



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

***HELICHRYSUM PAMPHYLICUM* DAVIS & KUPICHA
TÜRÜNÜN FİTOKİMYASAL PROFİL VE BİYOLOJİK
AKTİVİTE YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Alper ÇİMİK

Eskişehir 2022

***HELICHRYSUM PAMPHYLICUM* DAVIS & KUPICHA TÜRÜNÜN
FİTOKİMYASAL PROFİL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

Alper ÇİMİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Alper ÇİMİK'in "*Helichrysum pamphylicum* Davis & Kupicha Türünün Fitokimyasal Profil ve Biyolojik Aktivite Yönünden İncelenmesi" başlıklı tezi 19.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı- Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN	
Üye	: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK	
Üye	: Prof. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled “*Helichrysum pamphylicum* Davis & Kupicha Türünün Fitokimyasal Profil ve Biyolojik Aktivite Yönünden İncelenmesi” has been prepared and submitted by Alper ÇİMİK in partial full fillment of there quirements in “Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination” for the Degree of Master of Science in Pharmacognosy Department has been examined and approved on 19.01.2022.

	<u>Comitee Members</u>	<u>Signature</u>
Member (Supervisor)	: Asst. Prof. Dr. Hülya Tuba KIYAN	
Member	: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK	
Member	: Prof. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Director of Graduate School

ÖZET

HELICHRYSUM PAMPHYLICUM DAVIS & KUPICHA TÜRÜNÜN FİTOKİMYASAL PROFİL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Alper ÇİMİK

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN

Asteraceae familyasına ait *Helichrysum* türleri halk arasında diüretik, analjezik, sindirimi kolaylaştırıcı, antioksidan ve hepatoprotektif olarak pek çok terapötik amaçla kullanılmaktadır. Ülkemizde yetişen ve endemik bir tür olan *Helichrysum pamphylicum* Davis & Kupicha türünün açık çiçekli ve kapalı çiçekli formlarından hazırlanan infüzyon ve dekoksionların YBSK-DAD ile analizleri sonucu fitokimyasal içeriklerinde fenolik asitlerden protokateşik asit, kafeik asit, klorojenik asit, para-kumarik asit, ferulik asit, orto-kumarik asit ve trans-sinamik asit tespit edilmiştir. *H. pamphylicum* türünün açık çiçekli ve kapalı çiçekli formlarından elde edilen uçucu yağlarının GK ve GK/KS analizi ile majör bileşik olarak asetik asit, γ -muurolen, γ -kadinen, δ -kadinen ve germakren D saptanmıştır. Biyolojik aktivite sonuçlarına göre; *H. pamphylicum* türünün açık çiçekli ve kapalı çiçekli formlarının infüzyon, dekoksion ve uçucu yağlarının makro ve mikro şelatlayıcı yöntemle göre iyi düzeyde antioksidan, iyi düzeyde MAO-B, orta düzeyde kolinesteraz, iyi düzeyde MMP-2 inhibitör etkilerinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca, yalnızca ekstreler ABTS radikal katyon renksizleştirme ve DPPH serbest radikal süpürücü yöntemle göre iyi düzeyde antioksidan, COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon yöntemine göre orta düzeyde antienflamatuvar etki göstermiştir. Spesifik olarak *H. pamphylicum* çiçekli formlarının dekoksionu kuvvetli derecede CD73 enzim inhibisyonu ile antitümöral aktivite göstermiştir. *H. pamphylicum* açık çiçekli ve kapalı çiçekli formlarının infüzyon, dekoksion ve uçucu yağlarının antioksidan, anti-Alzheimer, anti-Parkinson ve antienflamatuvar aktiviteleri bu tez ile ilk kez çalışılmıştır. **Anahtar Sözcükler:** *H. pamphylicum*, YBSK-DAD, MAO-B, Kolinesteraz inhibitörü, Antikanser

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *HELICHRYSUM PAMPHYLICUM* DAVIS & KUPICHA SPECIES IN TERMS OF PHYTOCHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Alper ÇİMİK

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2022

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Hülya Tuba KIYAN

Of the phenolic acids, protocatechic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, para-coumaric acid, ferulic acid, ortho-coumaric acid, and trans-cinnamic acid were determined in the phytochemical content with the analysis of infusions and decoctions prepared from *Helichrysum pamphylicum* Davis & Kupicha, which is the member of Asteraceae family, with flowers and buds, an endemic species grown in our country, by HPLC-DAD. Acetic acid, γ -muurolene, γ -cadinene, δ -cadinene, and germacrene D were identified as major compounds by GC and GC/MS method from *H. pamphylicum* with flowers and buds. According to the results of biological activity; infusion, decoction and essential oils of *H. pamphylicum* with flowers and buds have strong antioxidant activity, strong MAO-B, moderate cholinesterase, and strong MMP-2 inhibitory effects on the basis of macro and micro chelating method. In addition, only the extracts proved strong antioxidant effect by ABTS radical cation decolorization and DPPH free radical scavenging method, and moderate anti-inflammatory effect by COX-1 and COX-2 enzyme inhibition method. Decoction of *H. pamphylicum* with flowers indicated specific antitumor activity with strong CD-73 enzyme inhibition. Antioxidant, anti-Alzheimer's, anti-Parkinson's and anti-inflammatory activities of infusion, decoction, and essential oils of *H. pamphylicum* with flowers and buds were studied for the first time in this thesis.

Keywords: *H. pamphylicum*, HPLC-DAD, MAO-B, Cholinesterase inhibitor, Anticancer

TEŞEKKÜR

Tez ve bilimsel çalışmalarım sürecince, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, her türlü teknik ve etik bilgiler çerçevesinde iyi ve samimi niyetleriyle beni özgün bilime teşvik eden çok kıymetli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN’a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen, tez bitkilerimin polar bileşenlerinin incelenmesini, zor koşullarda dahi büyük bir özveriyle gerçekleştiren hocam Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK’e,

Tez bitkilerimin uçucu bileşenlerinin tayinini büyük bir şevkle gerçekleştiren Prof. Dr. Gülmira ÖZEK hocama,

Çalışmalarım sırasında Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (AÜBİBAM)’nin imkanlarını kullanmam konusunda her türlü kolaylığı sağlayan eski AÜBİBAM Müdürü Prof. Dr. Temel ÖZEK hocama,

Antikanser çalışmalar ve doğal kaynaklı ilaç hammaddeleri konusundaki bilimsel yönlendirmeleri ve uzak mesafelerden dahi olsa desteğini her daim yanımda hissettiren hocam Prof. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN’e,

Bitki fotoğraflarının çekilmesinde danışman hocama yardım eden, samimi ve değerli fikirlerini ileterek bizlere yol gösteren Elif PAKSOY’a,

Bu zorlu süreçte iyi günlerimde mutluluklarıma şahit ve kötü günlerimde dertlerime çare olan uzaktan ve yakından tam 22 senedir bağımızın hiç kopmadığı ve kopmayacağı kıymetli arkadaşım İbrahim CAV’a,

Güler yüzüyle sevgisini eksik etmeyip acı çekse dahi bunu bana belli etmemeye çalışarak hayatın her türlü zorluklarına ve yaşadığı onca büyük hastalıklara rağmen hayata sıkı sıkı tutunup biz aile gençlerine örnek olan canım anneannem Sevim GÜLDAŞ’a,

İç dünyamdaki düşünceleri dogmatik skolastik yapıdan arındırıp, güncel ve her türlü durumdan haberdar olmamı belirterek sıkı bağlar ile bilime tutunmam gerektiğini bana her zaman öğütleyen canım dedem merhum Mehmet GÜLDAŞ’a,

Bu zorlu süreçte bana güler yüzünü eksik etmeyen ve her türlü koşulda benim fikirlerime değer veren, her zaman yanımda olup zorlukları aşma sebebim olan ve hayatın zorluklarını birlikte aşacağım canım arkadaşım Şevval KARACA’ya,

Her şeyden önemlisi, benim her zaman çalışmamı isteyen, hayatta her daim her türlü zorluğun aslında zorluk değil bir sınav olduğunu hissettiren, sağ omzumda elini hissettiğim, her daim güçlü olmamı isteyen ve azimle çalışmanın bir insanı ne kadar güçlü yapacağını öğreten, “hangi işi yaparsan yap her zaman en iyisini yapmaya çalış” mottosu ile bana azim veren, insanlık ve bilime çokça önem vermemin yegâne ve mutlak sebebi en kıymetlim, canım annem merhum Gülsüm Süreyya ÇİMİK’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Alper ÇİMİK

19/01/2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

19/01/2022

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

HELICHRYSUM PAMPHYLICUM DAVIS & KUPICHA TÜRÜNÜN FİTOKİMYASAL PROFİL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE YÖNÜNDEN İNCELENMESİ	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
FINAL APPROVAL FOR THESIS	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	viii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
GÖRSELLER DİZİNİ	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Asteraceae Familyası Türlerine Ait Botanik Özellikler	4
2.2. <i>Helichrysum</i> Geartner Cinsi Botanik Özellikleri	4
2.2.1. <i>H. pamphylicum</i> Davis & Kupicha.....	7
2.3. <i>Helichrysum</i> Türlerinin Fitokimyasal Bileşimleri.....	8
2.3.1. Pironlar	9
2.3.2. Floroglusinoller	9
2.3.3. Benzofuranlar ve Ftalitler	10
2.3.4. Flavonoitler, Kalkonlar ve Fenolik Asitler	11

2.3.5. Terpenler ve Uçucu Yağlar	13
2.3.6. Diğer Bileşikler	18
2.4. <i>Helichrysum</i> Türlerine Ait Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	25
2.5. <i>Helichrysum</i> Türlerinin Etnofarmakolojik Kullanımları	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Bitkisel Materyal.....	32
3.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	32
3.2.1. Kimyasal Maddeler	32
3.2.2. Cihazlar	33
3.3. <i>H. pamphylicum</i> Ekstrelerinin Elde Edilmesi	34
3.3.1. <i>H. pamphylicum</i> Dekoksiyonunun Hazırlanması	34
3.3.2. <i>H. pamphylicum</i> İnfüzyonunun Hazırlanması.....	34
3.4. <i>H. pamphylicum</i> Uçucu Yağlarının Eldesi.....	34
3.5. Fitokimyasal Analizler	34
3.5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi.....	34
3.5.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarının Belirlenmesi	35
3.5.3. Ters-Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK-DAD) ile Fenolik Asit Miktar Tayini.....	36
3.5.4. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizi ile Uçucu Yağ Bileşimlerinin Belirlenmesi.....	37
3.6. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	37
3.6.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	37
3.6.1.1. Metal şelatlayıcı yöntem.....	37
3.6.1.2. ABTS ⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemi.....	39
3.6.1.3. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem	40
3.6.2. Enzimatik Aktivite Deneyleri.....	41

3.6.2.1. AChE ve BuChE inhibitör aktivite yöntemi.....	41
3.6.2.2. MAO-B enzim inhibisyon aktivite yöntemi	43
3.6.2.3. COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon aktivite yöntemi (antienflamatuvar etki)	45
3.6.2.4. 5-LOX enzim inhibisyon aktivite yöntemi (antienflamatuvar etki)	47
3.6.2.5. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) enzim inhibisyon testi (antikanser etki).....	50
3.6.2.6. 5' Nükleotidaz (CD73) enzim inhibisyon aktivite yöntemi (antikanser etki)	52
4. BULGULAR	55
4.1. İnfüzyon, Dekoksiyon ve Uçucu Yağ Verimleri	55
4.2. İnfüzyon ve Dekoksiyonların Toplam Fenolik Madde Miktarları	55
4.3. İnfüzyon ve Dekoksiyonların Toplam Flavonoit Madde Miktarları.....	57
4.4. Ters-Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK-DAD) ile Fenolik Asit Miktar Tayini	59
4.5. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizi ile Uçucu Yağ Bileşimlerinin Belirlenmesi	61
4.6. Biyolojik Aktivite Sonuçları	65
4.6.1. Antioksidan Aktivite	65
4.6.1.1. Metal şelatlayıcı yöntem	65
4.6.1.2. ABTS ⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemi	66
4.6.1.3. DPPH [•] serbest radikal süpürücü yöntem	67
4.6.2. Enzimatik Aktivite Sonuçları.....	68
4.6.2.1. AChE ve BuChE enzim inhibisyon testi sonuçları	68
4.6.2.2. MAO-B enzim inhibisyon sonuçları.....	70
4.6.2.3. COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon sonuçları.....	71
4.6.2.4. 5-LOX enzim inhibisyon sonuçları	72

4.6.2.5. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) enzim inhibisyon testi sonuçları.....	73
4.6.2.6. 5'-NT (CD73) enzim inhibisyon test sonuçları	74
5. TARTIŞMA	76
KAYNAKÇA.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	0

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 <i>Helichrysum</i> sp. flavonoit ve fenolik asitleri.....	12
Çizelge 2.2. <i>Helichrysum</i> sp. uçucu yağlarının majör bileşenleri.....	14
Çizelge 4.1 <i>H. pamphylicum</i> ekstre ve uçucu yağlarının % verim hesapları	55
Çizelge 4.2 <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon ve infüzyonlarının toplam fenolik madde miktarları.....	56
Çizelge 4.3 <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon ve infüzyonlarının rutine göre toplam flavonoit madde miktarları	58
Çizelge 4.4 <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon ve infüzyonlarının ters-faz YBSK ile tespit edilen fenolik asit miktarları.....	59
Çizelge 4.5 <i>H. pamphylicum</i> kapalı çiçek durumlu bitki uçucu yağının kimyasal bileşimi	62
Çizelge 4.6 <i>H. pamphylicum</i> açık çiçek durumlu bitki uçucu yağının kimyasal bileşimi	64
Çizelge 4.7 <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon ve infüzyonlarının makro düzeyde metal şelatlayıcı aktivite sonuçları	65
Çizelge 4.8 <i>H. pamphylicum</i> Dekoksasyon, İnfüzyon ve uçucu yağlarının mikro düzeyde metal şelatlayıcı IC ₅₀ sonuçları	66
Çizelge 4.9 <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının ABTS ^{•+} radikal kasyon renksizleştirme aktivite sonuçları	66
Çizelge 4.10 <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının DPPH [•] serbest radikal süpürücü aktivite sonuçları	68
Çizelge 4.11 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının AChE inhibisyon aktivite sonuçları.....	69
Çizelge 4.12 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının BuChE inhibisyon aktivitesi sonuçları	70
Çizelge 4.13 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının MAO-B inhibisyon aktivite sonuçları.....	70
Çizelge 4.14 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının COX-1 inhibisyon IC ₅₀ sonuçları.....	72

Çizelge 4.15 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının COX-1 inhibisyon aktivite sonuçları.....	72
Çizelge 4.16 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının 5-LOX inhibisyon aktivite sonuçları.....	73
Çizelge 4.17 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının MMP-2 inhibisyon IC ₅₀ sonuçları.....	73
Çizelge 4.18 <i>H. pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının CD73 aktivasyon sonuçları.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mikropiron, 23-metilaurisepiron, 23-metilitidipiron ve italipiron (soldan sağa sırası ile) (Hänsel vd., 1980, s. 639-644)	9
Şekil 2.2. helinudifolin, helivinen A, helivinen B ve kespitat (soldan sağa sırası ile) (Jakupovic vd., 1986, s. 1133-1142, Popoola vd., 2015, s.17309-24)	10
Şekil 2.3. isokproilbitalin A, nonanoilbitalin A, oleilbitalin A, platiteroftalit, 5,7-dihidroksiftalit, 5,7-dimetoksiftalit, 7-hidroksi-5-metoksiftalit (üst sıra önce olmak üzere soldan sağa sırası ile) (Jakupovic vd., 1987, s. 580-581; Vrkoc vd., 1973; Opitz vd., 1971, s. 228-230)	11
Şekil 2.4. Seskiterpenlerin (Eudesman, drimane ve guaiane seskiterpenleri) kimyasal yapıları (Bianchini vd., 2004, s. 983-984).....	18
Şekil 2.5. Kersetin ve Kemferol (soldan sağa sırası ile) (Meriçli vd., 1983, s. 112-115)	19
Şekil 2.6. Helichrysin-A ve Tilirozit (soldan sağa sırası ile) (Öztürk vd., 2004)	20
Şekil 2.7. Kersetin-3-glikozit ve Kersetin-4-glikozit (soldan sağa sırası ile) (Öztürk, 2004).....	20
Şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 4.2. <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon ve infüzyonlarının toplam fenolik madde miktarları.....	57
Şekil 4.3 Rutin kalibrasyon eğrisi.....	58
Şekil 4.4 <i>H. pamphylicum</i> dekoksasyon ve infüzyonlarının rutine göre toplam flavonoit madde miktarları	59
Şekil 4.5 Fenolik asit standartlarının YBSK kromatogramı.....	60
Şekil 4.6 <i>Helichrysum pamphylicum</i> kapalı çiçek infüzyonu YBSK kromatogramı.....	60
Şekil 4.7 <i>Helichrysum pamphylicum</i> kapalı çiçek dekoksasyonu YBSK kromatogramı..	60
Şekil 4.8 <i>H. pamphylicum</i> kapalı çiçek uçucu yağından elde edilmiş GK kromatogramı	61
Şekil 4.9 <i>H. pamphylicum</i> açık çiçek uçucu yağından elde edilmiş GK kromatogramı .	61
Şekil 4.10 NH_4^+ kalibrasyon grafiği	74

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. <i>H. pamphylicum</i> Davis & Kupicha türüne ait kapalı çiçekli bitki	7
Görsel 2.2. <i>H. pamphylicum</i> Davis & Kupicha türüne ait çiçekli bitki	8
Görsel 3.1. Gallik asit standart kalibrasyon çözeltileri, infüzyon ve dekoksasyonlar	35
Görsel 3.2. EDTA, <i>Helichrysum pamphylicum</i> infüzyon ve dekoksasyonların Makro Metal Şelatlayıcı aktivite küvetleri.....	38
Görsel 3.3. EDTA, <i>Helichrysum pamphylicum</i> infüzyon ve dekoksasyonların Mikro Metal Şelatlayıcı aktivite mikrolakaları	39
Görsel 3.4. C vitamini, BHT, <i>Helichrysum pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının DPPH serbest radikal süpürücü aktivite mikrolakaları	41
Görsel 3.5. sC-560, DuP-697, <i>Helichrysum pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon aktivite mikrolakaları	47
Görsel 3.6. NDGA, <i>Helichrysum pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının 5-LOX enzim inhibisyon aktivite mikrolakaları	50
Görsel 3.7. NNGH, <i>Helichrysum pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının MMP-2 enzim inhibisyon aktivite mikrotitrasyon plakası	52
Görsel 3.8. 5'NT inhibitörü, <i>Helichrysum pamphylicum</i> infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının 5'NT enzim inhibisyon aktivite mikrolakası	54

KISALTMALAR DİZİNİ

aCD73	: anti-CD73
5-LOX	: 5-Lipoksijenaz
a/h	: ağırlık/hacim
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AID	:Alev İyonlaşma Dedektörü
ATCC	: American Type Culture Collection
BHT	: Bütil Hidroksi Toluen
BuChE	: Bütililkolinesteraz
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
FA	: Ferulik asit
FMC	: Food Machinery
GAE	: Gallik aside eşdeğer
GK	: Gaz Kromatografisi
GK/KS	: Gaz kromatografisi/ Kütle Spektrometrisi
HCDEK	: <i>H. pamphylicum</i> açık çiçek dekoksiyonu
HCINF	: <i>H. pamphylicum</i> açık çiçek infüzyonu
HCUY	: <i>H. pamphylicum</i> açık çiçek uçucu yağı
HTDEK	: <i>H. pamphylicum</i> kapalı çiçek dekoksiyonu
HTINF	: <i>H. pamphylicum</i> kapalı çiçek infüzyonu
HTUY	: <i>H. pamphylicum</i> kapalı çiçek uçucu yağı
KA	: Kafeik asit
KLA	: Klorojenik asit
MMP-2	: Matriks Metalloproteinaz - 2
NNGH	: Norhidroguaiareik asit

<i>o</i> -KU	: orto-kumarik asit
<i>p</i> -KU	: para-kumarik asit
pro-KA	: prokateşik asit
RE	: Rutine eşdeğer
RSKK	: Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu
<i>tr</i> -SİN	: trans-sinnamik asit
UVA	: Ultraviyole A
UVB	: Ultraviyole B
YBSK-DAD	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi – Diyot Array Dedektör

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asteraceae familyasına ait olan *Helichrysum* cinsi Dünya’da 100’den fazlası endemik olmak üzere yaklaşık 600 tür, ülkemizde ise 21 endemik tür ve 27 taksonla temsil edilmektedir (Davis vd., 1975, s. 80-97; Davis vd., 1988, s. 159-160).

Helichrysum taksonlarından bazıları asırlarca bulundukları coğrafyada içerdikleri biyoaktif bileşikler nedeniyle etnofarmakolojik olarak kullanılmışlardır. Dioscorides “Materia Medica”da Anadolu’da bulunan *H. soechas* subsp. *barellieri*’nin kolagog etkilerinden bahsetmiştir. Günümüzde Anadolu’da da yetişen *Helichrysum* türlerinin safra salgılarını düzenleyici ve idrar söktürücü etkileri nedeniyle Avrupa’da kullanımları mevcuttur. *H. Arenarium*, çeşitli Avrupa ülkeleri ulusal farmakopelerinde ve Rus Farmakopesi’nde ve ayrıca Komisyon E monograflarında yer almaktadır. Güney Afrika’da sarılığa karşı, safra salgısı yetersizliklerinde, hepatoprotektif etkisi nedeniyle, antivomitif ve astrenjan olarak farklı *Helichrysum* türlerinin kullanıldığı bilinmektedir (Çubukçu vd., 2002, s. 145-150; Alman E Komisyonu Monografı, 1988).

Ülkemizde ise bazı *Helichrysum* taksonlarına ait kurutulmuş kapitulumların ve yaprakların halk arasında analjezik, diüretik, böbrek taşı düşürücü ve sarılığa karşı kullanımları olduğu bilinmektedir (Yeşilada vd., 1995, s.133-152).

Günümüze kadar yapılan fitokimyasal çalışmalarda *Helichrysum* türlerinin uçucu yağ (mono-, di-, tri-, seskiterpen laktonlar), flavonoidler, asetilenik bileşikler, fenolik bileşikler, karbonhidratlar, kumarinler ve yağ asitleri gibi bileşik grupları içerdiği bildirilmiştir (Max vd., 2002, s. 282-285).

H. arenarium türüne ait çiçekli kısımlardan elde edilen sulu ekstrenin antioksidan (Czinner vd., 2000, s. 437-443), güneşten koruyucu (Jarzycka vd., 2013, s. 50-57), antitümöral (Grinev vd., 2016, s. 770-776); uçucu yağın ise antimikrobiyal (Rančić vd., 2005, s. 341-345) etkili olduğu bildirilmiştir. Türkiye florasında yer alan bu türden elde edilen sulu ekstraktların ve uçucu yağların belirtilen terapötik etkilerinin, bileşimindeki polifenolik bileşikler ve flavonoidlerden kaynaklandığı söylenilmektedir.

H. plicatum türüne ait kapitulumlar Anadolu’da diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Aslan vd., 2007, s. 54-59). Çeşitli ekstraktlarının potansiyel antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik ve ileum kasılmalarını giderici etkilerinin olduğu

(Vujić vd, 2020, s. 337; Bigović vd., 2011; Bigović vd., 2010, s. 3391-3401); uçucu yağının antimikrobiyal (Bigović vd., 2017, s. 337-342) olduğu belirtilmektedir.

Türkiye florasında kayıtlı başka bir tür olan *H. graveolens*'e ait kapitulumlardan elde edilen ekstraktların antidiyabetik, antioksidan ve yara iyileştirici etkiye sahip olduğu (Aslan vd., 2007, s. 396-400), uçucu yağ bileşimindeki majör bileşiklerden α -kübaben, β -karyofilen ve oktahidro azulene bağlı lokal anestezik ve antikanser aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Bagci vd., 2013, s. 7254; Ghelardini vd., 2001, s. 387-389; Legault ve Pichette., 2007, s. 1643-1647).

Danimarka'da Afrika bitkileri üzerinde yapılan bir çalışmaya göre *H. agyroolepis*, *H. umbraculigerum* ve *H. rudemale*'nin monoamin oksidaz-B (MAO-B) enzimini sırasıyla 0.1 μ g/mL, 4.3 μ g/mL ve 3.3 μ g/mL IC₅₀ değerleri ile inhibe ettiği bildirilmiş olup, bu değerler sonucu *Helichrysum* türlerinin Parkinson hastalığının tedavisinde yüksek ihtimalle dopaminerjik yolak üzerinden kullanıldığı düşünülmüştür (van Staden vd., 2006, s. 14).

H. pamphylicum türünden kapitulum kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin Tip I Topoizomeraz enzim aktivitesini 1000-200 μ g/mL doz aralığında inhibe ettiği bildirilmiştir. DNA replikasyonunun, transkripsiyonunun, rekombinasyonunun ve transpozisyonunun Tip I Topoizomeraz enzimine bağlı olduğu bilinmektedir ve tümör hücrelerinde endotel migrasyonunu azaltarak antianjiyogenik aktivite göstermesi nedeniyle *H. pamphylicum*'un kanser tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (Topcu, 2008, s. 69-74).

H. stoechas türüne ait toprak üstü kısımlarından elde edilen fraksiyonların Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü olduğu (Les vd., 2017, s. 295-302), *H. chionophilum* ve *H. plicatum* subsp. *plicatum* taksonlarından elde edilen etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının AChE ve Bütirilkolinesteraz (BuChE) inhibitör aktivitesinin olduğu bildirilmiş olup (Acet vd., 2020), *Helichrysum* türlerine ait çeşitli bitki kısımlarından elde edilen ekstraktların Alzheimer tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Helichrysum türleri ile ilgili literatüre kayıtlı fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarının ışığında ve etnofarmakolojik kullanımları ile ilgili veriler de dikkate alınarak, bu tez çalışmasında *H. pamphylicum* Davis & Kupicha türünün açık çiçekli ve

kapalı çiçekli formlarından elde edilen uçucu yağ, infüzyon ve dekoksiyonların fitokimyasal bileşenlerinin yanı sıra Siklooksijenaz-1 (COX-1), Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve 5-Lipoksijenaz (5-LOX) İnhibitör Testi ile antienflamatuvar; Ellman Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütilkolinesteraz (BuChE) İnhibisyon Testi ile anti-Alzheimer; Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve 5'-Nükleotidaz (CD73) enzim inhibisyon testleri ile antitümöral; Monoamin Oksidaz-B (MAO-B) inhibisyon testleri ile anti-Parkinson aktiviteleri incelenmiştir. *H. pamhylicum* uçucu yağ, dekoksiyon ve infüzyonlarının kimyasal bileşenleri, çeşitli kromatografik ve spektrometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Asteraceae Familyası Türlerine Ait Botanik Özellikler

Tek yıllık ve çok yıllık otsulardır. Yapraklar alternat veya bazen karşılıklı, stipulsuz, tam kenarlı, değişik şekillerde parçalı, nadiren hepsi tabandadır. Bir kısmı çalı şeklinde olan birkaçı latisifer (süt boruları) içeren entomofil (entomogam) bitkilerdir. Çiçek birimleri (kapitula), çok sayıda çiçek, nadiren tek çiçeklidir. Çiçekler sapsız ve çok sıralı fillarilerden (brakteler) oluşan koruyucu bir involukrum ile sarılı kapitulumda toplu haldedir. Çiçekler ya erdişi veya tek eşeyli, aktinomorf veya zigomorftur. Çiçeklerde kaliks ya papus ya halka veya pul biçiminde ya da yoktur. Ovaryum alt durumlu (inferior), iki karpelden meydana gelmiş tek ovüllü, meyve tipi aken, tepesinde bazen bir papus, bazen kaliks artığı ile birlikte. Asteraceae tipi salgı tüyü ya da örtü tüyüne sahiptirler (Süslü vd., 2010, s. 182-187).

2.2. *Helichrysum* Geartner Cinsi Botanik Özellikleri

Asteraceae familyasının Astereae tribusunun bir üyesidir. Kapitulumlar çoğunlukla heterogam (erkek erdişi veya steril)'dır. Kapitulumlarında yalnız tüpsü çiçekler bulunanlarda çiçekler erdişi, kapitulumları dilsli ve tüpsü çiçekli olanlarda dıştaki dilsli çiçekler dişi veya steril, ortadaki tüpsü çiçekler verimli erdişi veya erkektir. Bazılarında gelişmiş papus mevcut, bazılarında yoktur. Anterler altta küt şekildedir. Çok yıllık yarı çalı şeklinde veya otsu, yünsü ya da keçemsi tüylü veya glandular bitkilerdir. Rizomları kısa, odunsu ya da ince uzun kökler şeklindedir (Zeybek ve Zeybek, 2002, s. 403). Birkaç taksonda sürgünler ile dip yaprakları birlikte bulunmaktadır. Yapraklar basit, tam lineerden oblanseolata kadar spatulat özellikte, alternan dizilişlidir. Korimbus (kapitulumların oluşturduğu topluluk) tepede kapitulumları ile bulunmaktadır. Kapitulumlar disk şeklinde, 3-12 mm uzunlukta, küreden ters piramide kadar veya silindirik şekillidir. Involukrum brakteleri çok sıralı az çok düzensizden, çok düzenliye kadar imbrikat dizilmiş, beyaz, saman sarısı, limon sarısı, portakal rengi, kayısı rengi hatta kırmızı renkli ve kalıcıdır. Reseptakulum (Çiçek tablası) düz, çıplak çiçekler sarı renkli, hepsi hermafrodit ya da kenardaki bir sıra dişi karakterdedir. Papus sarımsı, sert pürüzlü veya yumuşaktır. Korolla tüp şeklinde 5 parçalı, üstü glandular haldedir. Akenler silindirik, az çok glandular biçimdedir (Tanker ve Sezik., 1978, s. 19-39).

Türkiye Florası'nda doğal yayılış gösteren *Helichrysum* taksonlarına eklenen yeni taksonlar *H. goulandrionum*, *H. peshmenianum*, *H. kitianum* ve *H. sivasicum* (Erik, 1983; Georgiadou, 1982; Yildiz, 1988) olup Türkiye Florası'nda doğal yayılış gösteren *Helichrysum* taksonlarına ait tayin anahtarı, yeni eklenen türler hariç, aşağıdaki gibidir: (Davis vd., 1975, s. 80-97).

1. Çiçek durumu genellikle dallanmış, her dal sık bir korimbus taşımakta, involukrum brakteleri koyu kırmızı ve dış dairedeki çiçekler dışı

1.sanguineum

1. Böyle olmayanlar.
2. Involukrum brakteleri mat kar beyazı.

2.pamphilicum

2. Involukrum brakteleri fildişi, sarı veya kayısı rengi.
3. Yaprakların her iki yüzü de çok sık beyaz, gri-beyaz keçe gibi yünsü tüylü (lanat-tomentos) veya yumuşak yünsü tüylü (villos-lanat).
4. Bitki belirgin yarıçalı, kalın toprak üstü dallara sahip.
5. Kapitulum 3 mm, limon sarısı, her korimbusta 40-90 kapitulum var.

5.chasmolysicum

5. Kapitulum 5-8 mm, parlak sarı veya kayısı rengi, her korimbusta 7-27 kapitulum var.

4.orientale

4. Bitkiler tabanda mat seklinde küme halinde veya toplu halde.
6. Kapitulum topaçsı (turbinat), involukrum brakteleri basık, korimbus sık, yarıküremsi (subglobos).
7. Gövde yaprakları dallara doğru basık, involukrum brakteleri soluk limon sarısı.

6.compactum

7. Gövde yaprakları dallardan uzak, involukrum brakteleri koyu altın sarısı.

15.artvinense

6. Kapitulum yarıküremsi, involukrum brakteleri basıkdeğil korimbus gevşek.
8. Bitkiler tabanda sık mat şeklinde küme halinde, steril sürgünler tabanda şişkin değil, her korimbusta 1-6 kapitula var ve 8-12 mm boyunda.

11.chionophilum

8. Bitkiler tabanda bir arada ve daha az kompak, steril sürgünler tabanda belirgin şişkin, her korimbusta 3-çok sayıda kapitulum var ve 5-9 mm boyunda.

9. Dallar kavisli, involukrum brakteleri dağınık ve belirgin kukulat.

9.noeanum

9. Dallar düz, involukrum brakteleri kısmen dağınık, düz ya da kısmen kukulat.

15.arenarium

3. Yapraklar neredeyse çıplak ya da zayıf tüylü (villos) veya en azından üst yüzleri çok seyrek tüylü.

10. Bitki belirgin yarıçalı, kıvrık ve dallanmış gövdeli.

11. Yapraklar kenarları düz, salgılı (glandular), bütün çiçekler hermafrodit.

14.armenium

11. Yaprak kenarları alta doğru kıvrık, glandular değil dış dairedeki çiçekler dışı.

12. Kapitular sık bir korimbusta, involukrum brakteleri parlak prinç renkli ve gevşek imbrikat dizilişli.

3.stoechas subsp. barellieri

12. Kapitular gevşek bir korimbusta, involukrum brakteleri donuk saman renkli ve yakın düzgün imbrikat dizilişli.

10. Bitkiler yarı çalı değil, bir arada, gövde yukarıda dallanmamış.

13. Her korimbusta 1-6 (10) kapitula var ve 9-12 mm boyunda.

10.pallasii

13. Her korimbusta çok sayıda kapitula var ve 4-9 mm boyunda.

14. Dallar ve yapraklar belirgin glandular.

15. Steril sürgünler tabanda belirgin şişkin, sık yarıküremsi korimbustaki kapitular topaçsı.

8.heywoodianum

15. Steril sürgünler genellikle tabanda şişkin değil, gevşek korimbustaki kapitular yumurtamsıdan yarıküremsiye.

13.plicatum

14. Dallar ve yapraklar belirgin glandular değil.

16. Dış dairedeki çiçekler dışı.

17. Bitki ince stolonlarla yayılır, korimbus sık, özellikle pedunküller çok sık yumuşak yünsü tüylerle kaplı.

12.graveolens

17. Bitki sert dallanmış odunsu gövdeli, korimbus gevşek villos-lanat değil seyrek tüylü.

13.plicatum

16. Bütün çiçekler hermafrodit.

18. Düzgün sık yarıküremsi korimbustaki kapitulalar topaçası.

16.artvinense

18.Sıktan gevşeye, kısmen düz tepeli korimbustaki kapitulalar yarı küremsiden yumurtamsıya.

19. Steril sürgünler belirgin şişkin, yapraklar sıklıkla spatulattan ve/veya undulat kenarlı, involukrum brakteleri sarı veya kayısı (nadiren fildişi), kısmen düzden kukulatalıya.

15. arenarium

19. Steril sürgünler belirgin şişkin değil, yapraklar sıklıkla sivri asla undulat kenarlı değil, involukrum brakteleri sarı veya fildişi ve kukulatalı değil.

13.plicatum

2.2.1. *H. pamphylicum* Davis & Kupicha



Görsel 2.1. *H. pamphylicum* Davis & Kupicha türüne ait kapalı çiçekli bitki (Foto: Elif Paksoy, Mayıs 2021)



Görsel 2.2. *H. pamphylicum* Davis & Kupicha türüne ait açık çiçekli bitki (Foto: Hülya Tuba Kıyan, Temmuz 2021)

Sinonim: *Helichrysum niveum* Boiss. Heldr.

Risk Durumu: Nesli düşük risk altında (Ekin vd., 2000, s. 71)

Çiçeklenme: Mayıs-Ağustos

Habitat: 20-910 m, kireç taşı kayalar ve *Pinus brutia* orman açıklıkları

Türkiye’de Yayılış: Antalya, Mersin

Yayılış: Endemik Doğu Akdeniz Elementi

Çok yıllık, otsu, 30-45 (-60) cm boyunda, tomentoz, sespitoz, steril sürgünler yok, gövde dik ve dallanmamış, gövde yaprakları dar, taban yaprakları linear-spatulat, linear-oblanseolat, tepesi akut ve yukarıya doğru küçülen, Korimbus sık, 2-2.5 cm genişliğinde 15-45 ovoid kapitulumlu, kapitulumlar taşıyıcı yaprakların koltuklarında, Kapitulum 5-6 mm boyunda, 15-20 çiçek taşır, pedinkul tomentoz, involukrum brakteleri donuk kar beyazı, gevşek imbrikat dizilişli, 30-35 adet konkav, dıştaki çiçekler dışıdır (Davis vd. 1988, s. 159-160; Güner vd., 2000, s. 153-154).

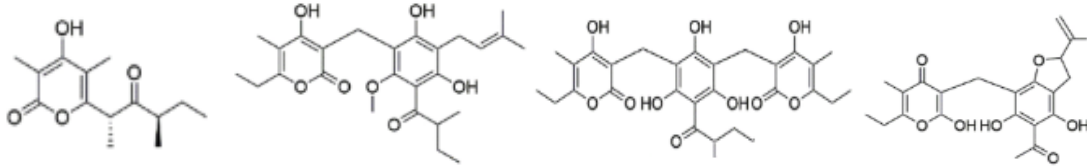
2.3. *Helichrysum* Türlerinin Fitokimyasal Bileşimleri

Helichrysum türleri üzerinde yapılan ilk fitokimyasal araştırma, 1967’de *H. dendroideum* türü üzerinde yapılmış olup, bileşiminde terpen alkol grupları tespit edilmiştir (Bohlmann ve Zdero, 1973, s. 1337-1340). Yapılan diğer çalışmalara göre *Helichrysum* uçucu yağlarının büyük bir yüzdesini terpenoit grupları oluşturmalarına rağmen, majör bileşikler fenolik ve oksijen grubu bulunduran bileşiklerin oluşturduğu belirlenmiştir. *Helichrysum* türlerinin bildirilen sekonder metabolitlerine göre fitokimyasal bileşenleri altı grupta kategorize edilebilmektedir. Bunlar: flavonoit ve

kalkonlar, fenolik asitler, terpenler ve uçucu yağlar, pironlar (homo ve hetodimerik grupların her ikisi de), benzofuranlar ve floroglusinoller olarak sınıflandırılmaktadır. Sıklıkla belirlenen sübstitüe gruplar ise pirenil, geranil ve açıl gruplarıdır. Açıl sübstitüe grupları ise genellikle metil, izopropil ve 2-metilbütanoil grupları olarak tespit edilmiştir (Taglialatela-Scafati vd., 2013, s. 346-353).

2.3.1. Pironlar

Helichrysum türlerinden izole edilen pironlar homo-dimer, hetero-dimer ve hetero-trimer yapısında olmak üzere üç gruba ayrılır (Opitz ve Hansel, 1970). Mikropiron, glikozide formdaki yangonin (D'Abrosca vd., 2013, s. 7038-7046), helipiron A (Opitz ve Hansel, 1970), helipiron B, helipiron C (Vrkcoč vd., 1975, s. 1383-1384) homo-dimer yapısındaki örneklerdir. Hetero-dimer yapısındaki *Helichrysum* sp. pironları bir floroglusinol halka yapısına metilen köprüsü üzerinden bağlı α -piron gruplarıdır. 23-metilaurisepiron, noraürisepiron, arzanol ve arenol *Helichrysum* türlerinden izole edilmiş pirenile floroglusinol α -piron yapısındaki gruplardır (Bohlmann ve Zdero, 1980; Appendino vd., 2007, s. 608-612; Lavault ve Richomme., 2004). Hetero-trimerlere, *H. italicum*'dan izole edilmiş iki α -piron halkasına sahip 23-metilitalidipiron ve italidipiron örnek olarak verilebilir (Hänsel vd., 1980, s. 639-644). Bazı durumlarda pirenile floroglusinol α -piron yapısındaki gruplar geranile yapıda bulunabilirler. Bunlara italipiron, 20-pirenilitapiron, plikatipiron, izobütirilhelikromenopiron, 2-metilbütirilhelikromenopiron, heliserastripiron, sikloarzanol ve helisiklol örnek olarak verilebilir (Hänsel vd., 1980, s. 639-644; Bohlmann vd., 1984, s.174-176; Rios vd., 1991, s. 51-55, Akaberi vd., 2019, s. 958-969).

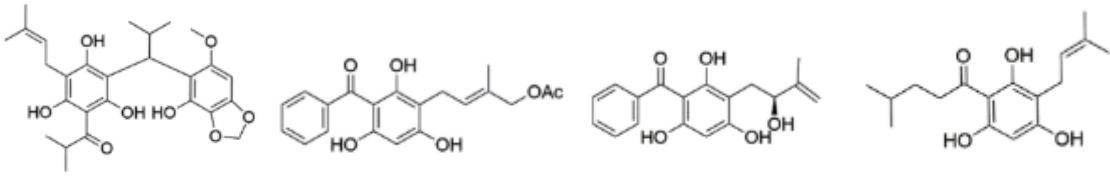


Şekil 2.1. Mikropiron, 23-metilaurisepiron, 23-metilitalidipiron ve italipiron (soldan sağa sırası ile)
(Hänsel vd., 1980, s. 639-644)

2.3.2. Floroglusinoller

Yapılan birçok fitokimyasal çalışmada, floroglusinoller homo-dimerler ve monomerler halinde, diğer sınıf sekonder metabolitlerin içeriğini oluşturmaktadır

(Jakupovic vd., 1986, s. 1133-1142; Popoola vd., 2015, s. 17309-24). *Helichrysum* türlerinin fitokimyasal bileşiminde tespit edilen bazı floroglusinoller; helinudifolin, 2-(2-metilpropanoil)-4-pirenilfloroglusinol, (Jakupovic vd., 1986, s. 1133-1142), heliniven A, heliniven B, 1-bütanon-3-pirenil-floroglusinol, 1-(2-metilbütanon)-3-pirenil-floroglusinol, 1-bütanon-3-(3-metilbüt-2-enilaktat)-floroglusinol, kespitat (Popoola vd., 2015, s. 17309-24), 1-(2-metilpropanon)-3-pirenilfloroglusinol, 2-bütanoil-4-pirenilfloroglusinol (Mutanyatta-Comar vd., 2006, s. 61-68), 2-(2-metilbütanoil)-4-pirenilfloroglusinol (Bohlmann ve Mahanata, 1979, s. 348-350), kespitin (Dekker vd. 1984, s. 607-608) ve helispiroketal A-H'dir (Akaberi vd., 2019, s. 958-969).



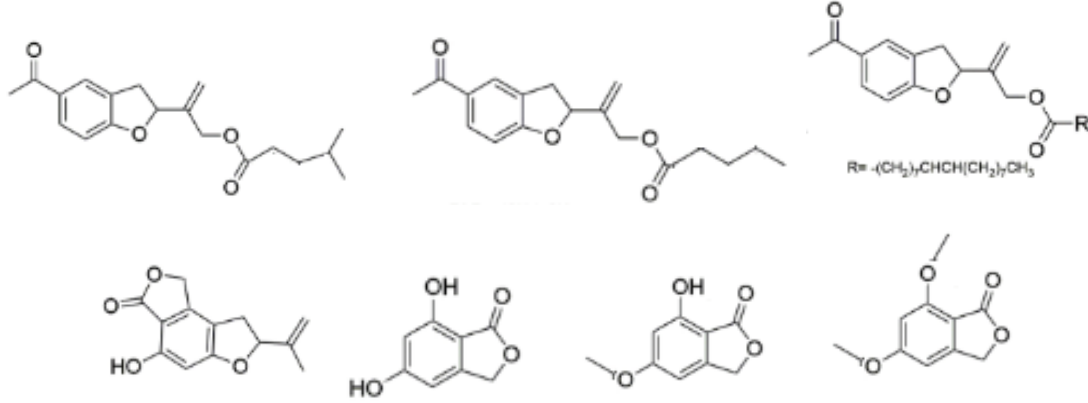
Şekil 2.2. helinudifolin, heliniven A, heliniven B ve kespitat (soldan sağa sırası ile) (Jakupovic vd., 1986, s. 1133-1142, Popoola vd., 2015, s.17309-24)

2.3.3. Benzofuranlar ve Ftalitler

Helichrysum türlerinin fitokimyasal bileşiminde tespit edilen heterosiklik benzofuran halkaları sırası ile propanoilbitalin A, nonanoilbitalin A, oleilbitalin A, isokaproilbitalin A (Bohlmann ve Zdero, 1970), bitalin A β -D-glukopiranozit türevleri (D'Abrosca vd., 2013, s. 7038-7046) ve 2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-isopropenil-6-(2-metilpropenoil) benzofurandır (Bohlmann vd., 1984, s. 174-176). 2016'da yapılan bir çalışmaya göre süperkritik CO₂ ile ekstraksiyon yöntemi kullanılarak, kurutulmuş *H. italicum* çiçeklerinden tremeton türevi olan 12-asetoksitremeton, gnafaliol (bitalin A) ve 9-asetilgnafaliol elde edilmiştir (Jerković vd., 2016, s. 2925-2931). Bu ganfadiol formundaki bileşikler bitkide aynı zamanda " β -D-O" glikozitleri şeklinde de bulunabilir (Bohlmann vd., 1984, s. 174-176; Mari vd., 2014, s. 249-255; Rigano vd., 2014, s. 198-203; Rosa vd., 2007, s. 117-126; Taglialatela-Scafati vd., 2013, s. 346-353).

Helichrysum türlerinin bileşiminde tespit edilen ftalitlere ise *H. platypterum*'dan elde edilen platiteroftalit (Jakupovic vd., 1987, s. 580-581); *H. italicum* ve *H. arenarium*'dan elde edilen 5,7-dihidroksiftalit (Vrkoc vd., 1973), 5,7-dimetoksiftalit, 7-hidroksi-5-metoksiftalit ve onların glikozit formları olan 7-O- β -D-glukopiranozit, 7-O-

(6-O-malonil- β -D-glukopiranozit) ve 7-O-[β -D-glukopiranozil- β -D-glukopiranozit] (Opitz ve Hansel, 1971, s. 228-230) örnek verilebilir.



Şekil 2.3. isokoproilbitalin A, nonanoilbitalin A, oleilbitalin A, platiteroftalit, 5,7-dihidroksiftalit, 5,7-dimetoksiftalit, 7-hidroksi-5-metoksiftalit (üst sıra önce olmak üzere soldan sağa sırası ile) (Jakupovic vd., 1987, s. 580-581; Vrkoc vd., 1973; Opitz vd., 1971, s. 228-230)

2.3.4. Flavonoitler, Kalkonlar ve Fenolik Asitler

Helichrysum türlerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen polar fraksiyonlarda tespit edilen antioksidan ve antienflamatuvar aktiviteye sahip bileşikler Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Flavonoitler hem glikozit hem de serbest aglikon formunda dimer, trimer ve kompleks agregatlar şeklinde tespit edilmiştir. Örneğin, serbest aglikonlardan apigenin, naringenin ve kamferol'ün hem serbest formu hem de glikozit formları *H. plicanum*'un çiçekli kısımlarında tespit edilmiştir (Bigović vd., 2017, s. 337-342).

Helichrysum türlerinin fitokimyasal bileşimlerinde tespit edilen diğer önemli flavonoitler prunin, isosalipurposit, narirutin, naringin, eriyodiktiyol, luteolin, galuteolin, astragalin ve kersetin'dir (Bohlmann vd., 1984, s. 174-176; Grinev vd., 2016, s. 770-776; Mao vd., 2017, s. 2812-2817). *H. arenarium*'a ait çiçeklerden elde edilmiş metanol ekstresinden izole edilip yapısı aydınlatılan dört flavonon ve kalkon glikoziti arenariumosid I, II, III ve IV olarak bildirilmiştir (Wang vd., 2009, 1235-1242). *H. italicum* subsp. *picardii* toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyon ve dekoksasyonlarda UHPLC-PDA-MS (Ultra Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi-Foto Diyot Array-Kütle Spektrometrisi) kullanılarak yapısı aydınlatılan monomer ve dimer

yapıdaki flavonoit prekürsörleri klorojenik ve kinik asitler, dikafeolkinik asit izomerleri ve gnaflaiin A majör bileşenler olarak belirlenmiştir (Pereira vd., 2017, s. 593-603). Yeni sinnamik asit glikozit esteri olan kameronesit A ilk defa *H. cameroonense* toprak üstü kısımlarından izole edilmiştir (Antoine vd., 2011, s. 305). *Helichrysum* türlerinin fitokimyasal bileşimlerinde bulunan kalkonlar en önemli biyoaktif bileşenler olarak nitelendirilmektedir (Do Nascimento ve Mors, 1972, s. 3023-3028; Popoola vd., 2015, 7143-7155). Sırbistan’da yapılan bir çalışmaya göre *H. zivojinii*’den izole edilmiş olan tomorosit A ve tomorosit B kalkonunun anti-kanser aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir (Aljančić vd., 2014, s. 190-196). Yine *H. arenarium* L. Moench çiçeklerinden elde edilen metanol ekstresinden izole edilen dihidrokalkon türevi dimerik yapıda kalkon glikoziti arenariumosit V, VI ve VII bileşiklerinin anti-kanser etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Morikawa vd., 2015, s. 494-506).

Çizelge 2.1. *Helichrysum* sp. flavonoit ve fenolik asitleri

<i>Helichrysum</i> sp.	Bileşen (ler)	Biyolojik aktivite
<i>H. arenarium</i> subsp. <i>arenarium</i>	Kafeik asit konjugatları (klorojenik asit ve dikafeolkuinik asitler) ve flavonoitler (apigenin, naringenin, apigenin 7-O-glikozit ve naringenin-O-hekzoditleri)	Antibakteriyel (Gradinaru vd., 2014, s. 2076-80)
<i>H. arenarium</i> (L.) Moench	Naringenin-7-O-β-d-glikozit, izokersitrin ve astragalin (68)	-
<i>H. aureonites</i>	Galangin	Antibakteriyel ve Antioksidan (Cushnie ve Lamb, 2006, s. 187-191; De la Puerta vd., 1999, s. 507-511)
<i>H. decumbens</i>	3,5-dihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon, 5,7-dihidroksi-3,6,8-trimetoksiflavon ve 3,5-dihidroksi-6,7-dimetoksiflavon	Antifungal (Tomás-Lorente vd., 1989, s. 1613-15)
<i>H. devium</i>	Kinik asit türevleri, O-glikozitler, flavonoitler, kafeik asit türevleri ve protokateşik asit türevleri (Gouveia ve Castilho, 2009, s. 3939-53)	-

Çizelge 2.1. *Helichrysum* sp. flavonoit ve fenolik asitleri (devamı)

<i>H. foetidum</i> (L.) Moench	7,4'-dihidroksi-5-metoksi-flavanon, 6'-metoksi-2',4-dihidroksikalkon, 6'-metoksi-2',4-dihidroksikalkon-4'-O- β -D-glikozit, kaur-16-en-18-oik asit	Antimikrobiyal (Malolo vd., 2015, s. 1-11)
<i>H. italicum</i>	Lignanlar ve kinik asit türevleri, kemferol, 3,5,7-trihidroksi-8-metoksiflavon ve 3,5-dihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon	Antibiyofilm (D'Abrosca vd., 2013, s. 7038-46; Karasartov vd., 1992, s. 504-505)
<i>H. maracandicum</i>	Naringenin kalkon ve isosalipurposit	Antikarsinojenik (Yagura vd., 2008, s. 174-178))
<i>H. mechowlanum</i> Klatt.	3,5,7-trihidroksi-8-metoksiflavon ve 4,5-dikafeolkinik asit	Antimikrobiyal (Malolo vd., 2015, s. 1-11)
<i>H. obconicum</i>	Kinik asit türevleri, kafeoilkinik asit, malonilkafeoilkinik asit, kumaroilkinik asit ve kafeoilşikimik asit türevleri (76)	-
<i>H. paraonychloides</i>	3-metilkersetin, 3,3'-dimetilkersetin, 3,7-dimetilkemferol, penduletin, eupalitin, 2-(2-metilpropanoil)-4-pirenilfloroglusinol ve 2-(2-metilbütanoil)-4-pirenilfloroglusinol (44)	-
<i>H. pedunculatum</i>	Flavonoitler, proantosiyandinler ve fenolik bieşikler	Antioksidan (Aiyegoro ve Okoh, 2009, s. 4990-5001)
<i>H. stoechas</i>	Neo-klorojenik asit, klorojenik asit ve kriptoklorojenik asit, izomerik dikafeoil kinik asitler, izomerik naringenin glikozitleri, kersetin, kemferol, apigenin glikozitleri, tetrahidroksi kalkon glikozitleri	Antioksidan (Carini vd., 2001, s. 517-526)
<i>H. teretifolium</i>	İzoksantohumol, 2',4',6'-trihidroksi-3'pirenilkalkon, İzoglabranin, glabranin ve kersetin	Antioksidan (Popoola vd., 2015, s. 7143-7155)

2.3.5. Terpenler ve Uçucu Yağlar

Helichrysum türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmaların kendilerine has vejetatif ve floral kimlik oluşturduğundan, genellikle uçucu yağlar üzerine olduğu görülmektedir. *Helichrysum* uçucu yağlarının ilaç etkin maddesi olarak ve ilaç dışı olarak

kullanımları bulunmaktadır. Çizelge 2.2. farklı *Helichrysum* türlerine ait uçucu yağların majör bileşiklerini özetlemektedir. Yapılan çalışmalarda uçucu yağların majör bileşenlerinin monoterpenler ve seskiterpenler olduğu ve en çok belirlenen biyolojik etkilerin antibakteriyel, antifungal, insektisit ve sitotoksik aktiviteler olduğu bildirilmiştir.

Helichrysum türleri Asteraceae familyasına ait diğer türler gibi seskiterpen bileşik grupları açısından zengin türlerdir. Bugüne kadar rapor edilen uçucu yağ majör bileşik kimyasal yapıları Şekil 2.2.'te verilmiştir. *H. italicum*'dan izole edilmiş seskiterpen yapıdaki bileşikler Eudesman seskiterpenleri (eudesm-5-en-11-ol) (Bianchini vd., 2004, s. 983-984), drimane seskiterpenleri ve guaiane seskiterpenleri'dir (Mari vd., 2014, s. 249-255). Diterpenler de *Helichrysum* türlerinde bulunmaktadır. Bunlardan önemli olanları abietan, pimarane ve kauran diterpenleri'dir. Örneğin, bir diterpenik asit olan eritroksidiol A *H. refluxum*'dan izole edilmiştir (Bohlmann vd., 1985, s. 611-612). Bazı türlerden izole edilen triterpenlere ise 3 β -hidroksi-28,13-ursanolid, ursalolakton (Lloyd ve Fales, 1967, s. 4891-95) ve 3-asetil-28-oleananoik asit örnek verilebilir (Bohlmann vd., 1979, s. 1375-78).

Çizelge 2.2. *Helichrysum* sp. uçucu yağlarının majör bileşenleri

<i>Helichrysum</i> sp.	Majör Bileşen (ler)
<i>H. acutatum</i> DC.	Triterpen: Squalen Diterpen: 11,12H-11,12-dihidroksi-9-geranil kurkumen, 11,12H-12,12-dihidroksi-9-geranil- α -terpinen, α -11,12H-11,12-dihidroksi-9-geranilaskaridol, β -11,12H-11,12-dihidroksi-9-geranilaskaridol (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453).
<i>H. acuminatum</i>	Seskiterpenler: karyofillen türevleri, azulen türevleri (Jakupovic vd., 1989, s. 543-551)
<i>H. adenocarpum</i> DC.	Triterpenik bileşikler (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. albirosulatum</i> Kill.	Seskiterpenler: İsomanol, 3-hidroksi-isomanol, 3-oksoisomanol, 3-okso-10,14H-alloaromadendren Triterpenik Bileşikler (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. ambiguum</i>	Geraniol, geranil asetat, neril asetat, nerolidol (Jakupovic vd., 1989, s. 543-551)
<i>H. appendiculatum</i> (Lf.) Less.	Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. arenarium</i> (L.) Moench	Triterpen: Kampesterol, β -sitosterol (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. armenium</i> DC.	Seskiterpen lakton (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. aureonitens</i> Sch. Bip.	Seskiterpen: Karyofillenepoksit, trisiklik karyofillen türevleri

Çizelge 2.3. *Helichrysum* sp. uçucu yağlarının majör bileşenleri (devamı)

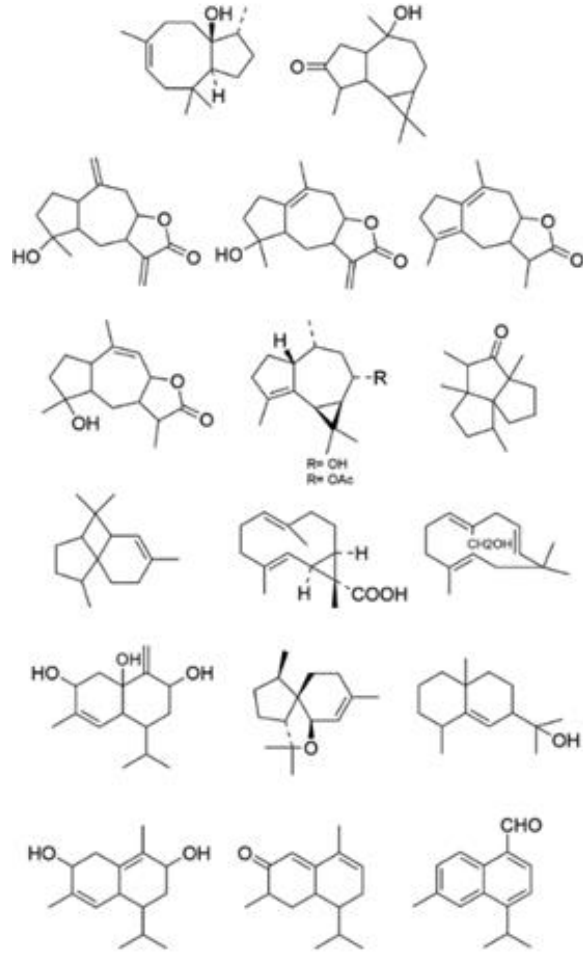
<i>H. aureum</i> (Houtt) var.	Diterpen: Kaurenik asit, 11- β -astoksi-kaurenik asit, 3- α -asetoksi-kaurenik asit (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. monocephalus</i> (DC.) Hilliard	
<i>H. bellum</i> Hilliard	Diterpen: Kaurenik asit (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. benthami</i> Viguiet et Humbert	Monoterpen: Sineol (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. bilobum</i>	Diterpen Türevleri (Jakupovic vd., 1987, s. 580-581)
<i>H. brakteatum</i> Andr.	Seskiterpen: 4-formil-1-metoksi-karbonil azulen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. callicomum</i> Harv.	Seskiterpen: Farnesen, humulen, Diterpen: Helikalen-16-al, heliaklen-16-ol, 14,15-dihidro-helikalen-16-asit Triterpen: β -amirin, squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. chionosphaerum</i> DC.	Seskiterpen: Humulen, 14-hidroksi-humulen Diterpen: Atis-16-en-19-asit (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. chrysargyrum</i> Moeser	Seskiterpen: β -farnesen Triterpen: Oleanol asit asetat, squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. conferium</i> N.E.B.	Diterpen: Kaurenik asit, labdan türevleri Triterpenler (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. cooperi</i> Harv.	Diterpen: Kaurenik asit, 11- β -astoksikaurenik asit, 3- α -asetoksi-kaurenik asit (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. cymosum</i> (L.) Don. subsp. <i>calvum</i> Hilliard	Seskiterpen: Humulen, Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. davenportii</i>	Diterpen türevleri (Jakupovic vd., 1989, s. 543-551)
<i>H. davyi</i>	Seskiterpen türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. dendroideum</i>	Diterpen: Kauren ve staken türevi terpen alkoller (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. diosmifolium</i> Sweet	Diterpen: (-)-16- α -17-dihidroksi-16- β -kauron-19-oil
<i>H. drakensbergense</i> Killick	Diterpen: Fitol, Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. formosissimum</i>	Diterpenler, kaurenler, labdanlar (Jakupovic vd., 1990, s. 1589-90)
<i>H. forskahlii</i>	Diterpenler, kaurenler, labdanlar (Jakupovic vd., 1990, s. 1589-90)
<i>H. fulvum</i> N.E.Br.	Diterpen: Beyeren-19-asit, kaurenik asit, 11- α -asetoksihelifulvan-19-asit metilesteri, 11- α -hidroksihefulfulvan-19-asit metil esteri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. glomeratum</i> Klatt.	Seskiterpen: Humulen Diterpen: Fitol, fitilinolesat Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. gymnoconum</i> DC.	Triterpen: 19-oleanolasetat (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. herbaceum</i> (Andr.) Sweet	Seskiterpen: Germakren-D, bisiklogermakren Triterpen: Squalen Politerpen: Poliizopren (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)

Çizelge 2.4. *Helichrysum* sp. uçucu yağlarının majör bileşenleri (devamı)

<i>H. heterolasium</i> Hilliard	Monoterpen: Mirtenol, 1-mirtenolasetat Seskitерpen: Aromadendren türevleri Diterpen: Kaurenik asit türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. hypocephalum</i> Hilliard	Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. infaustum</i> Wood et Evans	Seskitерpen: Humulen, α -kurkumen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. italicum</i> G. Don	Monoterpen: (+)- α -pinen, (-)- β -pinen, nerol, neril asetat, 3,5-dimetil oktan-4,6-dion, 2,4-dimetilheptan-3,5-dion, 4-metilnonan-3,5-dion, linalool, pinonik asit Seskitерpen: Azulogenik seskitерpenler Triterpen: β -sitosterol, α -amirin, uvaol, ursalik asit lakton (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. krebsianum</i> Less	Diterpen: 9-geranil- α -terpinen, 12-okso-geranillinol (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. krookii</i> Moeser	Seskitерpen: Farnesen Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. leucopsideum</i>	Diterpen türevleri
<i>H. lindleyi</i>	Diterpen türevleri
<i>H. miconifolium</i> DC.	Diterpen: Kauren asit ve türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. monticola</i> Hilliard	Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. mundii</i> Harv.	Diterpen: Geranillinalol Triterpen: Lupeol, oleanolik asit (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. nanum</i> Klatt	Seskitерpen: Humulen Diterpen: Fitillinoelonat, geranillinalol (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. natalitium</i> DC.	Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. nudifolium</i> (L.) Less	Seskitерpen: α -guryunen, 8- β -asetoksi- α -guryunen, 8- α -asetoksi- α -guryunen, 8- β -hidroksi- α -guryunen, α -kurkumen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. odoratissimum</i> Sweet	Diterpen türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. oreophyllum</i> Klatt	Seskitерpen: Trisiklik karyofillen türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. pallidum</i> DC.	Diterpen: Kaurenik asit Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. panduratum</i> O. Hoffm.	Seskitерpen: β -farnesen, germakren-D Triterpen: squalen, lupeol (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. pinifolium</i> (Lam.) Schrank	Diterpen: Labdan türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. platypterum</i> DC.	Seskitерpen: Karyofillen türevleri Diterpen: kaurenik asit

Çizelge 2.5. *Helichrysum* sp. uçucu yağlarının majör bileşenleri (devamı)

<i>H. polyclatum</i> Klatt	Seskiterpen: Farnesen, humulen, (-)- γ -kadinen Triterpen: Oleanol türevleri, lupeol, squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. refluxum</i>	Diterpen: Eritroksidiol A (Bohlmann vd., 1985, s. 611-612)
<i>H. retortoides</i> N.E.Ber.	Triterpenler (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. ruderale</i> Hilliard et Burth	Seskiterpen: Karyofilen asidi türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. saxatile</i> Moris	Oksijenli seskiterpen türevleri (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. schimperi</i>	Diterpenler, kaurenler, labdanlar (Jakupovic vd., 1990, s. 1589-90)
<i>H. serpyllifolium</i> (Berg.) Pers.	Triterpen: β -amirin asetat (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. splendidum</i> DC.	Seskiterpen: Germakren-D, bisiklogermakren, nerolidol, halisplendiolit, spatulenol Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. stirlingii</i>	Seskiterpenler: karyofillen türevleri, azulen türevleri (Jakupovic vd., 1987, s. 803-807)
<i>H. stoechas</i> (L.) Moench	Monoterpenler: α -pinen, β -pinen, kamfen, cis- β -osimen, trans- β -osimen, mirsen, limonen, linalol, nerol, geraniol, neril asetat, terpineol, sineol, dimetil-4,7-oktan-6-on Triterpen: Uvaol, urdolik asit, oleanolik asit, eritrodiol, β -sitosterol, stimasterol, β -sitosterol-D-glukopiranozit, stimasterol- β -glikozit (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. stoechas</i> (L.) Moench subsp. <i>barellieri</i> (Ten.) Nyman	Monoterpen: kamfen, geraniol Seskiterpen: β -karyofilen, β -elemen (Chinou vd., 1997, s. 181-183)
<i>H. subfalcatum</i> Hilliard	Diterpen: 15-hidroksi-8H,13H-isokembren, geranillinalol (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. tenuiculum</i> Killick	Seskiterpen: Humulen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. trilineatum</i> DC.	Triterpen: Oleanolik asit (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. umbraculigerum</i> Less.	Triterpen: Squalen (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)
<i>H. vernum</i> Hilliard	Seskiterpen: Kadinen türevi, Diterpen: Kaurenik asiti labdan türevi (Çubukçu ve Bingöl, 1983, s. 441-453)



Şekil 2.4. Seskiterpenlerin (*Eudesman*, *drimane* ve *guaiane* seskiterpenleri) kimyasal yapıları (Bianchini vd., 2004, s. 983-984)

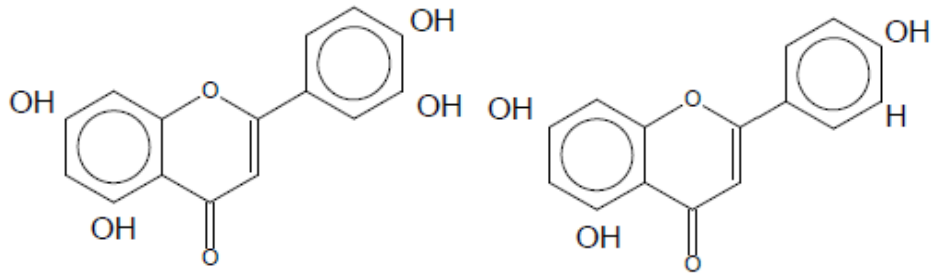
2.3.6. Diğer Bileşikler

Helichrysum türleri yukarıdaki bileşik gruplarının yanısıra birçok farklı bileşik grubu da içermektedir. Bunlara örnek kroman türevi olan helinudikromen kinon (Jakupovic vd., 1986, s. 1133-1142), 6-asetil-3,4-dihidro-3-hidroksi-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran (Bohlmann ve Vorwerk, 1980, s. 261-266; de Quesada vd., 1972, s. 446-449), 6-benzoil-5,7-dihidroksi-2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-kroman (Bohlmann vd., 1980, s. 683-684), 5,7-dihidroksi-6-izobütiril-2,2-dimetilkroman, 2,2-dimetil-8-(2-metil-1-oksopropil)-5,7-dimetilkroman (Jakupovic vd., 1986, s. 1133-1142), 5,7-dihidroksi-2,3-dimetil-4-kromanon (Mutanyatta-Comar vd., 2006, s. 61-68); asetofenon türevi olan 4-hidroksi-3-(3-metil-2-bütenil)-asetofenon (Appendino vd., 2007, s. 608-612; Sala vd., 2001, s. 1360-1362); glikozit türevi olan everlastosit A-M grubu bileşikler örnek verilebilir (Morikawa vd., 2009, s. 853-859). Ayrıca farklı *Helichrysum* türleri poliasetilenler, sülfür içerikli

bileşikler ve eskuletin, skopoletin ve isoskopoletin gibi kumarin grubu bileşikler de içermektedir (Wang vd., 2009, s. 1235-1242; Morikawa vd., 2009, s. 853-859, Karasartov vd., 1992, s. 504-505).

***H. sanguineum* (L.) Kostel**

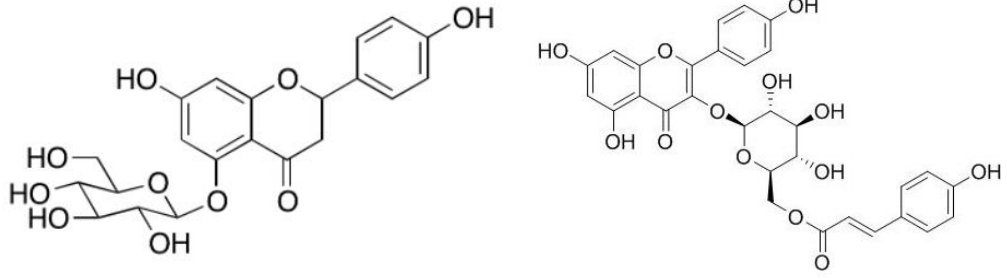
H. sanguineum'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan aseton fraksiyonlarında kardiyak glikozitler, fenolik bileşikler, steroidler ve flavonoidler; su fraksiyonlarında saponin glikozitleri, fenolik bileşikler, tanenler ve flavonoidler; metanol fraksiyonlarından fenolik bileşikler, uçucu yağ bileşenleri, tanenler, steroidler, flavonoidler; hekzan fraksiyonlarında kardiyak glikozitler, fenolik bileşikler, uçucu yağ bileşenleri, steroidler ve flavonoidler tespit edilmiştir (Jaradat vd., 2021, s. 41-51). Ayrıca yapılan başka bir çalışmaya göre, bitkinin kapitulum kısımlarından astragalin (kemferol-3-glikozit), kemferol, kersetin, kersetin-4-glikozit, gnafalin (5,7-dihidroksi-3,8-dimetoksiflavon) ve 3,5,7-trihidroksi-6,8-dimetoksiflavon flavonoidleri, yapraklarından ise flavonoid olarak sadece kemferol izole edilmiştir (Meriçli vd., 1983, s. 112-115).



Şekil 2.5. Kersetin ve Kemferol (soldan sağa sırası ile) (Meriçli vd., 1983, s. 112-115)

***H. pamphylicum* Davis & Kupicha (E)**

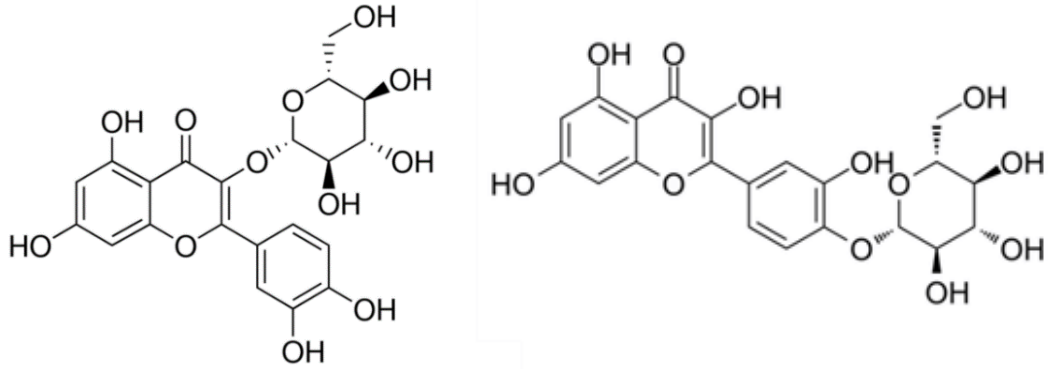
H. pamphylicum'un kapitulum kısımlarında tespit edilen flavonoidler Astragalin (kemferol-3-glikozit), kemferol, luteolin, luteolin-4-glikozit, naringenin, (-) naringenin-5-glikozit (helichrysin-A), kersetin-3glikozit (İzokersitrin) ve tilirozit (kemferol-3-p-kumaroilglikozit)'tir (Bohlmann vd., 1985, s. 611-612, Sezik ve Akdemir, 1986, s. 387-390). Ayrıca *H. pamphylicum*'un kapitulumları ve yapraklarından %70 metanol ekstresi hazırlanarak yapılan başka bir çalışmada, kapitulumlarda helichrysin-A, izokersitrin, luteolin-4-glikozit ve naringenin; yapraklarda helichrysin-A, izokersitrin, luteolin-4-glikozit, kersetin-4-glikozit ve naringenin bulunduğu tespit edilmiştir (Sezik ve Akdemir, 1986, s. 387-390).



Şekil 2.6. Helichrysin-A ve Tilirozit (soldan sağa sırası ile) (Öztürk vd., 2004)

H. chasmolysicum P.H. Davis (E)

H. chasmolysicum'un toprak üstü kısımlarından elde edilen %70'lik metanol ekstresinde helichrysin-A, izokersitrin, kersetin, kersetin-4-glikozit, naringenin, apigenin ve luteolin-4-glikozit tespit edilmiştir. Ayrıca kapitulum kısımlarında apigenin, luteolin-4-glikozit, naringenin, helichrysin-A, kersetin-3-glikozit ve kersetin-4-glikozit bulunduğu literatürde bildirilmiştir (Öztürk, 2004).



Şekil 2.7. Kersetin-3-glikozit ve Kersetin-4-glikozit (soldan sağa sırası ile) (Öztürk, 2004)

H. orientale (L) DC

H. orientale flavonoit bakımından zengin olup, kapitulumlarında tespit edilen flavonoitler astragalin, izoastragalin, kemferol, naringenin, naringenin-4-glikozit, helichrysin-A, ($\pm$) naringenin-5-glikozit (helichrysin-B), kersetin, tilirozit, 3,5-dihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon ve izosalipurposit; yapraklarında tespit edilenler naringenin, izokersitrin ve tilirozit'tir. Ayrıca bitkide kumarin glikoziti olan skopoletin bulunmaktadır (Öztürk, 2004). Yapılan başka bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan %10 (a/h) metanol ekstresinde tespit edilen fenolik bileşikler

klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, syringic asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, naringenin ve resveratrol'dür. Çalışmada Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) tekniği (LC-10ADvp) pompalı, DAD dedektörlü (278 nm) Eclipse XDB-C18 kolon (250x4.60 mm, i.d., 5 µm patikül çapı) (Agilent) cihazı kullanılarak uygulanmıştır (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. compactum* Boiss. (E)**

H. compactum kapitulum ve yapraklarından hazırlanan %60'lık etanol, kloroform ve etil asetat ekstraktlarında flavonoidler, %60'lık etanol ekstresinde 3,5-dihidroksi-6,7,8-trimethoksisflavon; kloroform ekstresinde apigenin ve luteolin; etilasetat ekstresinde ise kemferol, naringenin, kemferol-3-*O*-glikozit, luteolin-7-*O*-glikozit ve luteolin-4',7-di-*O*-glikozit tespit edilmiştir (Süzgeç vd., 2005, s. 269-272). Ayrıca toprak üstü kısımlarından helichrysin-B izole edilmiştir (Öztürk, 2004).

***H. artvinense* Davis et. Kupicha (E)**

H. artvinense toprak üstü kısımlarından hazırlanan %10 (a/h)'luk metanol ekstresinin bileşiminde fenolik asitler ve flavonoid türevi bileşikler olarak klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, şiranjik asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, epikateşin, hesperidin, luteolin ve naringenin tespit edilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. chionophilum* Boiss. & Bal. (E)**

H. chionophilum kapitulum ve kök kısımlarından elde edilen sabit yağda majör bileşik olarak palmitik asit (%31.21) tespit edilmiştir (Acet vd., 2020). Toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ bileşiminde ise majör bileşikler sırası ile dekanik asit (%18.9), tetradekanik asit (%17), dodekanik asit (%13.9) ve heksadekanik asit (%12.3) olarak tespit edilmiştir (Kürkçüoğlu vd., 2019). Ayrıca %10 (a/h)'luk metanol ekstresinde tespit edilen bileşikler klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, şiranjik asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, epikateşin, luteolin, naringenin, kersetin ve resveratrol'dür (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. noeanum* Boiss. (E)**

H. noeanum kapitulum kısımlarında tespit edilen flavonoidler sırası ile apigenin, apigenin-7-glikozit, naringenin, naringenin-4-glikozit, (-)-naringenin-5-glikozit (helichrysin-A), (±)-naringenin-5-glikozit (helichrysin-B), 3,5-dihidroksi-6,7,8-

trimetoksiflavon ve izosalipurpozit (2',4,4',6' tetrahidroksikalkon-6-glikozit); yaprak kısımlarında tespit edilen flavonoidler apigenin, apigenin-7-glikozit, kemferol, helichrysin-B, kersetin-3-glikozit (izokersetin)'tir (Öztürk, 2004). Toprak üstü kısımlarından elde edilen %10 (a/h)'luk metanol ekstresinin içeriğinde bulunan flavonoidler ise klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-hidroksibenzoik asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, hesperidin, naringenin ve resveratrol'dür (Albayrak vd., 2010, s. 114-122). Yapılan farklı bir çalışmaya göre *H. noeanum* kapitulumlarındaki toplam flavonoid miktarı %5.23, yapraklarındaki toplam flavonoid miktarı %1.57 olarak saptanmış, toprak üstü kısımlarındaki total helichrysin-B miktarı %1.12 olarak belirlenmiştir (Çubukçu vd., 1981, s. 77-85).

***H. arenarium* (L.) Moench**

Yapılan çalışmalara göre *H. arenarium*'dan organik asitler, uçucu bileşenler, karotinoidler, steroidler, tanenler, kinonlar, kumarinler, heterosiklik bileşikler ve flavonoidler izole edilmiştir. Toprak üstü kısımlarından elde edilen %70'lik etanol, petrol eteri ekstraktlarından gradiyen elüsyon tekniğiyle β -sitosterol, oleanolik asit, β -sitosterol β -D-glukopiranozit, naringenin, Helichrysumphytalide ve diosmin saptanmıştır (Eshbakova ve Aisa, 2009, s. 929-930). Çin'de yapılan bir araştırmaya göre *H. arenarium* etanol ve etil asetat ekstraktlarından β -sitosterol, stigmasterol, β -sitosterol β -D-glukopiranozit, stigmasterol- β -D-glukopiranozit, kafeik asit etil ester, 3,4-metilendioksisinamik asit ve 3,5-dihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavonol tespit edilmiştir (Yong vd., 2011, s. 872-875).

***H. armenium* DC.**

İran'da yapılan bir çalışmaya göre *H. armenium* kapitulum, yaprak ve köklerinden hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağların içeriğinde sırası ile kapitulumlarından limonen, α -kadinol, borneol, γ -kadinen, bornil asetat ve α -humulen; yaprak kısımlarından limonen, α -pinen, karyofilen oksit, α -gurjunen, bornil asetat ve torreyol; köklerinden limonen, α -pinen, spatulenol, α -gurjunen, karyofillen oksit, bornil asetat, β -kübaben ve γ -kadinen tespit edilmiştir (Oji vd., 2012). Toprak üstü kısımlarının %10 (a/h)'luk metanol ekstresinden elde edilen flavonoidler ise klorojenik asit, kafeik asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, epikateşin, hesperidin, luteolin ve naringenin'dir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122). Ülkemizde yapılan farklı bir çalışmaya göre *H. armenium* subsp. *armenium* kapitulumlarında apigenin, luteolin, naringenin, apigenin-4'-glikozit,

apigenin-7-glikozit, astragalin, kersetin-3-glikozit, helichrysin-A, helichrysin-B ve izosalipurposit; yapraklarında kemferol, kersetin ve kersetin-3-glikozit; farklı bir alt tür olan *H. armenium* subsp. *araxinum* kapitulumlarında galangin-3-metil eter, apigenin, luteolin, naringenin, apigenin-4'-glikozit, apigenin-7-glikozit, astragalin, kersetin-3-glikozit, helichrysin-A, helichrysin-B ve izosalipurposit; yapraklarında galangin-3-metil eter, kemferol, kersetin ve kersetin-3-glikozit tespit edilmiştir (Çubukçu ve Yüksel, 1982, s. 137-139).

***H. stoechas* (L.) Moench subsp. *barellieri* (Ten) Nyman**

H. stoechas subsp. *barellieri* toprak üstü kısımlarından hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyon, mikrodalga aracılı ekstraksiyon, ultrasonikasyon aracılı ekstraksiyon, maserasyon ve Soxhlet (devamlı) ekstraksiyon teknikleri kullanılarak elde edilen %5 (a/h)'lik etanol ekstrelerinde dihidroksibenzoik asit heksosit, protokateşik asit, *p*-hidroksifenilasetik asit, gentisik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, dihidroksibenzoik asit etil esteri, hidroksi sinnamik asit türevleri, kafeoil-kinik asit izomerleri, kafeik asit heksosit, 5-*O*-kafeoil-kuinik asit, kafeoil gliserol, kafeik asit, dikafeoil kinik asit, kumaroil-kinik asit, kafeoil-şikimik asit, feruloil-kinik asit, krisantemorimik asit, *p*-kumarik asit, dihidroksibenzoil-kafeoil-heksosit, asetil-dikafeoil-kinik asit, kafeoil-kumaroil-kinik asit, malonil-dikafeoil-kinik asit, rosmarinik asit, asetil-dikafeoil-kinik asit, trikafeoil-kuinik asit, asetil-dikafeoil-kinik asit, feruloil-kinik asit, diferuloil-kinik asit, dikafeoil-süksinilkinik asit, kafeik asit etil esteri, eskulin, eskuletin, kersetagetin 3,7-di-*O*-heksosit, luteolin-8-*O*-heksosit, kersetagetin 7-*O* heksosit, kersetagetin 3-*O*-(malonil-kumaroil)-heksosit-7-*O*-heksosit, kersetagetin 3-*O*-(kumaroil)-heksosit, kersetin-7-*O*-(asetil)-heksosit, kersetin-3-*O*-(asetil-kumaroil)-heksosit, kersetin-7-*O*-kafeoil heksosit, kemferol-7-*O*-(kumaroil) heksosit, izoramnetin 7-*O*-kumaroil heksosit, eriyodiktiyol, luteolin, kersetin, naringenin, apigenin, kemferol, pinobanksin, izoramnetin, pinosembrin, dimetoksi-hidroksi-flavon, galangin, trihidroksi-metoksiflavon ve helipiron tespit edilmiştir (Zengin vd., 2020, s. 113-125).

***H. pallasii* (Sprengel) Ledeb.**

H. pallasii yaprak ve kapitulumlarından elde edilen uçucu yağ Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) ile analiz edilerek majör bileşikler heksadekanoik asit, (Z,Z)-9,12-oktadekanoik asit, tetradekanoik asit, (Z)-karyofillen ve γ -kadinen olarak tespit edilmiştir (Formisano vd., 2009, s. 203-207). Ayrıca

toprak üstü kısımlarından hazırlanan %10 (a/h)'luk metanol ekstresinde klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, şirinjik asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, hesperidin, naringenin ve resveratrol tespit edilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. heywoodianum* P.H. Davis (E)**

H. heywoodianum toprak üstü kısımlarından hazırlanan %10 (a/h)'luk metanol ekstresinde tespit edilen bileşikler klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, apigenin-7-glikozit, eriyodiktiyol, hesperidin, luteolin, naringenin, kersetin ve resveratrol'dür (Albayrak vd., 2010, s. 114-122). Kapitulumlarında ise flavonoit içeriği apigenin, luteolin, luteolin-4-glikozit, naringenin, helichrysin-A, kersetin ve kersetin-4-glikozit olarak belirlenmiştir (Öztürk, 2004).

***H. plicatum* DC.**

H. plicatum yaprak, kapitulum ve köklerden hazırlanan %5-10 (a/h)'luk metanol ekstrelerinde sırasıyla gallik asit, protokateşuik asit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, şirinjik asit, *p*-kumarik asit, benzoik asit, rutin, *o*-kumarik asit, trans-sinamik asit ve kersetin; gallik asit, protokateşuik asit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, şirinjik asit, epikateşin, ferulik asit, *p*-kumarik asit, benzoik asit, rutin, *o*-kumarik asit ve kersetin; gallik asit, protokateşuik asit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, şirinjik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, benzoik asit, rutin, *o*-kumarik asit, trans-sinamik asit ve kersetin tespit edilmiştir (Kolaylı vd., 2010, s. 269-276). Ayrıca diğer bir çalışmada, %30 (a/h)'luk metanol ekstresinde tespit edilen bileşikler β -sitosterol, apigenin, nonakosanoik asit, astragalin, β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glukopiranozot, helichrysin A, helichrysin B ve izosalipurpozit olarak bildirilmiştir (Aydın, 2020, s. 153-159).

***H. graveolens* (Bieb.) Sweet**

H. graveolens toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağda tespit edilen bileşikler: bisiklo [2,2,1] hept-2-ene, α -pinen, α -fenken, β -pinen, 4-hekzen-3-on, 1-4 metil benzen, *d*-limonen, *l*-linalool, 3-siklohekzen-1-ol, α -terpineol, karvakrol etanon, izoterpinolen, α -ylangen, α -kopaen, β -burbonen, β -elemen, 1,4-methano-1H-inden, tetradekan, izoleden, β -karyofillen, B-germakren, himachala-2,4-dien, α -amorfen, β -farnesen, α -humulen, cis-kalamenen, 2-izopropenil-4a,8-dimetan, α -

kübaben, α -sedren, Δ -selinen, butanoik asit, γ -amorfen, α -selinen, α -muurolen, α -gurjunen, trisiklo[5.4.0.02,8]undek-9-n,2,6,6,9- tetrametan, Δ -kadinen, cis-kalamanen, epizonaren, selina-3,7 (11)-dien, 1,2,3,4-tetrahidro- naftalen, 4,4-dimetil-3-3(3-metilbüt-3- eniliden), spatulenol, karyofillen oksit, aromadendren, viridiflorol, siklohekzen, humulen epoksit, 2-naftelenmetanol, 1,10-di-epi-kübenol ve 1,2,3,4,4a,5,6,8a-naftalen'dir (Bagci vd., 2013, s. 7254). Ayrıca toprak üstü kısımlarından elde edilen %10 (a/h)'luk metanol ekstresinde klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, şirinjik asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, hesperidin, luteolin, naringenin ve kersetin flavonoitleri tespit edilmiştir (Öztürk, 2004).

2.4. *Helichrysum* Türlerine Ait Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Helichrysum türleri üzerinde yapılmış farmakolojik çalışmalar; 'South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry' isimli makalede (Lourens vd., 2008, s. 630-652), ve 'Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*' isimli makalede derlenmiştir (Akaberi vd., 2019, s. 111471). Bu tezde ise tekrardan kaçınmak amacı ile günümüze kadar yapılmış olan farmakolojik çalışmalar derlenerek verilmiştir.

***H. sanguineum* (L.) Kostel**

Filistin'de yapılan bir *in vivo* çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen suda çözünür ekstraktların anti-lipaz ve anti α -amilaz etkiler gösterdiği ve buna bağlı olarak diabetes mellitus ve obezite tedavisinde kullanılabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca bitkinin toprak üstü kısımlarının DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivitesi de belirlenmiştir (Jaradat vd., 2021, s. 41-51).

***H. pampylicum* Davis & Kupicha**

Metanolik ekstredeki flavonoitlerden helichrysin-A, izokersitrin, luteolin-4-glikozit, naringenin ve luteolin'e bağlı olarak memeli hücre DNA'sı topoizomera I enzimini inhibe ederek antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Topcu vd., 2008, s. 69-74). Yine metanol ekstresinin insan lenfosit hücreleri üzerinde *in vitro* genotoksik aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (Erolu vd., 2010, s. 177-182).

***H. chasmolysicum* P.H. Davis (E)**

Toprak üstü kısımlardan elde edilen metanol ekstresinin *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* ve *Enterobacter cloacae* mikroorganizmaları üzerinde sırasıyla 12, 11, 9 ve 13 µg/mL’lik konsantrasyonlarda antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla bitkinin cilt üzerindeki ve gastrointestinal mikrofloradaki mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel etkiler gösterebileceği sonucuna varılmıştır (Öztürk, 2004).

***H. orientale* (L) DC**

Toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin *in vitro* fosfomolibden redüksiyon metodu kullanılarak antioksidan, Gram (-) mikroorganizmalarına karşı *in vitro* agar difüzyon metodu kullanılarak antibakteriyel, *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmalarına karşı *in vitro* agar difüzyon metodu kullanılarak ise antifungal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. compactum* Boiss. (E)**

Bitkinin kapitulum kısımlarından elde edilmiş %60’lık etanol ekstresinin *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı 40 µg/mL konsantrasyonda antimikrobiyal etki gösterdiği, *in vitro* lipid peroksidasyon yöntemi kullanıldığında ise antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (Süzgeç vd., 2005, s. 269-272). Ayrıca toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin insan lenfosit hücre hattında sitogenetik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Eroğlu vd., 2009, s. 65-72).

***H. artvinense* Davis & Kupicha (E)**

Toprak üstü kısımlardan elde edilen metanol ekstresinin bileşimindeki flavonoidlere bağlı olarak *in vitro* DPPH radikal süpürücü antioksidan etki gösterdiği; *in vitro* agar dilüsyon metodu ile *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mikroorganizmalarına karşı sırasıyla 10 µg/ml, 2,5 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonlarda antibakteriyel, *in vitro* agar dilüsyon metodu ile *C. albicans* ATCC 1223’e karşı antifungal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. chionophilum* Boiss. & Bal. (E)**

Metanol ekstresinin bileşiminde bulunan fenolik bileşikler ve flavonoidlere bağlı olarak *in vitro* lipid peroksidasyon aktivite testi ile antioksidan; *in vitro* agar dilüsyon metodu ile *A. hydrophila* ATCC 7965, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* FMC 5, *Morganella morganii* RUT, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus brevis* FMC 3, *B. cereus* RSKK 863, *S. aureus* ATCC 29213 mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. noeanum* Boiss. (E)**

%10 (a/h)'luk metanol ekstresi üzerinde yapılan *in vitro* biyoaktivite testlerine göre antioksidan; *A. hydrophila* ATCC 7965, *M. morganii* RUT, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. brevis* FMC 3, *B. cereus* RSKK 863 ve *S. aureus* ATCC 29213 mikroorganizmalarına karşı 1 µg/mL gibi az bir konsantrasyonda antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. arenarium* (L.) Moench**

Toprak üstü kısımlardan elde edilen uçucu yağın *in vitro* mikrodilüsyon testi ile *Candida* türlerine karşı antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Rančić vd., 2005, s. 341-345). Ayrıca bitkiden elde edilen kloroform ekstresinin *in vitro* Ultraviyole-A ve Ultraviyole-B spektrofotometrik fotostabilite testine göre fotoprotektif (Jarzycka vd., 2013, s. 50-57), kapitulumlardan elde edilen flavonoidlerin *in vivo* anti-aterosklerotik etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Mao vd., 2017, s. 2812-17).

***H. armenium* DC.**

Bitkinin kapitulum, yaprak ve köklerinden hidrodistilasyon ile elde edilmiş uçucu yağların *in vitro* agar difüzyon yöntemine göre Gram (+), Gram (-) ve funguslar üzerinde orta düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Oji ve Shafagat, 2012). Bir başka çalışmaya göre, bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanolik ekstrenin ökaryotik tip DNA Topoizomeras I enzimini inhibe ederek, antikanser etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kucukoglu vd., 2006, s. 189-193).

***H. stoechas* (L.) Moench subsp. *barellieri* (Ten) Nyman**

Toprak üstü kısımlardan elde edilen etanol ekstralarının metal şelatlayıcı, DPPH radikal süpürücü, ABTS⁺ radikal kation renksizleştirici, fosfomolibden redükleyici mekanizmalar ile antioksidan; *in vitro* asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz

(BuChE) enzim inhibisyon testleri ile anti-Alzheimer aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Zengin vd., 2020, s. 113-125).

***H. pallasii* (Sprengel) Ledeb.**

Yapraklarından ve kapitulumlarından elde edilen uçucu yağın *Staphylococcus epidermidis* mikroorganizması üzerinde 100 µg/mL konsantrasyonda *in vitro* antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Formisano vd., 2009, s. 203-207).

***H. heywoodianum* P.H. Davis (E)**

Toprak üstü kısımlardan elde edilen metanolik ekstrenin antioksidan ve antimikrobiyal etki gösterdiği, ayrıca bir diğer çalışmada insan lenfosit hücre hattı üzerinde sitogenetik aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122; Eroğlu vd., 2009, s. 65-72).

***H. plicatum* DC.**

H. plicatum subsp. *plicatum* kapitulumlarından elde edilen %3'lük infüzyonu üzerinde yapılan *in vivo* anti-diyabetik ve antioksidan çalışmalar sonucunda streptozosin uygulanmış fareler üzerinde antidiyabetik aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir (Aslan vd., 2007, s. 54-59). Ayrıca kapitulum, gövde ve kök kısımlarından elde edilen etanol, metanol ve etil asetat ekstraktlarının içerdiği fenolik bileşikler ve yağ asitlerine bağlı olarak DPPH radikal süpürücü, ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirici testlerinin sonucunda antioksidan; *in vitro* AChE ve BuChE enzim inhibisyon testlerinin sonucunda anti-Alzheimer aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir (Acet vd., 2020).

***H. graveolens* (Bieb.) Sweet**

Kapitulumlarından elde edilen dekoksasyonların ve etanol ekstraktlarının *in vivo* glikoz oksidaz metodu ile streptozosin verilmiş fareler üzerinde anti-diyabetik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Aslan vd., 2007, s. 396-400). Ayrıca fenolik bileşik içeriği fazla olan ham ekstraktlarının *in vitro* DPPH radikal süpürücü test sonucunda antioksidan aktivite gösterdiği de rapor edilmiştir (Süntar vd., 2013, s. 103-110).

2.5. *Helichrysum* Türlerinin Etnofarmakolojik Kullanımları

***H. sanguineum* (L.) Kostel**

Filistin'de bazı ürolojik enfeksiyonların tedavisinde ve oksidatif strese bağlı rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Jaradat vd., 2018, s. 107-114). Ayrıca

Türkiye, Filistin ve diğer Akdeniz ülkelerinin geleneksel tıbbında dekoksasyonlarının solunum yolları rahatsızlıklarında, ürogenital rahatsızlıklarda, cilt enflamasyonunda, diyarede, böbrek taşı tedavisinde, astım, ateş ve tüberküloz tedavisinde kullanımları bildirilmiştir (Jaradat vd., 2021, s. 41-51).

***H. pamphylicum* Davis & Kupicha**

Bu bitki endemik bir tür olduğundan, literatürdeki spesifik etnofarmakolojik kullanım bilgisi kısıtlı olmakla birlikte ülser tedavisinde, böbrek taşı ve böbrek kumu tedavisinde, diüretik amaçlı kullanımları bilinmektedir (Öztürk ve Altay, 2017, s. 10-11).

***H. chasmolysicum* P.H. Davis**

Bu bitki endemik bir tür olduğundan, literatürde spesifik herhangi bir etnofarmakolojik kullanıma rastlanmamıştır.

***H. orientale* (L) DC**

İspanya'nın Madeira ve Porto Santo Adalarında ve aynı zamanda Türkiye'de de yetişen bitkinin, İspanya geleneksel tıbbında kapitulumlarından hazırlanan infüzyonunun, antiastmatik ve öksürüğü azaltıcı olarak kullanıldığı kayıtlıdır (Rivera ve Obon, 1995, s. 73-93).

***H. compactum* Boiss. (E)**

Etnofarmakolojik olarak 2000 yıldır safra kesesi bozukluklarında tıbbi çay şeklinde kullanılmaktadır. Diüretik etkilerine bağlı olarak böbrek taşı tedavisinde kullanıldığı kayıtlıdır (Süzgeç vd., 2005, s. 269-272).

***H. artvinense* Davis & Kupicha (E)**

Ülkemizde geleneksel olarak yara ve enfeksiyonların ve solunum yolları hastalıklarının tedavisinde, gastrik sekresyon stimülasyonunda, kolagog, kolorektik aktivite düzenleyici, diüretik olarak ve mide ağrılarının tedavisinde kullanılmaktadır (Eroğlu vd., 2009, s. 65-72).

***H. chionophilum* Boiss. & Bal. (E)**

Türkiye florasının endemik türleri arasında yer alan *H. chionophilum*'un anti-enflamatuvar, antioksidan, insektisit ve antimikrobiyal olarak etnofarmakolojik kullanımları bulunmaktadır. Ayrıca halk arasında yaygın biçimde çay ve yiyeceklerin

korunması amacıyla antimikrobiyal olarak kullanımına rastlanmaktadır (Özcan ve Acet, 2018, s. 5045-52).

***H. noeanum* Boiss. (E)**

Tıbbi çay olarak anti-enflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal kullanımları bulunmaktadır. Ayrıca böbrek taşı tedavisi ve safra kesesi rahatsızlıklarında kullanıldığı bildirilmiştir (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. arenarium* (L.) Moench**

Avrupa’da geleneksel olarak *H. italicum* ile safra salgısı düzenleyici ve diüretik amaçla kullanımları bulunmaktadır. Koloretik, hepatoprotektif olarak ve detoksifikasyon amacıyla Macaristan’da kullanımları kayıtlıdır (Czinner vd., 2000, s. 437-443).

***H. armenium* DC.**

İran’da ve Türkiye’de halk arasında karın ağrısını rahatlatmak, yara pansumanlarında, anti-enfektif ve hepatoprotektif amaçlarla, detoksifikasyon, kolagog ve koloretik olarak, öksürük tedavisinde, eritematik durumlarda ve diabetes mellitusta, mide gastrik sıvısının düzenlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Oji vd, 2012).

***H. stoechas* (L.) Moench subsp. *barellieri* (Ten) Nyman**

Kuzey-Doğu Portekiz’de toprak üstü kısımlardan hazırlanan dekoksasyonların soğuk algınlığı, bronşit ve ateşte; İspanya’da enflamasyon komplikasyonlarının azaltılması amacıyla, yaraların tedavisinde, diş ağrısını gidermek amacıyla, ürolojik ve sindirim rahatsızlıklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Barroso vd., 2014, s. 330-336; Viegas vd., 2014, s. 54-65). Ayrıca influenza tedavisinde, sinirlilik durumlarında ve pankreatik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Les vd., 2017, s. 295-302).

***H. pallasii* (Sprengel) Ledeb.**

Adana’nın Karaisalı ilçesinde, üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde ve antimikrobiyal amaçlı kullanıldığı bilinmektedir (Güneş vd., 2017, s. 68-75).

***H. heywoodianum* P.H. Davis (E)**

Bu bitki endemik bir tür olduğundan, literatürde spesifik herhangi bir etnofarmakolojik kullanıma rastlanmamıştır. Yapılan etnofarmakolojik çalışmalar diğer *Helichrysum* türleri ile benzer amaçlı kullanımların olduğunu ifade etmektedir. Tıbbi çay

olarak anti-enflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal olarak kullanımları vardır. Ayrıca böbrek taşı tedavisi ve safra kesesi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Albayrak vd., 2010, s. 114-122).

***H. plicatum* DC.**

Kahramanmaraş'ın Andırın ilçesinde, inhalasyonu göz ağrılarını, bebeklerin kulak ağrılarını gidermek amacıyla, boğaz ve akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Yine böbrek taşı düşürmede, nezle ve soğuk algınlığında, analjezik amaçla, cilt rahatsızlıklarının tedavisinde, öksürük ve diyabet tedavisinde de kullanıldığı bildirilmiştir (Demirci ve Özhatay, 2012, s. 75-92).

***H. graveolens* (Bieb.) Sweet**

Bitkinin kapitulumları yara tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca karaciğere bağlı sarılık tedavisinde, sindirim sistemi bozukluklarında, böbrek taşı tedavisinde ve üriner sistem enfeksiyonlarında kullanıldığı bildirilmiştir (Yeşilada vd., 1995, s. 133-152).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Çiçekleri henüz açmamış (kapalı çiçekli) *H. pamphylicum*'un toprak üstü kısımları Mayıs 2021'de, çiçekleri açmış (açık çiçekli) olanların toprak üstü kısımları Temmuz 2021'de Hülya Tuba KIYAN ve Elif PAKSOY tarafından Kral Koyu, Gazipaşa-ANTALYA'dan toplanmış olup, tür tayini Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik ABD, Öğretim Görevlisi Dr. Ömer Koray YAYLACI tarafından yapılmıştır. Toplandıktan hemen sonra bitkisel materyaller serin ve karanlık ortamda kurutularak, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. (Kral Koyu, Gazipaşa-ANTALYA)

3.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.2.1. Kimyasal Maddeler

EDTA	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Ferrozin	(Sigma-Aldrich, Almanya)
FeCl ₂	(Sigma-Aldrich, Almanya)
FeSO ₄	(Fluka, Almanya)
K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	(Sigma-Aldrich, Almanya)
o-Kumarik Asit	(Sigma-Aldrich, Almanya)
p-Kumarik Asit	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Gallik Asit	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Klorojenik Asit	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Şirinjik Asit	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Ferulik Asit	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Butil Hidroksi Toluen	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Folin-Ciocalteu Reaktifi	(Sigma-Aldrich, Almanya)
ABTS ^{•+}	(Sigma-Aldrich, Almanya)
DPPH [•]	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Donepezil	(Sigma-Aldrich, Almanya)

Galantamin	(Sigma-Aldrich, Almanya)
ATC	(Sigma-Aldrich, Almanya)
BTC	(Sigma-Aldrich, Almanya)
AChE	(Sigma-Aldrich, Almanya)
BuChE	(Sigma-Aldrich, Almanya)
(5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) DTNB	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Sodyum Karbonat	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Jelatin	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Metanol	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Etanol	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Etil Asetat	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Siklooksijenaz İnhibitör Görüntüleme Deney Kiti	(Cayman Chemical, ABD)
Lipoksijenaz İnhibitör Görüntüleme Deney Kiti	(Cayman Chemical, ABD)
5' -Nükleotidaz (CD73) Aktivite Deney Kiti	(Abcam, ABD)
Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) Deney Kiti	(Enzo, İsviçre)
Monoamin Oksidaz-B (MAO-B) Deney Kiti	(Biovision, ABD)

3.2.2. Cihazlar

Yüksek Basıncılı (Performanslı) Sıvı	
Kromatografisi (YBSK) Sistemi ve SPD DAD	(Shimadzu 20 AVP, Kyoto, Japonya)
Dedektör	
Spektrofotometre	(Shimadzu UV5, Kyoto, Japonya)
Su Banyosu	(Nüve BM 302, Türkiye)
Vorteks	(IkaGenius 2, Almanya)
Rotavapor	(Buchi, İsviçre)
Liyofilizatör	(Labconco, ABD)

Mikroplaka Okuyucu (Microplate Reader)

(BioTek, ABD)

3.3. *H. pamphylicum* Ekstrelerinin Elde Edilmesi

3.3.1. *H. pamphylicum* Dekoksiyonunun Hazırlanması

Kapalı ve açık çiçekli bitkisel materyalin toprak üstü kısımlarından 10 g tartım alınmış ve üzerine 100 mL soğuk distile su eklenerek, 30 dakika hot plate üzerinde 100 °C’de kaynatılmıştır. Soğuduktan sonra pamuktan süzme işlemi gerçekleştirilmiş ve bu işlem üç kez tekrarlanarak süzüntüler birleştirilmiş ve liyofilize edilmiştir. Elde edilen toz ekstre için verim hesabı (% a/a) yapılmıştır.

3.3.2. *H. pamphylicum* İnfüzyonunun Hazırlanması

Kapalı ve açık çiçekli bitkisel materyalin toprak üstü kısımlarından 10 g tartılmış ve üzerine 100 mL sıcak distile su (100 °C) eklenmiştir. Yarım saatlik beklemenin ardından 45 °C’de ultrasonik su banyosunda 45 dakika daha beklenmiş ve sıcakken süzölmüştür. Bu işlem üç kez gerçekleştirilmiştir. Süzüntüler birleştirilerek liyofilize edilmiştir. Elde edilen toz ekstre için verim hesabı (% a/a) yapılmıştır.

3.4. *H. pamphylicum* Uçucu Yağlarının Eldesi

Oda sıcaklığında, nemden uzak karanlık kurutulmuş bitkilerin çiçekli toprak üstü kısımları, Clavenger apereyi kullanılarak 3 saat hidrodistilasyon işlemine tabi tutularak uçucu yağlar elde edilmiş ve kuru drog üzerinden verim hesabı (% h/a) yapılmıştır.

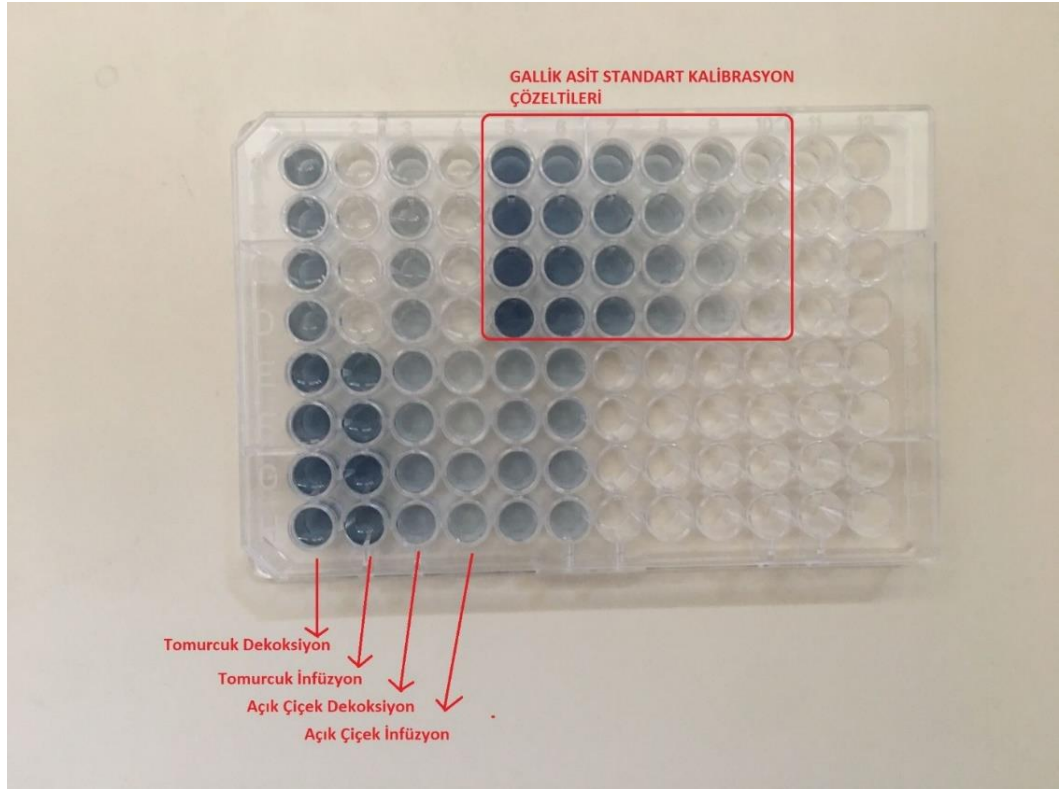
3.5. Fitokimyasal Analizler

3.5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

H. pamphylicum kapalı ve açık çiçek durumlu bitkilerinin toprak üstü dekoksiyon ve infüzyonlarının toplam fenolik madde miktarlarının analizi, fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu’s çözeltilinde bulunan metalik asitlerin kompleks iyonları ile oksidasyonu sonucu meydana gelen mavi renkli metalik kompleksin 760 nm dalga boyunda ölçülmesi ilkesine dayanan Folin-Ciocalteu’s spektrofotometrik yöntemine göre yapılmıştır (Vinson vd., 1995, s. 401-403).

Dekoksiyon ve infüzyonlar metanol ile 5 mg/mL konsantrasyonlara getirilmiştir. %20’lik Na₂CO₃ çözeltisi (7.5930 g Na₂CO₃ + 37.965 mL distile su) hazırlandıktan sonra standart olarak 1 mg/mL lik gallik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Gallik asit çözeltisi 1

mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL ve 0.1 mg/mL olmak üzere altı farklı konsantrasyona seyreltilmiştir. 96'lık 3000 µL derin kuyucuklu plakalara dört tekrarlı olacak şekilde 20 µL numune koyulmuştur. Her bir kuyucuğa 1560 µL distile su eklenmiştir ve ardından 100'er µL Folin-Ciocalteu's çözeltisi eklenmiştir. Her bir kuyucuğa 300 µL %20'lik Na₂CO₃ ekleme işleminin ardından, derin kuyucuklu makroplaka karanlıkta 2 saat saklanmıştır. Bekleme süresinin ardından her bir kuyucuktan 300 µL alınıp yeni bir 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarım yapılmış ve 760 nm'de sonuçlar okunmuştur. Elde edilen gallik asit kalibrasyon eşitliği kullanılarak, toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer (mg GAE/g ekstre) olacak şekilde hesaplanmıştır.



Görsel 3.1. Gallik asit standart kalibrasyon çözeltileri, infüzyon ve dekoksiyonlar

3.5.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarının Belirlenmesi

H. pamphylicum kapalı durumlu ve açık durumlu çiçekli bitkilerin toprak üstü dekoksiyon ve infüzyonlarının toplam flavonoit madde miktarlarının analizi, flavonoitlerin AlCl₃ çözeltisi ile kompleks oluşturması ile 415 nm'de spektrofotometrik ölçme işlemine dayanan TFC (Total Flavonoid Compound) yöntemine göre yapılmıştır (Vasco vd., 2008, s. 816-823).

Dekoksasyon ve infüzyonlar metanolde 10 mg/mL konsantrasyonlara getirilmiştir. %2'lik AlCl_3 çözeltisi (2 g AlCl_3 + 100 mL ultra saf su), ardından %15'lik asetik asit çözeltisi (15 mL glasiyel asetik asit + 85 mL ultra saf su) hazırlanmıştır. Rutin 96'lık derin kuyucuklu plakalar üzerinde 1 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL ve 0.1 mg/mL olmak üzere beş farklı konsantrasyona seyreltilmiştir. 96'lık 3000 μL derin kuyucuklu plakalara dört tekrarlı olacak şekilde 80 μL numune eklenmiştir. İlk üç sıra üzerine 80 μL AlCl_3 çözeltisi, dördüncü sıra üzerine ise 10 μL asetik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Her kuyucuğun üzerine 1840 μL absöü etanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 40 dakikalık bekleme süresinin ardından 96 kuyucuklu mikrolakalara her bir kuyucuk için 300 μL aktarım yapılarak, 415 nm de spektrofotometrik okumalar yapılmıştır. Elde edilen rutin kalibrasyon eşitliği kullanılarak, toplam flavonoit miktarları gram ekstrede mg rutine eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

3.5.3. Ters-Faz Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK-DAD) ile Fenolik Asit Miktar Tayini

Öztürk ve arkadaşlarının çalışmasında belirtilen koşullarda ters faz analitik kolon ve gradient elüsyon ile ayrılan fenolik bileşiklerin YBSK-DAD sisteminde, tutunma zamanları ve UV spektrumları kontrol edilerek, çalışılan ekstrelerin fenolik asitleri teşhis edilmiş, miktar tayinleri yapılmıştır (Öztürk vd., 2007).

YBSK-DAD Analiz Koşulları

Cihaz:	Shimadzu 20 AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan)
İşlemci:	Class VP Chromatography Manager Software (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Pompa:	Shimadzu LC20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolon:	INTERSIL ODS3-C ₁₈ kolon (100 mm, 4.6 mm i.d., 3 μm partikül çapı) (GL Sciences Inc., Japan)
Degazer:	DGU-20A ₅ (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Enjektör:	SIL 20A (Shimadzu, Japan)
Dedektör:	SPD-M 20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Akış Hızı:	1.0 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi:	10 μL

Gradient Sistem: **Hareketli Faz A:** Metanol: su: formik asit (10:88:2, h/h/h)
 Hareketli Faz B: Metanol: su: formik asit (90:8:2, h/h/h)

3.5.4. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizi ile Uçucu Yağ Bileşimlerinin Belirlenmesi

Elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonları, gaz kromatografi tekniğiyle incelenmiştir. Bu teknikte, uçucu yağ çözeltisi n-hekzan içinde (%10, v/v) hazırlanmıştır.

Uçucu yağların kimyasal kompozisyonları GK-AID ve GK/KS teknikleriyle aydınlatılmıştır. Her iki analiz için de HP-Innowax FSC kolonu (60 m × 0.25 µm), 0.25 µm film kalınlığı, Agilent, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, USA) ve taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmıştır. Fırın 60 °C’de 10 dakika kaldıktan sonra 220 °C’ye dakikada 4 °C ile çıkıp, 220 °C’de 10 dakika kalıp, 240 °C’ye dakikada 1 °C ile çıkmak üzere programlanmıştır. Split oranı 40:1 olarak seçilmiştir. Alev iyonlaşma detektörü ve enjektör 250 °C’de tutulmuştur. Kütle spektrumu 70 eV, kütle menzili 35-450 m/z seçilmiştir (Özek vd., 2007, s. 563-569).

3.6. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.6.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Oksidasyon, ilaç ve gıda güvenliğini, rengini ve organoleptik özelliklerini etkileyebileceğinden, ilaç ve gıda bozulmalarının en önemli süreçlerinden biridir. Antioksidanlara, özellikle insan vücudunda serbest radikallerin oksidatif strese bağlı zararlı etkilerini ve yağlar ile gıda maddelerinin diğer bileşenlerinin bozulmasını önlemeye yönelik olanlara karşı artan bir ilgi vardır.

3.6.1.1. Metal şelatlayıcı yöntem

3.6.1.1.1 Makro düzeyde metal şelatlayıcı yöntem

Helichrysum pamphylicum ekstrelerin demir iyonlarını şelatlama kabiliyetleri Orhan ve Üstün’ün çalışması modifiye edilerek tayin edilmiştir (Orhan ve Üstün, 2011, s. 386-390).

0.4 mg/mL konsantrasyonda 400 µL örnek üzerine 40 µL FeCl₂ (2mM) ve 80 µL Ferrozin (5mM) eklenmiş ve metanolla 2 mL’ye tamamlanmıştır. 15 dakika bekleme işleminin ardından 562 nm’de absorbanslar okunmuş, pozitif kontrol olarak EDTA (0.4 mg/mL) kullanılmıştır (n=3).

Metal şelatlama kapasitesi (%) aşağıdaki eşitlik (1) kullanılarak hesaplanmıştır;
$$\% \text{Metal şelatlama kapasitesi} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})] / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (1)$$



Görsel 3.2. EDTA, *Helichrysum pamphylicum* infüzyon ve dekoksasyonların Makro Metal Şelatlayıcı aktivite kuvvetleri

3.6.1.1.2 Mikro düzeyde metal şelatlayıcı yöntem

Helichrysum pamphylicum ekstre ve uçucu yağlarının demir iyonlarını şelatlama kabiliyetleri Santos ve arkadaşlarının çalışması göz önüne alınarak tayin edilmiştir (Santos vd., 2017, s. 515-522).

Numuneler ve EDTA 96 kuyucuklu plakalara 400 µg/mL den başlamak üzere 50 µL eklenmiş ve beş seri dilüsyon (200, 100, 50 ve 25 µg/mL olacak şekilde) ultra saf su ile yapılmıştır. Her bir kuyucuğa ekstra 160 µL ultra saf su ve 20 µL 0.3 mM FeSO₄ eklenmiş, ardından oda sıcaklığında beş dakika beklenmiştir. Metal şelatlama reaksiyonunun tamamlanması için her bir kuyucuğa 30 µL 0.8 mM Ferrozin eklenerek tüm kuyucuklar toplamda 260 µL sıvı hacmine tamamlanmıştır. 15 dakika bekleme süresinin ardından mikroparka okuyucuda 562 nm’de spektrofotometrik okumalar yapılmıştır.

Spektrofotometrik ölçüm sonrası ABTS^{•+} radikal katyonunun % giderimi aşağıdaki eşitliğe (3) göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Total Antioksidan aktivite} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3)$$

A_{kontrol} = ABTS^{•+} reaktif çözeltisinin absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Ekstre içeren reaktif çözeltisinin absorbansı

3.6.1.3. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), nitrojen köprüsünün bir atomunda eşleşmemiş değerlik elektronuna sahip kararlı bir serbest radikaldir. DPPH radikalının süpürülmesi, popüler DPPH antioksidan testinin temelidir. Yakın geçmişteki yayınlar incelendiğinde, çeşitli araştırma gruplarının DPPH konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve reaksiyon solventi açısından farklılık gösteren çok farklı protokolleri kullandığı görülmektedir (Sharma ve Bhat, 2009, s. 1202-05). Bu tez çalışmasında Brand-Williams DPPH serbest radikal süpürücü yöntem revize edilip kullanılmıştır (Brand-Williams vd., 1995, s. 25-30).

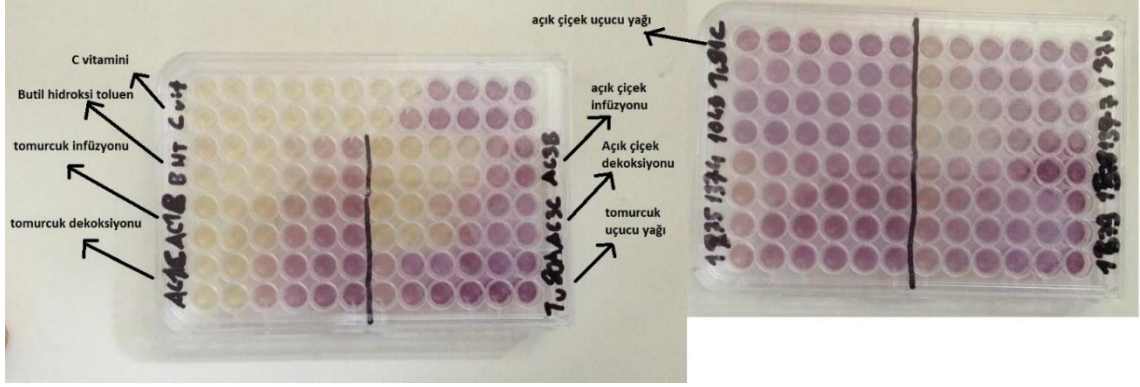
Metanol: distile su (50:50) çözücüsü içerisinde 10^{-4} M DPPH çözeltisi, karanlıkta bekletilmek üzere, su banyosunda, oda sıcaklığında, sonik karıştırıcı ile DPPH katısının çözünmesi beklenmiştir. Bu sırada 96 kuyucuklu mikrolakalar içerisinde C vitamini, BHT (pozitif kontrol olmak üzere) ve numunelerden, 400 µg/mL konsantrasyondan başlanıp seri dilüsyonlar yapılmıştır. Her kuyucukta 22 µL pozitif kontrol ve numune çözeltisi olacak şekilde numuneler için altı, C vitamini için 12 seri dilüsyon yapılmıştır (IC_{50} değerinin hesabı için pozitif kontroller yeterince aktif çıkacağından, daha fazla seri dilüsyon işlemi yapılmıştır.). DPPH spektrofotometrik ölçümünün yapılacağı kontrol kuyucuklarına 22 µL çözücü eklendikten sonra hazırlanan DPPH çözeltisi, her kuyucuğa 200 µL olacak şekilde eklenmiş ve 30 dakika sonra 515 nm’de mikrolaka okuyucuda absorbans okuma işlemi gerçekleştirilmiştir (Chedea ve Pop, 2019, s. 169-183).

DPPH serbest radikal süpürme kapasitesinin (%) giderimi aşağıdaki eşitliğe (4) göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Total Antioksidan aktivite} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (4)$$

A_{kontrol} = DPPH reaktif çözeltisinin absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Ekstre içeren reaktif çözeltisinin absorbansı



Görsel 3.4. C vitamini, BHT, *Helichrysum pamphylicum* infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının DPPH serbest radikal süpürücü aktivite mikrolakaları

3.6.2. Enzimatik Aktivite Deneyleri

3.6.2.1. AChE ve BuChE inhibitör aktivite yöntemi

Helichrysum pamphylicum infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının AChE ve BuChE enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi için Ellman Testi kullanılmış ve kolorimetrik belirginlik sağlanması için metot modifikasyonları yapılmıştır. Enzimatik çalışmalarda AChE (E.C.3.1.1.7., tip VIS *Electrophorus electricus*'dan (elektrikli yılan balığı), BuChE (E.C.3.1.1.8., at serumundan izole), Ellman belirteci, 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), enzim tampon çözeltileri (potasyum dihidrojen fosfat, potasyum hidroksit), sodyum hidrojen karbonat, asetilkolin iyodür, bütirilkolin iyodür, jelatin, dimetilsülfoksit (DMSO), donepezil ve galantamin kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler 412 nm'de mikrolaka okuyucuda gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin her aşamasında Milipor, Milli-Q Synthesis A10 cihazından elde edilmiş distile su kullanılmıştır. Kullanılan bütün çözeltiler taze hazırlanıp, stabilite değişimlerinin olmaması açısından 1-2 hafta içerisinde kullanılmasına özen gösterilmiştir. Tüm çözeltilerin hazırlanıp alikotlanması, 96 kuyucuklu mikrolakalara testlerin uygulanması, analizi yapılacak örneklerin seri dilüsyonlarının tamamı Eppendorf Transfer Pipette pipetörleriyle gerçekleştirilmiştir. 96 mikrokuyucuklu plakaların spektrofotometrik okumaları BioTek-Synergy H1 Microplate Reader cihazında yapılmıştır (Göger vd., 2021, s. 387-399).

AChE ve BuChE enzim çözeltisinin hazırlanması

Liyofilize durumdaki AChE/BuChE enzimini çözmek için %1'lik jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. AChE/BuChE enzimi, jelatin çözeltisi içerisinde 220 U/mL

konsantrasyonda hazırlanmıştır. Enzim çözeltisinden 0.5 mL alınarak 100 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle, 0.22 U/mL'ye seyreltilmiş stok enzim solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti -20 °C'de saklanmıştır. Enzim çözeltileri, aktivite çalışmalarına başlamadan önce oda ısısına getirilmiş, sürekli dondurma ısıtma işleminden kaçınılmıştır.

Asetilkolin iyodür (ATC) çözeltisinin hazırlanması (0.015 M)

ATC (0,043 g) bir miktar suda çözölmüş, ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

Bütirilkolin iyodür (BTC) çözeltisinin hazırlanması (0.015 M)

BTC (0,047 g) bir miktar suda çözölmüş, ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

5-5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) çözeltisinin hazırlanması (0.003 M)

0.119 g DTNB tartılarak, bir miktar suda çözölmüştür. Bu çözeltiye sodyum bikarbonat (0.045 g) ilave edilmiş ve hacim, suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Fosfat tamponunun hazırlanması (pH=8)

Potasyum dihidrojen fosfat (13.61 g), 1L suda çözölmüştür. Ayarlı çözelti, 4 °C'de saklanmıştır.

AChE BuChE enzim inhibisyon deneyi

H. pamphylicum infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının enzim inhibitör aktiviteleri 400, 200, 100, 50, 25 ve 12.5 µg/mL'lik altı konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Aktivite değerleri, %0-100 aralığında inhibisyon şeklinde değerlendirilmiştir.

Biyoaktivite çalışmalarında kolorimetrik Ellman metodu modifiye edilerek, enzim inhibisyonu incelemesi yapılmıştır. Test işlemine başlamadan önce çözelti 20-25 °C'ye getirilmiştir. Çalışmalarda 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Her bir kuyucukta 25 µL örnek, 50 µL fosfat tamponu, 25 µL AChE/BuChE enzimi, 125 µL DTNB, 25 µL substrat (ATC/BTC) olacak şekilde toplam 250 µL hacme ulaşılmıştır. Çözelti, enzim-substrat ve enzim-analiz örneği komplekslerinin sağlıklı bir şekilde oluşabilmesi için iki ayrı test çözeltisine ayrılmış olup, 1. test çözeltisi 50 µL fosfat tamponu, 25 µL enzim; 2. test

çözeltisi ise 125 µL DTNB ve 25 µL substrat şeklinde hazırlanmıştır. İlk test çözeltisinin üç tekrarlı seri dilüsyonları yapılmış, 25 µL'lik örnekler üzerine aktarılmış ve ardından 15 dakika 25 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra 2. test çözeltisi eklenmiş ve tekrar 15 dakika 25°C'de beklemenin ardından 412 nm'de mikropkaya okuyucuda absorbanlar kaydedilmiştir. Anlamli absorbanlar seçilerek, aşağıdaki eşitliğe (5) göre % inhibisyonlar hesaplanmıştır;

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[(A(K) - A(B)) - (A(\text{İ}) - A(B))]}{(A(K) - A(B))} \times 100 \quad (5)$$

B: Blank (Ekstre ve substratın eklenmediği kuyucuk)

K: Kontrol (Sadece ekstreinin eklenmediği kuyucuk)

A(B): Blank kuyucuğuna ait absorban

A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorban

A(İ): Analizi yapılacak örneğe ait absorban

3.6.2.2. MAO-B enzim inhibisyon aktivite yöntemi

MAO-B enzim inhibisyon testi, Biovision Monoamine Oxidase-B Inhibitor Screening Kit (Katalog No: K797-100) ile yapılmıştır. Kit içeriğinde; MAO-B enzim tamponu, OxiRed prob, MAO-B enzimi (MAO, EC 1.4.3.4), MAO-B substratı, developer ve inhibitör (Selejilin) bulunmaktadır. Kit, -20 °C'de saklanmış ve test, sürekli dondurma-ısıtma işleminden kaçınılarak gerçekleştirilmiştir. Test kitinin belirtmiş olduğu test protokolüne göre mikropkaya okuyucuda 96 kuyucuklu mikropkalarda spektrofotometrik okumalar sonucu elde edilen absorbanlar neticesinde, %0-100 inhibisyon verim hesapları yapılmıştır (Rao vd., 2021, s. 703-716).

3.6.2.2.1 MAO-B enzim tamponu

Kullanıma hazır halde tedarik edilmiş olup, oda sıcaklığına getirilip kullanılmıştır.

3.6.2.2.2 OxiRed prob

Kullanıma hazır halde tedarik edilmiş olup, test yapılırken ışıktan korumak oldukça önemlidir. Oda sıcaklığına getirilerek kullanılır ve ilk çözündürme işleminden sonra sadece iki ay stabildir.

3.6.2.2.3. MAO-B enzimi

22 µL MAO-B enzim tamponu ile seyreltilerek kullanılır. Seyreltmenin ardından -80 °C’de saklanmıştır. Seyreltmenin ardından stabilitesini iki ay boyunca korur.

3.6.2.2.4. MAO-B substratı

110 µL ultra saf su ile seyreltilerek kullanılmalıdır. -20 °C’de saklanmak koşulu ile iki ay boyunca stabildir.

3.6.2.2.5. İnhibitör (Selejilin)

250 µL ultra saf su ile seyreltildiğinde, son molaritesi 2 mM’dır. Teste başlanmadan önce 5 µL 2mM’lık Selejilin çözeltisi, 995 µL ultra saf su ile seyreltilerek 10 µM konsantrasyona getirilir ve seri dilüsyon bu aşamadan sonra gerçekleştirilir.

3.6.2.2.6. MAO-B enzim inhibisyon testinin uygulanması

Analizi yapılacak maddelerin seri dilüsyonları, MAO-B enzim tamponu ile 96 kuyucuklu mikrolakalara 10 µL’lik hacimler halinde yapılmıştır. MAO-B enzimi kullanılmadan önce tekrar 4’te 1 oranında bir seyreltme işlemi uygulanmıştır. Enzim-substrat ve enzim-örnek kompleksinin sağlıklı gerçekleşebilmesi için kit çözeltileri iki ayrı test çözeltisine ayrılmıştır. Her bir kuyucuk için 1. test çözeltisi 49 µL tampon, 1 µL enzim; 2. test çözeltisi 37 µL tampon, 1 µL MAO-B substratı, 1 µL Developer, 1 µL OxiRed probu olacak şekilde ayarlanmıştır. 1. test çözeltisinin eklenmesinin ardından gerekli komplekslerin gerçekleşmesi için 37 °C’de 10 dakika beklenmiş ve ardından 2. test çözeltisi eklenmiştir. 37 °C’de 10-40 dakika beklemenin ardından, kit protokolünde belirtildiği üzere, mikrolaka okuyucudan gerekli absorbanslar elde edilmiş ve % inhibisyon verim hesabı aşağıdaki eşitliğe (6) göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[(A(K) - A(B)) - (A(\text{İ}) - A(B))]}{(A(K) - A(B))} \times 100 \quad (6)$$

B: Blank (Ekstre ve substratın eklenmediği kuyucuk)

K: Kontrol (Sadece ekstrenin eklenmediği kuyucuk)

A(B): Blank kuyucuğuna ait absorbans

A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorbans

A(İ): Analizi yapılacak örneğe ait absrobans

3.6.2.3. COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon aktivite yöntemi (antienflamatuvar etki)

Analizi yapılacak örneklerin COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon testleri, Cayman Chemical COX Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit (Item no: 701050)'e göre gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğinde; COX deney tamponu, Hemin, COX-1 enzim standardı, kolorimetrik substrat, potasyum hidroksit çözeltisi, araşidonik asit, DuP-697 deney reaktifi (selektif COX-2 enzim inhibitörü) ve sC-560 deney reaktifi (selektif COX-1 enzim inhibitörü) bulunmaktadır. Kit -20 °C'de saklanmış ve test, sürekli dondurma-ısıtma işleminden kaçınılarak gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığına getirilmiş test kitinin belirtmiş olduğu test protokolüne göre, mikrolaka okuyucuda 590 nm 96 kuyucuklu mikrolakalarda spektrofotometrik okumalar sonucu elde edilen absorbanslar neticesinde, %0-100 inhibisyon verim hesapları yapılmıştır (Hamberg ve Samuelsson, 1973, 899-903; Nugteren ve Hazelhof, 1973, s. 448-461). Hesaplanan ardından IC₅₀ verileri *SigmaPlot 12.0* programı ile hesaplanmıştır.

3.6.2.3.1 COX deney tamponu

Kit ile gelen hazır tampon 3 mL'ye, 27 mL ultra saf su olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.6.2.3.2 Hemin

300 µL DMSO'da çözülmüş haldedir. 88 µL'si 1912 µL deney tamponu ile seyreltilmiştir.

3.6.2.3.3 COX-1 enzim standardı

Küçükbaş hayvanlardan izole edilmiş 50 µL COX-1 enzimi bulundurur. Kullanılmaya hazır bir şekilde kite eklenmiştir.

3.6.2.3.4 Araşidonik asit çözeltisi

Etanol içerisinde 400 µL çözelti şeklindedir. 100 µL Araşidonik asit ve 100 µL potasyum hidroksit vortekslenip, 800 µL ultra saf su ile 2.2 M son konsantrasyona getirilmiştir. Bu miktar 50 reaksiyon gerçekleştirecek kadar yeterlidir. Araşidonik asit çözeltisi hazırlandıktan sonra 30 dakika içerisinde kullanılmıştır.

3.6.2.3.5 Potasyum hidroksit

Vial içerisinde 500 µL olacak şekilde hazır halde bulunur. Kit ile gönderildiği şekilde kullanıma hazırdır.

3.6.2.3.6 Kolorimetrik substrat

Bu vial, kolorimetrik TMPD solüsyonu bulundurur ve kullanıma hazır şekilde gönderilmiştir.

3.6.2.3.7 DuP-697 deney reaktifi

Vial, 60µM'lık DuP-697 çözeltisi içerir. DuP-697, zamana bağımlı COX-2 inhibitörüdür ve kullanıma hazır şekilde gönderilmiştir.

3.6.2.3.8 sC-560 deney reaktifi

Vial, DMSO'da 66 µM'lık sC-560 çözeltisi bulundurur. sC-560, selektif COX-1 inhibitörüdür. Reaktif, kullanıma hazır bir şekilde gönderilmiştir.

3.6.2.3.9 COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon aktivite testlerinin yapılışı

Analizi yapılacak maddelerin seri dilüsyonları, daha önce seyreltilmiş COX deney tamponuyla yapılmıştır. COX standart hücreleri için 150 µL COX deney tamponu, 10 µL seyreltilmiş Hemin, 10 µL COX-1 enzim standardı, 20 µL TMPD ve 20 µL araşidonik asit çözeltisi (COX-1 enzim inhibisyon aktivitesini saptamak için 10 µL DuP-697, COX-2 enzim inhibisyon aktivitesini saptamak için 10 µL sC-560 eklenmelidir.); numune hücreleri için 110 µL deney tamponu, 10 µL seyreltilmiş Hemin, 40 µL numune çözeltisi, 20 µL TMPD ve 20 µL araşidonik asit çözeltisi; inhibitör hücreleri için ise 110 µL COX deney tamponu, 10 µL seyreltilmiş Hemin, 50 µL seri dilüsyon yapılacak inhibitör çözeltisi, 20 µL TMPD ve 20 µL araşidonik asit çözeltisi olacak şekilde her kuyucukta toplam 210 µL sıvı olacak şekilde hazırlık yapılmıştır. Kolorimetrik ölçüm yapılmadan önce, her kuyucuğa TMPD ve araşidonik asit çözeltisi hariç tüm çözeltiler eklenmiştir. 25 °C'de 5 dakikalık beklemenin ardından her kuyucuğa, belirtilen miktarda TMPD eklenmiş ve tekrar 25 °C'de 5 dakikalık beklemenin ardından spektrofotometrik mikropłaka okuyucuda 590 nm'de okuma yapılmıştır. İnhibitör ve numunelerin % inhibisyon aktivite verim hesapları, aşağıda belirtilmiş eşitlik 7 ve eşitlik 8'e göre yapılmıştır;

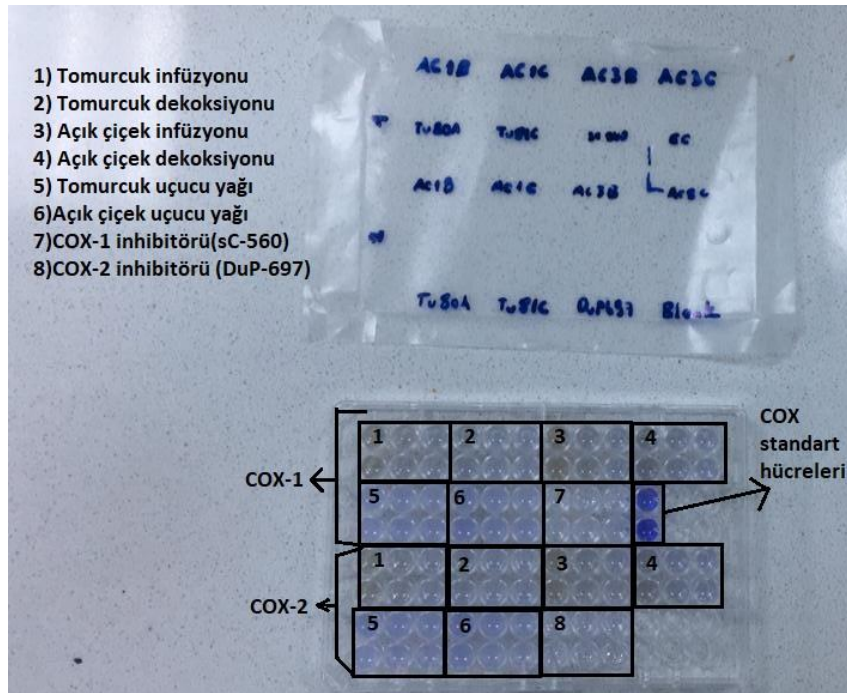
$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[A(\text{COX}) - A(\text{N})]}{A(\text{COX})} \times 100 \quad (7)$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[A(\text{COX}) - A(\text{İ})]}{A(\text{COX})} \times 100 \quad (8)$$

A(COX)= COX standart hücrelerinin absorbans değeri

A(N)= Numune hücrelerinin absorbans değeri

A(İ)= İnhibitör hücrelerinin absorbans değeri



Görsel 3.5. sC-560, DuP-697, *Helichrysum pamphylicum* infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon aktivite mikropalakaları

3.6.2.4. 5-LOX enzim inhibisyon aktivite yöntemi (antienflamatuvar etki)

Helichrysum pamphylicum infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının 5-LOX enzim inhibisyon testleri Cayman Chemical Lipoxigenase Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit (Item no: 760700)'e göre gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğinde; 5-LOX deney tamponu, Developer-1, Developer-2, 5-LOX enzim standardı, araşidonik asit, linoleik asit, potasyum hidroksit çözeltisi ve nordihidroguaiaretik asit (NDGA) (5-LOX enzim inhibitörü) bulunmaktadır. Kit, -20 °C'de saklanmış ve test, sürekli dondurma-ısıtma işleminden kaçınılarak gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığına getirilmiş test kitinin

belirtmiş olduğu test protokolüne göre, mikrolaka okuyucuda 495 nm 96 kuyucuklu mikrolakalarda spektrofotometrik okumalar sonucu elde edilen absorbanslar neticesinde %0-100 inhibisyon verim hesapları yapılmıştır (Gaffney, 1996, s. 431-459; Yamamoto, 1992, s. 117-131; Zhang vd., 1999, s. 67-73).

3.6.2.4.1 5-LOX deney tamponu

Kit ile gelen 3 mL deney tamponu, 27 mL ultra saf su ile seyreltilmiştir.

3.6.2.4.2 Developer 1 ve Developer 2

Kit içeriğinde kullanıma hazırdır.

3.6.2.4.3 Kromojen

Developer 1 ve Developer 2 aynı hacimde karıştırılarak hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µL denk gelecek şekilde hazırlanmıştır.

3.6.2.4.4 5-LOX enzim standardı

5-LOX enzim standardından 10 µL alınarak, 990 µL deney tamponuyla seyreltilmiştir.

3.6.2.4.5 Potasyum hidroksit çözeltisi

Vial içerisinde 500 µL olacak şekilde hazır halde bulunur. Kit ile gönderildiği şekilde kullanıma hazırdır.

3.6.2.4.6 Araşidonik asit çözeltisi

Kit içerisinde hazır gelen 25 µL araşidonik asit, 25 µL potasyum hidroksit çözeltisiyle karıştırılmıştır ve üzerine 950 µL ultra saf su eklenmiştir.

3.6.2.4.7 Linoleik asit çözeltisi

Kit içerisinde hazır gelen 25 µL linoleik asit, 25 µL potasyum hidroksit çözeltisiyle karıştırılmıştır ve üzerine 950 µL ultra saf su eklenmiştir. (Deneyde ya araşidonik asit ya da linoleik asit çözeltisi kullanılmalıdır. Tercihen linoleik asit çözeltisi kullanılmıştır.)

3.6.2.4.8 NDGA pozitif kontrolü (inhibitör) (100 µM)

Kitte gelen NDGA çözeltisi, 500 µL deney tamponu ile seyreltilerek son molarite 100 µM'a ayarlanmıştır.

3.6.2.4.9 5-LOX enzim inhibisyon aktivite testinin yapılışı

Analizi yapılacak maddelerin seri dilüsyonları, daha önce seyreltilmiş 5-LOX deney tamponuyla yapılmıştır. 5-LOX enzim-substrat kompleksi hücreleri için 10 µL 5-LOX deney tamponu ve 90 µL 5-COX seyreltilmiş enzim standardı ve 10 µL linoleik asit çözeltisi (Tercihen araşidonik asit çözeltisi de eklenebilir.); numune hücreleri için 90 µL 5-COX seyreltilmiş enzim standardı, 10 µL numune çözeltisi ve 10 µL linoleik asit çözeltisi (Tercihen araşidonik asit çözeltisi de eklenebilir.); inhibitör hücreleri için ise 90 µL 5-COX seyreltilmiş enzim standardı, 10 µL inhibitör çözeltisi ve 10 µL linoleik asit çözeltisi (Tercihen araşidonik asit çözeltisi de eklenebilir.) olacak şekilde her kuyucukta toplam 110 µL sıvı olacak şekilde hazırlık yapılmıştır. Linoleik asit çözeltisi eklenmeden önce 5 dakika oda sıcaklığında beklenmiş ve yukarıda belirtildiği gibi her kuyucuğa 10 µL linoleik asit çözeltisi eklenmiştir. 10 dakikalık bekleme süresinin ardından, her kuyucuğa 100 µL kromojen eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra, 495 nm’de mikropılaka okuyucu ile spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

İnhibitör ve numunelerin % inhibisyon aktivite verim hesapları aşağıda belirtilmiş eşitlik 9 ve eşitlik 10’a göre yapılmıştır;

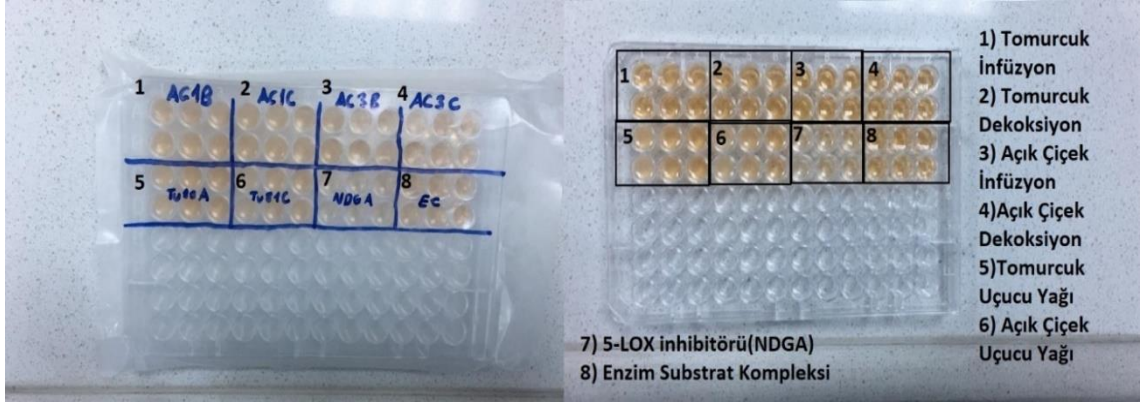
$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[A(\text{LOX}) - A(\text{N})]}{A(\text{LOX})} \times 100 \quad (9)$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[A(\text{LOX}) - A(\text{İ})]}{A(\text{LOX})} \times 100 \quad (10)$$

A(LOX)= LOX standart hücrelerinin absorbens değeri

A(N)= Numune hücrelerinin absorbens değeri

A(İ)= İnhibitör hücrelerinin absorbens değeri



Görsel 3.6. NDGA, *Helichrysum pamphylicum* infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının 5-LOX enzim inhibisyon aktivite mikrolakaları

3.6.2.5. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) enzim inhibisyon testi (antikanser etki)

Matriks Metalloproteinaz-2, hücre dışı proteaz enzim ailesinden olan MMP enzimlerinin bir üyesidir. MMP-2 enziminin hedefleri arasında doğal ve denatüre kolajenler, fibronectin, elastin, laminin-5, pro-TNF- α ve nörokan vardır. MMP-2, 72 kDa'lık bir proenzim olarak salgılanır, 62 ve 59 kDa'ya bölünme ile aktive edilir. MMP-2 enziminin inhibisyonu ateroskleroz, kanser hücrelerinin büyümesi, anjiyogenez ve metastaz gibi patolojik durumların engellenmesi açısından önem teşkil etmektedir. Bu tez için kullanılan MMP-2 deney kiti, kromojenik tiyopeptid substrat inhibitörlerini tespit etmek amaçlı geliştirilmiş olup, MMP enziminin tiyoester bağının sülfidril grupları ile hidroliz olup olmadığı prensibine göre sonuç vermektedir. Sülfidril gruplarını hidroliz etmek amaçlı DTNB, kolorimetrik substrat olarak kullanılmıştır

Helichrysum pamphylicum infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının MMP-2 enzim inhibisyon testleri Enzo MMP-2 Colorimetric Drug Discovery Kit (Item no: BML-AK408)'e göre gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğinde; MMP-2 enzim tamponu, insan rekombinant MMP-2 enzimi, kromojenik MMP-2 substratı, NNGH MMP-2 inhibitörü ve 96 kuyucuklu ½ mikrotitrasyon plakası bulunmaktadır. Kit -80 °C'de saklanmış, sürekli çözündürme-soğutma işleminden kaçınılmıştır. Oda sıcaklığına getirilmiş test kitinin belirtmiş olduğu test protokolüne göre mikrolaka okuyucuda 412 nm'de absorbanslar tespit edilmiştir.

3.6.2.5.1 MMP-2 enzim tamponu (50 mM HEPES, 10 mM CaCl₂, %0,05 Brij-35, 1 mM DTNB, pH 7.5)

Deney tamponu kit ile hazır olarak temin edilmiştir. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

3.6.2.5.2 İnsan rekombinant MMP-2 enzimi (40 kDa, 100 µM, 150 U)

Kullanmadan önce 1/56 oranında seyreltilmiştir. -80 °C’de saklanmış ve sürekli çözündürme-dondurma işleminden sakınılmıştır.

3.6.2.5.3 Kromojenik MMP-2 substratı (25 mM)

Kit içeriğinde 16 mg/L konsantrasyonda DMSO’da çözülmüş halde teslim alınmıştır. Enzim inhibisyon testi yapılmadan önce 1/25 oranında MMP-2 enzim tamponunda çözündürülmüştür.

3.6.2.5.4 NNGH MMP-2 inhibitörü (1.3 mM)

Kitte DMSO içerisinde çözündürülmüş halde gelen inhibitör, 1/200 oranında seyreltilip, 6,5 µM konsantrasyonda kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.2.5.5 MMP-2 enzim inhibisyon testinin yapılışı

Helichrysum pamphylicum infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının seri dilüsyonları, kit ile gelen hazır tamponla her kuyucukta 400 µg/mL, 200 µg/mL ve 100 µg/mL olacak şekilde üç konsantrasyonda, 70 µL hacimde olacak şekilde yapılmıştır. MMP-2 kontrol kuyucukları için 70 µL MMP-2 enzim tamponu, 20 µL MMP-2 (58 mU/mL) enzimi, 10 µL kromojenik substrat (1 mM); numune kuyucukları için 70 µL seri dilüsyon çözeltileri, 20 µL MMP-2 enzimi, 10 µL kromojenik substrat; NNGH inhibitör kuyucukları için 70 µL seri dilüsyonu yapılmış inhibitör, 20 µL MMP-2 enzimi, 10 µL kromojenik substrat; blank kuyucukları için 90 µL MMP-2 enzim tamponu ve 10 µL kromojenik substrat olacak şekilde her kuyucukta toplam 100 µL hacim sıvı olacak şekilde ayarlama yapılmıştır. İlgili kuyucuklara kromojenik substrat eklenmeden önce, enzim-numune etkileşiminin sağlanması için inkübatörde 37 °C’de bir saat bekletilmiştir. Bekleme işleminin ardından her kuyucuğa 10 µL kromojenik substrat eklenmiştir. 1. ve 20. dakikalarda 412 nm’de mikroparka okuyucu ile spektrofotometrik ölçüm yapılmış ve absorbans değişimleri doğrultusunda % inhibisyon aktivite verim hesapları aşağıda belirtilmiş eşitlik 11 ve eşitlik 12’ye göre belirlenmiştir;

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[V(\text{MMP}) - V(\text{N})]}{V(\text{MMP})} \times 100 \quad (11)$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[V(\text{MMP}) - V(\text{İ})]}{A(\text{MMP})} \times 100 \quad (12)$$

V(MMP)= MMP-2 kontrol kuyucuklarının absorbens hız değişimi

V(N) = Numune kontrol kuyucuklarının absorbens hız değişimi

V(İ) = NNGH inhibitör kuyucukları absorbens hız değişimi



Görsel 3.7. NNGH, *Helichrysum pamphylicum* infüzyon, dekoksiyonları ve uçucu yağlarının MMP-2 enzim inhibisyon aktivite mikrotitrasyon plakası

3.6.2.6. 5' Nükleotidaz (CD73) enzim inhibisyon aktivite yöntemi (antikanser etki)

Ekto-5'-nükleotidaz (5'-NT) olarak da bilinen CD73, tümör proliferasyonunu artırır. İmmunosupresif yollar aracılığıyla pro-anjiojenik aktiviteye sebebiyet verir (Antonioli vd., 2016, s. 95-109). Ayrıca, kanser hücrelerinin migrasyonunu destekler (Gao vd., 2017, s. 1-8). Çalışmalarımızda kullanılan CD73 enzim aktivite deney kiti, alkalen fosfotazlar aracılığı ile indüklemeye prensibine dayanan Berthelot testi yöntemine göre oluşturulmuştur.

Helichrysum pamphylicum infüzyon, dekoksiyon ve uçucu yağlarının 5' Nükleotidaz (CD73) enzim inhibisyon testleri enzim inhibisyon testleri, Abcam 5'-Nucleotidase (CD73) Activity Assay Kit (Colorimetric) (Item no: ab235945)'e göre gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğinde; 5'-NT deney tamponu, 5'-NT dönüştürücü, 5'-NT developer I, 5'-NT developer II, 5'-NT inhibitörü, liyofilize 5'-NT enzimi, 5'-NT stop solüsyonu, 5'-NT substratı ve NH_4^+ standardı bulunmaktadır. Kit -20 °C'de saklanmış, sürekli çözündürme-soğutma işleminden kaçınılmıştır. Oda sıcaklığına getirilmiş test

kitinin belirtmiş olduğu test protokolüne göre, mikrolaka okuyucuda 670 nm’de absorpsanlar okunmuştur.

3.6.2.6.1 5'-NT deney tamponu

Kitten temin edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

3.6.2.6.2 5'-NT dönüştürücü

Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilip, 220 µL 5'-NT deney tamponu ile seyreltilmiştir.

3.6.2.6.3 5'-NT developer I

Kitten temin edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

3.6.2.6.4 5'-NT developer II

Kitten temin edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

3.6.2.6.5 5'-NT inhibitörü (aCD73)

Kitten temin edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

3.6.2.6.6 Liyofilize 5'-NT enzimi

Kullanmadan önce 22 µL 5'-NT deney tamponu eklenmiştir. Eklendikten sonra -80 °C’de saklanmış ve sürekli çözündürme-dondurma işleminden kaçınılmıştır.

3.6.2.6.7 5'-NT stop çözeltisi

Kitten temin edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

3.6.2.6.8 5'-NT substratı

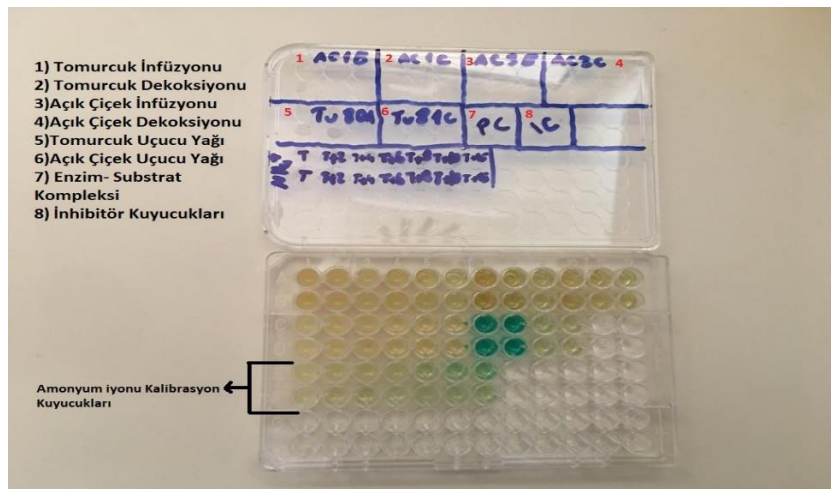
Liyofilize toz halde temin edilmiştir. Kullanmadan önce 1.1 mL 5'-NT deney tamponu ile seyreltilmiştir.

3.6.2.6.9 NH_4^+ standardı (100 mM)

Kitten temin edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

3.6.2.6.10 5'-NT enzim inhibisyon testinin yapılışı

96 kuyucuklu mikrolakalar içerisinde 5'-NT enzim inhibitörü, *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının seri dilüsyonları, kit ile gelen hazır tamponla her kuyucukta 400 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ ve 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde üç konsantrasyonda 50 μL hacme getirilmiştir (İnhibitör için iki kuyucuk seyreltme yapılmıştır.). Enzim-numune etkileşiminin gerçekleşebilmesi adına, her bir kuyucuk için 38 μL enzim tamponu, 2 μL dönüştürücü, 10 μL substrat 1. reaksiyon çözeltisi; 4 μL stop çözeltisi, 80 μL developer I ve 40 μL developer II 2. reaksiyon çözeltisi olacak şekilde ayarlama yapılmıştır. Enzim kuyucuklarına 2 μL seyreltilmiş enzim eklendikten sonra, her kuyucuğa 1. reaksiyon çözeltisi eklenmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için kit ile temin edilen NH_4^+ standart çözeltisi sırası ile 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 15 μL ; 5'-NT enzim tamponu 100, 98, 96, 94, 92, 90 ve 85 μL olacak şekilde 2 tekrarlı yedi kuyucuğa aktarım yapılmıştır. 37 °C'de 20 dakika beklenmiştir (Bekleme süresi inhibitör kuyucuklarının bulanıklığı gidene dek artabilir durumdadır.). Beklemenin ardından 2. reaksiyon çözeltisi eklenmiş ve bu kez 20 dakikayı geçmeyecek şekilde 37 °C'de inkübasyonun ardından, 670 nm'de mikrolaka okuyucu (Microplate reader) yardımıyla absorbanslar elde edilmiştir. Elde edilen NH_4^+ kalibrasyon eğrisi kullanılarak, ilgili kuyucuklardaki toplam enzim aktivasyonu (mU/mL) hesaplanmıştır.



Görsel 3.8. 5'NT inhibitörü, *Helichrysum pamphylicum* infüzyon, dekoksasyonları ve uçucu yağlarının 5'NT enzim inhibisyon aktivite mikrolakası

4. BULGULAR

4.1. İnfüzyon, Dekoksiyon ve Uçucu Yağ Verimleri

Üzerinde çalışılan *H. pamphylicum* türünün kapalı ve açık çiçek durumundaki toprak üstü bitki kısımlarının infüzyon, dekoksiyon ve uçucu yağları % (verim) olarak hesaplanmıştır. İlgili (% a/a) verim sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *H. pamphylicum* Ekstre ve Uçucu Yağlarının % Verim Hesapları

Ekstre ve Uçucu Yağlar	Verim (%)
HTDEK	9.71
HCDEK	4.41
HTINF	14.33
HCINF	6.32
HTUY	0.16
HCUY	0.007

HTDEK: Kapalı Çiçek Dekoksiyonu, HCDEK: Açık Çiçek Dekoksiyonu, HTINF: Kapalı Çiçek İnfüzyonu, HCINF: Açık Çiçek İnfüzyonu, HTUY: Kapalı Çiçek Uçucu Yağı, HCUY: Açık Çiçek Uçucu Yağı

H. pamphylicum türünün infüzyon ve dekoksiyonlarının yüzde verimleri sırasıyla %4.41 (Açık Çiçek Dekoksiyonu), <%6.32 (Açık Çiçek İnfüzyonu), <%9.71 (Kapalı Çiçek Dekoksiyonu) ve <%14.33 (Kapalı Çiçek İnfüzyonu) olarak değişmektedir.

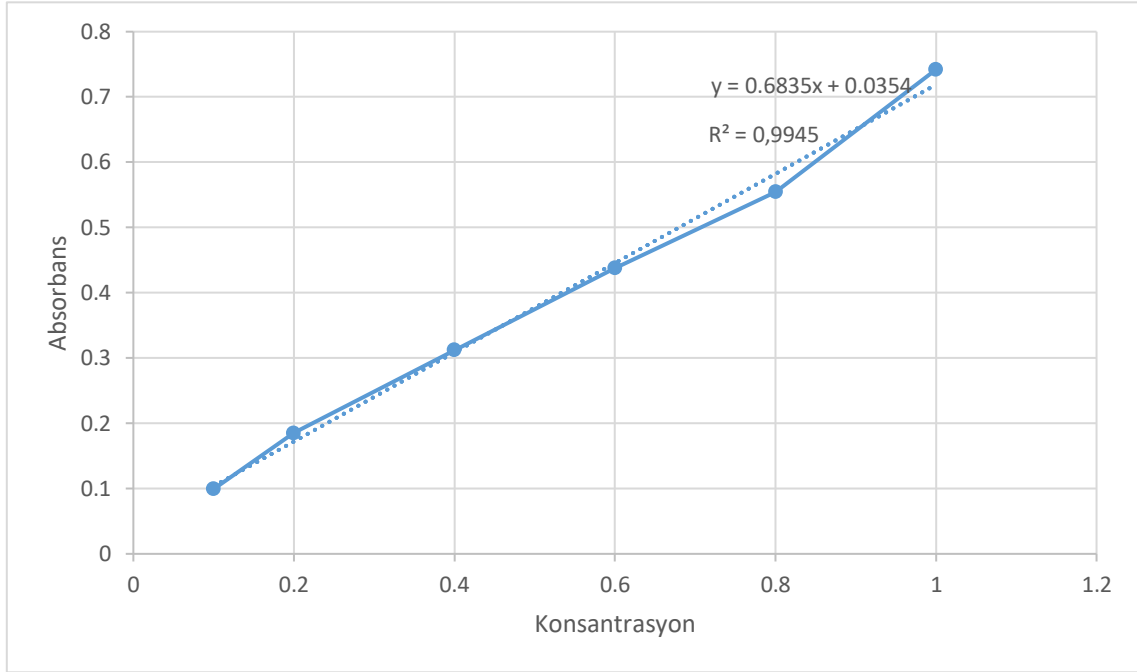
4.2. İnfüzyon ve Dekoksiyonların Toplam Fenolik Madde Miktarları

Fenolik bileşikler, yapıları içerisinde taşıdıkları fonksiyonel gruplar nedeniyle elektron ve hidrojen verebilme kapasitesine sahip önemli antioksidan bileşiklerdir. Bu çeşitli gruplar, onların polar özelliklerini artırırken, antioksidan özelliklerini de artırmaya yardımcı olur, ayrıca serbest radikaller ve diğer oksidasyon ajanları elimine olur.

Yöntemin amacı, kısaca fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibden ve tungstene elektron aktarımına dayanmaktadır. Mavi renk değişim absorbanları 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmektedir.

H. pamphylicum infüzyon ve dekoksiyonlarının içerdiği toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu's reaktifi kullanılarak Şekil 4.1.'de verilen gallik asidin metanol çözeltisinin kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemden faydalanılarak,

gram ekstrede gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eşitliği $y = 0.6835x + 0.0354$ 'tür.



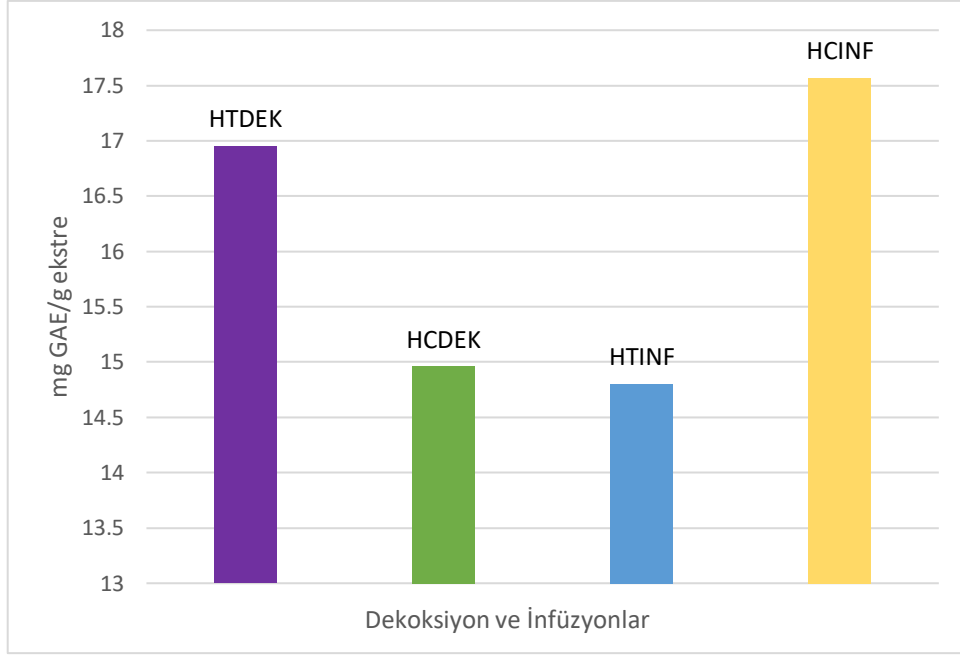
Şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

Sonuçlara göre, en yüksek fenolik madde miktarı *H. pamphylicum* kapalı çiçek dekoksiyonundadır (93.52 ± 5.11 mg GAE/g ekstre); en düşük fenolik madde miktarının ise *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksiyonunda (72.16 ± 8.93 mg GAE/g ekstre) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.2. *H. pamphylicum* dekoksiyon ve infüzyonlarının toplam fenolik madde miktarları

Ekstreler	Toplam Fenolik Madde Miktarları (mg GAE/g ekstre)
HCDEK	72.158 ± 8.93
HTDEK	$93.52 \pm 5.11^*$
HTINF	87.08 ± 5.26
HCINF	88.54 ± 9.02

*Ortalama standart sapma değerleri



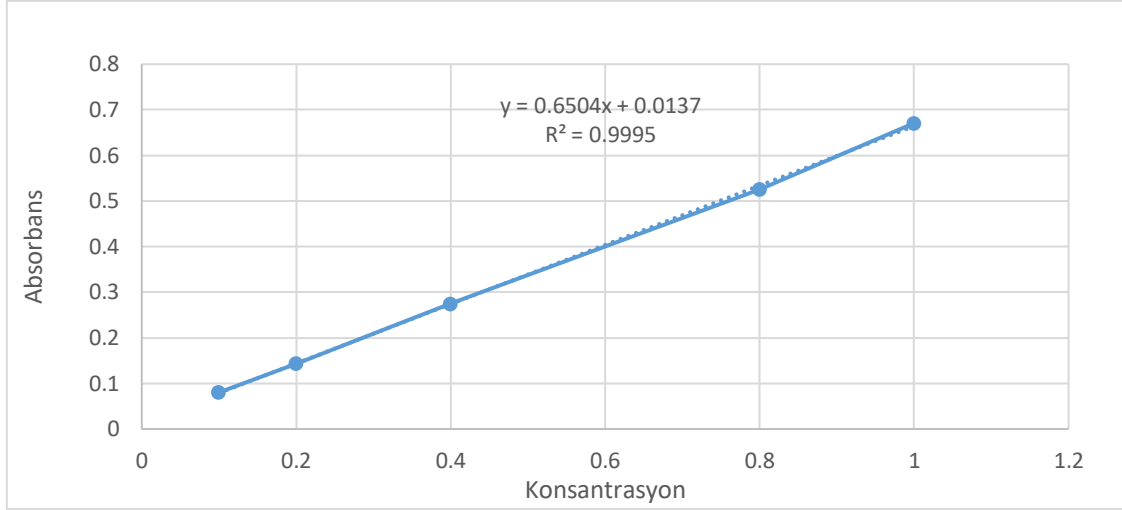
Şekil 4.2. *H. pamphylicum* dekoksasyon ve infüzyonlarının toplam fenolik madde miktarları

4.3. İnfüzyon ve Dekoksasyonların Toplam Flavonoit Madde Miktarları

Flavonoitler, değişken süstitüe gruplara sahip olduklarından, temel hücresel enzim fonksiyonunu modüle etme kapasiteleri ile antioksidan etkiye sahip bileşiklerdir. Fenolik bileşikler grubu içerisinde yer alan flavonoitler, antioksidan etkilerinin yanısıra antienflamatuvar, antikanser ve anti-mutajenik etkilere de sahiptirler (Panche vd., 2016).

Yöntemin amacı, flavonoit bileşiklerin $AlCl_3$ ile tepkimesinden yararlanarak oluşan sarı renkli kompleksin 412 nm’de spektrofotometrik absorbanlarının elde edilmesi ve flavonoit miktarının tayin edilmesine dayanmaktadır.

H. pamphylicum infüzyon ve dekoksasyonlarının içerdiği toplam flavonoit madde, miktarları $AlCl_3$ ve asetik asit reaktifleri kullanılarak Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te verilen rutin metanol çözeltisinin kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemden faydalanılarak, gram ekstrede rutine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eşitliği sırası ile $y = 1.6116x - 0.0037$ ve $y = 0.6504x + 0.0137$ ’dir.

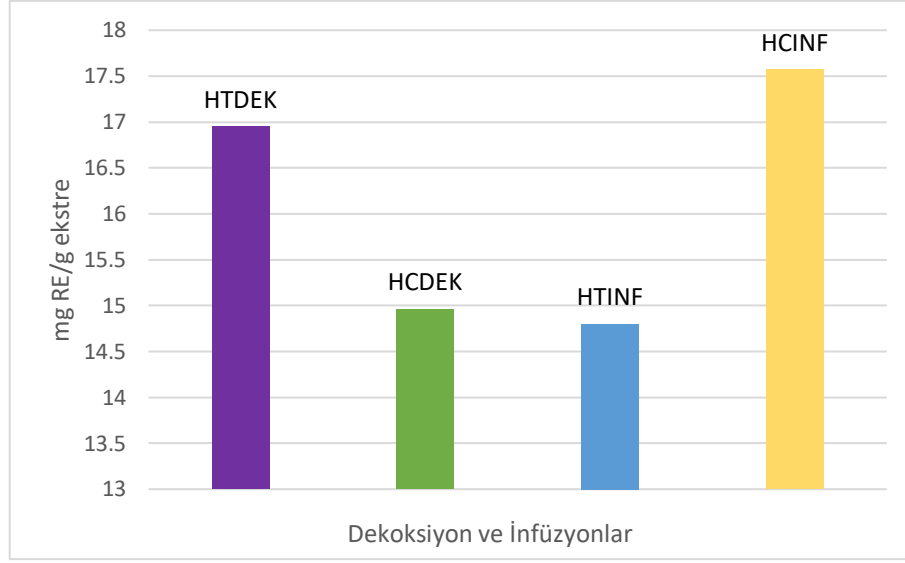


Şekil 4.3 Rutin kalibrasyon eğrisi

Sonuçlara göre, en yüksek flavonoit madde miktarının rutine göre *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonunda olduğu (17.57 ± 0.95 mg RE/g ekstre), en düşük flavonoit madde miktarı ise *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunda (14.80 ± 0.74 mg RE/g ekstre) olduğu bulunmuştur. (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5)

Çizelge 4.3. *H. pamphylicum* dekoksiyon ve infüzyonlarının rutine göre toplam flavonoit madde miktarları

Ekstreler	Toplam Flavonoit Madde Miktarları (mg RE/g ekstre)
HTDEK	16.95 ± 0.88
HCDEK	14.96 ± 0.32
HTINF	14.80 ± 0.74
HCINF	17.57 ± 0.95



Şekil 4.4 *H. pamphylicum* dekoksiyon ve infüzyonlarının rutine göre toplam flavonoit madde miktarları

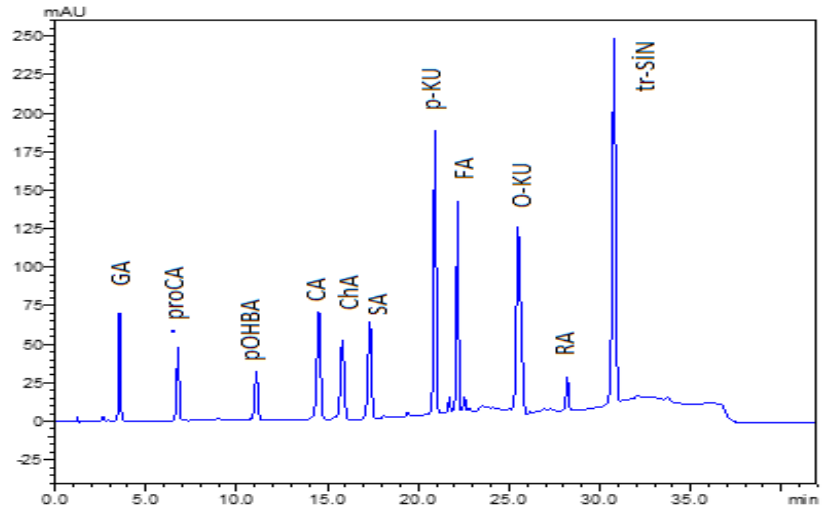
4.4. Ters-Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK-DAD) ile Fenolik Asit Miktar Tayini

Shimadzu LC 20A Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Cihazı kullanılarak analizi gerçekleştirilen *H. pamphylicum* ekstralarında bulunan fenolik asitlerin (gallik (GA), protokateşik (proto-KA), kafeik (KA), klorojenik (KLA), *p*-kumarik (*p*-KU), ferulik (FA), *o*-kumarik (*o*-KU), *trans*-sinnamik (*tr*-SİN) asitler) ayırımı, C₁₈ kolonda deneysel kısımda belirtildiği koşullarda gerçekleştirilmiş, sonuçlar Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

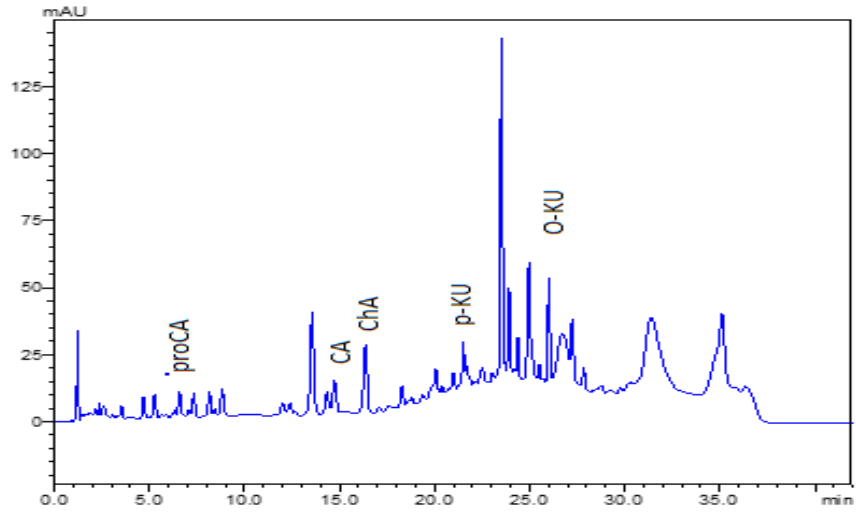
Çizelge 4.4. *H. pamphylicum* dekoksiyon ve infüzyonlarının ters-faz YBSK ile tespit edilen fenolik asit miktarları

Fenolik asit miktarları (µg/g bitki)							
Ekstreler	proKA	KA	KLA	p-KU	FA	o-KU	tr-SİN
HTDEK	0.12	0.84	0.79	0.29	0.36	0.24	0.17
HCDEK	0.14	0.60	0.59	0.28	0.35	0.92	0.29
HCINF	0.40	0.81	0.90	0.27	0.36	1.78	0.31
HTINF	0.52	0.43	1.61	0.41	0.57	0.29	0.19

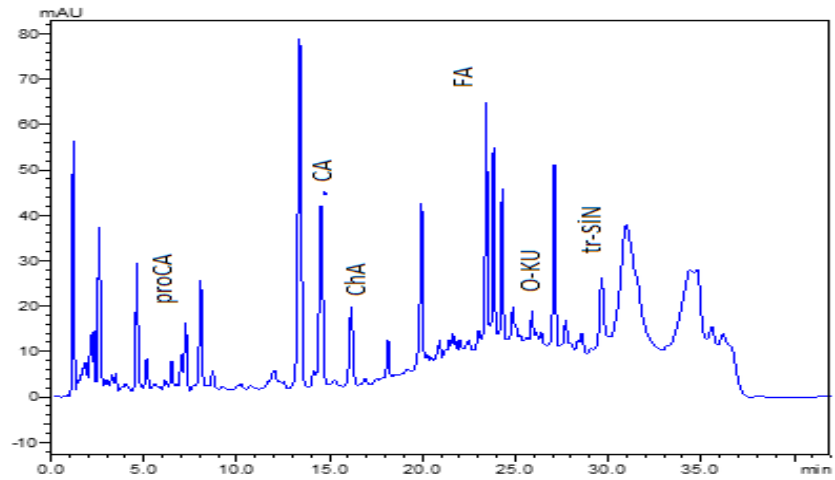
pro-KA: Protokateşik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, *p*-KU: *para*-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, *o*-KU: *orto*-Kumarik Asit, *tr*-SİN: *trans*-sinnamik asit).



Şekil 4.5 Fenolik asit standartlarının YBSK kromatogramı



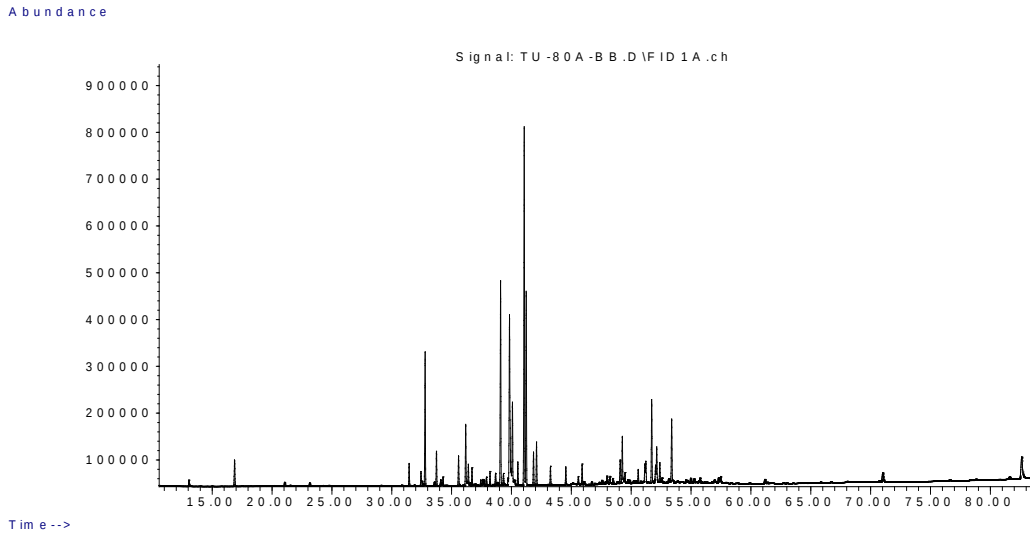
Şekil 4.6 *Helichrysum pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonu YBSK kromatogramı



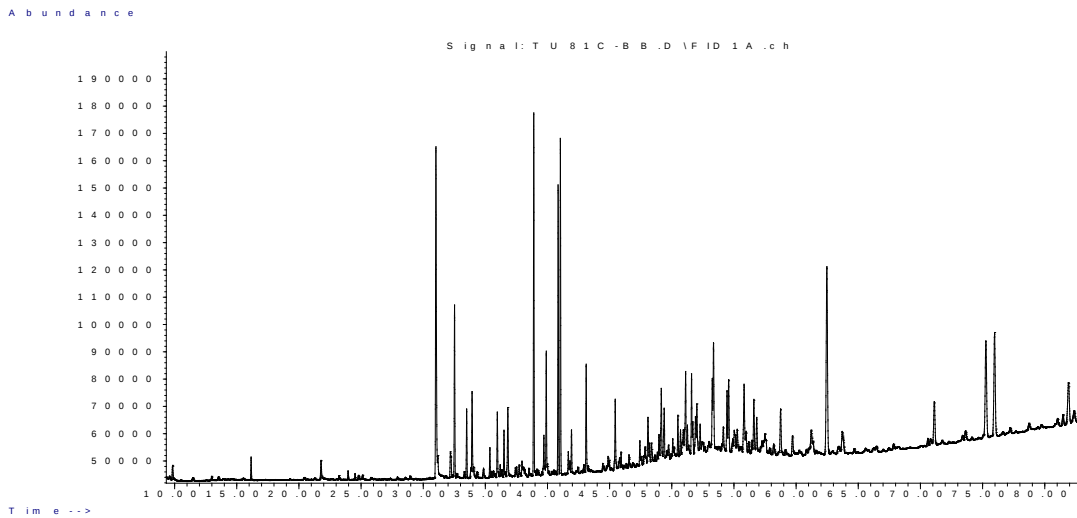
Şekil 4.7 *Helichrysum pamphylicum* kapalı çiçek dekoksiyonu YBSK kromatogramı

4.5. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizi ile Uçucu Yağ Bileşimlerinin Belirlenmesi

H. pamphylicum kapalı ve açık çiçek durumlu bitkilerinin toprak üstü kısımlarından uçucu yağlarının Clavenger apereyi aracılığı ile elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonları gaz kromatografisi tekniği ile araştırılmıştır. Bileşenlerin kalitatif analizi için GK-KS, kantitatif analizi için GK-AID sonuçları kullanılmıştır. Bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların açık ve kapalı çiçekli bitki olmak üzere sırası ile %98.7'sini temsil eden toplam 65 ve %89.5'ini temsil eden toplam 35 bileşik tanımlanmıştır. Uçucu bileşenlere ait kromatogramlar Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8 *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağından elde edilmiş GK kromatogramı



Şekil 4.9 *H. pamphylicum* açık çiçek uçucu yağından elde edilmiş GK kromatogramı

H. pamphylicum kapalı çiçekli bitki durumunun toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GK/KS-AID yöntemi ile tespit edilen ana bileşenin δ -kadinen (%16.6) olduğu gözlenmiştir. Bu bileşenden başka, uçucu yağ içeriğinde %9.8 ile germakren D ve sırasıyla γ -kadinen (%9.1), α -kopaen (%5.8), T-kadinol (%4.0), α -muurolen (%3.6), α -kadinol (%3.5), epi-bisikloeskifellandren (%2.6) tayin edilmiştir (Çizelge 4.5).

H. pamphylicum açık çiçekli bitki durumunun toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GK/KS-AID yöntemi ile tespit edilen ana bileşenin asetik asit (%12.0) olduğu belirlenmiştir. Bu bileşenden başka, uçucu yağ içeriğinde %9.8 ile γ -muurolen ve sırasıyla γ -kadinen (%9.2), δ -kadinen (%7.8), α -kopaen (%4.6), kadalen (%3.8), propanoik asit (%2.7), 4-okzo- α -ylangen (=Mustakon) (%2.7) tayin edilmiştir. (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. *H. pamphylicum* kapalı çiçek durumlu bitki uçucu yağının kimyasal bileşimi

RRI*	Bileşik	%
1032	α -Pinen	0.3
1118	β -Pinen	1.3
1188	α -Terpinen	e*
1203	Limonen	0.2
1218	β -Fellandren	e
1255	γ -Terpinen	0.1
1280	<i>p</i> -Simen	e
1290	Terpinolen	e
1466	α -Kubeben	0.9
1493	α -Ylangen	0.6
1494	Siklosativen	0.2
1497	α -Kopaen	5.8
1528	α -Burbonen	0.2
1535	β -Burbonen	1.5
1544	α -Gurjunen	0.3
1553	Linalol	e
1559	β -Kubeben	0.4
1589	β -Ylangen	1.3
1608	<i>epi</i> -Bisikloeskifellandren	2.6
1612	β -Karyofillen	0.8
1628	Aromadendren	0.8

Çizelge 4.5. *H. pamphylicum* kapalı çiçek durumlu bitki uçucu yağının kimyasal bileşimi (devamı)

1639	Kadina-3,5-dien	0.3
1661	Alloaromadendren	0.4
1677	<i>epi</i> -Zonaren	0.6
1707	δ -Selenin	0.6
1710	γ -Gurjunen	0.1
1714	γ -Muurolen	9.3
1716	Leden	0.6
1718	Zonaren	0.3
1726	Germakren D	9.8
1733	γ -Amorfen	e
1743	Bisikloseskifellandren	0.6
1746	α -Muurolen	3.6
1755	Bisiklogermakren	1.0
1773	δ -Kadinen	16.6
1776	γ -Kadinen	9.1
1799	Kadina-1,4-dien (=Kubenen)	1.4
1807	α -Kadinen	1.8
1849	Kalamenen	0.8
1900	<i>epi</i> -Kubebol	0.7
1941	α -Kalakoren-I	0.4
1984	α -Kalakoren-II	e
2037	Salvial-4(14)-en-1-on	e
2051	Gleenol	0.3
2057	Ledol	0.3
2078	Junenol	e
2081	1,10-di- <i>epi</i> -Kubenol	1.4
2088	1- <i>epi</i> -Kubenol	2.1
2098	Globulol	0.5
2144	Spatulenol	0.6
2150	Muurola-4,10(14)dien-1-ol	1.0
2173	6- <i>epi</i> -Kubenol	1.0
2187	T-kadinol	4.0
2188	Kopaborneol	1.0
2209	T-Muurolol	1.7
2219	Torreyol	0.9
2227	Guaia-6,10(14)-dien-4- β -ol	0.3
2255	α -Kadinol	3.5
2257	Torilenol	e

Çizelge 4.5. *H. pamphylicum* kapalı çiçek durumlu bitki uçucu yağının kimyasal bileşimi (devamı)

2259	Kadalen	e
2289	4-Okzo- α -ylangen (=Mustakon)	e
2302	Eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	0.2
2362	Eudesma-4(15),7-dien-1-ol isomer	0.4
2670	Tetradekanoik asit	e
2931	Palmitik asit	2.4
Toplam %		98.7

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % AID (alev iyonlaşma dedektörü) verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (<%0,1).

Çizelge 4.6. *H. pamphylicum* açık çiçek durumlu bitki uçucu yağının kimyasal bileşimi

RRI*	Bileşik	%
1466	α -Kubeben	e*
1475	Asetik asit	12.0
1492	α -Ylangen	e
1494	Siklosativen	e
1497	α -Kopaen	4.6
1528	α -Burbonen	1.9
1535	β -Burbonen	e
1565	Propanoik asit	2.7
1597	β -Kopaen	1.7
1628	Aromadendren	1.2
1632	4,4-Dimetilbut-2-enolid	2.4
1714	γ -Muurolen	9.8
1773	δ -Kadinen	7.8
1776	γ -Kadinen	9.2
1853	<i>cis</i> -Kalamenen	3.1
1941	α -Kalakoren	2.5
2051	Gleenol	1.3
2057	Salvial-4(14)-en-1-on	1.1
2059	Norbourbonone (=15-nor-4-bourbonon)	e
2080	Kubenol	0.6
2088	1- <i>epi</i> -Kubenol	1.9
2093	6-Metil-5(3-metilfenil)-2-heptanon	e
2104	Viridiflorol	1.5
2144	Spatulenol	1.2
2150	Muurola-4,10(14)-dien-1-ol	2.7
2187	T-Kadinol	2.3

Çizelge 4.6. <i>H. pamphylicum</i> açık çiçek durumlu bitki uçucu yağının kimyasal bileşimi		
2189	<i>nor</i> -Kopaanon	0.9
2209	T-Murol	1.8
2219	Torreyol	0.7
2255	α -Kadinol	2.1
2256	Kadalen	3.8
2273	Murola-4,10(14)-dien-3-on*	2.1
2289	4-okzo- α -Ylangen (=Mustakon)	2.7
2342	Kadina-4,10(15)-dien-3-on	2.0
2405	4-İzopropil-6-metil-1-tetralon	1.9
Toplam %		89.5

4.6. Biyolojik Aktivite Sonuçları

4.6.1. Antioksidan Aktivite

4.6.1.1. Metal şelatlayıcı yöntem

Metal şelatlayıcı aktivite, *Helichrysum pamphylicum* dekoksiyon ve infüzyonlarının Fe^{2+} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirilmiş, EDTA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.6.1.1.1 Makro metal şelatlayıcı yöntem

Sonuçlar 400 μ g/mL konsantrasyonda EDTA ile karşılaştırıldığında (%98,08) *H. pamphylicum* kapalı çiçek dekoksiyonu, *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksiyonu, *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonu ve *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonu sırası ile %97.44, 98.72, 98.88 ve 94.55 inhibisyon oranları ile belirgin antioksidan aktivite göstermiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *H. pamphylicum* dekoksiyon ve infüzyonlarının makro düzeyde metal şelatlayıcı aktivite sonuçları

İnfüzyon ve Dekoksiyonlar	Antioksidan aktivite % inhibisyon (400 μg/mL)
HTDEK	97.44 $\pm$ 0.005
HCDEK	98.72 $\pm$ 0.001
HTINF	98.88 $\pm$ 0.002
HCINF	94.55 $\pm$ 0.002
EDTA	98.08 $\pm$ 0.005

4.6.1.1.2 Mikro metal şelatlayıcı yöntem

Mikro düzeyde metal şelatlayıcı aktivite Fe^{2+} iyon yolağını FeCl_2 bileşiği üzerinden oluşturmak yerine FeSO_4 bileşiği üzerinden almaktadır. Ferrozin ile yarışmalı durumu bu bileşik oluşturmaktadır. Bu çalışmada, *Helichrysum pamphylicum* dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının mikro düzeyde metal şelatlayıcı aktiviteleri araştırılmış olup, *SigmaPlot 12.0* programı kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.8.)

Çizelge 4.8. *H. pamphylicum* dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının mikro düzeyde metal şelatlayıcı IC_{50} sonuçları

İnfüzyon, Dekoksasyon ve Uçucu Yağlar	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HTDEK	18.99
HCDEK	19.59
HTINF	19.16
HCINF	12.58
HTUY	39.33
HCUY	40
EDTA	4.47

4.6.1.2. ABTS^{•+} radikal katyon renksizleştirme yöntemi

Bu yöntemde, çalışılan ekstrelerin antioksidan kapasitesi için ABTS^{•+} radikal katyon kapasitesine göre absorbanslar elde edilmiş ve sonuçlar pozitif kontrol olarak C vitamini ve bir fenolik asit olan elajik asit sonuçları ile kıyaslanmıştır. Örneklerin antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. *H. pamphylicum* dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının ABTS^{•+} radikal katyon renksizleştirme aktivite sonuçları

İnfüzyon ve Dekoksasyonlar	Antioksidan Aktivite % inhibisyon (400 $\mu\text{g/mL}$)
HTDEK	46.29 $\pm$ 0.023
HCDEK	89.31 $\pm$ 0.013
HTINF	73.62 $\pm$ 0.045
HCINF	85.49 $\pm$ 0.01

Çizelge 4.9 (devamı)	
HTUY	4.77 ± 0,013
HCUY	13.14 ± 0.01
C vitamini (Askorbik asit)	98.54 ± 0.003
Elajik asit	95 ± 0.018

Üzerinde çalışılan infüzyon ve dekoksasyonların (400 µg/mL) arasından C vitamini ve elajik asit çözeltilisine (98.54 ± 0.003; 95 ± 0.018) en güçlü ABTS⁺⁺ inhibisyonu *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonunda (89.31 ± 0.013) gözlenmiştir. Diğer infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağların ABTS⁺⁺ % inhibisyon değerleri sırasıyla, açık çiçek infüzyonu (85.49 ± 0.01)> kapalı çiçek infüzyonu (73.62 ± 0.045)> kapalı çiçek dekoksasyonu (46.29 ± 0.023)> açık çiçek uçucu yağı (13.14 ± 0.01)> kapalı çiçek uçucu yağı (4.77 ± 0.013) olarak gözlenmiştir.

4.6.1.3. DPPH' serbest radikal süpürücü yöntem

Hidrojen verme kapasitesine göre geliştirilen en kısa, en ucuz yöntemlerden birisi olan DPPH' serbest radikal süpürücü yöntem, farklı ekstre ve bileşiklerdeki antioksidan aktivitesini belirlemede kullanılan kararlı ve organik bir radikal testidir (Brand-Williams vd., 1995, s. 25-30).

H. pamphylicum'un infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının antioksidan aktiviteleri DPPH' serbest radikali üzerinden Chedea vd.'leri (2013) tarafından modifiye edilmiş yöntem olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak C vitamini ve BHT kullanılmıştır. Sonuçlar, test edilen konsantrasyonda % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak SigmaPlot 12.0 programında IC₅₀ değerleri hesaplanmış, Çizelge 4.10'da verilmiştir (Chedea vd., 2013, s. 169-189). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *H. pamphylicum* dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağları arasında en güçlü antioksidan aktiviteyi açık çiçek infüzyon çözeltilisi (IC₅₀ = 31.25 µg/mL) göstermiştir. Ardından en yüksek aktivite, kapalı çiçek infüzyon çözeltilisinde (IC₅₀ = 37.69 µg/mL) gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan uçucu yağların ise daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir (kapalı çiçek uçucu yağı IC₅₀ = 289.85 µg/mL ve açık çiçek uçucu yağı IC₅₀ = 833.33 µg/mL).

Çizelge 4.30. *H. pamphylicum* dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının DPPH[•] serbest radikal süpürücü aktivite sonuçları

İnfüzyon, Dekoksasyon ve Uçucu Yağlar	IC ₅₀ (µg/mL)
HTDEK	88.23
HCDEK	72.82
HTINF	37.69
HCINF	31.25
HTUY	289.85
HCUY	833.33
C vitamini	3.24
BHT	16.59

4.6.2. Enzimatik Aktivite Sonuçları

4.6.2.1. AChE ve BuChE enzim inhibisyon testi sonuçları

Asetilkolin, öncelikle asetilkolinesteraz (AChE) ve ikinci olarak butirilkolinesteraz (BuChE) tarafından inhibe edilen ve Alzheimer hastalığı patolojisinde rol oynadığı düşünülen bir nörotransmitterdir. Her iki enzim de sinir sisteminde bulunur ve nörofibriler düğümler ve nöritik plaklar arasında üretilir. Alzheimer hastalığının etiyolojisi bilinmemekle birlikte, AChE enzim inhibisyonu yoluyla asetilkolin miktarının yükselmesi, Alzheimer hastalığına karşı en etkili tedavi stratejisi olarak kabul edilmiştir (Orhan vd., 2004, s. 57-60).

Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere, doğal kaynaklı ürünlere son zamanlarda çok fazla ilgi vardır. Bu durum, doğal kaynaklı AChE ve BuChE inhibitörlerinin üzerinde yapılan araştırmaları artırmıştır. Bu çalışmada, *H. pamphylicum* toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının AChE ve BuChE inhibisyon aktiviteleri Ellman vd. (1961) tarafından uygulanmış kolorimetrik yöntem temel alınarak tespit edilmiştir. Yöntemin temeli, AChE ve BuChE enzimlerinin hidrolizi sonucu açığa çıkan tiyokolin türevi bileşiklerin kolorimetrik değişimine dayanmaktadır.

H. pamphylicum bitkisinin dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının farklı konsantrasyonlarda hesaplanan AChE ve BuChE % inhibisyon verileri Çizelge 4.11 ve

Çizelge 4.12’de verilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak donepezil ve galantamin kullanılmıştır.

H. pamphylicum dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının 400 µg/mL’deki % AChE enzim inhibisyon çalışmasında en yüksek aktivitenin, donepezil ve galantaminle (sırası ile %79 ± 0.001, %77.83 ± 0.02) karşılaştırıldığında, *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağı ve *H. pamphylicum* açık çiçek uçucu yağına ait olduğu tespit edilmiştir (sırası ile %53.07 ± 0.02, %52.6 ± 0.01). Çalışılan türe ait dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının 400 µg/mL’deki % BuChE enzim inhibisyonu çalışmasında en yüksek aktivitenin, donepezil ve galantaminle (sırası ile %84.53 ± 0.005, %73.98 ± 0.031) karşılaştırıldığında, *H. pamphylicum* açık çiçek uçucu yağı ve *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağına ait olduğu belirlenmiştir (sırası ile %33.73 ± 0.0325, %30.62 ± 0.012).

Çizelge 4.11. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının AChE inhibisyon aktivite sonuçları

Numuneler	AChE % İnhibisyon				
	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL
HTDEK	44.72 ± 0.01	43.15 ± 0.01	37.01 ± 0.01	34.96 ± 0.001	30.55 ± 0.01
HCDEK	42.20 ± 0.01	40.94 ± 0.001	37.63 ± 0.003	37.32 ± 0.01	26.30 ± 0.02
HTINF	44.10 ± 0.01	42.68 ± 0.002	39.37 ± 0.01	37.48 ± 0.01	34.65 ± 0.01
HCINF	44.25 ± 0.01	39.69 ± 0.01	36.69 ± 0.01	22.83 ± 0.02	11.65 ± 0.024
HTUY	53.07 ± 0.02	50.70 ± 0.02	50.39 ± 0.02	29.76 ± 0.01	11.18 ± 0.001
HCUY	52.6 ± 0.01	51.49 ± 0.02	48.97 ± 0.01	38.11 ± 0.002	23.62 ± 0.002
Donepezil	79 ± 0.001	78.73 ± 0.003	71.39 ± 0.002	68.35 ± 0.003	48.77 ± 0.01
Galantamin	77.83 ± 0.02	70.78 ± 0.01	61.46 ± 0.001	46.85 ± 0.002	33.25 ± 0.01

Çizelge 4.12. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının BuChE inhibisyon aktivitesi sonuçları

Numuneler	BuChE % İnhibisyon				
	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL
HTDEK	36.58 ± 0.033	33.47 ± 0.078	32.27 ± 0.054	32.27 ± 0.05	24.98 ± 0.0325
HCDEK	41.51 ± 0.0525	40.35 ± 0.042	37.64 ± 0.0405	36.62 ± 0.035	25.73 ± 0.0275
HCINF	41.15 ± 0.0135	39.24 ± 0.0225	36.22 ± 0.095	35.29 ± 0.0145	24.35 ± 0.212
HTINF	35.69 ± 0.004	35.69 ± 0.006	31.56 ± 0.003	35.51 ± 0.002	28.27 ± 0.0435
HTUY	30.62 ± 0.012	30.48 ± 0.038	30.09 ± 0.0255	30.04 ± 0.1115	29.33 ± 0.009
HCUY	33.73 ± 0.0325	33.56 ± 0.051	32.36 ± 0.0265	32.04 ± 0.026	29.33 ± 0.035
Donepezil	84.53 ± 0.005	79.56 ± 0.0245	72.62 ± 0.006	64.4 ± 0.001	58.09 ± 0.0065
Galantamin	73.98 ± 0.031	73.54 ± 0.0245	70.58 ± 0.011	67.07 ± 0.0315	59.93 ± 0.0065

4.6.2.2. MAO-B enzim inhibisyon sonuçları

Monoamin oksidaz-B (MAO-B), dopamin ve serotonin gibi endojen monoamin nörotransmitterlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan, iki flavin-adenin dinükleotit bağımlı izozimden biridir. MAO-B'nin, Parkinson hastalığının patofizyolojisinde iki önemli görevi vardır. Dopamin metabolizmasında rol oynayan ana enzimdir ve aynı zamanda serbest radikallerin ve diğer nörotoksik ajanların engellenmesinde yer aldığı varsayılmaktadır (Novaroli vd., 2005, s. 6212-17).

Günümüzde Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların sayısı oldukça kısıtlıdır. Bu durum, MAO-B enzim inhibitörlerinin araştırılmasını ilgi konusu haline getirmiştir. Daha önce de bahsedildiği üzere literatürde *Helichrysum* türlerinden *H. agyroolepis*, *H. umbraculigerum* ve *H. ruderale*'nin, monoamin oksidaz-B enzimini düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği belirtilmiş ve bu durum çalışmamızın bitkisi olan *H. pamphylicum* için potansiyel teşkil etmiştir.

H. pamphylicum toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının farklı konsantrasyonlarda hesaplanan %MAO-B enzim inhibisyon sonuçları Çizelge 4.13'te belirtildiği gibidir. Pozitif kontrol olarak selejilin kullanılmıştır.

Çizelge 4.13. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının MAO-B inhibisyon aktivite sonuçları

Numuneler	MAO-B % İnhibisyon		
	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL
HTDEK	80.56±0.01	77.78±0.01	57.41±0.01
HCDEK	75.93±0.034	72.22±0.002	69.44±0.01
HTINF	61.11±0.001	42.59±0.02	38.89±0.02
HCINF	75±0.01	72.22±0.002	64.82±0.001
HTUY	89.82±0.01	87.04±0.01	80.55±0.001
HCUY	75±0.001	73.15±0.0025	71.30±0.003
Selejilin	84.53±0.005	79.56±0.0245	72.62±0.006

H. pamphylicum dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlarının 400 µg/mL'deki %MAO-B enzim inhibisyon çalışmasında en yüksek aktivitenin, selejilin ile karşılaştırıldığında (84.53 ± 0.005), *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağı ve *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonunda olduğu tespit edilmiştir (sırası ile 89.82 ± 0.01 ve 75.93 ± 0.034). Yaptığımız çalışma sonunda, *H. pamphylicum* açık çiçek uçucu yağının, selejilinden daha yüksek aktivitesinin olduğu belirlenmiştir.

4.6.2.3. COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon sonuçları

Antienflamatuvar etki ile ilgili COX-1 ve COX-2 IC₅₀ değerleri, sC-560 ve DuP-697'nin IC₅₀ (sırası ile 62.5 µg/mL ve 66.568 µg/mL) değerleri ile karşılaştırıldığında, *H. pamphylicum* kapalı çiçek dekoksasyonu ve *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonu hem COX-1 (sırası ile 75.597 µg/mL ve 82.89 µg/mL) hem de COX-2 (sırası ile 77.435 µg/mL ve 82.89 µg/mL) enzim inhibisyon aktivitelerinde en iyi sonucu vermişlerdir (Çizelge 4.14, Çizelge 4.15).

Çizelge 4.14. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının COX-1 inhibisyon IC₅₀ sonuçları

İnfüzyon, Dekoksasyon ve Uçucu Yağlar	IC ₅₀ (µg/mL)
HTDEK	75.597
HCDEK	91.391
HTINF	82.89
HCINF	87.796
HTUY	-
HCUY	929.368
sC-560 (inhibitör)	62.5

Çizelge 4.15. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının COX-2 inhibisyon IC₅₀ sonuçları

İnfüzyon, Dekoksasyon ve Uçucu Yağlar	IC ₅₀ (µg/mL)
HTDEK	77.435
HCDEK	81.985
HTINF	78.80
HCINF	87.796
HTUY	-
HCUY	826.446
DuP-697 (inhibitör)	66.568

4.6.2.4. 5-LOX enzim inhibisyon sonuçları

Ekstre ve uçucu yağların 5-LOX IC₅₀ değerleri, NDGA'nın IC₅₀ değerleri ile karşılaştırıldığında (125 µg/mL), *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonu ve *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunun çok az da olsa (sırası ile 538.79 µg/mL ve 970.87 µg/mL) enzim inhibisyon aktivite testinde en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının 5-LOX inhibisyon aktivite sonuçları

İnfüzyon, Dekoksasyon ve Uçucu Yağlar	IC ₅₀ (µg/mL)
HTDEK	1213.59
HCDEK	970.87
HTINF	538.79
HCINF	1118.568
HTUY	-
HCUY	-
Norhidroguaiaretik Asit (NDGA)	125

4.6.2.5. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) enzim inhibisyon testi sonuçları

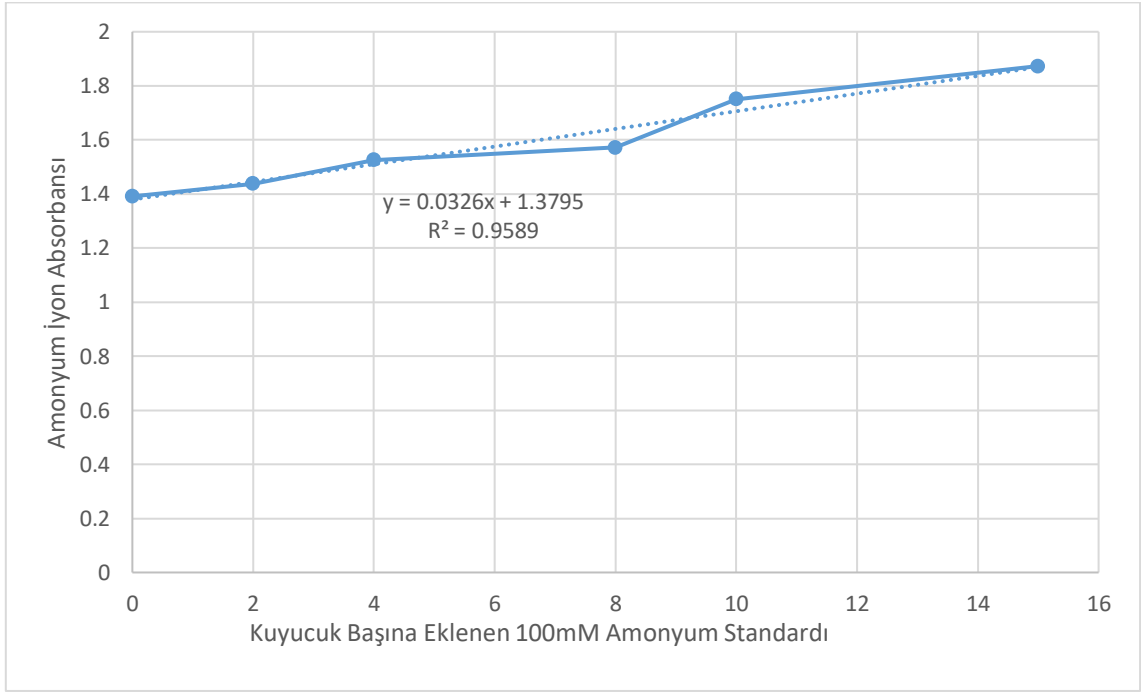
MMP-2 antikanser aktivite inhibisyon % verimleri için gerçekleştirilen hız testi sonucunda, 400 µg/mL konsantrasyondaki NNGH inhibisyon değerine kıyasla (%89.04) *H. pamphylicum* dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağları arasında en yüksek aktiviteyi *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağı ve *H. pamphylicum* açık çiçek uçucu yağı göstermiştir (sırası ile %95.21 ve %83.56). *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağının, MMP-2 inhibitörü olan NNGH'dan daha yüksek MMP-2 enzim inhibisyon aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının MMP-2 inhibisyon IC₅₀ sonuçları

Numuneler	MMP-2 % İnhibisyon		
	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL
HTDEK	71.23±0.04	47.95±0.05	41.78±0.11
HCDEK	76.71±0.01	68.49±0.07	43.83±0.06
HTINF	74.66±0.02	73.97±0.04	10.96±0.05
HCINF	56.16±0.04	48.63±0.04	39.04±0.13
HTUY	95.21±0.05	80.82±0.01	55.48±0.15
HCUY	83.56±0.04	68.49±0.04	59.59±0.02
NNGH	89.04±0.03	85.62±0.03	76.03±0.12

4.6.2.6. 5'-NT (CD73) enzim inhibisyon test sonuçları

CD73 enzim aktivasyon sonuçları NH_4^+ iyonu absorbans grafiğine göre hesaplanmış olup, ilgili doğrusal grafik Şekil 4.10'da belirtilmiştir. Enzim aktivasyonunun hesapları mU/mL cinsinden yapılmış olup, aktivasyon miktarının artması, inhibisyonun azalması anlamına gelmektedir. Herhangi bir numune olmadan enzimin kendi aktivasyon değeri 48.30 mU/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10 NH_4^+ kalibrasyon grafiği

400 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda antikanser etki CD73 enzim aktivasyon değerleri, aCD43'ün (inhibitör) enzim aktivasyon değerleri ile karşılaştırıldığında (5.21 mU/mL), *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonu, *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonu ve *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağı (sırası ile 3.95 mU/mL, 30.14 mU/mL ve 30.14 mU/mL) en iyi enzim inhibisyon sonuçlarını vermiştir (Çizelge 4.18). *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonu, aCD73'ten daha iyi enzim inhibisyon sonucuna sahiptir. Herhangi bir inhibitör, ekstre ya da uçucu yağ koyulmayan kuyucuklardaki CD73 aktivasyonu 48.30 mU/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksiyon ve uçucu yağlarının CD73 aktivasyon sonuçları

Numuneler	CD73 (mU/mL)		
	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL
HTDEK	32.72	34.16	47.90
HCDEK	3.95	8.46	45.21
HTINF	30.14	31.65	43.92
HCINF	36.92	38.09	44.04
HTUY	30.14	31.65	41.46
HCUY	32.72	34.16	42.90
aCD73	5.21	5.24	8.26

5. TARTIŞMA

Doğal kaynaklı biyoaktif bileşikler; biyolojik sistemlerde ağır metal zehirlenmeleri, akut ve kronik inflamasyon, nörodejeneratif rahatsızlıklar ve çeşitli kanser türleri gibi patolojilere sebebiyet veren oksidatif strese karşı koyarak, bu hastalıkların tedavisinde etkindir; bu nedenle bu tür bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi literatür açısından oldukça önemlidir.

Helichrysum türlerinin, halk arasında sarılık tedavisinde, boğaz ve akciğer enfeksiyonlarında, cilt rahatsızlıklarının tedavisinde, analjezik olarak bebeklerin kulak ağrısını ve göz ağrılarını gidermede, üriner enfeksiyon tedavisinde, sindirim sistemi rahatsızlıklarında, detoksifikasyon amacıyla kolagog olarak, kolorektik olarak, Diabetes mellitusta, antioksidan olarak, diüretik olarak kullanımları mevcuttur. Literatürde bazı *Helichrysum* türlerine ait ekstre ve diğer doğal kaynaklı hammaddelerden izole edilen biyoaktif bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antienflamatuvar, hepatoprotektif, monoamin oksidaz inhibitör ve kolinesteraz inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Akaberi vd., 2019, s. 111471). Etnofarmakolojik kullanımları ve literatür çalışmaları ışığında bu tez kapsamında *H. pamphylicum* türünün açık çiçekli ve kapalı çiçekli durumlarının toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksasyon, infüzyon ve uçucu yağlar üzerinde bazı fitokimyasal araştırmaların yanı sıra antioksidan, antikolinesteraz, MAO-B inhibitör, 5-LOX, COX-1, COX-2 inhibitör, MMP-2 ve 5'-NT inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır.

Bu çalışmada ilk olarak *H. pamphylicum* türü açık ve kapalı çiçek durumlarının toprak üstü kısımlardan hazırlanan dekoksasyon ve infüzyonların toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş ve en yüksek toplam fenolik madde miktarının *H. pamphylicum* kapalı çiçek dekoksasyonunda (93.52 ± 5.11 mg GAE/g ekstre), en düşük fenolik madde miktarının ise *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonunda (72.16 ± 8.93 mg GAE/g ekstre) olduğu gözlemlenmiştir.

Albayrak vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada; *H. arenarium* subsp. *aucheri*, *H. armenium* subsp. *armenium*, *H. artvinense*, *H. chionophilum*, *H. compactum*, *H. goulandriorum*, *H. graveolens*, *H. heywoodianum*, *H. kitianum*, *H. noeanum*, *H. orientale*, *H. palasii*, *H. peshmenianum*, *H. plicatum* subsp. *plicatum*, *H. plicatum* subsp. *polyphyllum* ve *H. stoechas* subsp. *barellieri* toprak üstü kısımlarından

ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş ve sonuçlara göre; en yüksek fenolik madde miktarı *H. noeanum* türüne ait toprak üstü metanol ekstresinde (160.63 ± 1.2 mg GAE/g ekstre), en düşük toplam fenolik madde miktarı ise *H. peshmenianum* türüne ait toprak üstü metanol ekstresinde (66.74 ± 1.3 mg GAE/g ekstre) tespit edilmiştir (Albayrak vd., 2010, s.114-122).

Yine Albayrak vd.'nin 2009'da yapmış olduğu farklı bir çalışmada *H. pamphylicum* toprak üstü kısımlarından Soxhlet ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilmiş metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarı 119.85 ± 2.0 mg GAE/g ekstre olarak bulunmuştur (Albayrak vd., 2010, s.463-473). Tez çalışmamızda, *H. pamphylicum* türüne ait kapalı çiçek durumlu bitkinin toprak üstü kısımlarının dekoksasyon ve infüzyonlarının toplam fenolik madde miktarı 93.52 ± 5.11 mg GAE/g ekstre olarak belirlenmiş olup, bu değer daha önce yapılmış olan çalışma verilerine hemen hemen benzerdir.

Toplam fenolik madde miktarı yüksek olan *H. pamphylicum* türünün kapalı çiçek durumlu bitkisine ait toprak üstü kısımlarının dekoksasyonunda YBSK ile tespit edilen başlıca fenolik asitler; protokateşik, kafeik, klorojenik, *para*-kumarik, ferulik, *orto*-kumarik ve *trans*-sinnamik asitlerdir. Fenolik asitlerden protokateşik asit en fazla *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunda 0.52 µg/g bitki olarak; kateşik asit *H. pamphylicum* kapalı çiçek dekoksasyonunda 0.84 µg/g bitki olarak; klorojenik asit *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunda 1.61 µg/g bitki olarak; *para*-kumarik asit *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunda 0.41 µg/g bitki olarak; ferulik asit *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunda 0.57 µg/g bitki olarak; *orto*-kumarik asit *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonunda 1.78 µg/g bitki olarak; *trans*-sinnamik asit *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonunda 0.31 µg/g bitki olarak tespit edilmiştir.

Toplam flavonoit madde miktar tayini sonuçlarına göre *H. pamphylicum* türü açık ve kapalı çiçek durumlarının toprak üstü kısımlardan hazırlanan dekoksasyon ve infüzyonlarının rutine göre en yüksek flavonoit madde miktarına sahip olan ekstre *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonu (17.57 ± 0.95 mg RE/g ekstre); en düşük flavonoit madde miktarına sahip olan ekstre ise *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonu (14.80 ± 0.74 mg RE/g ekstre) olduğu tespit edilmiştir. Gouveia-Figueira vd.'nin (2014) yaptığı çalışmada

H.

devium,

H. melaleucum ve *H. oboconicum* toprak üstü kısımlarının n-hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ekstralarının rutine göre en yüksek toplam flavonoit miktarları sırası ile 3.03 ± 0.001 mg RE/g ekstre, 8.16 ± 0.002 mg RE/g ekstre ve 7.03 ± 0.003 mg RE/g olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, rutine göre en düşük toplam flavonoit içeriğine sahip *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonu 14.80 ± 0.74 mg RE/g ekstre olarak tespit edilmiş olup, Gouveia-Figueira vd.'nin bulduğu sonuçtan oldukça yüksektir (Gouveia-Figueria vd., 2014, s. 713-729).

Tez kapsamında çalışılan *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerinin toprak üstü kısımlarının infüzyon ve dekoksasyonlarının makro düzeyde metal şelatlayıcı antioksidan aktivite sonuçlarına göre 400 µg/mL konsantrasyonunda EDTA (98.08 ± 0.005) ile karşılaştırıldığında kapalı çiçek dekoksasyonu, açık çiçek dekoksasyonu, kapalı çiçek ve açık çiçek infüzyonu sırası ile %97.44, 98.72, 98.88 ve 94.55 inhibisyon oranları ile belirgin antioksidan aktivite göstermiştir. Genel olarak, çalışılan *Helichrysum* türlerinden hazırlanan farklı polaritelerdeki fraksiyonlardan daha yüksek metal şelatlayıcı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

H. pamphylicum açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerinin toprak üstü kısımlarının infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının mikro düzeyde metal şelatlayıcı antioksidan IC₅₀ sonuçları göre EDTA (4.47 µg/mL) ile karşılaştırıldığında, sırası ile kapalı çiçek dekoksasyonu, açık çiçek dekoksasyonu, kapalı çiçek infüzyonu, açık çiçek infüzyonu, kapalı çiçek uçucu yağı ve açık çiçek uçucu yağı, sırası ile 18.99, 19.59, 19.16, 12.58, 39.33 ve 40 µg/mL IC₅₀ değerleri ile belirgin antioksidan aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, farklı metal şelatlayıcı ajanların (FeSO₄ ve FeCl₃ gibi) metal şelatlayıcı aktivite üzerindeki etkilerinin farklılaştıkça değiştiği gözlemlenmiştir.

ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemine göre, 400 µg/mL konsantrasyonda C vitamini (%98.54) ve elajik asit (%95) ile karşılaştırıldığında, açık çiçek ve kapalı çiçekli bitki uçucu yağları (%13.14 ve %4.77) hariç tüm ekstraların belirgin antioksidan aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Tüm ekstralar için, metal şelatlayıcı antioksidan aktivite ile ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme antioksidan aktivite birbirini destekler niteliktedir.

DPPH[•] serbest radikal süpürücü aktivite IC₅₀ sonuçlarına göre, *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerin toprak üstü kısımlarının infüzyon ve

dekoksasyonlarının, uçucu yağlara kıyasla daha aktif olduğu tespit edilmiştir. BHT (16.59 µg/mL) ve C vitamini (3.24 µg/mL) sonuçlarına göre, kapalı çiçek infüzyonunun (37.69 µg/mL) ve açık çiçek infüzyonunun (31.25 µg/mL) DPPH[•] serbest radikal süpürücü aktivitelerinin, diğer ekstre ve uçucu yağlara göre en fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çalışılan ekstre ve uçucu yağların ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme aktivitesi ve DPPH[•] serbest radikal süpürücü aktivite sonuçları karşılaştırıldığında, belirgin DPPH süpürücü antioksidan aktivite gösteren *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonu (IC₅₀ 31.25 µg/mL) açık çiçek dekoksasyonundan (%89.31) sonra en yüksek ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme aktivitesini göstermiştir (%85.49). Bu sonuçlar ile ABTS⁺ ve DPPH[•] antioksidan aktivite sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Demans, nörodejeneratif rahatsızlıklarla çoğunlukla yaşlı insanlarda gözlemlenen bir semptomdur. Hafıza, düşünme, anlama, hesaplama ve konuşma dili gibi çeşitli bilişsel işlevlerin bozulmasıyla karakterize olan demansın en yaygın eşlik ettiği rahatsızlıklar arasında Alzheimer (AD), Parkinson gibi nörolojik bozukluklar sayılabilir. AD'nin patolojisi; yaşlılık plaklarında plazma β -amiloit'in ($A\beta$) hücre dışı birikimi, nörofibriler yumruların hücre içi oluşumu ve sinir sinapslarının ve piramidal nöronların kaybı ile karakterizedir. AD'nin merkezi sinir sistemindeki (CNS) ana nörotransmitter olan asetilkolin (ACh) düzeylerini azaltması, bu patolojiyi destekleyen başlatıcı faktörlerin açığa kavuşturulamamasına rağmen bu durumla ilişkili olduğu bilinmektedir (Brühlmann vd., 2001, s. 3195-3198). ACh hidrolizinde ve AD gelişimine sebebiyet veren birincil enzimin AChE, ikincil enzimin ise BuChE olduğu düşünülmektedir (Orhan vd., 2004, s. 57-60). Kolinerjik hipoteze göre, AD ilerlemesi sırasında giderek kaybolan ACh düzeylerinin restorasyonu, bilişsel işlev kaybını geciktirmektedir. Yapılan güncel çalışmalara göre, AChE inhibitörlerinin nöropsikiyatrik AD hastalarındaki semptomları azaltabilir bulunduğu ve sinaptik bölgede ACh düzeylerini artırarak, bilişsel yeteneğe faydalı etkiler sağlayabileceği bildirilmiştir (Meng vd., 2012, s. 4462-4466). AChE'nin inhibe edilmesi aynı zamanda ataksi, senil demans, Parkinson hastalığı ve Miyastenia gravis gibi diğer nörodejeneratif rahatsızlıklar için iyi bir strateji oluşturmaktadır.

Çeşitli nörodejeneratif süreçlerde patolojik olarak önemli olduğu düşünülen bir başka durum, hastalığın ilerlemesi sırasında erken bir olay olarak AD'de patofizyolojik

açından anahtar rol oynayan oksidatif streştir. D vitamini gibi doğal antioksidanların yokluğunun bir fare modelinde AD'yi şiddetlendirdiği ve artmış serbest radikal seviyelerinin, AD'nin hızını artırdığı ve bilinen enflamatuvar sürece sebebiyet verdiği bildirilmiştir (Custódio vd., 2012, s. 134-140).

Nörodejeneratif rahatsızlıkların gelişiminde, çeşitli ağır metallerin beyinde birikmesinin de rol aldığı tespit edilmiştir. Örneğin, demir homeostazındaki değişiklikler, hipokampusta ve serebral kortekste değişen demir, ferritin ve transferrin seviyelerinin artışı AD hastalarında görülen farklılıklardır. Bu bilgi doğrultusunda, demir ve diğer redoks aktif metallerin (örneğin bakır) şelasyonunu içeren tedaviler, AD'de değerli bir strateji olarak düşünülmektedir (Liu vd., 2005, s. 246-252). Ayrıca, beyinde metal dishomeostazının oluşumu (bakır, çinko ve demir iyonlarının aşırı artışı), metale bağımlı enzimleri ve metabolik süreci olumsuz etkilemektedir. Homosistein (Hcy), AD'de potansiyel bir kan biyobelirteçidir, çünkü çok sayıda çalışma grubu, AD hastalarında, aynı yaştaki kontrollere kıyasla yüksek serum veya plazma Hcy seviyeleri bildirmiştir (Greenough vd., 2013, s. 540-555). Protein karbonillerindeki ilişkili artışlarla birlikte demir ve bakır ile güçlü etkileşimleri olan Hcy ve oksidatif hasar arasında nedensel bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, oksidatif stres ile redoks aktif metallerin oluşturduğu serbest radikallerin AD'nin patojenezi ile doğrudan ilişkili olduğu açıktır (Greenough vd., 2013, s. 540-555).

Çalışılan *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağların asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör aktivite sonuçları, 400 µg/mL konsantrasyonda inhibitör maddeler donepezil (%79) ve galantamin (%77.83) ile karşılaştırıldığında, en yüksek inhibisyon aktivitesini *H. pamphylicum* açık çiçek uçucu yağı (%52.6), en düşük inhibisyon aktivitesini *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonu (%42.20) göstermiştir. *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağların bütirilkolinesteraz (BuChE) inhibitör aktivite sonuçları, 400 µg/mL konsantrasyonda inhibitör maddeler donepezil (%84.53) ve galantamin (%73.98) ile karşılaştırıldığında ise en yüksek inhibisyon aktivite sonucu *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonu (%41.51), en düşük aktivite sonucu ise *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağında (%30.62) tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre tüm ekstre ve uçucu yağların AChE ve BuChE inhibitör aktivitelerinin ortalama

değerlerde ve birçok doğal kaynaklı bileşenden daha aktif olduğunu söylemek mümkündür.

H. pamphylicum açık ve kapalı durumlu bitkilerin monoamin oksidaz-B (MAO-B) inhibitör aktivite sonuçları, sentetik MAO-B inhibitörü selejilin ile (%84.53 inhibisyon) karşılaştırıldığında, 400 µg/mL konsantrasyonda *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağı ile *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağı'nın sırası ile %80.56, 75, 61.11, 75.93, 89.82 ve 75 inhibisyonla yüksek MAO-B inhibitör aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Ekstre içeriğindeki flavonoidlerin ve uçucu yağlar içeriğindeki mono- ve seskiterpenlerin MAO-B aktivitelerinin olduğu bilinmektedir (Jäger ve Saaby, 2011, s. 1471-1485; Flores-González vd., 2020). Bu bilgiler, *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçekli bitkilerin infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının MAO-B aktivitelerinin olduğunu kanıtlar niteliktedir.

‘*Helichrysums*: antibacterial and monoamine oxidase inhibitory activity of South African summer-rainfall species’ adlı makalede, *H. aegyrolepis*, *H. umbraculigerum* ve *H. ruderale* türlerinin toprak üstü kısımlarının basit ekstrelerinin, MAO-B IC₅₀ değerlerinin sırası ile 0.1 µg/mL, 4.3 µg/mL ve 3.3 µg/mL gibi çok yüksek inhibisyon aktivite değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, *H. pamphylicum* kapalı ve açık çiçek durumlu bitkilerin toprak üstü kısımlarının infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının MAO-B inhibisyon sonuçları, daha önce van Staden vd.’nin (2006) yapmış olduğu bu çalışmayı destekler niteliktedir (van Staden vd., 2006, s. 14).

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAII’ler) analjezik, antienflamatuvar ve ateş düşürücü olarak, ayrıca romatoid artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu ilaçların şiddetli olmaları nedeniyle kronik kullanımı sınırlıdır; ülseratif rahatsızlıklar veya astım gibi patolojik yan etkiler oluşturabilmektedir. NSAII’lerin klinik olarak neden olduğu patolojilerin en önemlisi gastrointestinal (GI) patolojilerdir; şöyle ki GI perforasyon, peptik ülser ya da GI kanaması gibi ciddi komplikasyonlara yol açar. NSAII’ler esas farmakolojik aktivitelerini, prostaglandin ve tromboksan oluşumunu katalize eden siklooksijenaz (COX) enzimlerinin inhibisyonu ile gerçekleştirir. COX’un farmakolojik etkileri net bir şekilde aydınlatılmış iki izoenzimi vardır. Bunlar COX-1 ve COX-2’dir. Yapısal olarak aydınlatılmış bu iki enzimden COX-1, esas fizyolojik işlevleri düzenlerken, akut ya da kronik enflamasyon

oluşumunda COX-2 enzimi daha etkindir. COX-1 ve COX-2 enzimlerinin inhibisyonunu durumunda araşidonik asit, COX enzimleri yerine 5-lipoksijenaz (5-LOX) enzimi tarafından metabolize edilir ve enflamasyon bu yolakla devam etmiş olur. 5-LOX enzimi, vücutta enflamasyona sebebiyet veren lökotrienlerin artışına yol açar. Bu nedenle enflamasyonda COX-1 ve COX-2 enzimlerinin inhibisyonunun yanı sıra 5-LOX enzim inhibisyonu da bir o kadar önemlidir (Tries vd., 2002, s. 135-143). Bu nedenlerle, sentetik NSAII'lin yol açtığı yan etkilerin yaşanmaması için doğal kaynaklı COX-1, COX-2 ve 5-LOX enzim inhibitörlerinin araştırılması önem teşkil etmektedir.

Çalışılan *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının COX-1 inhibitör aktivitesi sonuçları, inhibitör madde olan sc-560 ile IC₅₀ sonucu ile karşılaştırıldığında, (62.5 µg/mL) en yüksek inhibitör aktivite *H. pamphylicum* kapalı durumlu bitki dekoksasyonunda (75.597 µg/mL), en düşük inhibitör aktivite ise *H. pamphylicum* açık durumlu bitki uçucu yağında (929.368 µg/mL) saptanmıştır. Açık durumlu bitki uçucu yağı dışında tüm inhibisyon aktivite sonuçlarının (75.597-91.391 µg/mL) yüksek düzeyde, açık durumlu bitki uçucu yağının inhibisyon aktivite sonucunun ise düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir.

H. pamphylicum açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının COX-2 inhibitör aktivitesi sonuçları, inhibitör madde olan DuP-697 ile IC₅₀ sonucu karşılaştırıldığında (66.568 µg/mL), en yüksek inhibitör aktivite *H. pamphylicum* kapalı durumlu bitki dekoksasyonunda (77.435 µg/mL), en düşük inhibitör aktivite ise *H. pamphylicum* açık durumlu bitki uçucu yağında (826.446 µg/mL) saptanmıştır. Açık durumlu bitki uçucu yağı dışında tüm inhibisyon aktivite sonuçlarının (77.435-87.796 µg/mL) yüksek düzeyde, açık durumlu bitki uçucu yağının inhibisyon aktivite sonucunun ise düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bulunan sonuçlar doğrultusunda, ekstre ve uçucu yağların COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon aktivitelerinin birbirini destekler nitelikte olduğu saptanmıştır.

Araşidonik asit metabolizmasının COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonu sonucu 5-LOX yolağı üzerinden gerçekleşme ihtimali doğrultusunda, çalışılan *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının 5-LOX enzim inhibisyon aktivite IC₅₀ sonuçları, sentetik

olan NDGA ile karşılaştırıldığında (125 µg/mL) en yüksek inhibitör aktivite *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunda (538.79 µg/mL), en düşük inhibitör aktivite *H. pamphylicum* kapalı çiçek dekoksiyonunda (1213.59 µg/mL) gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre, uçucu yağların 5-LOX enzim inhibitör aktivitesi gözlenmemiştir. Sadece *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonunda orta düzey, diğer ekstraktlarda ise düşük düzeyde enzim inhibisyon aktivitesi saptanmıştır. Bu çalışmaya göre, arşidonik asidin 5-LOX yolağından metabolizmasının engellenmesi açısından *H. pamphylicum* kapalı çiçek infüzyonu önem teşkil etmektedir.

Kothavade vd.'nin (2013) yapmış olduğu bir çalışmaya göre, *H. italicum* (Roth) Don subsp. *microphyllum* toprak üstü kısımlarının aseton ekstresinin COX-1, COX-2 ve 5-LOX enzim % inhibisyon sonuçlarına göre (%47, 31, 27), bu tez çalışmamızda *H. pamphylicum* infüzyon, dekoksiyon ve uçucu yağlarının % inhibisyon sonuçlarının genel itibarıyla orta düzey anti-inflamatuar etki göstermesi literatür ile uyumaktadır.

CD73 (5'-nükleotidaz), normal ve neoplastik glial plazma membranlarında üretilen bir ektoenzimdir. Enzim, hücre iskeleti elemanı olan aktin filamente ve hücre dışı matriks proteinleri olan laminin ve fibronektine bağlanır. CD73, lenfositlerin immün yanıtında bir sinyal yolu metabolitidir. Bu ektoenzim, pürin ve pirimidin ribo- ve deoksiribonükleozit monofosfatların dönüşümünü katalize eder ve hücrelerarası alanda nükleozitlerin (adenozin) artışına yol açar, bu nedenle nöronal sinyalleşmeyi ve vasküler perfüzyonu modüle edebilir. CD73 ayrıca, hücre hareketliliği faktörü olarak da bilinmektedir; CD73 aktivitesinin hücre iskemisi, rejenerasyonu, onarımı, glioma hücre proliferasyonunu artırması yanı sıra, ektoenzimin olası invaziv durumda hücre göçünü (migrasyon) artırdığı da bilinmektedir (Ludwig vd., 1999, s. 1747-1752). CD73, enzimatik ve enzimatik olmayan işlevler yoluyla tümör anjiyogenezini de destekler. Yapılan çalışmalar sonucunda, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF), bir meme kanseri fare modelinde, CD73'e karşı oluşturulan bir monoklonal antikor ile tedaviyi takiben, tümör anjiyogenezini baskıladığı ve tümör seviyelerini azalttığı görülmüştür (Allard vd., 2014, s. 1466-1473).

Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2, jelatinaz A, 72 kDa tip IV kollajenaz), MMP hücre dışı proteaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzimler, geniş substrat özgüllükleri sayesinde birçok fizyolojik ve patolojik durumda rol oynar (McCawley ve Matrisian, 2001, s. 534-540). MMP-2'nin hedefleri arasında doğal ve denatüre kollajenler,

fibronektin, elastin, laminin-5, pro-TNF- α ve nörokan bulunur (McCawley ve Matrisian, 2001, s. 534-540; Egeblad ve Werb, 2002, s. 161-174; Giannelli vd., 1997, s. 225-228; Wallon ve Overall, 1997, s. 7473-7481; Turk vd., 2001, s. 661-667). MMP-2, 72 kDa'lık bir proenzim olarak salgılanır, 62 ve 59 kDa'ya bölünce aktive olur (Atkinson vd., 1995, s. 30479-30485). MMP-2, ateroskleroz (George, 2000, s. 993-1007), hücre büyüme faktörlerine bağlı gelişen kanser, anjiyogenez ve metastaz gibi hastalıklarda yer alması nedeniyle enzim inhibisyon çalışmaları için önemli bir hedeftir (Egeblad vd, 2002, s. 161-174; Chang ve Werb, 2001, s. 37-43). MMP-2 enziminin ekspresyonu sonucunda meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, over kanseri ve malign glioma gibi patolojik durumların gelişimi yanında bronşektazi, kronik astım, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), kistik fibrozis, hipertansiyon ve felç gibi hastalıklar da oluşabilir (Öztürk, 2013, s. 209-220). MMP-2 enziminin inhibisyonu, bu gibi patolojik durumların oluşumunun engellenmesi, hastalıkların insidans ve prevalanslarının azaltılması açısından önem teşkil etmektedir. Tez kapsamında yapılan antikanser çalışmalarda, *H. pamphylicum* açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının 400 µg/mL konsantrasyondaki MMP-2 inhibitörü NNGH'ye göre (%89.04), en yüksek MMP-2 enzim inhibitör aktivitesi *H. pamphylicum* kapalı çiçek uçucu yağında (%95.21), en düşük MMP-2 enzim inhibitör aktivitesi *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonunda (%56.16) gözlenmiştir. Tüm ekstre ve uçucu yağlar 400 µg/mL-200 µg/mL konsantrasyon aralığında %95.21-47.95 MMP-2 enzim inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Belirtilen konsantrasyonlardaki bu % inhibisyon değer aralığı, MMP-2 inhibitörü olduğu bilinen sentetik N-sülfonilamino asit türevi bileşiklerin % inhibisyon değer aralıklarından (%75-20) dahi oldukça yüksektir (Tamura vd., 1998, s. 640-649).

H. pamphylicum açık ve kapalı çiçek durumlu bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının 400 µg/mL konsantrasyondaki CD73 enzim aktivasyon testinde, sentetik inhibitör olan aCD73'e göre (5.21 mU/mL), en yüksek inhibisyon *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonunda (3.95 mU/mL), en düşük inhibisyon ise *H. pamphylicum* açık çiçek infüzyonunda (36.92 mU/mL) belirlenmiştir. CD73 enzimin hiçbir inhibitör, ekstre ya da uçucu yağ eklenmeyen kuyucuklarındaki enzim aktivasyonuna göre (48.30 mU/mL), *H. pamphylicum* açık çiçek dekoksasyonu hariç, tüm ekstre ve uçucu yağların CD73 enzim inhibisyon sonuçları düşük çıkmıştır. Belirtilen konsantrasyonda *H. pamphylicum* açık

çiçek dekoksasyonu CD73 enzim inhibisyon değerinin (3.95 mU/mL), literatürde iyi bilinen CD73 inhibitörü olan sentetik adenosin 5'-(α , β -metilen) difosfat'ın (APCP) (Forte vd., 2012, s. 2226-33) CD73 enzim inhibisyon değerinden (7.5 mU/mL) bile daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

H. pamphylicum türünün toprak üstü kısımlarından elde edilmiş ekstrelerin içeriğindeki flavonoidler fitokimyasal; *H. pamphylicum* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilmiş ekstrelerin topoizomera I enzim inhibisyonu, insan lenfosit kültür genotoksitesite aktiviteleri gibi biyolojik aktivite çalışmaları daha önce yapılmışken, *H. pamphylicum* türünün açık çiçekli ve kapalı çiçekli bitkilerinin infüzyon, dekoksasyon ve uçucu yağlarının fenolik asit tayinleri, uçucu yağ *analizleri in-vitro* antioksidan, anti-Alzheimer, anti-Parkinson, antienflamatuvar, antikanser ve antianjiyojenik çalışmaları ilk kez bu tez çalışmasında bildirilmiştir.

Sonuç olarak, ülkemizde yetişen *Helichrysum* türleri ile ilgili bilimsel çalışmalara farklı bir bakış açısı getiren bu tez çalışması, Türkiye endemiği olan *H. pamphylicum* türüne ait toprak üstü kısımların fenolik asit, monotermen ve seskiterpen zengin içeriklerinin ve biyoaktivite potansiyellerinin, hala kesin bir tedavisi bulunmayan farklı nörodejeneratif ve enflamatuvar hastalıklar ile kanser türlerinin tedavisinde terapötik açıdan değerlendirilebileceği multidisipliner fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalara öncülük edecektir.

KAYNAKÇA

- Acet, T., Ozcan, K., & Zengin, G. (2020). An assessment of phenolic profiles, fatty acid compositions, and biological activities of two *Helichrysum* species: *H. plicatum* and *H. chionophilum*. *Journal of food biochemistry*, 44(2), e13128.
- Aiyegoro, O. A., & Okoh, A. I. (2009). Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. *International journal of molecular sciences*, 10(11), 4990-5001.
- Akaberi, M., Danton, O., Tayarani-Najaran, Z., Asili, J., Iranshahi, M., Emami, S. A., & Hamburger, M. (2019). HPLC-based activity profiling for antiprotozoal compounds in the endemic Iranian medicinal plant *Helichrysum ooecephalum*. *Journal of natural products*, 82(4), 958-969.
- Akaberi, M., Sahebkar, A., Azizi, N., & Emami, S. A. (2019). Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*. *Industrial Crops and Products*, 138, 111471.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., & Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food chemistry*, 119(1), 114-122.
- Albayrak, S., Aksoy, A., SAĞDIÇ, O., & BUDAK, Ü. (2010). Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 34(4), 463-473.
- Aljančić, I. S., Vučković, I., Jadranin, M., Pešić, M., Đorđević, I., Podolski-Renić, A., & Milosavljević, S. M. (2014). Two structurally distinct chalcone dimers from *Helichrysum zivojinii* and their activities in cancer cell lines. *Phytochemistry*, 98, 190-196.
- Allard, B., Turcotte, M., Spring, K., Pommey, S., Royal, I., & Stagg, J. (2014). Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *International journal of cancer*, 134(6), 1466-1473.
- Alman E komisyonu Monografıları*, Fasikül numarası:122, Yayınlanma tarihi 06.07.1988.
- Antoine, K. Z., Hussain, H., Dongo, E., Krohn, K., & Schulz, B. (2011). Cameroonenside A: a new antialgal phenolic glycoside from *Helichrysum cameroonense*. *Records of Natural Products*, 5(4), 305.
- Antonioli, L., Yegutkin, G. G., Pacher, P., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2016). Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends in cancer*, 2(2), 95-109.
- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., ... & Munoz, E. (2007). Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol α -pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *Journal of natural products*, 70(4), 608-612.
- Aslan, M., Orhan, D. D., Orhan, N., Sezik, E., & Yesilada, E. (2007). In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* capitulum in streptozotocin-induced-diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 109(1), 54-59.
- Aslan, M., Orhan, D. D., Orhan, N., Sezik, E., & Yeşilada, E. (2007). A study of antidiabetic and antioxidant effects of *Helichrysum graveolens* capitulum in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 396-400.

- Atkinson, S. J., Crabbe, T., Cowell, S., Ward, R. V., Butler, M. J., Sato, H., ... & Murphy, G. (1995). Intermolecular Autolytic Cleavage Can Contribute to the Activation of Progelatinase A by Cell Membranes (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30479-30485.
- Aydin, T. (2020). Secondary metabolites of *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* flowers as strong carbonic anhydrase, cholinesterase and α -glycosidase inhibitors. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 75(5-6), 153-159.
- Bagci, E., Elkiran, O., & Evren, H. (2013). Constituents of the essential oils of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet from Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 25(13), 7254.
- Barroso, M. R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., ... & Ferreira, I. C. (2014). Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Industrial crops and products*, 53, 330-336.
- Bianchini, A., Tomi, F., Richomme, P., Bernardini, A. F., & Casanova, J. (2004). Eudesm-5-en-11-ol from *Helichrysum italicum* essential oil. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42(11), 983-984.
- Bigović, D. J., Stević, T. R., Janković, T. R., Noveski, N. B., Radanović, D. S., Pljevljakušić, D. S., & Djurić, Z. R. (2017). Antimicrobial activity of *Helichrysum plicatum* DC. *Hemijska industrija*, 71(4), 337-342.
- Bigovic, D., Brankovic, S., Kitic, D., Radenkovic, M., Jankovic, T., Savikin, K., & Zivanovic, S. (2010). Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. *Molecules*, 15(5), 3391-3401.
- Bigović, D., Šavikin, K., Janković, T., Menković, N., Zdunić, G., Stanojković, T., & Djurić, Z. (2011). Antiradical and cytotoxic activity of different *Helichrysum plicatum* flower extracts. *Natural product communications*, 6(6), 1934578X1100600617.
- Bohlmann, F., & Mahanta, P. K. (1979). Weitere Phloroglucin-derivate aus *Helichrysum gymnoconum*. *Phytochemistry*, 18(2), 348-350.
- Bohlmann, F., & Vorwerk, E. (1980). Synthese natürlich vorkommender p-Hydroxyacetophenon-Derivate, II. *Chemische Berichte*, 113(1), 261-266.
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1970). Neue benzofuranderivate aus *Doronicum austriacum* jacq. *Tetrahedron letters*.
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1973). Natürlich vorkommende Terpenderivate, XXII. Über ein neues Azulen aus *Helichrysum bracteatum* (Vent.) Willd. *Chemische Berichte*, 106(4), 1337-1340.
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1980). Neue geranylphloroglucin-derivate aus *Helichrysum monticola*. *Phytochemistry*.
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1980). Neue phloroglucin-derivate aus *Helichrysum*-arten. *Phytochemistry*.
- Bohlmann, F., Hartono, L., & Jakupovic, J. (1985). A diterpene related to erythroxydiol from *Helichrysum refluxum*. *Phytochemistry*, 24(3), 611-612.
- Bohlmann, F., Misra, L. N., & Jakupovic, J. (1984). Weitere phloroglucin-und α -pyron-derivate aus *Helichrysum*-arten. *Planta medica*, 50(02), 174-176.
- Bohlmann, F., Zdero, C., & Ziesche, J. (1979). Neue flavone und phloroglucin-derivate aus *Helichrysum herbaceum* und *Helichrysum chrysargyrum*. *Phytochemistry*, 18(8), 1375-1378.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brühlmann, C., Ooms, F., Carrupt, P. A., Testa, B., Catto, M., Leonetti, F., ... & Carotti, A. (2001). Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(19), 3195-3198.
- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R., & Facino, R. M. (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(3), 517-526.
- Chang, C., & Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology*, 11, S37-S43.
- Chedea, V. S., & Pop, R. M. (2019). Total polyphenols content and antioxidant DPPH assays on biological samples. In *Polyphenols in Plants* (pp. 169-183). Academic Press.
- Chinou I.B., Roussis V., Perdetzoglou D., Tzakou O., Loukis A., (1997), "Chemical and antibacterial studies of two *Helichrysum* species of Greek origin", *Planta Medica*, Vol.63, 2, s:181-183.
- Cubukcu, B., & Yüksel, V. (1982). Constituents of Anatolian medicinal plants; flavonoids of *Helichrysum armenium*. *Journal of Natural Products*, 45(2), 137-139.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2006). Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 13(3), 187-191.
- Custódio, L., Justo, T., Silvestre, L., Barradas, A., Duarte, C. V., Pereira, H., ... & Varela, J. (2012). Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 131(1), 134-140.
- Czinner, E., Hagymasi, K., Blazovics, A., Kery, A., Szőke, É., & Lemberkovics, E. (2000). In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), 437-443.
- Çubukçu B., (2002) "*Helichrysum* Species as Choleretic and Chologogue Crude Drugs", *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44:145-150.
- Çubukçu B., Bingöl S., (1983) "*Helichrysum* Cinsinin Sekonder Metabolitleri", *Doğa Bilim Dergisi, Seri A, Cilt:7, Sayı:3*, s:441-453.
- Çubukçu, B., Meriçli, A.H., Yüksel, V. (1981). Evaluation based on the flavonoid the flavonoid contents of the Anatolian *Helichrysum* species *J.Fac.Pharm.İstanbul* 17:77-85.
- D'Abrosca, B., Buommino, E., D'Angelo, G., Coretti, L., Scognamiglio, M., Severino, V., ... & Fiorentino, A. (2013). Spectroscopic identification and anti-biofilm properties of polar metabolites from the medicinal plant *Helichrysum italicum* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(22), 7038-7046.
- Davis, P.H., (Ed.) (1975) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" University Press, Edinburg, Vol.5, s:80-97.
- Davis, P.H., Mill R.R., Tan K., (Ed) (1988) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands-Supplement" University Press, Edinburg, Vol.10, s:159-160,342.
- De la Puerta, R., Forder, R. A., & Hoult, J. R. S. (1999). Inhibition of leukocyte

- eicosanoid generation and radical scavenging activity by gnaphalin, a lipophilic flavonol isolated from *Helichrysum picardii*. *Planta medica*, 65(06), 507-511.
- de Quesada, T. G., Rodriguez, B., & Valverde, S. (1972). The constituents of *Helichrysum stoechas*. *Phytochemistry*, 11(1), 446-449.
- Dekker, T. G., Fourie, T. G., Snyckers, F. O., & van der Schyf, C. J. (1984). ¹³C NMR spectra of 3-substituted phlorophenone compounds. *Organic magnetic resonance*, 22(9), 607-608.
- Demirci, S., & Özhatay, N. (2012). An ethnobotanical study in Kahramanmaraş (Turkey); wild plants used for medicinal purpose in Andirin, Kahramanmaraş. *Turk J Pharm Sci*, 9(1), 75-92.
- Do Nascimento, M. C., & Mors, W. B. (1972). Chalcones of the root bark of *Derris sericea*. *Phytochemistry*, 11(10), 3023-3028.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews cancer*, 2(3), 161-174.
- Erik, S. (1983). New floristic records from Turkey. *Notes-Royal Botanic Garden Edinburgh*.
- Eroğlu, H. E., Aksoy, A., Hamzaoglu, E., Budak, Ü., & Albayrak, S. (2009). Cytogenetic effects of nine *Helichrysum* taxa in human lymphocytes culture. *Cytotechnology*, 59(1), 65-72.
- Erolu, E. H., Hamzaolu, E., Aksoy, A., Budak, Ü., & Özkul, Y. (2010). In vitro genotoxic effects of four *Helichrysum* species in human lymphocytes cultures. *Biological research*, 43(2), 177-182.
- Eshbakova, K. A., & Aisa, H. A. (2009). Components of *Helichrysum arenarium*. *Chemistry of natural compounds*, 45(6), 929-930.
- Flores-González, M., Torres-Benítez, A., & Simirgiotis, M. (2020). Terpenic Compounds in Chilean Species of the Genus *Blechnum* (Pteridophyta: Blechnaceae) with Neuroprotective Potential. In *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings (Vol. 71, No. 1, p. 2)*.
- Formisano, C., Mignola, E., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N. A., Bruno, M., & Rosselli, S. (2009). Constituents of leaves and flowers essential oils of *Helichrysum pallasii* (Spreng.) Ledeb. growing wild in Lebanon. *Journal of medicinal food*, 12(1), 203-207.
- Forte, G., Sorrentino, R., Montinaro, A., Luciano, A., Adcock, I. M., Maiolino, P., ... & Morello, S. (2012). Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *The Journal of Immunology*, 189(5), 2226-2233.
- Gaffney, B. J. (1996). Lipoxygenases: structural principles and spectroscopy. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 25(1), 431-459.
- Gao, Z. W., Wang, H. P., Lin, F., Wang, X., Long, M., Zhang, H. Z., & Dong, K. (2017). CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC cancer*, 17(1), 1-8.
- George, S. J. (2000). Therapeutic potential of matrix metalloproteinase inhibitors in atherosclerosis. *Expert opinion on investigational drugs*, 9(5), 993-1007.
- Georgiadou, E. (1982). *Helichrysum goulandrionum* (Compositae), a new species from Turkey. In *Annales Musei Goulandris*.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Mannelli, L. D. C., Mazzanti, G., & Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, 56(5-7), 387-389.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G., & Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2

- cleavage of laminin-5. *Science*, 277(5323), 225-228.
- Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2009). Analysis of phenolic compounds from different morphological parts of *Helichrysum devium* by liquid chromatography with on-line UV and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(24), 3939-3953.
- Gouveia, S., & Castilho, P. C. (2011). Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI–MSn method. *Food Chemistry*, 129(2), 333-344.
- Gouveia-Figueira, S. C., Gouveia, C. A., Carvalho, M. J., Rodrigues, A. I., Nording, M. L., & Castilho, P. C. (2014). Antioxidant capacity, cytotoxicity and antimycobacterial activity of madeira archipelago endemic *Helichrysum* dietary and medicinal plants. *Antioxidants*, 3(4), 713-729.
- Göger, G., Türkyolu, Ü., Gürşen, E. N., Yur, S., Karaduman, A. B., Göger, F., ... & Özek, G. (2021). Phytochemical characterisation of *Phlomis linearis* Boiss. & Bal and screening for anticholinesterase, anti-amylase, antimicrobial, and cytotoxic properties. *Turkish Journal of Chemistry*, 45(2), 387-399.
- Gradinaru, A. C., Sillion, M., Trifan, A., Miron, A., & Aprotosoie, A. C. (2014). *Helichrysum arenarium* subsp. *arenarium*: phenolic composition and antibacterial activity against lower respiratory tract pathogens. *Natural product research*, 28(22), 2076-2080.
- Greenough, M. A., Camakaris, J., & Bush, A. I. (2013). Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 62(5), 540-555.
- Grinev, V. S., Shirokov, A. A., Navolokin, N. A., Polukonova, N. V., Kurchatova, M. N., Durnova, N. A., ... & Maslyakova, G. N. (2016). Polyphenolic compounds of a new biologically active extract from immortelle sandy flowers (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 42(7), 770-776.
- Güner A., Özhatay N., Ekim T., Başer K.H.C., (Ed.) (2000) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands-Supplement-2" *University Press, Edinburg*, Vol.11, s:153-154.
- Güneş, S., Savran, A., Paksoy, M. Y., Koşar, M., & Çakılcıoğlu, U. (2017). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Karaisalı and its surrounding (Adana-Turkey). *Journal of herbal medicine*, 8, 68-75.
- Hamberg, M., & Samuelsson, B. (1973). Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3), 899-903.
- Hänsel, R., Cybulski, E. M., Çubukçu, B., Meriçli, A. H., Bohlmann, F., & Zdero, C. (1980). Neue pyron-derivate aus *Helichrysum*-arten. *Phytochemistry*, 19(4), 639-644.
- Jäger, A. K., & Saaby, L. (2011). Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16(2), 1471-1485.
- Jakupovic J., Grenz M., Bohlman F., Mungai G.M., (1990), "12β-hydroxyabieta-7,13-diene and other constituents from east african *Helichrysum* species", *Phytochemistry*, Vol.29, 5, s:1589-1590.
- Jakupovic J., Pathak V.P., Bolmann F., King R.M., Robinson H., "Obliquin

- derivatives and other constituents from Australian *Helichrysum* species”, *Phytochemistry*, Vol.26, 3, s:803-807.
- Jakupovic J., Schuster A., Bolmann F., Ganzer U., King R.M., Robinson H., (1989), “Diterpens and other constituents from Australian *Helichrysum* and related species”, *Phytochemistry*, Vol.28, 2, s:543-551.
- Jakupovic J., Schuster A., Sun H., Bolmann F., Bhakuni D.S., (1987), “Prenylated phythalides from *Anaphalis araneosa* and *Helichrysum platypterum*”, *Phytochemistry*, Vol.26, 2, s:580-581.
- Jakupovic, J., Kuhnke, J., Schuster, A., Metwally, M. A., & Bohlmann, F. (1986). Phloroglucinol derivatives and other constituents from South African *Helichrysum* species. *Phytochemistry*, 25(5), 1133-1142.
- Jaradat, N., Al-Masri, M., Zaid, A. N., Hussein, F., Shadid, K. A., Al-Rimawi, F., ... & Eid, A. (2018). Assessment of the antimicrobial and free radical scavenging activities of *Moluccella spinosa*, *Helichrysum sanguineum*, and *Styrax officinalis* folkloric medicinal plants from Palestine. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(2), 107-114.
- Jaradat, N., Qneibi, M., Hawash, M., Sawalha, A., Qtaishat, S., Hussein, F., & Issa, L. (2021). Chemical composition, antioxidant, antiobesity, and antidiabetic effects of *Helichrysum sanguineum* (L.) Kostel. from Palestine. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1), 41-51.
- Jarzycka, A., Lewńska, A., Gancarz, R., & Wilk, K. A. (2013). Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 50-57.
- Jerković, I., Rajić, M., Marijanović, Z., Bilić, M., & Jokić, S. (2016). Optimization of supercritical CO₂ extraction of dried *Helichrysum italicum* flowers by response surface methodology: GC-MS profiles of the extracts and essential oil. *Separation Science and Technology*, 51(18), 2925-2931.
- Karasartov, B. S., Kurkin, V. A., & Zapesochaya, G. G. (1992). Coumarins and flavonoids of the flowers of *Helichrysum italicum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 28(5), 504-505.
- Kolaylı, S., Şahin, H., Ulusoy, E., & Tarhan, Ö. (2010). Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichrysum plicatum*. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 38(4), 269-276.
- Kothavade, P. S., Nagmoti, D. M., Bulani, V. D., & Juvekar, A. R. (2013). Arzanol, a potent mPGES-1 inhibitor: novel anti-inflammatory agent. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Kucukoglu, O., Ozturk, B., Kamataki, T., & Topcu, Z. (2006). Inhibitory Activities of *Helichrysum*. Taxa on Mammalian Type I DNA Topoisomerase. *Pharmaceutical biology*, 44(3), 189-193.
- Kürkçüoğlu, M., Agalar, H. G., Aksoy, A., & Başer, K. (2019). Composition of the essential oils of two endemic *Helichrysum* species in Turkey.
- Lavault, M., & Richomme, P. (2004). Constituents of *Helichrysum stoechas* variety olonnense. *Chemistry of natural compounds*, 40(2).
- Legault, J., & Pichette, A. (2007). Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1643-1647.
- Les, F., Venditti, A., Cásedas, G., Frezza, C., Guiso, M., Sciubba, F., ... & López, V. (2017). Everlasting flower (*Helichrysum stoechas* Moench) as a potential

- source of bioactive molecules with antiproliferative, antioxidant, antidiabetic and neuroprotective properties. *Industrial crops and products*, 108, 295-302.
- Liu, G., Garrett, M. R., Men, P., Zhu, X., Perry, G., & Smith, M. A. (2005). Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1741(3), 246-252.
- Lloyd, H. A., & Fales, H. M. (1967). Terpene alcohols of *Helichrysum dendroideum*. *Tetrahedron letters*, 8(48), 4891-4895.
- Lourens, A. C. U., Viljoen, A. M., & Van Heerden, F. R. (2008). South African *Helichrysum* species: a review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 630-652.
- Ludwig, H. C., Rausch, S., Schallock, K., & Markakis, E. (1999). Expression of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer research*, 19(3A), 1747-1752.
- Malolo, F. A. E., Nougá, A. B., Kakam, A., Franke, K., Ngah, L., Flausino, O., ... & Wessjohann, L. (2015). Protease-inhibiting, molecular modeling and antimicrobial activities of extracts and constituents from *Helichrysum foetidum* and *Helichrysum mechowianum* (compositae). *Chemistry Central Journal*, 9(1), 1-11.
- Mao, Z., Gan, C., Zhu, J., Ma, N., Wu, L., Wang, L., & Wang, X. (2017). Anti-atherosclerotic activities of flavonoids from the flowers of *Helichrysum arenarium* L. MOENCH through the pathway of anti-inflammation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(12), 2812-2817.
- Mari, A., Napolitano, A., Masullo, M., Pizza, C., & Piacente, S. (2014). Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 96, 249-255.
- Max Wichtl (Ed.) (2002), *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, CRC Press, Mepfarm Scientific Publishers s:282-285
- McCawley, L. J., & Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Current opinion in cell biology*, 13(5), 534-540.
- Meng, F. C., Mao, F., Shan, W. J., Qin, F., Huang, L., & Li, X. S. (2012). Design, synthesis, and evaluation of indanone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors and metal-chelating agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(13), 4462-4466.
- Meriçli A.H., Çubukçu B., Dortunç T., (1983), "Flavonoids and Anthocyanins of *Helichrysum sanguineum*", *Fitoterapia*, Vol.LV, No.2, s:112-115.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84(4), 407-412.
- Morikawa, T., Ninomiya, K., Akaki, J., Kakihara, N., Kuramoto, H., Matsumoto, Y., ... & Matsuda, H. (2015). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dimeric dihydrochalcone glycosides from flowers of *Helichrysum arenarium*. *Journal of natural medicines*, 69(4), 494-506.
- Morikawa, T., Wang, L. B., Ninomiya, K., Nakamura, S., Matsuda, H., Muraoka, O., ... & Yoshikawa, M. (2009). Medicinal Flowers. XXX. Eight New Glycosides, Everlastosides F—M, from the Flowers of *Helichrysum arenarium*. *Chemical*

- and *Pharmaceutical Bulletin*, 57(8), 853-859.
- Mutanyatta-Comar, J., Phale, O. J. K., Abegaz, B. M., & Croft, K. (2006). Phloroglucinol derivatives and flavones from *Helichrysum paronychioides*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 20(1), 61-68.
- Novaroli, L., Reist, M., Favre, E., Carotti, A., Catto, M., & Carrupt, P. A. (2005). Human recombinant monoamine oxidase B as reliable and efficient enzyme source for inhibitor screening. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(22), 6212-6217.
- Nugteren, D. H., & Hazelhof, E. (1973). Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 326(3), 448-461.
- Oji, K. A., & Shafaghat, A. (2012). Constituents and antimicrobial activity of the essential oils from flower, leaf and stem of *Helichrysum armenium*. *Natural product communications*, 7(5), 1934578X1200700533.
- Opitz, L., & Hansel, R. (1970). Helipyron, ein Methylen-bis-Triacetsaurelacton aus *Helichrysum italicum*. *Tetrahedron letters*.
- Opitz, L., & Hansel, R. (1971). Phthalide aus *Helichrysum italicum*. *Archiv der Pharmazie*, 304(3), 228-230.
- Orhan, I., & Üstün, O. (2011). Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 386-390.
- Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M. I., & Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 57-60.
- Ozturk, M., & Altay, V. (2017). An overview of the endemic medicinal and aromatic plants of Türkiye-conservation and sustainable use. *Full Text Proceedings Book*, 10, 11.
- Özcan, K., & Acet, T. (2018). Antimicrobial and antioxidant screening, synergy studies of *Helichrysum chionophilum* extracts against to resistant microbial strains. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(7), 5045-5052.
- Özek, G., Özek, T., Işcan, G., Başer, K., Hamzaoglu, E. and Duran, A. (2007). Comparison of hydrodistillation and microdistillation methods for the analysis of fruit volatiles of *Prangos pabularia* Lindl., and evaluation of its antimicrobial activity. *South African Journal of Botany*, 73(4), 563-569.
- Öztürk, Bintuğ. Türkiye *Helichrysum*'larının Flavonoid ve Uçucu Yağ İçerikleri Açısından Karşılaştırması ve Antioksidan, Antimikrobiyal Aktivite Potansiyelleri, *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 2004
- Öztürk, N., Tuncel, M., & Tuncel, N. B. (2007). Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 30 (4), 587-596.
- Öztürk, Ö. G. (2013). Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(2), 209-220.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Pereira, C. G., Barreira, L., Bijttebier, S., Pieters, L., Neves, V., Rodrigues, M. J., ... & Custódio, L. (2017). Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in vitro biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane (*Aspalathus linearis*). *Journal of Pharmaceutical and*

- biomedical analysis*, 145, 593-603.
- Popoola, O. K., Marnewick, J. L., Rautenbach, F., Ameer, F., Iwuoha, E. I., & Hussein, A. A. (2015). Inhibition of oxidative stress and skin aging-related enzymes by prenylated chalcones and other flavonoids from *Helichrysum teretifolium*. *Molecules*, 20(4), 7143-7155.
- Popoola, O. K., Marnewick, J. L., Rautenbach, F., Iwuoha, E. I., & Hussein, A. A. (2015). Acylphloroglucinol derivatives from the South African *Helichrysum niveum* and their biological activities. *Molecules*, 20(9), 17309-17324.
- Rančić, A., Soković, M., Vukojević, J., Simić, A., Marin, P., Duletić-Laušević, S., & Djoković, D. (2005). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Myrrhis odorata* (L.) Scop, *Hypericum perforatum* L and *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Essential Oil Research*, 17(3), 341-345.
- Rao, Y. J., Abhijit, K., Mallikarjun, G., & Hemasri, Y. (2021). Design and synthesis of novel benzyloxy-tethered-chromone-carboxamide derivatives as potent and selective human monoamine oxidase-b inhibitors. *Chemical Papers*, 75(2), 703-716.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rigano, D., Formisano, C., Pagano, E., Senatore, F., Piacente, S., Masullo, M., ... & Borrelli, F. (2014). A new acetophenone derivative from flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Fitoterapia*, 99, 198-203.
- Rios, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1991). Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*. *Journal of ethnopharmacology*, 33(1-2), 51-55.
- Rivera D., Obon C., (1995) "The Ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review", *J. Ethnopharmacol.*, 46, s:73-93.
- Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, M. P., ... & Dessì, M. A. (2007). Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2), 117-126.
- Sala, A., Recio, M. D. C., Giner, R. M., Máñez, S., & Ríos, J. L. (2001). New Acetophenone Glucosides Isolated from Extracts of *Helichrysum italicum* with Antiinflammatory Activity. *Journal of Natural Products*, 64(10), 1360-1362.
- Santos, J. S., Brizola, V. R. A., & Granato, D. (2017). High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chemistry*, 214, 515-522.
- Sezik E., Akdemir Z., (1986), "*Helichrysum pamphilicum* Davis&Kupicha'nın flavonoidleri", *VI: Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Özet Kitabı* s:387-390.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Süntar, I., Akkol, E. K., Keles, H., Yesilada, E., & Sarker, S. D. (2013). Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 103-110.
- Süslü, İ., Pehlivan, S., Müslim, E. K. N. İ., & Şenel, E. (2010). Türkiye'nin çeşitli ballarına kaynak oluşturan compositae (Asteraceae) familyasında *Inula*

- türlerinin polen morfolojilerine istatistiksel bir yaklaşım. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 3(2), 182-187.
- Süzgeç, S., Meriçli, A. H., Houghton, P. J., & Çubukçu, B. (2005). Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. *Fitoterapia*, 76(2), 269-272.
- Taglialatela-Scafati, O., Pollastro, F., Chianese, G., Minassi, A., Gibbons, S., Arunotayanun, W., ... & Appendino, G. (2013). Antimicrobial phenolics and unusual glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Journal of natural products*, 76(3), 346-353.
- Tamura, Y., Watanabe, F., Nakatani, T., Yasui, K., Fuji, M., Komurasaki, T., ... & Ohtani, M. (1998). Highly selective and orally active inhibitors of type IV collagenase (MMP-9 and MMP-2): N-sulfonylamino acid derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 41(4), 640-649.
- Tanker N., Sezik G., (1978) “Türkiye’de Yetişen *Helichrysum* Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar”, Ankara Ecz. Fak. Mec. 8.19, s:19-39
- Tomás-Lorente, F., Iniesta-Sanmartín, E., Tomás-Barberán, F. A., Trowitzsch-Kienast, W., & Wray, V. (1989). Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrysum decumbens*. *Phytochemistry*, 28(6), 1613-1615.
- Topcu, Z., Ozturk, B., Kucukoglu, O., & Kilinc, E. (2008). Flavonoids in *Helichrysum pumphylicum* inhibit mammalian type I DNA topoisomerase. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(1-2), 69-74.
- Tries, S., Neupert, W., & Laufer, S. (2002). The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflammation Research*, 51(3), 135-143.
- Turk, B. E., Huang, L. L., Piro, E. T., & Cantley, L. C. (2001). Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries. *Nature biotechnology*, 19(7), 661-667.
- van Staden, J., Stafford, G. I., Pedersen, P. D., Chukwujekwu, J. C., & Jäger, A. K. (2006). *Helichrysums*: Antibacterial and monoamine oxidase inhibitory activity of South African summer-rainfall species. *Planta Medica*, 72(11), P_014.
- Vasco, Catalina, Jenny Ruales, and Afaf Kamal-Eldin. "Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador." *Food chemistry* 111.4 (2008): 816-823.
- Viegas, D. A., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2014). *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of ethnopharmacology*, 151(1), 54-65.
- Vinson, J. A., & Hontz, B. A. (1995). Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 401-403.
- Vrkoc, J., Dolejš, L., & Buděšínský, M. (1975). Methylene-bis-2H-pyran-2-ones and phenolic constituents from the root of *Helichrysum arenarium*. *Phytochemistry*, 14(5-6), 1383-1384.
- Vrkoc, J., Ubik, K., & Sedmera, P. (1973). Phenolic extractives from the achenes of *Helichrysum arenarium*. *Phytochemistry*.
- Vujić, B., Vidaković, V., Jadranin, M., Novaković, I., Trifunović, S., Tešević, V., & Mandić, B. (2020). Composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of *Helichrysum plicatum* DC. various extracts. *Plants*, 9(3), 337.

- Wallon, U. M., & Overall, C. M. (1997). The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) requires Ca^{2+} for fibronectin and heparin binding: binding properties of recombinant gelatinase AC domain to extracellular matrix and basement membrane components. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 7473-7481.
- Wang, L. B., Morikawa, T., & Nakamura, S. (2009). Medicinal flowers. 28. structures of five new glycosides, everlastosides A, B, C, D, and E, from the flowers of *Helichrysum arenarium*. *Heterocycles*, 78(5), 1235-1242.
- Yagura, T., Motomiya, T., Ito, M., Honda, G., Iida, A., Kiuchi, F., ... & Nishino, H. (2008). Anticarcinogenic compounds in the Uzbek medicinal plant, *Helichrysum maracandicum*. *Journal of natural medicines*, 62(2), 174-178.
- Yamamoto, S. (1992). Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1128(2-3), 117-131.
- Yang, Y., Huang, Y., Gu, D., Yili, A., Sabir, G., & Aisa, H. A. (2009). Separation and purification of three flavonoids from *Helichrysum arenarium* (L.) Moench by HSCCC. *Chromatographia*, 69(9), 963-967.
- Yeşilada E., Honda G., Sezik E., Tabata M., Fujita T., Tanaka T., Takeda Y., Takaiski Y., (1995) "Traditional Medicine in Turkey V. Folk Medicine in The Inner Taurus Mountains", *J. Ethnopharmacol.*, 46:133-152.
- Yildiz K., (1988) "Yildiz in Notes", Royal Botanic Garden Edinburgh, 45:445, f.3
- Yong, F., Aisa, H. A., Mukhamatkhanova, R. F., Shamyaynov, I. D., & Levkovich, M. G. (2011). New flavanone and other constituents of *Helichrysum arenarium* indigenous to China. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(6), 872-875.
- Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Tešić, Ž., Stupar, A., Bulut, G., ... & Mahomoodally, M. F. (2020). A comparative exploration of the phytochemical profiles and bio-pharmaceutical potential of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* extracts obtained via five extraction techniques. *Process Biochemistry*, 91, 113-125.
- Zeybek U., Zeybek N., (2002), "Farmasötik Botanik – Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae Sistematigi ve Önemli Maddeleri- Ders Kitabı", Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:3, E.Ü. Basımevi Bornova İZMİR, s:403.
- Zhang, J. H., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of biomolecular screening*, 4(2), 67-73.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Alper ÇİMİK

Doğum Yeri ve Yılı :

e-Posta :

Eğitim Durumu:

Lisans : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Lise : Eskişehir Fatih Anadolu Lisesi

İlk ve Orta Öğretim : İkieylül İlköğretim Okulu

Yabancı Diller : İngilizce

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleleri:

1. **Cimik, A.**, Alyu, F., & Ozturk, Y. (2018). *In vitro* Activity of Levetiracetam on Probiotic Microorganisms. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28, 87-88.
2. **Cimik, A.** (2021). Chemical Characterization, Antimicrobial-Antifungal Activity on Probiotic Microorganisms and Genotoxicity-Cytotoxicity Effects of Lamiaceae Family Essential Oils from Different Plants. *Journal of Bioequivalence Studies*, 7 (1), 1-9. ISSN: 2575-551X
3. **Cimik, A.** (2021). Chemical Characterization and Antibacterial-Antifungal Activity of Rutaceae Family Essential Oils from Different Plants on Probiotic Microorganisms. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 9 (3), 120-125. DOI: 10.15406/ppij.2021.09.00336.
4. **Cimik, A.** (2021). Chemical Composition of Apiaceae Family Essential Oils from Different Plants and *in-vitro* Antimicrobial Activities on Probiotic Microorganisms. *Journal of Pathology Research Reviews and Reports*, SRC/JPR-142. DOI: doi.org/10.47363/JPR/2021(3)135.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. **Cimik, A.**, Alyu, F., & Ozturk, Y. (2018). *In vitro* Activity of Fusidic Acid on Probiotic Microorganisms.; IV. International Congress on Applied Biological Sciences, 225. 3-5 May 2018, Eskişehir-Turkey.

2. **Cimik, A.**, & Demirci, F. (2018). *In vitro* Effects of Fluoroquinolone Antibiotics on Probiotic Microorganisms. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Abstract Book, 144. 26-29 June 2018, Ankara-Turkey.
3. **Cimik, A.**, Sever, B., Altıntop, M. D., & Özdemir, A. (2019). The Antimicrobial and Genotoxic Effects of a New Series of Quinoxaline-Based Hydrazones. ISPBS-5 Proceedings Book, 21-22. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, April 26th-28th, 2019, Cappadocia-Turkey.
4. **Cimik, A.**, Alyu, F., & Ozturk, Y. (2020). *In vitro* Activity of Gabapentin on Probiotic Microorganisms. 32th International Online Chemistry Congress Proceedings Book, 205.
5. **Cimik, A.**, Sever, B., Altıntop, M. D., & Özdemir, A. (2020). The Effects of a New Series of Phenothiazine-Based Hydrazones on Probiotic Microorganisms. 32th International Online Chemistry Congress Proceedings Book, Kaynakça.
6. Karis, M., **Cimik, A.**, Gurel-Gurevin E., Ozturk A.A. & Kiyan, H.T. (2021). *In vitro* Biological Effects of Endemic Anatolian Spotted Newt Dermal Venom: A Potential Active Pharmaceutical Ingredient (API) For Drug Delivery Systems. 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences Proceedings Book, 114-115. June 22-25, 2021, Ankara-Turkey.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. **Çimik, A.** (2016). Probiyotik İlaçlar. ESKON 2016 Ulusal Öğrenci Kongresi, 16-18 Aralık, Eskişehir, Türkiye.
2. Öztürk, Y., Karaca, H., & **Çimik, A.** (2017). Fusidik Asidin Probiyotik ve Patojen Mikroorganizma Türleri Üzerindeki *in-vitro* Aktivitesi. 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26-29 Nisan, İstanbul, Türkiye.
3. **Çimik, A.** (2018). *Bacillus subtilis* var. *natto*'nun Sekonder Metabolitlerinin Nutrasötik Açısından Değerlendirilmesi. V. Ulusal Eczacılık Öğrenci Kongresi Farmakon Erciyes 2018, 20-22 Nisan, Kayseri, Türkiye.
4. **Çimik, A.** (2018). OTC Preparatlar ve OTC Pazarına Genel Bakış. V. Ulusal Eczacılık Öğrenci Kongresi Farmakon Erciyes 2018, 20-22 Nisan, Kayseri, Türkiye.

Ulusal ve Uluslararası Projeler:

1. *Abies cilicica* (Ant. & Kotschy) Carr. subsp. *isaurica* Coode & Cullen, *Pinus brutia* Ten. var. *pendulifolia* Frankis ve *Ulmus minor* Miller subsp. *canescens* (Melville) Browicz & Zielinski türlerinin fitokimyasal bileşimleri ile *in vivo* ve *in vitro* anti-anjiyogenik ve anti-enflamatuvar potansiyellerinin araştırılması, AÜBAP 1906S121 (2019).
2. 7-Hidroksikumarin (umbelliferon) substitüe benzimidazolyum hibrit organik tuzlarının dizaynı, sentezi ve *in vitro* ve *in vivo* anti-enflamatuvar aktivitelerinin araştırılması, GAP (2021).
3. *Centaurium erythraea* Rafn. metanol ekstresi ve yeni vanilin trifenilfosfinyum tuzu içeren yarı katı sistemlerin hazırlanması, *in vitro/in vivo* biyolojik aktiviteleri ve iritasyon profillerinin belirlenmesi, Yayın ve Araştırma Teşvik Projeleri (2021).

Bilimsel ve Sanatsal Kuruluşlara Üyelikler

1. 9. Bölge Eczacı Odası, 9261372 Oda Sicil No'lu Üye, 2019.
2. Türk Eczacılar Birliği, 2019.
3. Journal of Analytical & Pharmaceutical Research (eISSN: 2473-0831) Reviewer Board Member, 2021.