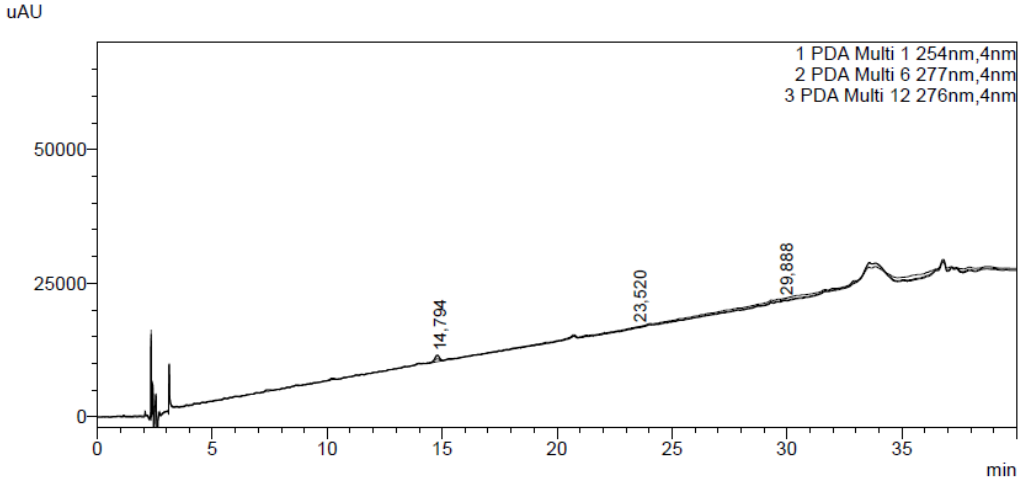
EK-3.*Origanum Vulgare* Kloroform HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 2_1000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 2_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 7 örnek.lcb		
Vial #	: 3-5	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 30.09.2024 17:28:20	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 12:57:39	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	23,520	1034	49	0,051	mg/L		Rutin
Total		1034	49				

PDA Ch6 277nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	14,794	16287	1162	2,277	mg/L		Epicatechin
Total		16287	1162				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	29,888	2031	196	0,023	mg/L		Cinnamic Acid
Total		2031	196				

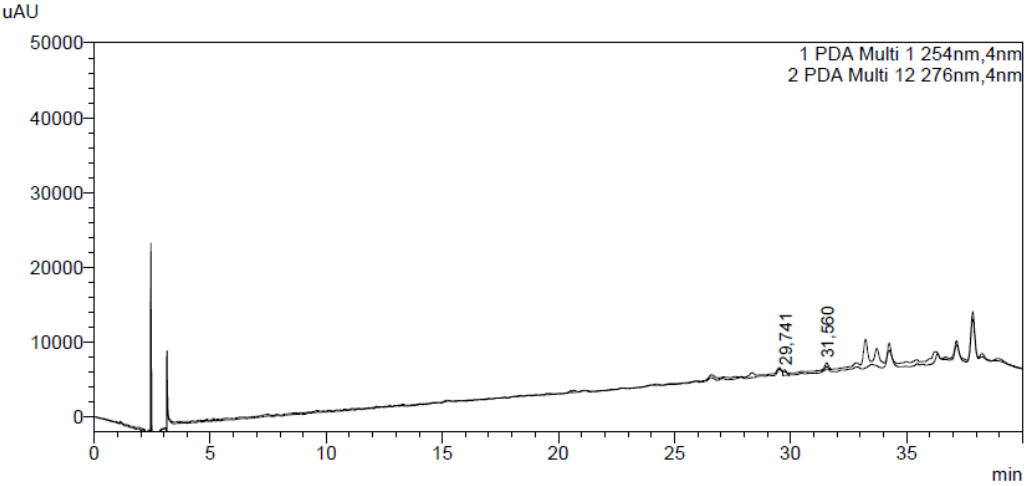
EK-4.*Mentha pipperita* Hekzan HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 4_2000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 4_2000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 6 örnek.lcb		
Vial #	: 3-2	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 1.10.2024 13:02:25	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 12:54:26	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	31,560	10671	896	0,344	mg/L		Quercetin
Total		10671	896				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	29,741	7928	743	0,089	mg/L		Cinnamic Acid
Total		7928	743				

EK-5.***Mentha Piperita*** **Kloroform HPLC Sonuçları**

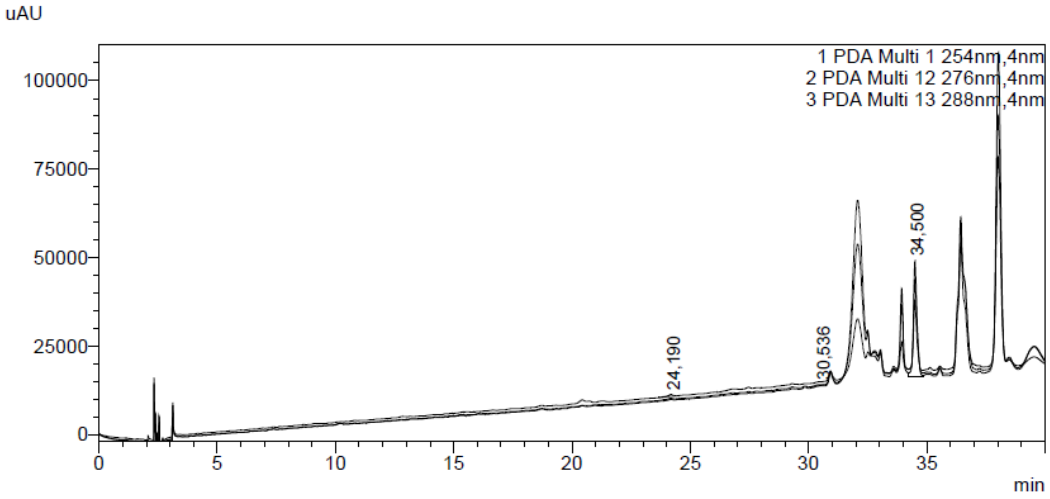
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: 5_1000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 5_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 7 örnek.lcb		
Vial #	: 3-7	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 30.09.2024 18:49:03	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 12:44:44	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	24,190	8392	569	0,413	mg/L		Rutin
Total		8392	569				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	30,536	6245	214	0,070	mg/L		Cinnamic Acid
Total		6245	214				

PDA Ch13 288nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	34,500	346837	32579	8,580	mg/L		Naringenin
Total		346837	32579				

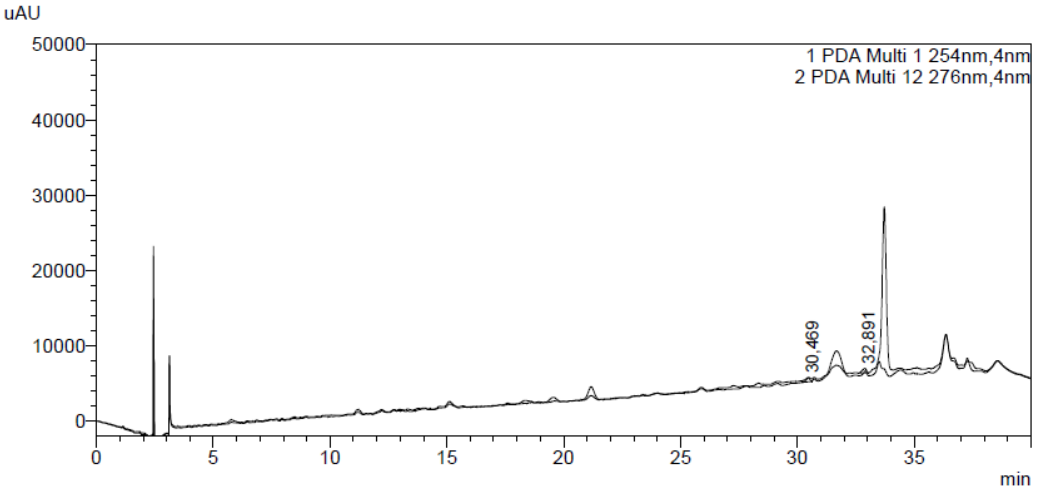
EK-6.*Mentha Spicata* Hekzan HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 7_2000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 7_2000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 6 örnek.lcb		
Vial #	: 3-3	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 1.10.2024 13:42:49	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 12:39:36	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	32,891	7224	602	0,233	mg/L		Quercetin
Total		7224	602				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	30,469	5889	527	0,066	mg/L		Cinnamic Acid
Total		5889	527				

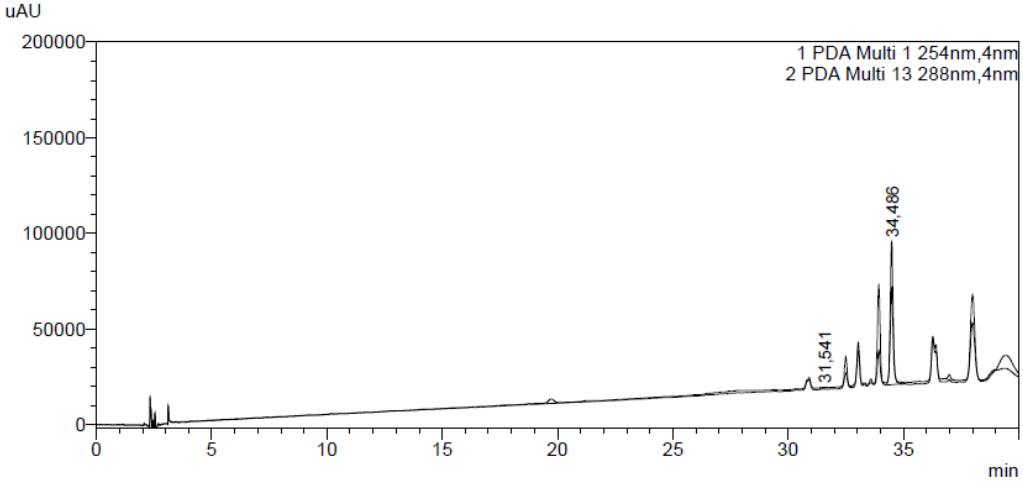
EK-7.*Mentha Spicata* Kloroform HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 8_1000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 8_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 7 örnek.lcb		
Vial #	: 3-6	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 30.09.2024 18:08:42	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 12:35:18	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	31,541	1888	222	0,061	mg/L		Quercetin
Total		1888	222				

PDA Ch13 288nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	34,486	658612	74602	16,292	mg/L		Naringenin
Total		658612	74602				

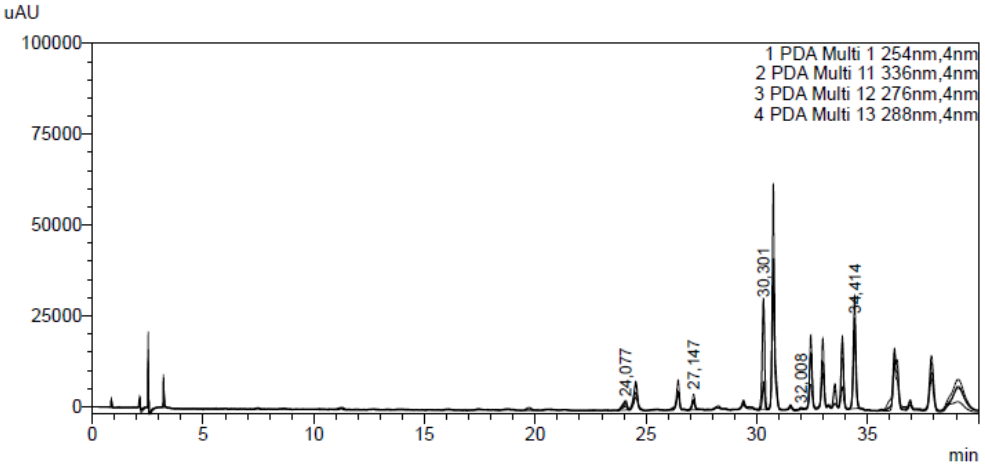
EK- 8.*Mentha spicata* Etilasetat HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 9_1000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 9_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 5 örnek.lcb		
Vial #	: 1-37	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 26.09.2024 16:39:32	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 12:22:34	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	24,077	31599	2322	1,555	mg/L		Rutin
2	32,008	2179	323	0,070	mg/L		Quercetin
Total		33778	2645				

PDA Ch11 336nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	27,147	39669	4275	0,870	mg/L		Apigenin-7-O-glucoside
Total		39669	4275				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	30,301	223699	29547	2,509	mg/L		Cinnamic Acid
Total		223699	29547				

PDA Ch13 288nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	34,414	214864	24825	5,315	mg/L		Naringenin
Total		214864	24825				

EK-9.*Salvia Oficinalis* Hekzan HPLC Sonuçları

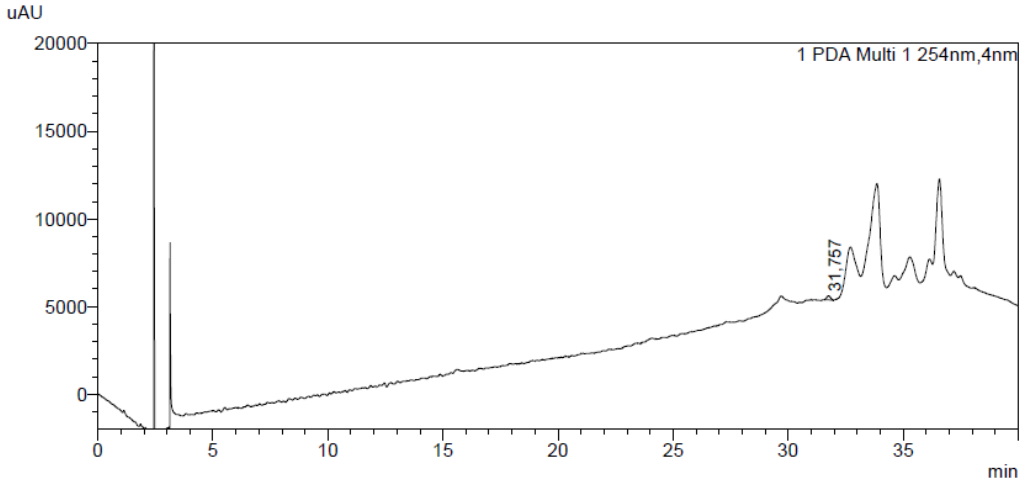
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: 10_2000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 10_2000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 6 örnek.lcb		
Vial #	: 3-4	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 1.10.2024 14:23:11	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 14:39:45	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	31,757	2601	232	0,084	mg/L	Quercetin
Total		2601	232			

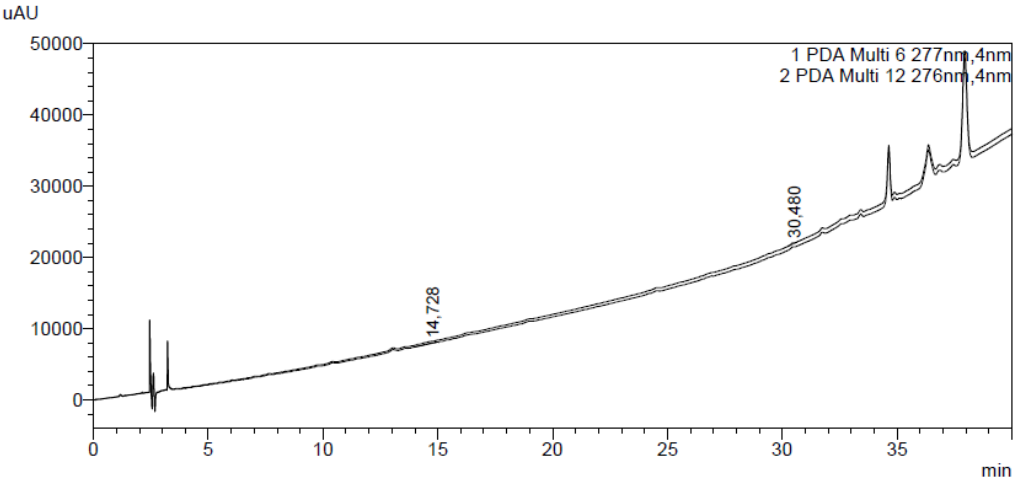
EK-10.*Salvia Oficinalis* Kloroform HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 11_1000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 11_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 7 örnek.lcb		
Vial #	: 3-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 30.09.2024 14:46:48	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 14:37:42	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch6 277nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	14,728	1611	56	0,225	mg/L		Epicatechin
Total		1611	56				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	30,480	1878	162	0,021	mg/L		Cinnamic Acid
Total		1878	162				

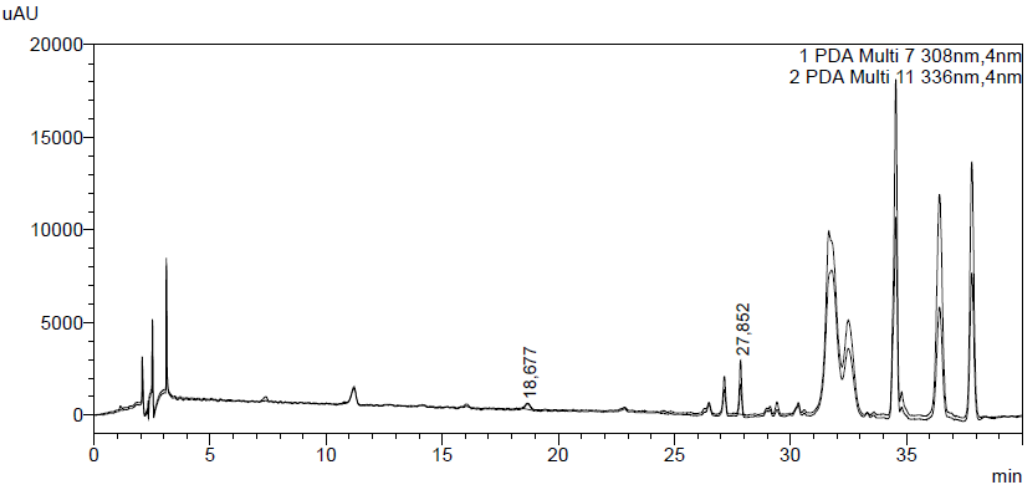
EK-11.*Salvia Oficinalis* Etilasetat HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 12_1000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 12_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 5 örnek.lcb		
Vial #	: 1-38	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 26.09.2024 17:19:54	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 14:35:53	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch7 308nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	18,677	4334	313	0,055	mg/L		p-Coumaric Acid
Total		4334	313				

PDA Ch11 336nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	27,852	20859	2911	0,457	mg/L		Apigenin-7-O-glucoside
Total		20859	2911				

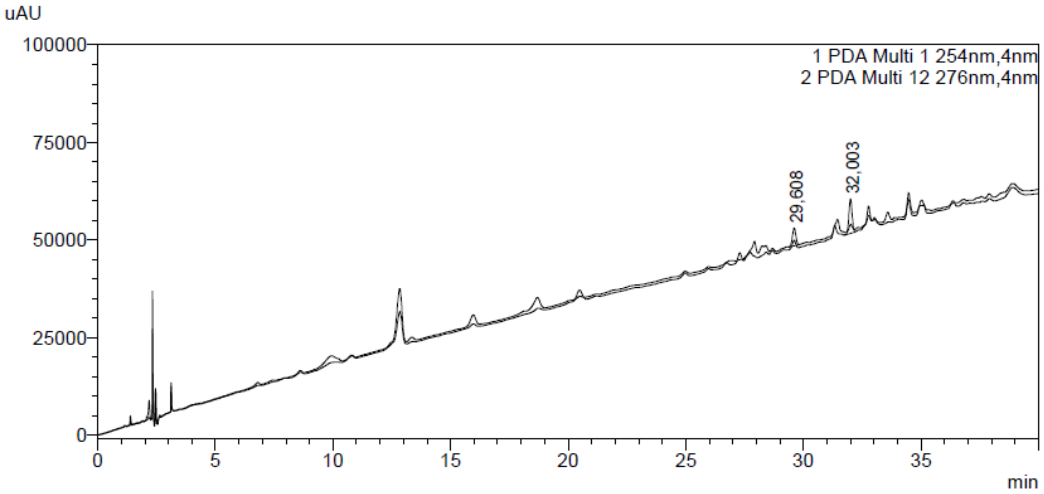
EK-12.*Thymus vulgaris* Kloroform HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 14_1000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 14_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 7 örnek.lcb		
Vial #	: 3-2	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 30.09.2024 15:27:11	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 14:32:48	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	32,003	84147	8814	2,710	mg/L		Quercetin
Total		84147	8814				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	29,608	46339	4562	0,520	mg/L		Cinnamic Acid
Total		46339	4562				

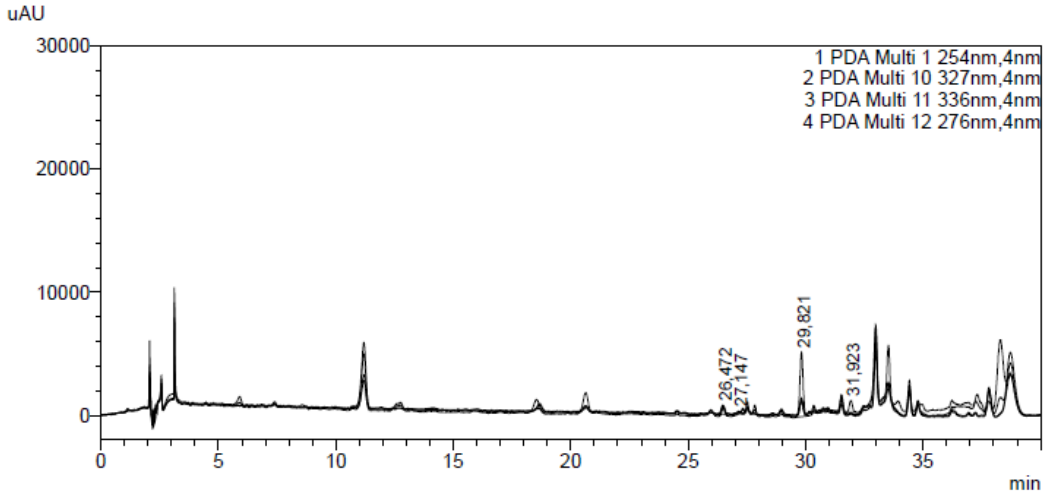
EK-13.*Thymus vulgaris* Etilasetat HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 15_10000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 15_1000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 5 örnek.lcb		
Vial #	: 1-39	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 26.09.2024 18:00:18	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 14:29:17	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	31,923	8975	972	0,289	mg/L		Quercetin
Total		8975	972				

PDA Ch10 327nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	26,472	6456	721	0,583	mg/L		Chicoric Acid
Total		6456	721				

PDA Ch11 336nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	27,147	2225	196	0,049	mg/L		Apigenin-7-O-glucoside
Total		2225	196				

PDA Ch12 276nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	29,821	49733	5225	0,558	mg/L		Cinnamic Acid
Total		49733	5225				

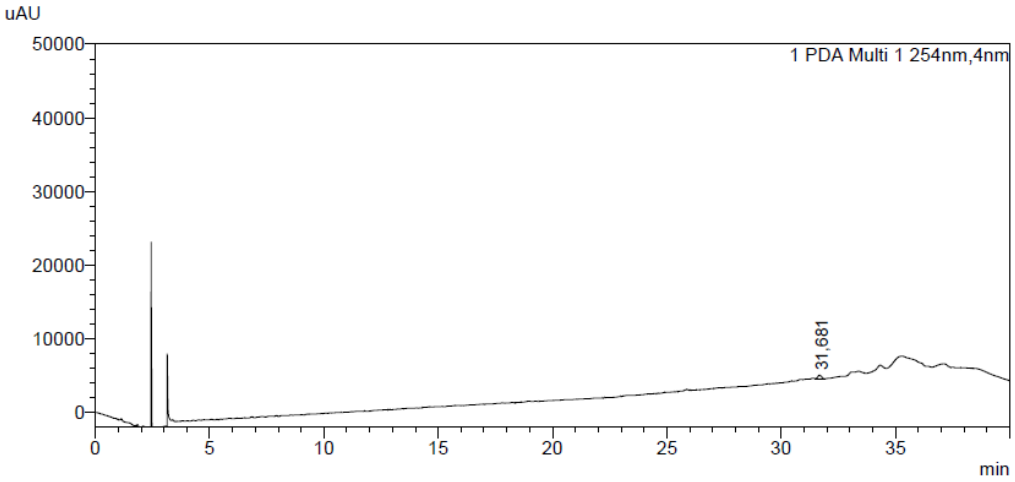
EK-14.*Silybum Marianum* Hekzan HPLC Sonuçları

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: 20_4000ppm		
Sample ID	:		
Data Filename	: 20_4000ppm.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: 6 örnek.lcb		
Vial #	: 3-6	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 1.10.2024 15:43:57	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 7.10.2024 13:06:52	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	31,681	5122	499	0,165	mg/L		Quercetin
Total		5122	499				