

**DOĞAL MADDE VE
KOMBİNASYONLARININ ENZİMATİK
IN VITRO ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİVİRAL ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Ezgi AK SAKALLI

Eskişehir 2024

**DOĞAL MADDE VE KOMBİNASYONLARININ ENZİMATİK *IN VITRO*
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİVİRAL ETKİLERİ**

Ezgi AK SAKALLI

DOKTORA TEZİ

**Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ
İkinci Danışman: Prof. Dr. Müberra KOŞAR**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Şubat 2024**

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen BAP2005S058 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ezgi AK SAKALLI'nın "Doğal Madde ve Kombinasyonlarının Enzimatik *in vitro* Antimikrobiyal ve Antiviral Etkileri" başlıklı tezi 26/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognози Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ	
Üye	: Prof. Dr. Gökalg İŞCAN	
Üye	: Doç. Dr. Hale Gamze AĞALAR	
Üye	: Prof. Dr. Mustafa ASLAN	
Üye	: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	

Prof. Dr. Saime ÖNCE
Enstitü Müdürü

ÖZET

DOĞAL MADDE VE KOMBİNASYONLARININ ENZİMATİK *IN VITRO* ANTİMİKROBİYAL VE ANTİVİRAL ETKİLERİ

Ezgi AK SAKALLI

Farmakognozi Anabilim Dalı
Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2024
Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ
İkinci Danışman: Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Bu tez kapsamında ticari *Origanum* ve *Eucalyptus* uçucu yağları ve ana bileşenlerinin birbiriyle ve standart etken maddelerle farklı kombinasyonlarının *in vitro* antimikrobiyal etkileri sinerjistik/antagonistik etkileşmeler açısından değerlendirilmenin yanı sıra, uçucu yağların ve ana bileşenlerinin potansiyel antiviral etkileri, enzimatik *in vitro* testler ile değerlendirilmiş, bulgular *in silico* yöntemlerle desteklenmiştir.

Deneysel olarak mikrodilüsyon ve dama tahtası yöntemleri kullanılarak *Origanum*, *Eucalyptus*, karvakrol, timol, ampisilin, siprofloksasin kombinasyonlarının etkileri dört bakteri üzerinde incelenmiş seçilen en aktif (FİKİ<0.75) kombinasyonların *in vitro* sitoksisiteleri hücre kültüründe test edilmiştir. Ayrıca uçucu numunelerin *in vitro* anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) ve nöraminidaz (NA) ticari kitleriyle etki mekanizmaları incelenmiştir. Uçucu bileşenlerin farmakokinetik özellikleri ve toksisiteleri *in silico* yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Ana monoterpen bileşenler GK ve GK/KS ile *Origanum onites*, *O. minutiflorum*, *O. vulgare* için karvakrol (%62-81), *Eucalyptus globulus* için 1,8-sineol (%31), *E. citriodora* için ise sitronellal (%80) olarak belirlenmiştir. *In vitro* enzim inhibisyon deneylerinde *O. minutiflorum*, *O. vulgare* ve *E. globulus* uçucu yağları ile saf ana bileşenler; ACE2, TMPRSS2 ve NA enzimlerini inhibe etmiştir, sonuçlar *in silico* verilerle de desteklenmiştir.

Genel sonuç olarak, *Origanum* uçucu yağları ve karvakrolun antimikrobiyal maddeler birlikte kullanıldığında etkiyi arttırdığını; yüksek enzim inhibisyonu gösteren *Origanum* ve *Eucalyptus* uçucu yağlarının güvenli konsantrasyonlarda potansiyel antiviral olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Origanum*, *Eucalyptus*, ACE2, TMPRSS2, Nöraminidaz.

ABSTRACT

IN VITRO ENZYMATIC, ANTIMICROBIAL AND ANTIVIRAL EFFECTS OF NATURAL PRODUCTS AND THEIR COMBINATIONS

Ezgi AK SAKALLI

Department of Pharmacognosy
Anadolu University, Institute of Graduate Education, February 2024
Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ
Co-Supervisor: Prof. Dr. Müberra KOŞAR

In this present study, *in vitro* antimicrobial effects, with special emphasis on synergistic/antagonistic interactions of commercial *Origanum* and *Eucalyptus* essential oils, and their major constituents, alone or in their various combinations with standard antimicrobials were evaluated. In addition, the potential antiviral effects were tested using *in vitro* enzymatic assays and *in silico* molecular docking.

Antibacterial activity and synergistic interactions of *Origanum*, *Eucalyptus*, carvacrol, thymol, ampicillin, ciprofloxacin combinations were assessed *via* microdilution checkerboard method, where selected most active combinations (FICI index <0.75) were further evaluated for cytotoxicity using *in vitro* tests.

For potential antiviral activity evaluation; angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2), and neuraminidase (NA) assay kits were used. Also, binding, pharmacokinetic and toxicity characteristics of volatile components were assessed *in silico*.

The major monoterpene constituents were determined by GC and GC/MS as carvacrol (62-81%) for *Origanum* sp., whereas as 1,8-cineol (31%) for *E. globulus*; and citronellal for *E. citriodora* (80%), respectively.

In vitro enzyme test results demonstrated that *O. minutiflorum*, *O. vulgare* and *E. globulus* essential oils, and their major constituents inhibited ACE2, TMPRSS2 and NA enzymes, which were in correlation with *in silico* findings.

Overall results suggests that *Origanum* essential oils, and carvacrol may provide better antibacterial effects when combined with antimicrobials, without toxicity. The tested *Origanum* and *Eucalyptus* essential oils with relative high enzyme inhibitions may be utilized for their antiviral potential.

Keywords: *Origanum*, *Eucalyptus*, ACE2, TMPRSS2, Neuraminidase.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi, tecrübe ve desteklerini benden esirgemeyen, bana yeni ufuklar açan değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Doktora öğrenimim boyunca karşılaştığım her sorunda yanımda olan, yol gösteren ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Müberra KOŞAR'a

Antimikrobiyal çalışmalarımın planlanmasında ve değerlendirilmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen, bana laboratuvarını açan Y. Doç. Dr. Mehmet İLKTAÇ'a,

Hücre kültürü deneyleri için her türlü yardım ve desteği sağlayan Y. Doç. Dr. İmge KUNTER'e,

In silico çalışmalarda bana yol göstererek değerli bilgilerini benimle paylaşan Doç. Dr. Kerem TERALI ve Doç. Dr. İsmail ÇELİK'e,

Birlikte ilerlemekten gurur duyduğum ekip arkadaşlarım Nesrin ÖZTİNEN, Beste ATLI ve Dr. Öğr. Üy. Ayşe Esra KARADAĞ'a

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora süresince içten desteklerini hissettiğim canım annem, babam, kardeşim ve sevgili eşime içtenlikle teşekkürlerimi sunarım. Sabrı için sevgili kızıma da teşekkür ederim.

Son olarak bilimin ışığında düşünüp, tasarlayıp, gerçekleştirebildiğimiz tüm çalışmaların alt yapısını bize hazırlayan, aydınlık Türkiye'nin mimarı Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal Atatürk'ü saygıyla ve sevgiyle anarım.

Ezgi AK SAKALLI

.../.../2024

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 programıyla 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.

Uzm. Ecz. Ezgi AK SAKALLI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Uçucu Yağlar	4
2.1.1. Uçucu yağların antimikrobiyal ve antiviral etkileri	5
2.1.2. Antimikrobiyal direncin önlenmesinde yağların kullanımı	6
2.1.3. Uçucu yağlar ve izomerizm.....	8
2.2. <i>Origanum</i> L. Cinsi.....	9
2.2.1. <i>Origanum onites</i> L.	10
2.2.2. <i>Origanum minutiflorum</i> O. Schwarz & P.H. Davis	10
2.2.3. <i>Origanum vulgare</i> L.	11
2.3. <i>Origanum</i> L. Uçucu Yağlarının Biyolojik Aktiviteleri	11
2.4. <i>Eucalyptus</i> L' Hèr Cinsi.....	12
2.4.1. <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.....	12
2.4.2. <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.....	13
2.4.3. <i>Eucalyptus</i> L' Hèr uçucu yağının biyolojik aktiviteleri.....	13
2.5. Kombinasyonların Tedavideki Önemi	15
2.6. Doğal Ürünlerin Kombinasyonları.....	16
2.7. Tez Kapsamındaki Biyolojik Aktivitelerle İlgili Genel Bilgiler	19
2.7.1. Antimikrobiyal aktivite	19
2.7.1.1. Dilüsyon testleri	20
2.7.1.2. Kombinasyon çalışmaları	21
2.7.2. Enzim inhibisyon testleri	21

	<u>Sayfa</u>
2.7.2.1. Antiviral enzim inhibisyon mekanizmaları.....	22
2.7.2.2. Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2)	23
2.7.2.3. Transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2)	24
2.7.2.4. Nöraminidaz (NA)	25
2.7.3. Toksisite testleri.....	26
2.7.3.1. <i>In vitro</i> toksisite testleri.....	26
2.8. Yapay Zeka Uygulamaları ve <i>In Silico</i> Araştırmaların Farmakognozideki Yeri.....	27
2.8.1. <i>In silico</i> aktivite çalışmaları	28
2.8.2. <i>In silico</i> farmakokinetik özelliklerin tespiti ve toksisite testleri	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Kullanılan Materyaller ve Kimyasal Maddeler.....	32
3.1.1. Uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenleri	32
3.1.2. Standart antibakteriyel ilaç etken maddeleri	32
3.1.3. Kimyasal maddeler ve çözücüler	32
3.2. Cihazlar	33
3.3. Yöntemler.....	33
3.3.1. Kromatografik-Spektroskopik yöntemler	33
3.3.1.1. Gaz kromatografisi (GK) ve Gaz kromatografisi/Kütle spektrometrisi (GK/KS) ile analizleri	33
3.3.2. <i>In vitro</i> yöntemler	34
3.3.2.1. Antimikrobiyal aktivite çalışması	34
3.3.2.2. Kombinasyon çalışmaları: Dama tahtası yöntemi.....	37
3.3.2.3. <i>In vitro</i> enzim inhibisyon testleri.....	41
3.3.2.3.1. Anjiyotensin 2 dönüştürücü enzim (ACE2) inhibisyonu testleri	41
3.3.2.3.2. Transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) enzim inhibisyon testleri	42
3.3.2.3.3. Nöraminidaz (NA) enzim inhibisyon testleri.	43
3.3.2.4. <i>In vitro</i> toksisite testleri.....	44
3.3.3. İstatistiksel analiz.....	46
3.3.4. <i>In silico</i> yöntemler	46
3.3.4.1. Enzim inhibisyon testleri	46
3.3.4.1.1. Ligand ve protein hazırlanması	46

	<u>Sayfa</u>
3.3.4.1.2. Ligand ve protein kenetlenmesi	47
3.3.4.1.3. Etkileşimlerin görselleştirilmesi ve analizi	47
3.3.4.2. Farmakokinetik ve toksisite çalışmaları.....	47
4. BULGULAR VE YORUM.....	49
4.1. Kromatografik- Spektroskopik Bulgular	49
4.1.1. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizleri	49
4.2. <i>In Vitro</i> Yöntemler	51
4.2.1. Antimikrobiyal etkinlik bulguları	51
4.2.1.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları	51
4.2.1.2. Kombinasyon çalışmaları	52
4.2.2. <i>In vitro</i> enzim inhibisyon sonuçları.....	58
4.2.2.1. ACE2 enzim inhibisyon sonuçları.....	58
4.2.2.2. TMPRSS2 enzim inhibisyon sonuçları.....	60
4.2.2.3 Nöraminidaz enzim inhibisyon sonuçları.....	61
4.2.3. <i>In vitro</i> toksisite bulguları.....	63
4.3.3. <i>In silico</i> yöntemler	64
4.3.3.1. <i>In silico</i> enzim-inhibitör kenetleme testleri.....	64
4.3.3.2. <i>In silico</i> farmakokinetik ve toksisite sonuçları.....	69
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	76
KAYNAKÇA.....	80
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	32
Tablo 3.2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	33
Tablo 3.3. Mikrodilüsyon testi için hazırlanan konsantrasyonlar	36
Tablo 3.4. Uçucu yağların kombinasyon deneylerindeki konsantrasyonları	41
Tablo 3.5. <i>In vitro</i> TMPRSS2 enzim inhibisyonu karışımı	43
Tablo 3.6. <i>In vitro</i> nöraminidaz enzim inhibisyonu reaksiyon karışımı	44
Tablo 3.7. <i>In silico</i> analizler için bileşik listesi.....	48
Tablo 4.1. <i>Origanum</i> uçucu yağlarına ait uçucu bileşenler	49
Tablo 4.2. <i>Eucalyptus</i> uçucu yağlarına ait uçucu bileşenler	50
Tablo 4.3. Test materyalleri MİK değerleri	51
Tablo 4.4. <i>Origanum onites</i> kombinasyonları.....	53
Tablo 4.5. <i>Origanum vulgare</i> kombinasyonları.....	53
Tablo 4.6. <i>Origanum minutiflorum</i> kombinasyonları	54
Tablo 4.7. <i>Eucalyptus globulus</i> kombinasyonları	55
Tablo 4.8. <i>Eucalyptus citriodora</i> kombinasyonları.....	56
Tablo 4.9. Saf madde kombinasyonları.....	57
Tablo 4.10. <i>Origanum</i> türleri ACE2 inhibisyon sonuçları.....	59
Tablo 4.11. <i>Eucalyptus</i> türleri ACE2 inhibisyon sonuçları	59
Tablo 4.12. <i>Origanum</i> türleri TMPRSS2 enzim inhibisyon sonuçları.....	61
Tablo 4.13. <i>Eucalyptus</i> türleri TMPRSS2 enzim inhibisyon sonuçları	61
Tablo 4.14. <i>Origanum</i> türleri nöraminidaz enzim inhibisyon sonuçları	62
Tablo 4.15. <i>Eucalyptus</i> türleri nöraminidaz enzim inhibisyon sonuçları.....	62
Tablo 4.16. Kombinasyon kodları ve FİKİ değerleri.....	63
Tablo 4.17. Uçucu bileşenlerin hedef proteinlerle bağlanma enerjileri (kcal/mol) ..	66
Tablo 4.18. Uçucu bileşenlerin kimyasal yapısı ve biyoyararlanım radarı	70

Sayfa

Tablo 4.19. SwissADME web sunucusu kullanılarak elde edilen veriler.....	71
Tablo 4.20. SwissADME yazılımında kullanılan modeller	73
Tablo 4.21. PkCSM kullanılarak tanımlanan moleküllerin <i>in silico</i> toksisite değerlendirme sonuçları	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Karvakrol ve timol monotermenlerinin yapısı.....	8
Şekil 3.1. Dama tahtası yöntemi uygulama detayları.....	38
Şekil 3.2. İki kombinasyon için tek plağın kullanıldığı dama tahtası yöntemi	39
Şekil 4.1. TMPRSS2 enzim inhibisyonu testi prensibi	60
Şekil 4.2. Hücre canlılık oranları	64
Şekil 4.3. Karvakrol, timol ve 1,8-sineolün bağlanma pozları.....	67
Şekil 4.4. BOILED-Egg modeli gösterimi.....	74

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE2	: Angiotensin Converting Enzyme 2 (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2)
ADMET	: Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon ve Toksikite
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)
CFU	: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
COVID-19	: Coronavirus Disease (Korona Virüs Hastalığı)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sıvı besiyeri)
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMA	: European Medicines Agency (Avrupa İlaç Kurumu)
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi)
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu)
FİK	: Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyon
FİKİ	: Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu İndisi
GK/KS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
GK	: Gaz Kromatografisi
HSV-1	: Herpes Simplex Tip 1 Virüs

HSV-2	: Herpes Simplex Tip 2 Virüs
IC ₅₀	: Maksimum İnhibisyonun %50'sini Oluşturan Madde Konsantrasyonu
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MCA	: Metoksikumarin
MERS	: Middle East Respiratory Syndrome (Ortadoğu Solunum Sendromu)
MHB	: Mueller Hinton Broth (Sıvı besiyeri)
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum
NA	: Nöraminidaz
PAINS	: Pan Assay Interference Compounds (Pan-Tahlil Girişim Bileşikleri)
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PkCSM	: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic Properties Using Graph-Based Signatures (Grafik Tabanlı Veriler Kullanılarak Küçük Molekül Farmakokinetik ve Toksikite Özelliklerinin Tahmin Edilmesi)
QS	: Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama)
P	: Probability (Olasılık)
SARS	: Severe Acute Respiratory Syndrome (Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu)
SARS-CoV-2	: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü 2)

SMILES : Simplified Molecular Input Line Entry System (Basitleştirilmiş Moleküler Veri Hattı Giriş Sistemi)

TİTCK : Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

TMPRSS2 : Transmembran Serin Proteaz 2

1. GİRİŞ

Farmakognozide mikroorganizmalardan elde edilen antibiyotiklerin önderliğinde antibakteriyel ilaçlar, enfeksiyonlarla mücadelede önemli aşama kaydetse de antiviral tedaviler halen istenilen düzeyde gelişmemiştir. Virüsün canlı hücrede çoğalmasını önleyebilecek ilaçların sınırlı olması yanı sıra, virüsün temas ile çoğalmasının en yüksek büyüme oranına genellikle klinik semptomlar ortaya çıkmadan önce ulaşması, virüslerin konak hücrelerin yapı taşlarını kullanması ve bu nedenle ayırt ediciliklerinin az olması yan etkiyi arttırırken, antiviral ilaçlara direnç gelişmesi de bir diğer güncel halk sağlığı sorundur.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ile koordineli yürütülen bir çalışmada, dönemsel epidemilere neden olan influenza virüslerinin her yıl dünya çapında yaklaşık 3-5 milyon vaka, buna bağlı 290.000 ile 650.000 solunum yolu kaynaklı mortaliteye neden olduğu belirtilmiştir (Iuliano vd., 2018). Genellikle semptomatik tedavinin yapıldığı influenza vakalarında, hastanın durumuna göre oseltamivir gibi nöroaminidaz (NA) inhibitörleri kullanılmaktadır. Son yıllarda dolaşımda olan influenza virüslerinin çoğunda amantan antiviral etken maddelerine (örn. amantadin ve rimantadin) direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Cheung vd., 2006; Deyle vd., 2007; Hay vd., 2008). Bu nedenle, klinik uygulamalarda ve tedavilerde genelde nöroaminidaz inhibitörleri sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak oseltamivir ve zanamivirin kullanıma sunulmasını takip eden yıllarda (1999-2004), klinik çalışma örneklerinde oseltamivir direnci saptanmıştır (Ward vd., 2005; Monto vd., 2006). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda daha sonraki yıllarda (2006-2007 ve 2007-2008 sezonu) oseltamivir direncinin daha da fazla olduğu ortaya koyulmuştur (Dharan vd., 2009; Hauge vd., 2009).

Koronavirüslerin neden olduğu Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu (SARS) 2003 yılında Çin'de ortaya çıkmış ve dört ülkeye yayılmış, DSÖ tarafından epidemi olarak adlandırılmıştır (WHO, 2004). SARS hastalığına karşı spesifik bir aşı ya da ilaç bulunmamakta, semptomatik tedavi ve izolasyon ile hastalık süreci yönetilmektedir.

2012 yılında Suudi Arabistan'da yine koronavirüslerle ilişkili olan Ortadoğu Solunum Sendromu (MERS) ortaya çıkmış ve 27 ülkede görülmüştür. Ölüm oranı %35 olan MERS'in spesifik bir tedavisi ya da aşısı şu an için bulunmamaktadır (WHO, 2019).

Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkan ve kısa sürede tüm dünyaya yayılan şiddetli akut solunum sendromu ile ilişkili koronavirüs türü nedeniyle, DSÖ tarafından pandemi ilan edilmiştir (Lai vd., 2020; WHO, 2020a). Dünya Sağlık Örgütü'ne

30.08.2023 tarihi itibariyle 770.085.713 vaka ve 6.956.173 ölüm rapor edilmiştir (WHO, 2020b). Söz konusu virüs, 2019-nCoV olarak sınıflandırılmış ve SARS-CoV-2 olarak adlandırılmıştır (CSG of ICTV, 2020).

SARS-CoV-2, koronavirüs ailesine ait bir virüstür. TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-15 ve IL-18 gibi proenflamatuvar sitokinlerin aracılık ettiği inflammatuar yanıtın, hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Buzsko vd., 2021; Wang ve Perlman, 2022). DSÖ tarafından, korona virüs hastalığına, korona (CO), virüs (VI) hastalığı (D) kelimeleri kullanılarak COVID-19 ismi verilmiştir. COVID-19, özellikle akciğerleri etkileyen orta ile şiddetli enfeksiyonunun yanı sıra çoklu organ yetmezliği ve hücre ölümüyle de ilişkilendirilen bir hastalıktır (Wang ve Perlman, 2022). Hastalığın tedavisi için DSÖ rehberleri ve önerileri doğrultusunda, farklı mekanizmaları hedefleyen ilaçlar kullanılmıştır (BMJ, 2020). Koruyucu önlemler olarak çeşitli aşılar geliştirilmiş ve ülkelerin aşılama programları dahilinde uygulanmıştır (WHO, 2022).

Tüm dünyayı etkisi altına alan influenza, SARS, MERS ve yeni tip corona virüs gibi virüs kaynaklı hastalıkların, hızlı bulaşıcılık yetenekleri ve virüslere karşı tedavinin istenilen etkiden uzak olması nedeniyle; yan etkisi ve toksisitesi az, etkili ve spesifik antiviral maddelerin geliştirilmesine olan ihtiyaç SARS-CoV-2 pandemisinde de görülmüştür. Viral kaynaklı hastalıkların çoğu zaman bakteriyel hastalıklarla birlikte ilerlemesi de süreci zorlaştıran bir diğer unsurdur. Doğal kaynaklı ürünler, özellikle uçucu yağlar, zengin sekonder metabolitleri sayesinde hem farklı bakteri ve virüslere eş zamanlı aktivite gösterebilirler hem de birden fazla patogenezi mekanizmasını etkileyebilirler. Bu nedenle doğal ürünler, yeni ilaç keşfi çalışmalarında ciddi potansiyel taşımaktadırlar.

Antimikrobiyal madde araştırma taramalarında *in silico* ve *in vitro* yöntemler ve etki değerlendirilmesinde sinerjizma çalışmaları son zamanlarda üzerinde durulan, antimikrobiyal tedavilere katkı sunabilecek nispeten yeni bir araştırma alanıdır. Özellikle *in silico* çalışmalar kısa sürede kapsamlı taramalar yapmaya ve hedefe yönelik aday molekülleri hızlıca değerlendirmeye olanak sağlayan, zaman ve maliyet açısından verimli olmaları nedeniyle son zamanlarda giderek daha fazla dikkat çeken yöntemlerdedir (Paul vd., 2021; Shaker vd., 2021). *In silico* çalışmalar sayesinde maddelerin hedef proteine etki ve bağlanma özellikleri tahmin edilebileceği gibi maddelerin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon gibi farmakokinetik özellikleri ve toksisite profilleri de tahmin edilebilmektedir (Daina vd., 2017). Ancak, bu çalışmalar çeşitli yazılımlar

aracılığıyla matematiksel anlamda tahmin ve olasılık sundukları için *in vitro* çalışmalarla desteklendiğinde çok daha anlamlı olmaktadır.

Bilindiği üzere tıbbi bitkilerden geliştirilen ürünler ve preparatlar binlerce yıl tedavi amaçlı kullanılmıştır. Bilindiği üzere *Origanum* ve *Eucalyptus* türleri ve bu bitkilerden elde edilen uçucu yağlar gibi preparatlarla halk arasında uzun yıllardır çeşitli mikrobiyal ve viral enfeksiyonların tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Ancak söz konusu bitkilere ait uçucu yağların ve uçucu yağların bileşenlerinin antiviral tedavide önemli rol oynayan enzimler üzerine *in vitro* ve *in silico* etkileri, ayrıca sentetik ilaçlarla antimikrobiyal kombinasyonlarına dair bilimsel veri yoktur.

Bu tez projesi kapsamında, ticari *Origanum* (*Origanum onites* L., *O. minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis, *O. vulgare* L.) ve *Eucalyptus* (*Eucalyptus globulus* Labill ve *E. citriodora* Hook) uçucu yağları ve sırasıyla bu yağların ana bileşeni olan karvakrol, 1,8-sineol ve karvakrolün yapısal izomeri timolün antimikrobiyal ve antiviral etki potansiyelleri ve kimyasal bağlanma özellikleri *in vitro* ve *in silico* yöntemler ile deneysel olarak incelenmiştir. Bu ürünlerin farklı oranlardaki kombinasyonlarının antimikrobiyal aktiviteleri sinerjik/antagonist etkileşmeler açısından standart etken maddeler ile birlikte değerlendirilmiştir. Uçucu yağlar ve hedef uçucu bileşenler ile bu ürünlerin yer aldığı ilaç-bitkisel ürün kombinasyonlarının *in vitro* toksisite etkin konsantrasyonlara göre belirlenen bir konsantrasyon aralığında, güvenlik için hücre kültüründe test edilmiş, ayrıca uçucu yağların ana bileşenlerinin *in silico* toksisite özellikleri incelenmiştir.

Antimikrobiyal aktivite, klinik olarak önemli çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde, üremenin baskılanması temelinde test edilmiştir.

Potansiyel antiviral aktivite ise, *in vitro* enzimatik test yöntemleri ve *in silico* enzim-inhibitör kenetleme testleri kullanılarak standart maddeler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bu tez kapsamında *Origanum* ve *Eucalyptus* uçucu yağları, ana bileşenleri ve kombinasyonlarının *in vitro* antimikrobiyal ve antiviral potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Temel amaç olarak da, güvenli ve etkili ilaçlara ihtiyaç duyulan, klinik açıdan önemli bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda kullanılacak doğal kaynaklı ilaçların faz çalışmaları kapsamında araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, bitkisel materyallerden distilasyon ve soğuk sıkım yöntemleriyle elde edilen, monoterpenler gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden oluşan, uçucu ve özel kokulu karışımlardır (Başer ve Demirci, 2007; 2011). Çoğunlukla Akdeniz bölgesi bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar, bitkilerin çiçek, yaprak, meyve, toprak üstü kısımları, odun, kabuk, rizom ve kök gibi farklı organlarında bulunabilirler. Apolar yapıda oldukları için suda çözünmeyip organik çözücülerde ve yağlarda çözünürler (Başer ve Buchbauer, 2010).

Bitkilerin sekonder metabolitleri olarak üretilen uçucu yağlar, genelde apolar bileşikler olan terpenoitlerden (monoterpen, seskiterpen ve diterpenler) oluşmaktadır. Ayrıca asitler, alkoller, aldehitler, ketonlar, asiklik esterler, laktonlar, daha seyrek olarak azotlu ve kükürtlü bileşikler, kumarinler ve fenilpropanoitlerin homologları da uçucu yağların bileşiminde yer alabilmektedir (Başer ve Demirci, 2007; 2011; Tongnuanchan ve Benjakul, 2014).

Uçucu yağların bileşimleri elde edildiği bitkinin cinsine, kullanılan kısmına, hatta üretim şekli ile bitkinin elde edildiği mevsime ve yetiştiği yöreye bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Toncer vd., 2009; Zheljzakov vd., 2013; Ozdemir vd., 2017; Tohidi vd., 2017).

Farmakopeler, tanı ve tedavi amacıyla kullanılan etken ve yardımcı maddelerin taşınması gereken standartları içeren resmi kaynaklardır. Sentetik maddelerin yanı sıra, tıbbi bitkiler ve tıbbi bitkilerden elde edilen ekstre, tentür ve uçucu yağ gibi ürünler de farmakopelerde yer almaktadır. Tıbbi bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen ürünlerin kalitesi, güvenilirliği ve etkinliği ancak belli standartlara sahip olmaları ile sağlanabilir. Bir uçucu yağın farmakope kalitesinde olması o ürünün ilaç ve ilaç yardımcı maddesi olarak kullanılabilir kaliteye sahip olduğu anlamına gelmektedir (Başer, 2012; Bouin ve Wierer, 2014; Ergene vd., 2023).

Farmakolojinin temel prensibi olan konsantrasyona bağlı yanıt ilişkisinin devamlılığının sağlanması için de farmakope kalitesinde ürün kullanımı önemlidir. Farmakope kalitesindeki bitkisel materyaller içerik ve kalite yönünden belirli standartlara sahip olup ilaç kalitesinde oldukları için dozlama ve doza bağlı yanıt değerlendirilmesinde avantaj sağlamaktadır (Başer, 2012).

2.1.1. Uçucu yağların antimikrobiyal ve antiviral etkileri

Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri uzun yıllardır bilinmektedir (Janssen vd., 1987; Rios ve Recio, 2005). Modern antibiyotiklerin keşfi ve kullanımıyla ikinci planda kalan uçucu yağların antimikrobiyal kullanımları, SARS-CoV-2 gibi yeni enfeksiyon ajanlarının ortaya çıkışı ile yeni ilaç moleküllerinin arayışı ve aynı zamanda antimikrobiyal direncin yaygınlaşması ile yeniden popüler bir araştırma konusu olmuştur.

Uçucu yağlar zengin kimyasal bileşimleri nedeniyle farklı bakteri ve virüslere karşı eş zamanlı aktivite sergileyebilmektedirler. Uçucu yağlar başta monoterpen ve seskiterpenler olmak üzere terpenoitlerden oluşurlar. Uçucu yağların içerisinde bulunan bileşenler farklı etki mekanizmaları ile genelde nispeten yüksek antimikrobiyal etki gösterirler. Karvakrol, sitraller, *p*-simen ve timolün bakteri plazma membran geçirgenliğinin artmasına ve hücrel membranların şişmesine katkıda bulunduğu; karvakrol ve timolün ayrıca Gram negatif bakterilerin dış zarını bozarak lipopolisakkaritlerin salınmasına yol açtığı düşünülmektedir (Helander vd., 1998). Fenolik yapıya sahip diğer bir bileşen olan öjenol, proteinlerle reaksiyona girerek bakteri hücrelerindeki enzimlerin aktivitesini engelleyebilir. Uçucu yağların içerisinde bulunan ve fenilpropanoit grubuna giren sinnamaldehit, bakteriyel hücre zarı ile etkileşime girerek hücre zarının bozulmasına neden olmaktadır. Bu bileşiklerin öjenol ile birlikte Gram pozitif bakterilerin enerji metabolizmasını inhibe ettikleri de gösterilmiştir. Ayrıca bu bileşenlerin neden olduğu hücre zarı hasarı proton hareketinde zayıflığa ve küçük iyonların hücreden sızmasına neden olabilmektedir (Walsh vd., 2003). Sinnemaldehit ve öjenolün bildirilen bir diğer etkisi de glukoz alımı ve glikoliziz inhibisyonudur (Gill ve Holley, 2004).

Uçucu yağların antiviral etkinliğe sahip olduklarını gösteren çok sayıda yayın bulunmaktadır (Reichling vd., 2009; Boukhatem, 2020; Ma ve Yao, 2020; Başer vd., 2023). Uçucu yağların virüslerde kapsid parçalanmasına neden olarak virüsleri etkisiz hale getirdiği, bazı virüslerde hemaglutininin inhibisyonu yaptığı, Herpes simplex tip 1 virüsü (HSV-1)'nin replikasyonu için gerekli olan Tat/TAR-RNA kompleksini bozduğu ve doğası gereği lipofilik olan uçucu yağların viral membranlara kolayca nüfuz ederek membranın bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (Feriotto vd., 2018).

Özellikle HSV-1 ve Herpes simplex tip 2 virüsü (HSV-2) üzerine etkileri sıklıkla çalışılmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmaların birinde, çay, okaliptüs ve kekik uçucu yağlarının ve bunların monoterpen içeriğinin HSV-1'e karşı büyük ölçüde antiviral

etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu çalışmada monoterpenler virüse karşı %80 etkinlik gösterirken uçucu yağlar HSV-1'i yaklaşık %96 oranında engellemiştir (Koch vd., 2008; Astani vd., 2010).

Uçucu yağların içerdikleri uçucu bileşenler sayesinde gösterdikleri karmaşık ve çoklu etki mekanizmalarına direnç geliştirmek, tek hedefli tedavilere karşı direnç geliştirmekten daha zor olduğu için uçucu yağların bu özelliği onları sentetik antimikrobiyallere karşı üstün kılan bir özellik olarak değerlendirilebilmektedir (Schelz vd., 2010).

Uçucu yağların HSV üzerine *in vitro* etkileri olmasına rağmen influenza virüsleri ve coronavirüsler üzerine etkileri çok fazla çalışılmamıştır. Ayrıca uçucu yağların antiviral etkileri ile ilgili yapılmış *in silico* enzim-inhibitör kenetlenme taramalarının çoğunda değerlendirmeler sadece *in silico* araştırmaların sonucu elde edilen verilere dayanarak yapılmıştır (Jusoh vd., 2018; Alabboud vd., 2020; Da Silva vd., 2020; Ma ve Yao, 2020; Kesharwani vd., 2020;). *In vitro* ya da *in vivo* çalışmalarla eş zamanlı yürütüldüğü araştırmalar eksiktir.

2.1.2. Antimikrobiyal direncin önlenmesinde yağların kullanımı

Antimikrobiyal ilaç / etken madde direnci, bakterilerin bu maddeleri nötralize etmek, atılımını sağlamak, ilacın mikrobiyal hücre üzerinde etkisini önlemek için yapısal bileşenlerin değiştirilmesi gibi çeşitli mekanizmalarla mikroorganizmaların antimikrobiyallerin etkisinden kaçtığı bir olgudur (Richardson, 2017). Bu direncin nedenleri arasında antimikrobiyallerin kliniğin yanı sıra tarım ve hayvancılıkta aşırı ve bilinçsiz kullanımı yer almaktadır. 1940'larda modern antibiyotiklerin ortaya çıkmasından bu yana bakteriler, mevcut olan hemen hemen tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir. Antimikrobiyal direnç dünya genelinde, ölümlerin başlıca nedenini oluşturmakta ve DSÖ tarafından küresel sağlığa yönelik ilk on tehdit arasında yer almaktadır (WHO, 2014).

Antimikrobiyal direnç hakkında DSÖ tarafından 2014 yılında yayınlanan Küresel Surveyans Raporu'na göre, idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir antibiyotik olan siprofloksasine karşı direnç oranı, Küresel Antimikrobiyal Direnç ve Kullanım Surveyansı Sistemi'ne rapor veren ülkelerde *Escherichia coli* için %8,4 ile %92,9 ve *Klebsiella pneumoniae* için %4,1 ile %79,4 arasında değişmektedir. Aynı raporda, bazı ülkelerde, pnömoni, kan dolaşımı enfeksiyonları ve yenidoğanlarda

ve yoğun bakım ünitesindeki hastalardaki enfeksiyonlar gibi hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedeni olan *K. pneumoniae* tedavisi için kullanılan karbapenem antibiyotiklerinin hastaların yarısından fazlasında direnç nedeniyle işe yaramadığı, *E.coli*'de idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan florokinolon direncinin yaygın olduğu, cilt floramızın bir parçası olabilen ve aynı zamanda hem toplum kökenli hem de nozokomiyal enfeksiyonların yaygın bir nedeni kabul edilen, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonu olan kişilerin enfeksiyona bağlı ölüm olasılığının, ilaca duyarlı bakterilerin neden olduğu enfeksiyonu olan kişilere göre %64 daha fazla olduğu DSÖ tarafından belirtilmiştir (WHO, 2014).

Antimikrobiyal direncin önlenmesinde antimikrobiyal maddelerin akılcı kullanımını, doğru enfeksiyon ajanına uygun tedavi ajanı ve uygun tedavi yönteminin seçilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca, antimikrobisellerin uygun sentetik ya da doğal maddelerle kombinasyonları oluşturularak kullanılan dozun azaltılması, çoklu hedefler seçilerek antimikrobiyal direnç gelişiminin önlenmesi ve dolaylı yoldan toksisitenin azaltılması son zamanlarda oldukça tercih edilen bir araştırma konusudur.

Antibiyotik direncinin ana mekanizmalarının anlaşılması, bununla baş etmeye yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesi için gereklidir. Antibiyotikler enzimatik modifikasyon veya bozunma yoluyla etkisiz hale getirilmektedir. Mikroorganizmalar, antibiyotiklerin etki ettiği hedef bölgedeki değişiklikler ile antibiyotiklerin bakteri hücrelerine bağlanması kısıtlayarak antibiyotik aktivitesini azaltılabilmektedirler. Bir başka direnç mekanizması, antibiyotiklerin akış (eflüks) pompalarının etkisiyle hücreden uzaklaştırılmasını içermektedir. Bu nedenle, eflüks pompa inhibitörleri ilaç direnci ile mücadele etmede önemli yer tutmaktadır (Webber ve Piddock, 2003; Marquez, 2005; Piddock, 2006; Almatar vd., 2021).

Antibiyotikler ve diğer maddelerin kombinasyonunun etkinliği artırıcı potansiyellere sahip olabileceği düşünülmektedir (Kalan ve Wright, 2011). Antimikrobiyal etki söz konusu olduğunda etkinlikleri tarih öncesi çağlardan beri bilinen uçucu yağlar, içerdikleri kimyasal maddelerin çeşitliliği ve karmaşık etki mekanizmaları ile ön plana çıkmaktadır (Jahnssen vd.,1987; Kalemba ve Kunicka, 2003; Bakkali vd., 2008). Özellikle lipofilik olmaları nedeniyle hücre zarı üzerinde etkili olabilen uçucu yağların ve yağların ana bileşenlerinin antimikrobisellerle kombine edildiği çalışmalarla ilgili kapsamlı bir derlemeye “*Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*” isimli kitapta yer verilmiştir (Kon ve Rai, 2013).

Uçucu yağlar ve yağların bileşenleri ile farklı antibiyotiklerin kombinasyonlarıyla ilgili yapılmış çok sayıda güncel çalışma mevcuttur (Aelenei vd., 2019; Rosato vd., 2020; Coimbra vd., 2022; Iseppi vd., 2023; Beşirik ve Göger, 2023; Romo-Castillo vd., 2023).

2.1.3. Uçucu yağlar ve izomerizm

Aynı molekül formülüne sahip ancak üç boyutlu düzenlemesi bakımından kimyasal yapıları farklı organik moleküllere izomer denilmektedir. Moleküllerin üç boyutlu yapılarının koku gibi organoleptik özellikler ve biyolojik aktivite üzerinde önemli olduğu bilinmekte ve bu konuda uzun yıllardır çalışmalar yapılmaktadır (Easson ve Stedman, 1933). Uçucu yağların bileşiminde, bir birinin izomeri olan maddeler belirli oranlarda yer alabilmektedir. İzomer moleküller, yapısal izomerler ve stereoizomerler olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

Yapısal izomerlerin moleküler formülleri aynıdır ancak atomların bağlanmaları farklıdır. Her ikisi de fenolik monotermen olan, karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) ve timol (2-izopropil-5-metilfenol) birbirinin yapısal izomeridir. Şekil 1.1’de görüldüğü üzere, her iki yapıda da hidroksil grubu C-1 pozisyonunda yer almaktadır. Karvakrolde metil grubu C-2 pozisyonuna bağlı ve izopropil grubu C-5 pozisyonuna bağlı iken, timolde metil grubu C-5 pozisyonuna bağlı ve izopropil grubu C-2 pozisyonuna bağlıdır. Karvakrol sıvı akışkan iken, timol kristal yapıda olması ise başka bir karakteristik özelliktir.



Şekil 1.1. Karvakrol ve timol monotermenlerinin yapısı

Thymus uçucu yağları ana bileşen olarak genellikle timol içerirken, Türkiye’de yetişen *Thymus* türlerinin uçucu yağları genellikle ana bileşen olarak karvakrol içermektedir (Başer, 2008).

Farklı bölgelerden toplanan aynı bitkinin, uçucu yağında izomerlerin farklı oranlarda bulunması da olasıdır. Örneğin Başer vd.’nin yaptığı bir çalışmada, Ağrı ili ve Van’ın farklı bölgelerinden toplanan *Thymus migricus* uçucu yağları analiz edildiğinde,

uçucu yağların farklı oranlarda karvakrol ve timol içerdikleri saptanmıştır (Başer vd., 2002).

İzomerler farklı fizyolojik etkilere ve farklı toksisite özelliklerine sahip olabilirler. Timolün karvakrolden daha toksik olduğu, test materyallerinin antianjiyogenik ve anti-enflamatuar özelliklerinin ve toksisitelerinin incelendiği *in vivo* bir yöntem olan koryoallantoik membran testi ile gösterilmiştir (Demirci vd., 2004).

İzomerler farklı özelliklere sahip olmalarının yanı sıra benzer fizyolojik etkilere de sahip olabilirler. Örneğin, karvakrol ve timolün ratlardan izole edilmiş aort üzerinde benzer damar gevşetici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Peixoto-Neves vd., 2010).

Uçucu yağların içeriğinde yer alan birçok doğal bileşik optik olarak aktiftir. Aynı bileşiğin farklı enantiyomerleri farklı organoleptik özelliklere ve fizyolojik etkilere sahip olabileceğinden şiralite uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenleri için önemlidir (Başer ve Demirci, 2007; Zavod ve Knittel, 2013). Örneğin *l*-mentol nanemsi ve serin bir kokuya sahipken, *d*-menton nanemsi, ilaç gibi, kafur benzeri bir kokuya sahiptir. Ayrıca enantiyomerler belirli bir uçucu yağ için karakteristik olabilir. *l*-karvon, (-)-(R), *Mentha spicata*'da bulunurken, *d*-karvon, (+)-(S), *Anethum graveolens* 'te bulunmaktadır (Başer ve Kırimer, 2022).

Uçucu yağların saflığını belirlerken enantiyomerlerin dağılımından yararlanılmaktadır. Örneğin doğal bergamot yağı linalool ve linalil asetatın sadece (R)-enantiyomerlerini içermektedir. Bergamot yağının saflığını kanıtlamak için uçucu yağdaki enantiyomerlerin analizi gerekmektedir (König, 1997). Enantiyomerlerin birbirinden ayrılmasında, gaz kromatografisinde kullanılan şiral kolonlar kullanılmaktadır. Ayrıca çok boyutlu gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sayesinde, şiral bileşikler önce normalfaz kolonda belirlenerek sonrasında kesilip şiral kolona yönlendirilerek enantiyomerlerine ayrılabilir. Kütle dedektörü ile ayrılan bileşiklerin daha doğru tanınması gerçekleştirilmektedir (König ve Hochmuth, 2004).

2.2. *Origanum* L. Cinsi

Origanum L. cinsi Lamiaceae familyasında yer almaktadır. Bitki ismi Yunanca “oros” (dağ) ve “ganos” (parlaklık) kelimelerinden oluşmuştur. *Origanum* türleri ülkemizde “kekik” adıyla bilinmektedir. Genelde baharat, çesni ve bitki çayı olarak kullanılmaktadır ve halk arasında yaygın kullanımları vardır. Türkiye’de 22 tür ve 32

takson ile temsil edilmekte olup 21 takson endemiktir (Davis vd., 1982; Davis, Mill ve Tan, 1988; Guner vd., 2000).

Origanum türlerinin ticari değeri de ülkemiz için oldukça fazladır. Türkiye, Yunanistan ve Meksika'dan sonra en büyük *Origanum* ihracatı yapan ülkedir. 2020 yılında 66 milyon dolar değerinden fazla 20.000 tondan fazla kurutulmuş kekik ve yaklaşık 9 milyon Dolar değerinde 100 tondan fazla kekik yağı ihraç etmiştir. Ticari açıdan önemli *Origanum* türlerinin başında *O. onites*, *O. minutiflorum*, *O. vulgare*, *O. majorana* ve *O. syriacum* gelmektedir (Başer, 2022).

Origanum cinslerinin genel özelliği uçucu yağlarında ana madde olarak karvakrol içermeleridir.

2.2.1. *Origanum onites* L.

İzmir kekiği olarak da bilinen *Origanum onites* daha çok Ege ve Batı Akdeniz kıyılarında geniş yayılım göstermekte ve Türkiye'den ihraç edilen kekiğin ana bölümünü oluşturmaktadır.

Kuzey Ege'de Balıkesir'den Doğu Akdeniz'de Antalya'ya kadar olan alandan alınan örneklerin uçucu yağlarının analiz edildiği bir çalışmada Antalya'dan alınan iki örnek dışında bu türlerin yüksek oranda (%66,5-80,4) karvakrol içerdiği; Antalya'dan alınan iki örneğin ise yüksek oranda (%91-92) linalool içerdiği görülmüştür (Baser vd., 1993).

Avrupa Farmakopesine kayıtlı bir tıbbi bitki olan *Origanum onites*, halk arasında soğuk algınlığı ve diyabette oral olarak; yanıklarda, baş ve karın ağrısında ise haricen kullanılmaktadır (Ph. Eur, 2011; Gürdal ve Kültür, 2013).

2.2.2. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis

Toros dağlarının Antalya ve Isparta kıyılarında yetişen *O. minutiflorum* endemik bir türdür. Ayrıca Isparta Sütçüler bölgesinde toplanmakta ve büyük miktarda ihraç edilmektedir.

Dört farklı bölgeden toplandıktan sonra uçucu yağı elde edilip analiz edildiğinde %75.4-83.6 aralığında karvakrol içerdiği görülmüştür (Baser vd.,1993).

2.2.3. *Origanum vulgare* L.

Türkiye’de Güveyotu, başkaldıran kekik, tarhana kekiği, İstanbul kekiği, Ova kekiği gibi isimlerle anılan *Origanum vulgare* L, Akdeniz bölgesine ve Batı Avrasya’ya özgü, 30–50 cm boyunda, beyaz veya mor çiçekli, lanseolat yaprakları olan çok yıllık aromatik bir bitkidir (Sezik vd., 1993).

Türkiye’de 4 alt türü bulunmaktadır: *O. vulgare* subsp. *hirtum*, subsp. *gracile*, subsp. *vulgare*, subsp. *viride* (Davis, 1982).

2.3. *Origanum* L. Uçucu Yağlarının Biyolojik Aktiviteleri

Buhar distilasyonu yoluyla elde edilen kekik uçucu yağları karvakrol açısından zengindir. Ticari olarak elde edilen *Origanum* türlerinin uçucu yağının büyük kısmı ihraç edilmektedir (Başer, 2008).

Kekik baharat olarak yaygın kullanılan bir bitki olmasının yanı sıra halk arasında da yerleşmiş kullanımlara sahiptir. Kekik çayı Türkiye’de sevilen ve tercih edilen bir bitki çayıdır. Uçucu yağ elde edilirken ortaya çıkan yan ürün olan kekik suyu da oral olarak mide-bağırsak rahatsızlıklarında ve kan kolesterolünü düşürmek amacıyla, haricen ağrılı romatizmada ağrılı uzuvlarda ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, antiseptik ve analjezik olarak çürük diş üzerine uygulanmaktadır. Açık yaralara uygulandığında yanma hissi yaratmadığı ve iyileşmeyi hızlandırdığı için ağız ülserlerine ve iltihaplı diş etlerine kullanılabilir (Başer, 2002).

Origanum uçucu yağının antimikrobiyal etkisi uzun yıllardır bilinmekte ve halk arasında kullanımı da büyük ölçüde bu etkiye dayanmaktadır. Türkiye’de yetişen *Origanum* türlerinin uçucu yağlarının çoğunun ana bileşeni olan karvakrolün antimikrobiyal etkisi hakkında yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur.

Karvakrol bakterilerin hücre membranlarına etki ederek antimikrobiyal etki göstermektedir. ATP sentezini indirgeyip hidrolizi arttırarak hücrelerarası ATP havuzunun azalmasına neden olur (Knobloch vd., 1986). Membran potansiyelinin azalması membranın proton geçirgenliğini arttırmaktadır. 1 Mm konsantrasyonda karvakrol bakterilerin hücre içi pH’sını ve hücre potasyumunu kullanarak hücre protein miktarını düşürmektedir (Ultee, Kets ve Smid, 1999).

Ultee ve ekibinin (2002) karvakrolün bakteri sitoplazma zarı ile ilgili hipotezlerine göre; karvakrol, plazma membranından geçer ve protonunu sitoplazmaya bırakarak ayrıştır. Daha sonra, bir potasyum iyonu taşıyarak, zardan ayrılmadan dış ortama geri

döner. Hücre dışında karvakrol, potasyumu protonla değiştirir ve hücreye aynı şekilde tekrar girer. Bu bulgulara destek olarak, karvakrol ve timolün eflüks pompası inhibitörü olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Cirino vd., 2015).

Kekik yağlarının etki mekanizmasının da karvakrol ile benzer şekilde, yapısal bileşenlerin sentezi ve hücrel enerji sistemlerinin bozulması ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bakteri hücrelerinden iyon, ATP ve amino asit sızıntısı bu olguyu açıklamaktadır. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin çok altındaki miktarlarda bile potasyum ve fosfat iyonu konsantrasyonlarının etkilediği belirtilmektedir (Lambert vd., 2001).

Kekik uçucu yağının ana maddelerinden biri olan karvakrolün, olası viral proteaz ve ACE2 üzerine etkisi nedeniyle SARS-CoV2 için potansiyel etken madde adayı olduğu bir derleme çalışmasında önerilmiştir (Javed, Nagoor Meeran ve Ojha, 2021).

2.4. *Eucalyptus* L' Hèr Cinsi

1788 yılında kayıtlara geçen *E. obliqua* L' Hèrit den ismini alan *Eucalyptus* cinsi, 1000'den fazla türe sahip türe sahip, hızlı büyüyen ve yaprak dökmeyen ağaçlardan oluşmaktadır. Anavatanı Avustralya kıtası olan bu cins Endonezya, Hindistan, Portekiz, Brezilya, Şili ve Fransa'da gibi ülkelerde yayılış göstermektedir.

Hızla büyüyen ökaliptus ağaçları, bol lifli keresteleri ile modern hasat uygulamalarına uygun, ticari anlamda tercih edilen bir cinstir (Brooker, 2002). Mevcut ticari ökaliptus ormanlarını genellikle *E. tereticornis*, *E. urophylla*, *E. pellita*, *E. nitens*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. saligna*, *E. macarthurii*, *E. smithii*, *E. benthamii*, *E. camaldulensis* ve *E. dunnii* ve bunların melezleri oluşturmaktadır (Stanturf vd., 2013).

Ormancılık faaliyetleri sonrasında atık olarak değerlendirilen yapraklarından uçucu yağ distilasyonu, günümüzde tıbbi özellikleri açısından da ticari olarak önemli yer tutmaktadır.

2.4.1. *Eucalyptus globulus* Labill

Dünya genelinde en yaygın olarak yetiştirilen, Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı olan ökaliptus türüdür. Çoğunlukla pürüzsüz kabuklu, uzun ve dik bir orman ağacıdır.

Dünyadaki tıbbi *Eucalyptus* uçucu yağının elde edildiği ana bitki *E. globulus*'tur. Çin, İspanya, Portekiz, Hindistan, Arjantin, Brezilya ve Şili'de bu amaçla yetiştirilmektedir. Uçucu yağın ana bileşeni 1,8-sineoldür (Brooker, 2002).

2.4.2. *Eucalyptus citriodora* Hook

Limon kokulu ökalıptus olarak da bilinen *E. citriodora*, başta Avustralya olmak üzere diğer ülkelerde de yetiştirilen ve en yaygın kullanılan ökalıptus türlerinden biridir.

Ağaç oldukça uzun, kabuğu pürüzsüz ve tek renktir. Büyük, alternat, peltat ve tüylü olan juvenil yaprakları kan ağaçları grubuna özgü özellikler taşıırken, yetişkin yaprakları dar lanseolattır ve kırıldığında kendine has limon kokusu taşır.

1995 yılında daha önce *Eucalyptus* cinsine dahil olan diğer birçok türle birlikte *Corymbia* cinsinin bir üyesi olarak yeniden adlandırılmış ve *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill & L.A.S. Johnson ismini almıştır (Hill ve Johnson, 1995). Fakat, halen birçok kaynakta ve literatürde *Eucalyptus* türleri altında, sinonim ismi *Eucalyptus citriodora* olarak yer almaktadır

2.4.3. *Eucalyptus* L' Hèr uçucu yağının biyolojik aktiviteleri

1,8-Sineol bakımından zengin ökalıptus uçucu yağı, *E. globulus* Labill.'in ve diğer ökalıptus türlerinin taze yaprakları ve dal uçlarından buhar distilasyonu yöntemi ile elde edilmektedir. Ana bileşeni siklik eter yapılı 1,8-sineol olan ökalıptus uçucu yağının diğer önemli bileşenleri α -pinen (%0.05-10), β -pinen (%0.05-1.5), sabinen (maksimum %0.3), α -fellandren (%0.05-1.5), limonen (%0.05-15) ve kafur (maksimum %0.1) olarak Avrupa Farmakopesi 2012'de belirtilmiştir.

Ökalıptus uçucu yağı halk arasında uzun yıllardır kronik sinuzit, bronşit, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve bronşiyal astım gibi alt ve üst solunum yolları hastalıklarında kullanılmaktadır.

Soğuk algınlığı ile ilişkili öksürükte rahatlatma amacıyla yetişkinlerde oral yolla günde 2 ile 5 kez, 100-200 mg geleneksel bitkisel tıbbi ürün olarak kullanılabilceği Avrupa İlaç Kurumu (EMA) monograflarında belirtilmiştir (EMA., 2014a; EMA. 2014b).

Ökalıptus uçucu yağının çeşitli bakteriyel suşlara ve mantarlara karşı antibakteriyel ve antifungal etkisi olduğu bildirilmiştir (EMA. 2014a; Elaissi vd., 2012). Özellikle solunum yolları rahatsızlıklarının ana etkenleri olan *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'a karşı antibakteriyel etkisi gösterilmiştir (Cermelli vd., 2008). Ökalıptus uçucu yağının saf 1,8-sineole kıyasla daha fazla antibakteriyel etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Bosnić, Dženita ve Jela, 2006).

E. globulus uçucu yağı ve 1,8-sineolün MRSA'nın biyofilm oluşturmamasını ve quorum sensing (QS) yani "çoğunluğu algılama" potansiyellerini azalttığı gözlenmiştir. Uçucu yağın 1,8-sineole kıyasla, düşük konsantrasyonda bile daha güçlü anti-QS aktivitesi gösterdiği görülmüştür. Ökalyptus uçucu yağının bu özelliği, MRSA biyofilm oluşumunun ve hastane enfeksiyonlarının yayılmasının önlenmesi açısından kayda değer olduğu bildirilmiştir (Merghni vd., 2018).

Rinosinüzit, bronşit, KOAH (Kronik obstrüktif akciğer hastalığı) ve astım dahil olmak üzere akut ve kronik solunum rahatsızlıkları olan hastalarda yürütülen klinik çalışmada 1,8-sineolün etkinliği gösterilmiştir (Juergens U.R vd., 2003; Juergens L.J. vd., 2020). Ayrıca 1,8-sineolün influenza A ile enfekte edilmiş fareler üzerine etkileri incelendiğinde, fareleri influenzaya karşı koruduğu bulunmuştur. 1,8-Sineolün enfekte olan farelerin nazal lavaj sıvılarında IL-4, IL-5, IL-10 ve MCP-1 düzeyini ve akciğer dokularında IL-1 β , IL-6, TNF-a ve IFN-y seviyesini etkili bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (Li vd., 2016).

242 KOAH hastasının dahil olduğu çift kör, çok merkezli bir randomize kontrollü çalışmada, normal tedavilerine ek olarak, 6 ay boyunca öğünlerden önce günde 2 x 3 adet 100 mg sineol kapsülü kullanan hastalarda dispne, akciğer fonksiyonları ve yaşam kalitesinde plaseboya göre iyileşme gözlenmiştir (Worth vd., 2009).

Yapılan yeni bir çalışmada, 1,8-sineolce zengin bir preparatın ve sineolün buhar fazı halinde SARS-CoV2 ile doğrudan temas testinde virüsün yok etme oranının 5. dakikada %79,9 ve 30. dakikada %93,2 olduğu bildirilmiştir (Başer vd., 2023).

E. globulus uçucu yağından daha farklı bir içeriğe sahip olan *E. citriodora* uçucu yağının ana maddesi ise uçucu yağın karakteristik kokusunu veren, asiklik monoterpen yapısındaki sitronellal olduğu bilinmektedir. Parfümeride önemli yer tutan *E. citriodora* uçucu yağı ve sitronellal esas olarak Çin, Hindistan ve Brezilya'da üretilmektedir (Brooker, 2002).

E. citriodora uçucu yağı da *E. globulus* uçucu yağına benzer antioksidan, antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal ve antikandidal aktiviteleri rapor edilmiştir (Ramezani vd., 2002; Luqman vd., 2008; Singh vd., 2012).

E. citriodora uçucu yağı ve sitronellal, antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra herbisit ve insektisit olarak etkili olduğu kayıtlıdır (Park ve Shin, 2005; Batish vd., 2008). Insektisidal özelliği nedeniyle özellikle "doğal sivrisinek kovucuların" formülasyonlarında yer almaktadır (Brooker, 2002).

E. globulus ve *E. citriodora* uçucu yağlarının analjezik ve anti-enflamatuvar etkilerinin değerlendirildiği bir *in vivo* hayvan çalışmasında iki uçucu yağın da merkezi ve periferik analjezik etkilerin yanı sıra nötrofile bağlı ve bağımsız anti-enflamatuvar aktivitelere sahip olduğunu gösterilmiştir (Silva vd., 2003).

2.5. Kombinasyonların Tedavideki Önemi

Yunanca *syn-ergo*'dan gelen 'sinerji' ya da 'sinerjizma', iki ya da daha fazla maddenin bir arada bireysel katkılarından daha fazla bir etki meydana getirmek için birlikte hareket ettiği zaman kullanılmaktadır. Kombinasyon tasarlanıp oluşturulurken aslında çoğu zaman sinerji hedeflense de, kombinasyon sonrasında görülebilecek etkiler aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir:

Sinerjik etki: İki ya da daha fazla maddenin bir arada kullanıldığında elde edilen etkinin, kombinasyonda yer alan maddelerin tek tek kullanıldıklarında gözlenen etkilerin toplamından fazla olması durumudur.

Antagonist etki: Kombine edilen maddelerin etkisinin, bu maddeler tek tek uygulandığında elde edilen etkiden daha az olması durumudur.

Aditif etki: Kombinasyondaki maddelerin toplam etkisinin, bu maddeler tek tek kullanıldığında gözlenen etkilerinden fazla ancak iki katından az olması durumudur.

Bağımsız etki: Kombinasyondaki maddelerin etkisinin bu maddeler tek tek kullanıldığında gözlenen etkilerin toplamına eşit olması durumudur.

Kombinasyonların farmakoterapide kullanımı yeni bir yaklaşım değildir. 1950'lerde kombine tedaviler oldukça popüler olmasına karşın bu tedavilerin genellikle akılcı geliştirilmemiş ve deneysel verilerle desteklenmemiştir (Schweim ve Schweim, 2014).

Talidomid faciasından sonra 1976 yılında yayınlanan Alman İlaç Yasası (AMG) bazı kombinasyon tıbbi ürünlerin ruhsatlarını "riskli ilaçlar" olarak değerlendirmiştir. Ayrıca kombine ilaçların hazırlanmasındaki bir diğer zorluk da "Avrupa Kombinasyon Kılavuzunun" gerekliliklerini sağlamak için kombinasyonda yer alan maddelerin biyoyararlanımlarının senkronize edilmesidir (EMA, 2008; Schweim ve Schweim, 2014).

Tüberküloz, AIDS\HIV, kanser, hipertansiyon, diyabet gibi birçok sistemi aynı anda hedef alan ve/veya farklı mekanizmalarla meydana gelen hastalıklar nedeniyle kombinasyon tedavisine olan ihtiyaç tekrar gündeme gelmiştir. Bu tip tedavilerin klinikte kullanılmasına en bilinen örneklerden biri *Helicobacter pylori* için uygulanan antibiyotik

kombinasyon tedavisidir. Tetrasiklin, metronidazol ve bizmut subsalisilattan oluşan Helidac, *H. pylori*'yi antibiyotiklerle elimine etmenin yanı sıra, ülseri önlemek için bir asit blokerinin de beraberinde kullanılmasının içeren bir tedavi protokolüdür. Pylera® (Bizmut substrat potasyum + metronidazol + tetrasiklin) da benzer bir yaklaşımla üçlü kombinasyon içeren güncel bir ilaçtır. Ayrıca klaritromisin, amoksisilin ve proton pompası inhibitörü içeren Prevpac® *H. pylori* tedavisinde klinikte reçete edilen bir diğer kombinasyon ilaçtır (Chey ve Wong, 2007; Malfertheiner vd., 2007).

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından 2016 yılında “*Kronik Hastalıklarda Kullanılan Sabit Doz Kombine İlaçlara İlişkin Maliyet Değerlendirmesi ve Bütçe Etkisi Analizi*” yayımlanmıştır. Bu analize göre bazı kronik hastalıklarda, ilaçların kombine edilerek uygulanmasının; ‘*sabit doz oranlı kombine ilaç*’ ve ‘*kombine tedavi*’ olmak üzere iki farklı şekilde uygulandığı belirtilmiştir (TİTCK, 2016)..

TİTCK tarafından 30.12.2014 tarihinde yayınlanan *Detaylı İlaç Fiyat Listesi*'ndeki toplam 11.719 ilacın 2.187 (%18,66) tanesini sabit doz kombine ilaçlar oluşturmaktadır. Bu ilaçların 1.253 tanesinin (%57,29) aktif reçete edilebilir durumda olduğu, yani Türkiye’de ruhsatlı ve kullanımda olan ilaçlar olduğu, piyasada bulunduğu görülmektedir (TİTCK, 2016).

Sabit doz kombine ilaçlar ATC-1 gruplarına göre incelendiğinde sırasıyla en fazla B grubu (Kan ve Kan Yapan Organlar), C grubu (Kardiyovasküler Sistem), A grubu (Sindirim Sistemi ve Metabolizma), J grubu (Sistemik Kullanılan Antiinfektifler) ve R grubunda (Solunum Sistemi) buldukları görülmüştür. Hazırlanan raporda, sabit doz kombine ilaçların uygun durumlarda kullanılmasının, hasta uyumunu artırma, ayrıca tedavi maliyetini düşürme anlamında önemli bir etken olarak görüldüğü belirtilmiştir (TİTCK, 2016).

2.6. Doğal Ürünlerin Kombinasyonları

Her ne kadar bitkilerden izole edilen etken maddeler tedavide çok önemli bir yere sahip olsada, günümüzde ilaç piyasasındaki bitkisel ürünlerin çoğu ya bir bitkinin ekstresini, ya da birden fazla ekstrenin karışımını içermektedir. Bu durum tıbbi bitkilerin geleneksel kullanımlarıyla da ilgilidir. Tıbbi bitkiler ve doğal ürünler kullanılarak elde edilen tedavi edici etki çoğu zaman tek bir maddenin değil, birden fazla maddenin preparatta bulunması nedeniyle görülmektedir. Bu nedenle, bitkilerden aktif maddelerin

izolasyonu oldukça gelişmiş olsada, ekstrelerin ve doğal ürünlerin karışımlarının kullanımı hala oldukça popülerdir.

Modern konvansiyonel ilaçlar genelde tek etken madde ve tek bir sistem (reseptör, enzim vs) hedeflerken; kombinasyonlar içerdikleri birçok etken madde ile çoklu sistemleri hedeflemektedir. Bu bağlamda düşünüldüğünde uçucu yağlar ve diğer doğal ürünler içerdikleri zengin sekonder metabolitler nedeniyle doğanın bize sunduğu doğal kombinasyonlar olarak değerlendirilebilmektedir. Bu özellik aynı zamanda bitkisel ilaçları konvansiyonel ilaçlardan ayıran en önemli özelliklerindedir (Williamson, 2009).

Doğal ürünlerin birbirleri ile ya da sentetik ilaçlarla kombine etmenin çeşitli avantajları vardır. Bu avantajlar en temelde, ilacın taşınmasını kolaylaştırarak biyoyararlanımı arttırabilmelerinin yanı sıra, bir hücrenin biyolojik aktivite durumunu, transportu, geçirgenliği, efüks pompasını etkileyerek bakteriyel direnci, çoklu ilaç direnç mekanizması etkileyerek kanser ya da otoimmün hastalıkları tedavi etmek olarak sıralanabilmektedir (Williamson, 2009).

Kombinasyon oluştururken her zaman asıl amaç tedaviyi mümkün olan en düşük dozla yürütmek ve tedavinin advers etkilerini en aza indirmektir. Özellikle antimikrobiyal tedavide kombine tedaviler, monoterapilere göre direnç gelişiminin önüne geçilmesi ve dozun azaltılarak toksisitenin düşürülmesi avantajlarının yanı sıra, enfeksiyon etkeninin tam olarak bilinemediği durumlarda geniş bir antimikrobiyal spektrum sağlanması ve viral enfeksiyonlara eşlik eden bakteriyel enfeksiyonlar gibi bir çok hastalık ajanının bir arada bulunduğu durumlarda tek bir antimikrobiyal maddenin yetersiz kaldığı durumlarda tedavinin başarıya ulaşması alanlarında oldukça tercih edilmektedir.

Birden fazla bitkinin ya da bitkisel ürünün bir arada kullanılması yeni bir yaklaşım değildir. Bilinen en eski kombinasyonlardan biri, geçmişi çok eskilere dayanan bir ayurvedik karışım olan 'trikatu'dur. Trikatu, *Zingiber officinale*, *Piper nigrum* ve *P. longum* içermektedir. Karışımın içinde bulunan *Piper* türlerinin ana alkaloidi olan piperin, anti-enflamatuvar, antialerjik ve sindirim sistemi etkilerine sahiptir. Ayrıca diğer maddelerin emilimini de arttırdığı gösterilen çalışmalar mevcuttur. Piperin, P-glikoproteini modüle ederek hem bitkisel hem de sentetik ilaçların hücrelere akışını etkiler (Najar vd., 2010). Benzer düşünce tarzı ile bitkisel ürünler ve doğal maddeler etkinliği arttırmak amacıyla kombinlenebilmektedir. Örneğin antibiyotiklerin etkinliğini arttırmak için, antibiyotiklerin bakteriyel membranlar boyunca difüzyonunu iyileştirecek

ve/veya Gram negatif bakterilerde genel bir direnç mekanizması olan eflüks pompalarını engelleyecek yöntemler bulmanın gerekliliği daha önce belirtilmiştir (Bolla vd., 2011).

Kombinasyon oluşturulurken sinerji elde etmek için hedeflenen ana mekanizmalar şu şekilde sıralanabilir,

- Bileşiklerin bakteri hücreindeki farklı bölgeleri hedeflediği çoklu hedef etkisi,
- Çözünürlüğün veya biyoyararlanımın iyileştirilmesi gibi fizikokimyasal veya farmakokinetik etkiler,
- Bakterilerin spesifik bir direnç mekanizmasını hedeflemek (Hemaiswarya ve Doble, 2008; Wagner ve Ulrich-Merzenich, 2009)

Doğal ürünler ya da doğal bileşenler kullanılarak hedeflenen sinerji ispatlanması zorunlu bir kavramdır. Bu nedenle aslında pratikte bu kombinasyonların amacı her zaman için sinerji elde etmek değildir. Stabilitayı arttırmak, yan etkileri azaltmak, tedavi için gereken doza daha kolay ulaşmak da diğer hedefler arasında sayılabilmektedir (Heinrich vd., 2012).

Doğal ürünlerin ya da doğal etken maddelerin birbiri ile, ya da sentetik maddelerle kombinasyonları deneysel literatürde de sıklıkla yer almıştır. Geleneksel antimikrobiyal maddelerin çeşitli gıda kaynaklı patojenler üzerinde iyi terapötik etkileri olmasına rağmen, ilaca dirençli gıda kaynaklı patojenlerin gelişimiyle mücadele etmek için etkili antimikrobiyal maddelere olan ihtiyaç, uçucu yağlarla antimikrobiyallerin kombine edilmesine neden olmuştur. Uçucu yağlar mikroorganizmalar üzerinde çok hedefli inhibitör etkileri olduğundan, bunları ilaçlarla birleştirmenin ilaçların aktivitesini artırabileceği ve gıda kaynaklı patojenlerin ilaca direncinin ortaya çıkmasını önleyebileceği, mevcut antimikrobiyal maddelerin kombine kullanımlarının umut verici potansiyel yeni bir antibakteriyel tedavi olduğu belirtilmiştir (Ju vd., 2020).

Uçucu yağların antibiyotiklerle kombinasyonları konulu çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmalar incelendiğinde ve özetlendiğinde uçucu yağ ve uçucu bileşenler sayesinde beta-laktamaz üreten bakteriler, MRSA ve penisiline dirençli *S. aureus* ve çoklu ilaca dirençli *S. typhimurium* DT104 dahil olmak üzere, birçok dirençli suş, antibiyotiklere karşı duyarlı hale gelebildiği görülmüştür (Abulrob vd., 2004; Si vd., 2008; Lorenzi vd., 2009; Kollanoor vd., 2010; Orhan vd., 2011; Kon ve Rai, 2012; Langeveld, Veldhuizen ve Burt, 2014).

Ayrıca antimikrobiyal özelliğe sahip olmayan doğal bileşenlerin, antimikrobiyal özellikteki maddelerle kombinasyonları da ilginç sonuçlar verebilmektedir, *p*-sime'nin

karvakrol aktivitesi üzerindeki arttırıcı etkisi bu kombinasyonlara örnek olarak verilebilmektedir (Ultee vd., 2002).

Uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin kombinasyonlarda gösterdikleri etkiler hedef patojene ve kullanılan uçucu yağa göre değişmektedir. Örneğin timol ve karvakrol birlikte *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger* üzerinde sinerjik inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Guarda vd., 2011). Başka bir çalışmada ise tarçın ve karanfil uçucu yağları kombinasyonu *E. coli*'nin üzerine antagonist etkiye sahipken *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Yersinia enterocolitica* üzerinde sinerjik bir etki göstermiştir (Moleyar ve Narasimham 1992).

Uçucu yağların birbiri ile ve antibiyotiklerle kombinasyonları pazarda ve klinikte de yer bulmaktadır. *Eucalyptus* ve *Abies* uçucu yağlarını içeren bir ticari kombinasyon olan Coldmix®'in *in vitro* antiviral potansiyeli yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Başer vd., 2023).

Bitkisel ürünler ve doğal maddelerle yapılan kombinasyonlarda etkinin yanı sıra toksisitenin de dikkatlice değerlendirilmesi gerekmektedir. Sentetik ilaçların etkileşim profilleri bitkisel ilaçlara göre daha iyi bilindiği için etkileşime neden olabilecek sentetik ilaçların kullanan hastalar etkileşime neden olabilecek ilaçları ve gıda maddelerini kullanmamaları hakkında uyarılmaktadır. Ancak bitkisel ilaçların mekanizmaları ve etkileşim profilleri üzerine yapılmış çalışmalar sentetik ilaçlar kadar fazla değildir. Bu nedenle bitkisel ürünlerle yapılan kombinasyonları içeren çalışmalarda toksisite profilinin ve etki mekanizmasının araştırılması, literatüre katkı sağlayarak akılcı tedavilerin önünü açabilecektir.

2.7. Tez Kapsamındaki Biyolojik Aktivitelerle İlgili Genel Bilgiler

2.7.1. Antimikrobiyal aktivite

Mikrobiyal ajanların sebep olduğu hastalıklarla mücadele için geliştirilen antibiyotiklere ve antivirallere karşı gelişen direnç son yıllarda küresel bir sorun haline gelmeye başlamıştır. Söz konusu direnç ile mücadelede yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılmasının yanı sıra aynı anda birçok farklı mekanizmayı hedefleyen kombine tedavilere yönelim de söz konusu olmuştur. Bitkilerin sahip olduğu sekonder metabolitlerin çeşitliliği, yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılmasında tıbbi bitkileri

ve tıbbi bitkilerden elde edilen farmakope kalitesindeki materyalleri hedef noktası haline getirmiştir.

Yapılan çalışmalar antibiyotikler ve uygun konsantrasyondaki uçucu yağların kombinasyonunun, çoklu ilaca dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir adım olabileceğini göstermektedir (Kon ve Rai, 2012).

Tez projesi çalışması kapsamında *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerin tespiti için mikrodilüsyon, kombinasyon çalışmalarında ise dama tahtası yöntemi kullanılmış ve yöntemler kısaca özetlenmiştir.

2.7.1.1. Dilüsyon testleri

Belirli bir bakteri izolatına karşı bir antimikrobiyal maddenin *in vitro* aktivitesini kantitatif olarak ölçmek için kullanılan testlerdir. Dilüsyon testleri ile MİK ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenir.

Dilüsyon testleri kullanılarak elde edilen MİK değerleri, enfeksiyona sebep olan mikroorganizmayı tedavi etmek için enfeksiyon bölgesinde gerekli olan antimikrobiyal madde konsantrasyonu hakkında bilgi vermesine rağmen kesin değerler değildir. Gerçek MİK organizmanın büyümesini engelleyen en düşük konsantrasyon ile bir sonraki en düşük konsantrasyon arasında bir yeredir. Yani iki katlı seri dilüsyon ile elde edilen MİK, kendi değeri ile kendi değerinin yarısı arasında bir değerdir. Bu nedenle deneyler kontrollü koşullarda gerçekleşse bile her zaman aynı MİK değeri elde edilmeyebilir (CLSI, 2012).

Test edilecek numune uygun koşullarda çözülür ve mikroplakalarda konsantrasyonu yarıya düşecek şekilde seyreltilerek eklenir. Belirli sayıda mikroorganizma içeren, standart besiyeri mikroplakalara eklenir. Mikroorganizma türlerine göre $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda üreme kontrolü yapılarak bulanık olan kuyucuklar mikroorganizmanın ürettiği kuyucuklar kabul edilerek, ayrıca tetrazolium tuzları ile renklendirme yapılarak, bulanıklığın olmadığı en küçük konsantrasyon MİK konsantrasyonu olarak belirlenir (CLSI, 2012).

2.7.1.2. Kombinasyon çalışmaları

Dama tahtası yöntemi, iki farklı test materyalinin çeşitli konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının aynı anda test edilmesine olanak sağlar (Horrevorts vd., 1987; Hsieh vd., 1993).

Dama tahtası yöntemi sonunda fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon (FİK) hesaplanır.

$FİK X = X$ 'in kombinasyondaki MİK değeri / X 'in tek başına MİK değeri

$FİK Y = Y$ 'nin kombinasyondaki MİK değeri / Y 'nin tek başına MİK değeri

Kombinasyonda yer alan her bir test materyalinin FİK değerlerinin toplanması ile FİK indisi (FİKİ) hesaplanır;

$FİKİ = FİK X + FİK Y$

FİKİ değerlerine göre kombinasyonlar 4 şekilde değerlendirilir:

- I. $FİKİ \leq 0.5$:** Sinerjik etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında, tek başlarında kullanıldığından elde edilen etkilerin toplamından daha fazla etki elde edilmesidir (örn.: $1 + 1 > 2$).
- II. $0.5 < FİKİ \leq 1$:** Aditif etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında elde edilen etkinin, tek başlarına kullanıldığında elde edilen etkiler toplamına eşit olmasıdır (örn.: $1 + 1 = 2$).
- III. $1 < FİKİ < 4$:** Bağımsız etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında elde edilen sonucun en etkili test materyalinin tek başına kullanıldığında elde edilen sonuçtan farksız olmadığı durumlardır (örn.: $1 + 1 = 1$).
- IV. $FİKİ \geq 4$:** Antagonist etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında elde edilen etkinin, test materyallerinin tek başına yaptığı etkiden daha az olması durumudur (örn.: $1 + 1 = < 1$) (Berenbaum, 1978; Horrevorts vd., 1987; Van Vuuren vd., 2009).

2.7.2. Enzim inhibisyon testleri

Antiviral tedavilerin çeşitlendirilmesi, yeni ve etkili antiviral maddelerin bulunması ve antiviral tedavilerin başarılarının artırılması tüm dünyada ilgi çeken bir araştırma konusudur. Virüslerin canlı hücrede çoğalmasını önleyebilecek ilaçların sınırlı olmasının yanı sıra, temasla çoğalmasının en hızlı ve yüksek büyüme oranına genellikle klinik semptomlar ortaya çıkmadan önce ulaşması, çoğalırken konak hücrelerin yapı taşlarını kullanması ve bu nedenle ayırt ediciliklerinin az olması antiviral tedavilerin yan etkilerini

arttıran noktalardır. Ayrıca antiviral ilaçlara direnç gelişmesi de klinikte çok karşılaşılan bir diğer önemli sorundur. Söz konusu sorunların aşılmasında zengin kimyasal çeşitliliğe sahip sekonder metabolitleri ile doğal kaynaklar önemli bir hammadde kaynağı oluşturmaktadır.

2.7.2.1. Antiviral enzim inhibisyon mekanizmaları

Virüslere karşı etkili ve güvenli antiviral ilaçların geliştirilmesi, virüslerin hem yaşamsal faaliyetlerini sürdürme hem de çoğalma için konak hücre ile benzer mekanizmaları kullanması nedeniyle oldukça zordur. Virüs yaşam döngüsünde gerekli ancak konak hücrenin fonksiyonlarında gerekli olmayan fonksiyonların saptanarak, bu fonksiyonlara yönelik *in vivo*, *in vitro* ve *in silico* etki saptama çalışmaları yürütülmektedir.

Örneğin SARS-CoV2 virüsünün yaşam döngüsü ele alındığında; viral yapıyı, konak hücre ile penetrasyonu, çoğalmayı ve immunojeniteyi belirleyen viral genom tek sarmallı RNA'dan oluşmaktadır. Virüs, viral yapı için zarf proteini ve nükleokapsit proteini üretirken, viral replikasyon için, Kemotripsin Benzeri Proteaz (CLPro) olan Ana Proteaz (MPro), Papain Benzeri Proteaz (PLPro), Helikazlar ve RNA'ya yönelik RNA Polimeraz (RdRp)'a ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca Spike Proteini (S), konakçı hücre reseptörü olan Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2) ile etkileşime girerek konakçı hücre penetrasyonu için hayati öneme sahiptir (Chapman ve Andurkar, 2022).

SARS-CoV2' nin neden olduğu pandemi süresince çeşitli mekanizmalara ait birçok ilaç tedavi protokollerinde yer almış, etkinlikleri denenmiştir. Polimeraz inhibitörleri (remdesivir, favipiravir), proteaz inhibitörleri (lopinavir ve nirmatrelvir) nükleosit ve nükleosit revers transkriptaz inhibitörleri (azvudin, molnupiravir), giriş ve vakuolden kurtulma (uncoating) inhibitörleri (amandatin) ve diğer antimikrobiyal (azitromisin, hidroksiklorokin ve klorokin) bu tip ilaçlara örnek olarak gösterilebilmektedir (Yuan vd., 2023).

Doğal kaynaklı maddelerin SARS-CoV2'ye karşı potansiyel etkileri araştırılırken *in silico* yöntemlere sıklıkla başvurulmuş ve benzer mekanizmalar hedeflenmiştir:

Mpro inhibitörleri: Hiperisin, rosmarinik asit ve rutin gibi bir çok doğal maddenin Mpro inhibe edici etkisi moleküler kenetleme ile çalışılmış ve *in vitro* deneyler ile potansiyel etkileri valide edilmiştir (Das vd., 2021; Majumder ve Mandal, 2022; Shahhamzehei vd., 2022; Shree vd., 2022).

Spike protein inhibitörleri: Kersetin ve kemferol gibi doğal kaynaklı etken maddelerin yanı sıra apiterapide sıklıkla kullanılan propolisin içerdiği maddelerin spike proteine bağlanma enerjileri ve stabiliteleri *in silico* tekniklerle çalışılmış anlamlı bağlanma enerjileri elde edilmiştir (Harisna vd., 2021; Pandey vd., 2021).

Rdrp inhibitörleri: Teaflavin, hesperidin ve mirsetin gibi polifenollerin RdRp'ye bağlanma enerjileri çalışılmış, moleküler dinamik simülasyonlar, sabit etkileşimler olduğunu göstermiştir (Ogunyemi vd., 2020; Singh vd., 2021).

ACE2 inhibitörleri: İzotimol, kateşin ve kurkumin gibi doğal bileşenlerin ACE2 bağlanma enerjileri test edilmiştir (Abdelli vd., 2021).

Dönemsel epidemilere neden olabilen influenza virüsü için de nöraminidaz inhibisyonu önemli bir yer tutmaktadır. Nöraminidaz inhibitörleri, yalnızca influenza A'ya karşı aktivite gösteren M2 blokerlere kıyasla influenza A ve B'ye karşı geniş kapsamlı aktivite gösterdikleri, ayrıca aktif bölgedeki yüksek düzeyde korunmuş kalıntının varlığı nedeniyle antiviral tedavi oldukça tercih edilen bir hedefdir (Burmeister vd., 1992; Kobasa vd., 1999; Gubareva, 2004). Piyasada bulunan ve klinikte kullanılan influenza ilaçlarının mekanizmaları nöraminidaz inhibisyonuna dayanmaktadır.

Tez çalışmasında belirlenen uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin antiviral etki potansiyellerini öngörebilmek için anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) ve nöraminidaz (NA) enzim inhibisyonları *in vitro* ve *in silico* olarak test edilmiştir.

2.7.2.2. Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2)

ACE2 damar daralttırıcı olan anjiyotensin 2 hormonunu anjiyotensin (1-7)'ye hidrolizinin hızlandırarak kan basıncının düşmesini sağlar. Bu nedenle kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ilaç hedefi olarak kullanılmaktadır.

Aynı zamanda bazı koronavirüslerin hücrelere girişinde hücre reseptörü olarak rol oynamaktadır. Korona virüslerin dış membran S proteinleri konak hücredeki adhezyon faktörleri, Ezrin, CD26, ACE2 ve siklofilin reseptörleri gibi spesifik hedeflere bağlanmayı sağlayan ana proteinlerdir (Li vd., 2003; Kuba vd., 2005).

HeLa hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, SARS-CoV2'nin ACE2 eksprese etmeyen hücrelere girmediği ancak ACE2 eksprese eden hücrelere girebildiği gösterilerek SARS-CoV2'nin de ACE2 reseptörlerini kullandığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada SARS-CoV2'nin diğer aminopeptidaz N ve dipeptidil peptidaz 4 gibi

diğer koronavirüs reseptörlerini kullanmadığı gösterilmiştir (Zhou vd., 2020). Bu anlamda ACE2 konak hücrelerin üzerinde bulunan ve koronavirüslerin hücreye girişinde anahtar rol oynayan bir enzimdir ve ACE2 enzimini bloke etmek antiviral ilaçlar için bir hedef noktası olarak düşünülebilir.

Doğal kaynaklı maddelerin ACE2 inhibisyonları üzerine çeşitli çalışmalar yapılmış olup, emodin, luteolin, kamferol, kersetin, apigenin, linalool, kafur, mentol gibi doğal maddelerin ACE2 inhibisyonu yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (Loizzo vd., 2007; Ho vd., 2007; Sui vd., 2010; Demirci vd., 2021; Biltekin vd., 2022).

2.7.2.3. Transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2)

Transmebran proteaz serin 2, serin proteaz aktivitesine sahip transmebran proteinlerinden biridir. İnsanda TMPRSS2 geni ile kodlanır. Akciğer ve prostat epitel hücrelerinin hücre membranlarında bol miktarda bulunur, ayrıca kalp, karaciğer ve gastrointestinal sistemde de yer alır.

TMPRSS2 genindeki mutasyonlar prostat kanseri ile sonuçlanabilir. Bu nedenle prostat kanseri tedavisinde bir hedef moleküldür.

Ayrıca TMPRSS2, koronavirüslerin ve influenza A virüslerinin neden olduğu viral enfeksiyonların yayılmasında önemli rol oynayan bir konak proteindir (Matsuyama vd., 2010).

SAR-CoV-2 pandemisinde antiviral ilaçların geliştirilmesi ve aşılar konusunda çalışılırken birçok hedef belirlenmiştir. Bu hedeflerden başlıcaları koronavirüs ana proteazı (3CLpro/Mpro) (Jin vd., 2020), papain benzeri proteaz (Plpro) (Li ve De Clercq, 2020), RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp), anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) (Han ve Král, 2020) ve viral spike glikoprotein S (S protein) (Robson, 2020) olarak sıralanabilir. TMPRSS2 de bu hedeflerden birisidir (Hoffmann vd., 2020; Li ve De Clercq, 2020).

Koronavirüslerin konak hücreye girişi, CoV spike proteinlerinin reseptör tanıma ve membran füzyon fonksiyonları aracılığı ile gerçekleşir. Son çalışmalar ACE2 ve TMPRSS2'nin SAR-CoV-2'nin konak hücrenin içine girmesi için tutunmasında hayati öneme sahip olduğunu göstermiştir (Hoffmann vd., 2020; Zhou vd., 2020). Virüs, spike proteininin (S), reseptör bağlayan S1 ünitesini kullanarak ACE2'yi tanır ve konak hücrenin reseptörü olarak ona bağlanır. TMPRSS2 ise, S proteinini S1/S2 ve S2

bölgelerine parçalayarak virüs ile hücre zarının kaynaşmasını ve virüsün yayılmasını kolaylaştırır (Glowacka vd., 2011; Hoffmann vd., 2020).

Başka bir bağımsız mekanizmada, TMPRSS2, insan hava yolu tripsin benzeri proteaza ek olarak ACE2'yi bölerek koronavirüsün konak hücrelere yayılmasını kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Heurich vd., 2014).

TMPRSS2'nin, konağın gelişim basamaklarında ya da normal fizyolojisinde (homeostaz) için önemli bir protein olmadığı ve fareler üzerinde yapılan deneylerde konağın etkilenmediği görüldüğünden SARS-CoV2 pandemisinde önemli bir ilaç hedefi haline gelmiştir (Kim vd., 2006; Hoffmann vd., 2020).

TMPRSS2 inhibisyonunun önem kazanmasıyla birlikte, pankreatiti tedavi etmek için kullanılan geniş spektrumlu bir serin proteaz inhibitörü olan kamostat mesilat, COVID-19'un tedavisi için klinik bir aday olarak yeniden değerlendirilmiştir (Wong ve Damania, 2021; Shapira vd., 2022). Kamostat mesilatın COVID-19 hastalarının tedavisinde kullanımının incelendiği çift kör randomize kontrollü klinik çalışma mevcuttur (Gunst vd., 2021). Yüksek TMPRSS2 inhibisyonuna rağmen kamostat mesilattan istenilen verim alınamamış bu nedenle COVID-19 tedavisinde etkili bir ajan olamamıştır. Ancak TMPRSS2 inhibisyon testlerinde kabul edilen standart olarak halen kamostat mesilat kullanılmaktadır.

Özetle, TMPRSS2, insan solunum ve gastrointestinal sistemin epitel hücrelerinde eksprese edilir. Membran füzyonunu başlatan spike proteini parçalayabilen, ekstraselüler proteaz alanına sahiptir. TMPRSS2'nin fazla eksprese edilen hücrelerinin viral girişe daha çok açık olduğunu ve tripsin benzeri serin-proteaz inhibitörü ilaçların (örn: kamostat) virüslerin hücreye girişini kısıtladığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Kawase vd., 2012; Uno, 2020). TMPRSS2 nin proteaz aktivitesi viral girişte etkili olan antivirallerin terapötik etkinliğini değerlendirmek üzere önerilmiştir (Bertram vd., 2012; Strobe vd., 2020).

2.7.2.4. Nöraminidaz (NA)

Sialidaz olarak da bilinen nöraminidaz (NA), polisakkarit zincirleri üzerindeki terminal sialik asit kalıntılarını hidrolize eden bir enzimdir. Ağırlıklı olarak bakteri ve virüsler gibi mikroorganizmalarda eksprese edilir. Sialik asit kalıntılarının nöraminidaz tarafından bölünmesinin, influenza virüslerinin neden olduğu enfeksiyonlarda mukozal astarların penetrasyonuna, hedef hücrelerin istilasına, enfekte hücrelerden projeni

virüslerin elüsyonuna ve kendi kendine agregasyonun önlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Nöraminidaz, influenza virüslerinin 3 yüzey proteininden biridir replikasyon sonrası oluşan yeni virüslerin hücre yüzeyinden salınmasını sağlar. Nöraminidaz inhibitörleri konak hücrede oluşan yeni virus partiküllerinin saçılımını engelleyerek antiviral etki gösterirler. İnflüzanın tedavisinde ve korunmasında M2 inhibitörleri (adamantanlar) ve nöraminidaz inhibitörleri (oseltamavir) kullanılmaktadır. Hidrojen iyon akışını etkileyerek virüsün kılıfından çıkmasını engelleyen M2 inhibitörleri nispeten ucuzdur. Ama sadece influenza A üzerine etkilidir. Ayrıca virüsler hızlıca direnç geliştirebilir (Takeda vd., 2002). Günümüzde yaygın olan influenza A virüsü H3N2 ve domuz gribi olarak adlandırılan H1N1 virüsleri, M2 inhibitörlerine karşı direnç geliştirmiştir. Bu nedenle klinikte daha çok nöraminidaz inhibitörleri özellikle de oseltamavir tercih edilmektedir (Kim vd., 2006; Mckimm-Breschkin, 2013). Oseltamavir, aktif formuna (oseltamavir karboksilat) karaciğerde dönüşen bir ön ilaçtır.

İnfluenza virüs nöraminidazının iyi bir ilaç hedefi olmasının ve direnç konusunda daha güvenli olmasının sebebi, bu yapının aktif bölgesinin iyi korunması, virüs alt tiplerinde N proteini farklılık gösterse bile enzimin iç kısmında kalan aktif bölgesinin değişiklik olmamasıdır (Colman vd., 1983). Bu nedenle nöraminidaz inhibisyonu antiviral ilaç geliştirmede iyi bir hedef olarak düşünülmektedir.

2.7.3. Toksikite testleri

Tanı ve tedaviye yönelik yeni maddeler araştırılırken etkililik, güvenilirlik ve kalite basamakları göz önünde bulundurulduğundan etkinliğin yanı sıra toksisite testleri de söz konusu araştırmalarda önemli yer tutmaktadır. Toksikite testleri *in vitro*, *in silico* ya da *in vivo* olarak yürütülebilir. İlaç tasarımı ve geliştirilmesinde potansiyel etkin maddenin önce toksik olmaması ve hedefe yönelik seçici (selektif) olması elzemdir (Williams, 2013; Zavod ve Knittel, 2013).

2.7.3.1. *In vitro* toksisite testleri

Sitotoksikite çeşitli biyokimyasal olaylar sonucunda hücre fonksiyonlarının aksamaya uğraması ve sonuç olarak hücrelerin fonksiyonlarında ve yapısında hasarlar oluşması ve bu hasarların ölçülmesi demektir.

Sitotoksik testlerin temeli, sitotoksositeye sebep olan moleküllerin *in vitro* ortamda canlı organizma ile akut maruziyeti sonucunda etkin dozun çeşitli sağ kalım/ölüm yüzdelerinin hesaplanması, IC₅₀, ID₅₀ gibi çeşitli sitotoksik belirteçlerin ortaya koyulmasına dayanmaktadır. Genellikle hücre kültürü ortamında yapılan bu testler sonucunda canlı kalan hücreler ve ölen hücreler oranlanarak toksisite verilerine ulaşılabilmektedir.

In vitro toksisite testleri, enzim aktivitesi, hücre zarı geçirgenliği, hücre yapışması, ATP üretimi, ko-enzim üretimi ve nükleotid alım aktivitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır.

1983'te Mosmann tarafından geliştirilen 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi de bir sitotoksosite tarama yöntemidir ve yaşayan hücrelerin tespitinde hem hücre kültüründe hem doku kültüründe sıkça kullanılmaktadır. Kolorimetrik yöntemler arasında yer alan MTT yöntemi, tetrazolyum tuzunun metabolik olarak indirgenmesine dayanmaktadır.

Canlı hücrelerde mitokondriyal zarın iç yüzeyinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi sayesinde sarı renkli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür tuzu formazan kristallerine dönüşmektedir. Formazan kristalleri mavi renklidir ve suda çözünmezler, dimetilsülfoksit (DMSO) ya da izopropil alkol gibi organik çözücülerde çözünürler. Oluşan formazan kristallerinin çözdürülmesi ile oluşan renk spektrofotometre ile kolorimetrik olarak ölçülür. Uygulama yapılmayan hücrelerdeki canlılık %100 kabul edilerek ilgili kıyaslamalar yapılır. MTT testi herhangi bir maddenin hücresel canlılığa olan etkisinin mitokondriyal etkinlik aracılığıyla ölçüldüğü, güvenilir, hızlı, tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntemdir (Mosmann, 1983).

2.8. Yapay Zeka Uygulamaları ve *In Silico* Araştırmaların Farmakognozideki Yeri

İlaca giden yolda aday moleküllerin öncelikle etkililik, güvenlik ve kalite basamaklarını tamamlaması beklenmektedir. Farmakognozi bilimi doğal kaynakların etkilerini, bu kaynakların kullanımlarını ve bu kaynaklardan ilaç etken maddesi izole edilmesini ya da standardize ekstre ve uçucu yağ elde edilmesini ele alan, tıp dünyasına yeni tedavi ajanları kazandıran değerli bir bilimdir. Doğal kaynaklar sahip oldukları zengin sekonder metabolitleri ile ilaç adayı olabilecek sayısız kimyasal maddeyi içinde barındırırlar. Ancak bu aday moleküllerin ilaca giden yoldaki ilk basamak olan etkililik basamağında test edilmesi oldukça zaman alan ve maliyetli bir iştir. Günümüzde

kullanımı giderek yaygınlaşan *in silico* teknikler sayesinde ilk kriter olan moleküllerin etkililiği yanı sıra ikinci kriter olan güvenliği de zaman ve maliyet sorunlarına takılmadan araştırılabilmektedir.

'*In silico*' terimi bilgisayar sistemlerinde kullanılan silikona atıfta bulunarak bilgisayar ortamında tahmini olarak gerçekleştirilen deneyleri anlatmak için kullanılmaktadır. 'Silikonda' yani 'bilgisayarda' veya 'bilgisayar simülasyonunda' anlamına gelmektedir. İlaç moleküllerinin dizaynı, aday moleküllerin değerlendirilmesi, moleküler modelleme, toksisite taraması gibi büyük zaman ve maliyet gerektiren ön eleme testleri büyük ölçüde *in silico* ortamda gerçekleştirilmektedir (Shaker vd., 2021).

2.8.1. *In silico* aktivite çalışmaları

In silico aktivite çalışmaları genellikle *in silico* kenetleme çalışmaları ile yapılmaktadır. *In silico* kenetleme çalışmaları, moleküler modelleme, moleküllerin davranışlarını modelleyerek onları taklit/simüle etmek için kullanılan tüm hesaplama yöntemleri ve teorik teknikleri kapsamaktadır (Mukesh ve Rakesh, 2011).

Moleküler modelleme, molekülleri oluşturmak ve kimyasal özelliklerini ve davranışlarını tahmin etmek için bu moleküller üzerinde çeşitli hesaplamalar yapmak için bilgisayarların kullanımını tanımlamak için kullanılan genel terimdir.

Moleküler kenetleme/yerleştirme ise genellikle bir protein (reseptör) ve ligandın kovalent olmayan bağlanmasını, etkileşimlerini, bağ enerjilerini verimli bir şekilde tahmin etmeye çalışan bir hesaplama yöntemidir. Moleküler kenetlemede asıl amaç küçük moleküllerin daha büyük moleküllere, yani proteinlere bağlanma şeklinin, bağlı konformasyonların ve bağlanma afinitesini tahmin etmektir. Bu tahmin sayesinde ilaç aday molekülleri hızlıca taranabilmektedir (Trott ve Olson, 2010).

Moleküler kenetlemenin temeli ligand ve reseptör eşleşmesinin hesaplamalı olarak simüle edilmesidir. Tüm sistemin serbest enerjisinin en aza indirilmesini hedef alan moleküler yerleştirme bunu hem proteinin hem de ligandın optimize edilmiş bir konformasyonda birbiri ile göreceli oryantasyonu sağlayarak yapmaktadır (Mukesh ve Rakesh, 2011). Kenetleme işleminin yapılabilmesi için proteinin ve ligandın moleküler yapısının belirlenmiş olması gerekmektedir.

Moleküler kenetleme işlemi birçok ücretli ve ücretsiz yazılımla yapılabilmektedir. Programlar matematiksel hesaplamalara ve tahminlere dayalı olduğu için hesaplamalarda

yönteme dayalı küçük farklılıklar olsa da sonuçların değerlendirilmesi adına genel yorumlar çoğu zaman tutarlıdır.

Moleküler kenetlemede kullanılacak proteinlerin yapılarına internet üzerinden çeşitli siteler aracılığıyla ulaşılabilmektedir. Protein data bank (<https://www.rcsb.org/>) internet sitesi de bu sitelerden biridir ve ücretsiz şekilde proteinlerin yapılarını ve proteinlerle ilgili bilgileri araştırmacılara sunmaktadır. Araştırılan ligandların yapılarının da belirli formatta olması gerekmektedir. Ligandlara ilişkin bilgilere kolaylıkla ulaşılabilen ücretsiz internet sitesi pubchem veri tabanından (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) tez projesi araştırması sırasında yararlanılmıştır.

2.8.2. *In silico* farmakokinetik özelliklerin tespiti ve toksisite testleri

Klinik araştırmalarla denenen ilaçların çoğu etkinlik azlığı ve yan etkiler nedeniyle piyasaya sürülmemektedir (Kola ve Landis, 2004). İlaç geliştirmede sürecinde, etkinlik, güvenlik ve farmakokinetiğin en üst düzeye çıkarmak için ilaç benzeri özelliklerin incelenmesi ve optimize edilmesi oldukça önemlidir. Birçok erken aşama ilaç keşif programı, ilgilenilen hedefe bağlanan molekülleri tanımlamaya odaklanır. Elbette moleküllerin potansi (etkileri) bu erken aşamalarda önemli bir faktör olsa da sonuçta farmakokinetik ve toksisite özellikleri, terapötik olarak etkinliğini ve başarısını arttırmayacağını belirler. Sonuç olarak bir molekülün farmakokinetik özellikleri ve güvenliği, onun ilaç olma yolundaki yolculuğunun belirleyici ölçütlerinden biridir.

Farmakokinetik, toksisite ve potens arasındaki etkileşim etkili ilaçlar için çok önemlidir. Yeni bir ilacın terapötik hedefe optimal bağlanma özellikleri çok önemli olmakla birlikte, fizyolojik etkiyi güvenli bir şekilde oluşturmak için hedef bölgeye yeterli konsantrasyonlarda ulaşabilmesinin kliniğe uygulanması için esastır. Absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon ve toksisite (ADMET) özelliklerinin öneminin anlaşılması, erken aşamadaki ilaç geliştirmede bunların dikkate alınmasına yol açmış ve zayıf ADMET özellikleri nedeniyle klinik deneylerde başarısız olan bileşiklerin sayısında önemli bir azalma sağlamıştır (Eddershaw vd., 2000; Merlot, 2010).

Bileşiklerin kimyasal yapılarından farmakokinetik ve toksisite özelliklerini tahmin etmeye yönelik pek çok *in silico* yaklaşım geliştirilmiştir. Veriye dayalı yaklaşımlar olan kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR) (Obrezanova vd., 2007), benzerlik araştırmaları (Fröhlich vd., 2006) ve 3 boyutlu QSAR (Lill, 2007) in yanı sıra ligand-protein kenetleme

(Moroy vd., 2012) ve farmakofor modelleme (Guner ve Bowen, 2013) gibi yapı tabanlı metotlar söz konusu *in silico* yöntemlere örnek olarak gösterilebilmektedir.

İlaç adayı moleküllerin fizikokimyasal özellikler değerlendirilirken yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan birisi Lipinski'nin 5 kuralı veya yüksek verimli taramalarda yanlış pozitif sonuçlar veren bileşiklerin elendiği PAIN (Pan-assay interference compounds) filtreleridir (Lipinski vd., 2001; Baell ve Holloway, 2010).

Lipinski'nin 5 kuralı çözünürlük ve geçirgenlikle ilgili hesaplamalara dayanan bir tahmin sunmaktadır. Söz konusu kriterlere göre, ilaç adayı olan molekül eğer;

- 5 hidrojen bağından fazla vericiyse,
- 10 dan fazla hidrojen bağı alıcısıysa,
- Molekül ağırlığı 500 den büyükse,
- LogP (ClogP) 5 den büyükse (ya da MlogP 4.15'den büyükse),
- Molar kırılma değerleri 4-130 arasında değilse

düşük absorpsiyon ve geçirgenliğe sahip olduğunu tahmin etmektedir.

Lipinski kurallarında yer alan belli başlı kriterlere göre moleküllerin ilaç olma kapasiteleri hakkında tahmin yürütülmesi aday moleküllerin elenmesi anlamında önemli olsa da kimi zaman bu kuralların dışında olan ancak klinik açıdan önemli olan ilaçlar da keşfedilmektedir. Dolayısı ile aday molekülleri sadece bu kurallarla değerlendirmek yetersiz kalabilmektedir. Ming-Qiang ve Barrie, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) onaylı oral ilaçların sadece %51'inin Lipinski'nin 5 kuralına uygun olduğunu, parenteral ilaç geliştirme ve doğal kaynaklı ilaçlar ve yarısentetikler söz konusu olduğunda Lipinski'nin 5 kuralının kapsayıcılığının azaldığını belirterek bu konuya dikkat çekmişlerdir (Zhang, ve Wilkinson, 2007).

Bu nedenle sadece Lipinski kuralları değil, aday moleküllerin erken aşamada ADMET profillerinin çıkartılması, ilaç geliştirme sürecinin bir basamağı olarak engetre edilmesi yeni bir bileşiğin potansiyel başarısı değerlendirilirken daha akılcı olacağı önerilmiştir (Pires vd., 2015).

Küçük moleküllerin farmakokinetik özelliklerinin saptanması için kullanılan hayvan modelleri her zaman insan ile aynı sonuçları vermeyebilir ve doğru bir ölçekleme olarak kabul edilemeyebilir. Bu noktada farmakokinetik özelliklerin saptanması için harcanacak olan zaman, emek ve kaynak tasarrufu da düşünülerek hesaplamalı verilere dayanan farmakokinetik özellikleri tahmin eden yazılım tabanlı sistemlerin ilaç geliştirmede kullanılmasının önemlidir (Cumming vd., 2013).

Toksisite testleri yeni ilaç keşfetme süreçlerinde zaman alıcı ve maliyetli testleri içinde barındırır. Toksisite, yeni moleküllerin yanı sıra hali hazırda ruhsat almış ilaçların da başarısızlığına neden olabilen bir faktördür (Waring vd., 2015).

İlaç geliştirme çalışmalarında, etkinlik ve toksisite açısından kriterleri sağlayan birçok madde farmakokinetik özellikleri ve zayıf biyoyararlanımları nedeniyle elenmek zorunda kalmaktadır (Kubinyi, 2003). ADMET bir bileşiğin farmakokinetik profilini içermekte ve farmakodinamik aktivitelerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İlaç geliştirmede zayıf farmakokinetik özellikler önemli bir engel teşkil etmektedir.

Bu nedenle moleküllerin farmakokinetik özelliklerinin ve toksisite profillerinin *in silico* değerlendirilmesine olan eğilim giderek artmaktadır. Bu testler sayesinde moleküllerin farmakokinetik özellikleri ve toksisite profilleri tahmin edilerek aday moleküller arasında ön elemelerin yapılması kolaylaşmaktadır. Doğal kaynaklardan elde edilen moleküllerin farmakokinetik özellikleri değerlendirilerek bu bileşiklere benzer yeni bileşikler sentezlenerek aktiviteleri değerlendirilebilir ya da bileşiklerin diğer türevlerine yoğunlaşılabilir.

Grafik tabanlı *in silico* yöntemlerle (örn: PkCSM) ile moleküllerin özellikleri araştırılırken öncelikle atomları ve bağları sezgisel olarak tahmin edilmektedir. Bu tahminde matematiksel hesaplamalardan yararlanılmaktadır. Örneğin toksisite araştırmasında, bir molekülün toksifor grubunun aranmasının mutajenite tahminindeki önemi daha önce gösterilmiştir (Kazius vd., 2005). Ayrıca moleküllerin kimyasal yapıları göz önüne alınarak yapılan alt grafik madenciliği, grafik çekirdekleri ve bütün bunlardan ortaya çıkan bilgilerle bir örüntü oluşturulmaktadır. Ayrıca deneysel verilerden elde edilen ADMET bilgileri makine öğrenmesi ile sisteme işlenerek daha sonra kullanım için hazır bulundurulmaktadır.

PkCSM aracılığı ile yapılan ADMET analizlerinde ilk olarak molekülün toksifor parmak izi, atomik farmakofor frekans sayımı ve lipofilite (log P), moleküler ağırlık, yüzey alanı, dönebilen bağların sayısı dahil olmak üzere genel moleküler özellikler hakkında veriler elde edilmektedir (Pires vd., 2015). Toksifor gruplar ve Ames toksisitesi Kazius ve diğerlerinin 2005 yılında yayınladığı çalışma eksen alınarak yorumlanmaktadır (Kazius vd., 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Materyaller ve Kimyasal Maddeler

Bu bölümde deneysel çalışmalarda test materyali olarak kullanılan uçucu yağlar ve uçucu bileşenler, standart antimikrobiyal maddeler, kimyasallar ve besiyerleri ticari kaynaklardan belirtilen saflık ve kalitelere temin edilmiştir.

3.1.1. Uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenleri

Origanum onites L., *O. minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis, *O. vulgare* L., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus globulus* Labill., uçucu yağları Doallin Ltd., İstanbul firmasından temin edilmiştir.

Saf madde olarak kullanılan karvakrol (%99), 1,8-sineol (%99), timol (≥ 99.0) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Standart antibakteriyel ilaç etken maddeleri

Kombinasyon çalışmalarında ve standart antimikrobiyal kontrol maddeleri olarak kullanılan Standart Farmakope kalitesindeki siprofloksasin ve ampisilin Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kimyasal maddeler ve çözücüler

Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer kimyasal maddeler Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

Kimyasal Madde	Markası
Anjiyotensin 2 dönüştürücü enzim (ACE2) inhibisyon tarama kiti	Biovision K-310
Columbia II Agar	Neogen
Dimetilsülfoksit	Honeywell
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – low glucose	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
L-Glutamine 200mM	Thermo Fisher Scientific
MTT [3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolyum bromür]	Serva
Mueller Hinton Broth	Liofilchem
Nöraminidaz aktivite kiti	Sigma MAK 121-1KT
PBS (Fosfat tamponlu tuz)	Gibco™
Penisilin-Streptomisin 10,000U/mL	Thermo Fisher Scientific
TMPRSS2 Florojenik aktivite kiti	BPS Bioscience 78083
Tween 80	Merck

3.2. Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Adı	Markası
Analitik terazi	Mettler Toledo
Bakteriyolojik inkübatör	n-Biotek
CO2 inkübatörü	Escoglobal
Çoklu santrifüj	BOECO Germany
Gaz-Kromatografisi	Agilent 6890 N GC
Gaz-Kromatografisi / Kütle Spektroskopisi	Agilent 5975 GC-MSD
Hücre kültürü kabini- Sınıf 2 Biyolojik güvenlik kabini	Escoglobal
Mikroplate okuyucu	ThermoFisher Scientific
Mikroskop	ESCOGLOBAL
Otoklav	Selecta AUTESTER ST DRY PV II 150
Otomatik tekli ve çoklu pipetler	ThermoFisher Scientific
pH-Metre	Ohaus
Ultra derin dondurucu -80 °C	Telstar Igloo

3.3. Yöntemler

Bu kısımda ticari kaynaklardan temin edilen uçucu yağların fitokimyasal analizleri, uçucu yağ ve uçucu bileşenlerin antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyotiklerle ve uçucu bileşenlerle kombinasyonları, *in vitro* ve *in silico* enzim inhibisyon aktiviteleri ile *in vitro* ve *in silico* toksisite çalışmalarının teknik detayları hakkında bilgiler verilmiştir.

3.3.1. Kromatografik-Spektroskopik yöntemler

3.3.1.1. Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) ile analizleri

Uçucu yağların analizleri eş zamanlı olarak gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GK/KS) ile gerçekleştirilmiştir. GK sisteminde kolonda ayrılan bileşikler alev iyonlaşma dedektörü ile tespit edilerek bileşiklerin bağıl yüzdeleri (%) belirlenmiştir. GK/KS sistemine ait kolonda ayrılan bileşiklerin kütle spektrometrisi kısmında tek tek kütle spektrumları alınmıştır.

Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi", Wiley GC/MS, Adams ve MassFinder 4.1 kütüphane tarama yazılımları kullanılarak, ayrıca tutunma indeksleri karşılaştırılarak yapılmıştır (McLafferty ve Stauffer, 1989; Koenig, Joulain ve Hochmuth, 2004)

GK Analiz Koşulları

<i>Sistem:</i>	Agilent 6890N
<i>Kolon:</i>	HP-Innowax (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
<i>Taşıyıcı gaz:</i>	Helyum (0.8 mL.dk ⁻¹)
<i>Enjeksiyon:</i>	250 °C'de yapılmıştır.
<i>Kolon:</i>	60 °C'de 10 dk, 4 °C/dk artışla 220 °C'ye, 220 °C'de 10 dk, 1 °C/dk artışla 240 °C olacak şekilde ayarlanmıştır.
<i>Dedektör:</i>	300 °C, FID

GK/KS Analiz Koşulları

<i>Sistem:</i>	Agilent 5975 GC/MSD
<i>Kolon:</i>	HP-Innowax (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
<i>Taşıyıcı gaz:</i>	Helyum (0.8 mL. dk ⁻¹)
<i>Enjeksiyon:</i>	250 °C'de yapılmıştır.
<i>Kolon:</i>	60 °C'de 10 dk, 4 °C/dk artışla 220 °C'ye, 220 °C'de 10 dk, 1 °C/dk artışla 240 °C olacak şekilde ayarlanmıştır.
<i>Split oranı:</i>	50:1
<i>Elektron enerjisi:</i>	70 eV
<i>Kütle aralığı:</i>	35-450 m/z

3.3.2. In vitro yöntemler

3.3.2.1. Antimikrobiyal aktivite çalışması

Deneylerde steril laboratuvar malzemeleri ve besiyerleri kullanılmıştır. Yeni hazırlanan besiyerleri ve kontamine olan malzemeler 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

CLSI'nin belirlediği standartlara uygun olarak antimikrobiyal maddelerin ve test materyallerinin MİK değerleri her bir mikrobiyal suşa karşı belirlenmiştir (CLSI, 2012).

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve Gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 hedef patojenler olarak seçilmiştir. Mikroorganizmalar 2-8 °C'de saklanmış, stok kültürleri -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

Antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında bakteri suşlarını aktive etmek için Columbia II Agar besiyeri kullanılmıştır. Hazır olarak temin edilen 43.1 g toz Columbia II Agar 1000 mL distile suda çözündürülerek hazırlanmış, pH ölçümünden sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ardından 45 °C’ye soğutulup Petri kaplarına dağıtılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite ve kombinasyon testlerinde ise Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri kullanılmıştır. Hazır olarak temin edilen toz halindeki 21 g MHB 1000 mL distile suda çözündürülerek hazırlanmış, pH ölçümü yapılarak 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir ve kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklanmıştır.

Deneysel çalışma kapsamında siprofloksasin ve ampisilin standart ilaç etken maddeleri kullanılmıştır.

Toz halde temin edilen ilaç etken hammaddelerinin ampisilin 128 mg/L ve siprofloksasin 16 mg/L olacak şekilde steril distile suda çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler steril mikro tüplere dağıtılarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Ticari olarak temin edilen uçucu yağlar dimetil sülfoksitte (son konsantrasyondaki DMSO oranı %3’ü geçmeyecek şekilde) çözülerek Tablo 3.3’ te belirtilen konsantrasyon aralığında MİK değerleri test edilmiştir.

Farmakope kalitesinde temin edilen karvakrol ve timol DMSO’de çözülmüş, 1/16 oranında seyrelterek plağa eklenmiştir.

1,8-sineol hazırlanırken DMSO’ya ek olarak %10 oranında Tween 80 kullanılmış yine 1/16 oranında seyreltilerek plağa eklenerek plaktaki en yüksek Tween 80 konsantrasyonunun %1’in altında kalması sağlanmıştır.

Uçucu yağları ve bileşenleri çözmek için kullanılan çözücü (DMSO) ve yardımcı madde (Tween 80)’nin mikroorganizma canlılığına etkisi test edilerek MİK değeri altında kalan oranlar tercih edilmiştir.

Hazırlanan uçucu bileşenler Tablo 3.3’te belirtilen konsantrasyon aralığında test edilmiştir.

Tablo 3.3. Mikrodilüsyon testi için hazırlanan konsantrasyonlar

Materyal	Kod	Mikrodilüsyon test konsantrasyonları (mg/mL)											
<i>Origanum onites</i>	OO	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
<i>O. minutiflorum</i>	OM	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
<i>O. vulgare</i>	OV	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
<i>Eucalyptus globulus</i>	EG	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
<i>E. citriodora</i>	EC	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
Karvakrol	K	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03
Timol	T	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03
1,8-sineol	Ö	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Siprofloksasin	SPF	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.007	0.0003
Ampisilin	AMP	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.0075

*siprofloksasin ve ampisilin µg/mL iken diğer test materyallerinin konsantrasyonu mg/mL'dir.

Deneyler 96 kuyucuklu “U” tipi steril mikroplateler yapılmıştır. Her antimikrobiyal numune için plağın 1’den 12’ye kadar olan bir satır kullanılmış ve her plakta sterilit kontrolü için sadece besiyeri içeren kuyucuk, üreme kontrolü için besiyeri ve mikroorganizma içeren kuyucuk ayrılmıştır. Kullanılan bu kuyucukların hepsine MHB besiyerinden 100 µL eklenmiştir. Her antimikrobiyal için kullanılan 12 kuyucuğun ilkine test edilecek antimikrobiyalın başlangıç konsantrasyonunu içeren çözeltilisinden 200 µL eklenmiştir. Test edilecek en yüksek madde konsantrasyonunun eklendiği ilk kuyucuktan 100 µL alınıp maddenin çift kat seri dilüsyonları yapılmıştır.

Bakteri süspansiyonunun hazırlanması: Mikroorganizma suşları muhafaza edildiği -80°C’den testin 48 saat öncesinde çıkarılıp oda ısısına geldikten sonra Columbia II Agar besiyerine pasajlanmıştır. Pasaj 35 ± 2 °C’de 24 saat inkübe edilip üreyen saf kolonilerden tekrar Columbia II Agar besiyerine ekim yapılmış ve 24 saat daha 35 ± 2 °C’de inkübe edilmiştir.

Test edilecek bakteri kolonilerinden McFarland No: 0.5 (1×10^8 CFU/mL) türbidometrik olarak eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, kuyucuklardaki son bakteri inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde MHB ile seyreltilerek üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa 10 µL eklenmiştir.

Daha sonra plakların üzeri steril kapaklar ile kapatılmış ve 35 °C’de 18 saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri görsel olarak değerlendirilmiş ve üreme görülmeyen en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu o maddenin çalışılan mikroorganizma için MİK değeri olarak belirlenmiştir (CLSI, 2012).

Daha sonra üreme kontrol reaktifi olarak hazırlanan MTT (5 mg/mL) her kuyucuğa 10 µL olacak şekilde pipetlenmiş ve plağın üstü kapatılarak 1 saat daha 35 ± 2 °C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plaklar tekrar değerlendirilmiş, indikatör olarak üreme olan kuyucuklar mor, üreme olmayan kuyucuklar sarı renkte gözlenmiştir. Sarı renkte gözlenen en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu test edilen mikroorganizma için o antimikrobiyal numunenin MİK değeri olarak kaydedilmiştir.

Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış, sonuçlar ortalama olarak verilmiştir.

3.3.2.2. Kombinasyon çalışmaları: Dama tahtası yöntemi

Antimikrobiyal kombinasyon çalışmalarında kullanılan dama tahtası yöntemi hem uygulama kolaylığı hem de değerlendirme yöntemlerinin basitliği sayesinde kombinasyon denemelerinde en çok tercih edilen yöntemlerden birisidir. Çalışmamızda tasarlanan ikili kombinasyonların değerlendirilmesinde bu yöntem tercih edilmiştir (Horrevorts vd., 1987; Hsieh vd., 1993; Van Vuuren vd., 2009).

Test sonuçları her bir kombinasyon için FİK indeksi hesaplanarak belirlenir. Yöntemin avantajlarının yanı sıra antimikrobiyal etkileşimlerin zaman içerisindeki farmakodinamik etkileşimlerini ortaya koymadığı için dezavantajı da mevcuttur.

Antimikrobiyal etkinlik testlerinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) *in vitro* mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2012).

Kombinasyonların etkileşimleri dama tahtası yöntemiyle sinerjik etkinlikleri açısından incelenmiştir (Humphries, 2016).

-80 °C'de saklanan siprofloksasin ve ampisilinin stok solüsyonları oda ısısına getirildikten sonra steril tüplerde MHB kullanılarak çift kat seri dilüsyonları yapılmıştır.

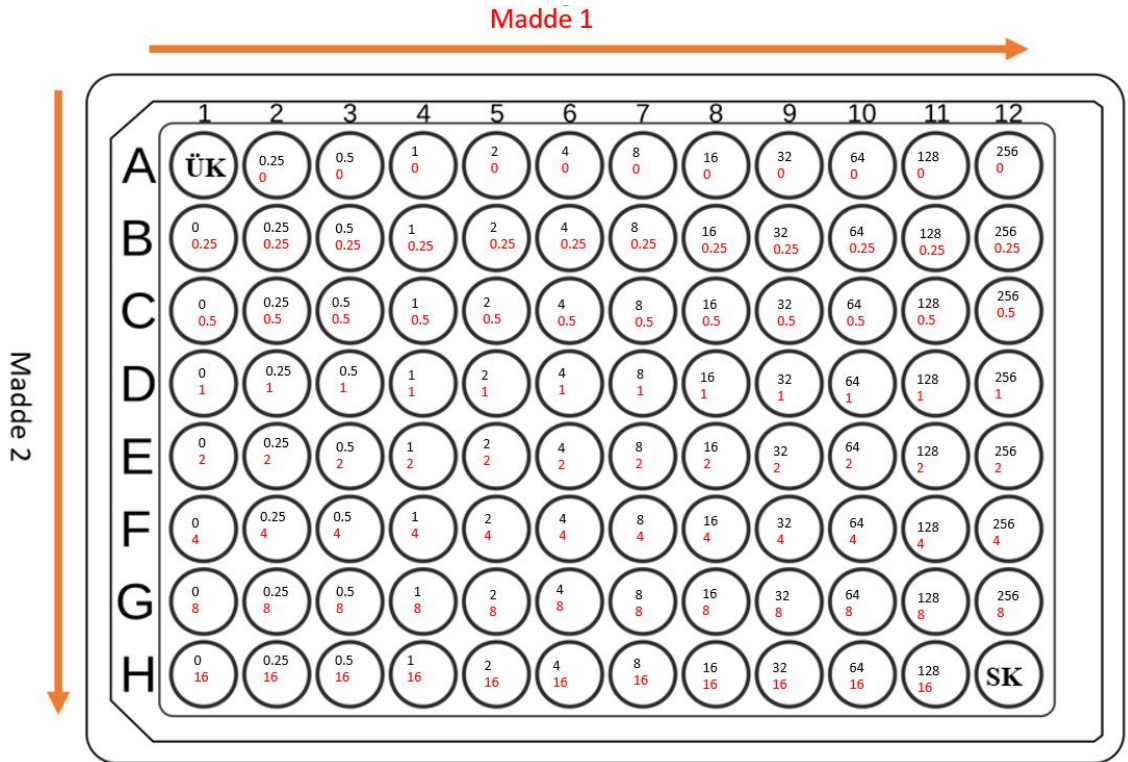
Kombinasyonda kullanılacak her iki maddenin de dilüsyonları steril tüplere hazırlandıktan sonra, 96 kuyucuklu, U tabanlı steril mikroparka alınarak, plağın A1 kuyucuğu üreme kontrolü (ÜK), H12 kuyucuğu ise sterilite kontrolü (SK) olarak işaretlenmiştir ve bu kuyucuklara antimikrobiyal konulmamıştır. Sterilite kontrol ve üreme kontrol kuyucuklarına 100 µL MHB pipetlenmiştir.

Kombinasyondaki maddelerden birincisi için 7 yatay sıra (B satırından başlanarak) 1'den 12'e kadar kullanılmıştır. En düşük konsantrasyon B1 kuyucuğuna gelecek şekilde her yatay satırda yer alan kuyucuklara aynı konsantrasyonda madde içerecek şekilde kullanılarak 50 µL pipetleme yapılmıştır. Her alt satıra geçildiğinde ise iki katı artan

konsantrasyon içerecek şekilde örnek eklenmeye devam edilmiştir. A sırası boş bırakılmıştır.

Diğer madde için ise 12 dikey sıra kullanılmış ve birinci sütun boş bırakılarak, en düşük konsantrasyonu plağın 2 no'lu dikey sütunundan başlayarak 50'er µL olacak şekilde pipetlenmiştir. Bir sonraki konsantrasyon 3 no'lu dikey sütuna eklenmiş, her yan sütuna geçildiğinde çift kat artan konsantrasyon ile maddeler sütunlara pipetlenmiştir. Daha sonra tüm kuyucukların final hacmi 100 µL olacak şekilde 1. sütuna ve A sırasına eksik hacim kadar MHB ilave edilmiştir.

Bir kombinasyon için 96'lık bir plağın tamamının kullanıldığı dama tahtası yöntemi uygulama detayları Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Şekilde gösterilen konsantrasyonlar temsili olarak alınmış olup, her kuyucuğa denk gelen konsantrasyonlar Madde 1 için kırmızı, Madde 2 için ise siyah renk ile gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Dama tahtası yöntemi uygulama detayları

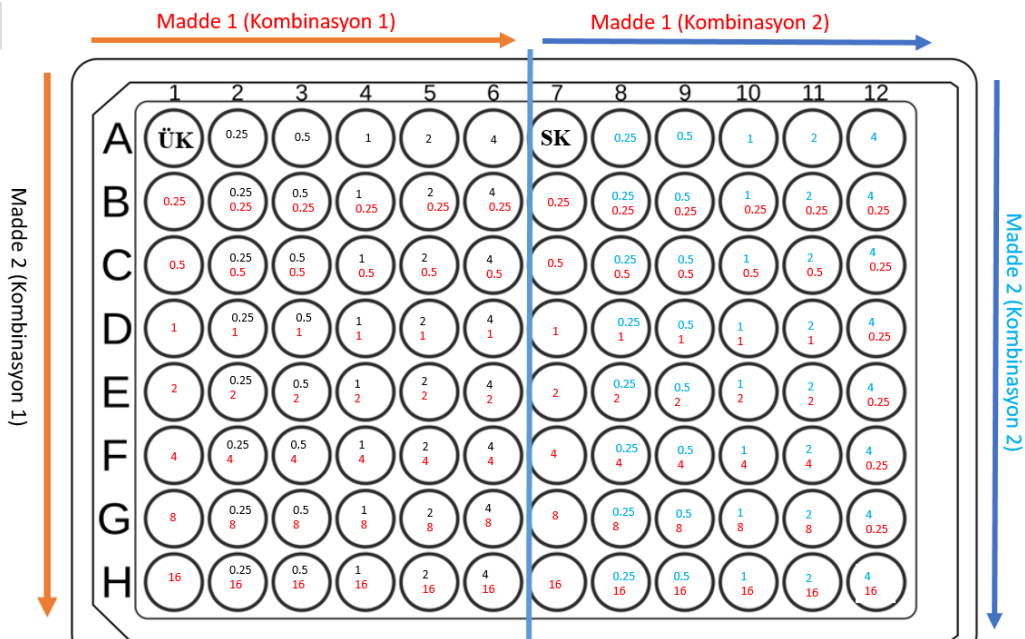
Kombinasyon denemelerinde ek olarak, konsantrasyon aralığı daha az olan taramalar esnasında 96 kuyucuklu steril mikrolakalar ortasından dikey olarak ikiye bölünerek kullanılmıştır. Böylelikle bir plakta iki farklı kombinasyon deneme imkanı oluşarak sarf malzemedен ve zamandan tasarruf sağlamıştır.

Bu sistemde, kombinasyonda kullanılacak maddelerin dilüsyonları steril tüplere hazırlandıktan sonra, 96 kuyucuklu, U tabanlı steril mikroparka alınarak birinci kombinasyondaki birinci madde için 7 yatay sıra kullanılmış, en yüksek konsantrasyon H sırasında olacak şekilde 7. kuyucuğa kadar madde eklenmiş, bir üst satıra iki katı dilüe edilen madde ilave edilerek çift kat artan dilüsyonlar sıra ile satırlara 50 µL olacak şekilde pipetlenmiş A satırı boş bırakılmıştır.

Diğer madde için ise 5 dikey sütun kullanılmış ve aynı şekilde en yüksek konsantrasyon plağın 6 no'lu dikey sütunundan başlayarak 50'er µL olacak şekilde pipetlenmiş, her yan sütuna geçildiğinde iki katı seyreltilmiş madde ilave edilmiştir. 1 no'lu sütun boş bırakılmıştır.

Test edilecek ikinci kombinasyon plağın ikinci yarısına da benzer işlem uygulanmıştır. Daha sonrasında tüm kuyucukların çalışma hacmi 100 µL olacak şekilde eksik olan kuyucuklara MHB ilave edilmiştir.

A1 kuyusu üreme kontrol (ÜK) kuyusu, A7 kuyusu sterilite kontrol (SK) kuyusu olarak kullanılmıştır. Kontrol kuyularına antimikrobiyal test materyali eklenmemiş, 100 µL MHB pipetlenmiştir. İki kombinasyonun test edilmesinde ortak bir plağın kullanıldığı yöntem Şekil 3.2'de verilmiştir. Şekilde yer alan konsantrasyonlar temsili olarak seçilmiş olup Madde 1'in konsantrasyonları her iki kombinasyonda da kırmızı renkle gösterilirken, birinci kombinasyonun ikinci maddesinin konsantrasyonları siyah renk ile ikinci kombinasyonun ikinci maddesinin konsantrasyonları ise mavi renkle gösterilmiştir.



Şekil 3.2. İki kombinasyon için tek plağın kullanıldığı dama tahtası yöntemi

Kombinasyon plakları hazırlandıktan sonra kuyucuklardaki son bakteri inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde MHB ile seyreltilerek hazırlanan inokulumdan üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her kuyucuğa 10 µL olacak şekilde pipetlenmiştir. Ardından plakların üstleri kapatılarak 35 ± 2 °C etüvde 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreme olan kuyucuklar gözle değerlendirilmiştir. Daha sonra reaktif olarak hazırlanan MTT solüsyonu (5 mg/mL) 10 µL olacak şekilde tüm kuyucuklara (besiyeri kontrol ve üreme kontrol kuyucuğu da dahil) pipetlenmiş ve plaklar 1 saat daha 35 ± 2 °C’de inkübe edilmiştir.

Test materyallerinin kombinasyonlarının etkilerinin değerlendirilmesinde fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu indisi (FİKİ) kullanılmıştır. Üreme görülmeyen kuyucuktaki en düşük test materyali konsantrasyonunun o test materyalinin tek başına aynı bakteriye karşı saptanan MİK değerine bölünmesiyle FİK değeri hesaplanmıştır (Van Vuuren vd., 2009; Stefanovic vd., 2011).

FİK X= X’in kombinasyondaki MİK değeri / X’in tek başına MİK değeri

FİK Y = Y’nin kombinasyondaki MİK değeri / Y’nin tek başına MİK değeri

Kombinasyonda yer alan her bir test materyalinin FİK değerlerinin toplanması ile FİK indisi (FİKİ) hesaplanmıştır;

FİKİ= FİK X + FİK Y

FİKİ ≤ 0.5 = Sinerjik etki,

$0.5 < \text{FİKİ} \leq 1$ = Aditif etki,

$1 < \text{FİKİ} < 4$ = Bağımsız etki,

FİKİ ≥ 4 = Antagonist etki,

şeklinde kabul edilmiştir.

MİK değerleri belirlenen uçucu yağlar ve uçucu bileşenlerle yapılan kombinasyonlarda, *Origanum* türleri, karvakrol ve timol için MİK değeri belirlenirken kullanılan konsantrasyonlardan daha düşük konsantrasyonlar tercih edilirken, *Eucalyptus* türleri için MİK değeri test edilirken kullanılan aynı konsantrasyonlar tercih edilmiştir. Kullandığımız yöntemde, 1,8-sineolun MİK değeri >256 mg/mL bulunmuştur. Söz konusu MİK’in üzerine çözünürlük sorunu nedeniyle çıkılamadığı için kombinasyonlar oluşturulurken 1,8-sineol çalışma dışı bırakılmıştır. Kombinasyon deneylerinde kullanılan konsantrasyonlar Tablo 3.4’te yer almaktadır.

Tablo 3.4. Uçucu yağların kombinasyon deneylerindeki konsantrasyonları

Uçucu yağlar	Kod	Kombinasyon deneylerindeki test konsantrasyonları (mg/mL)												
<i>Origanum onites</i>	OO	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03						
<i>O. minutiflorum</i>	OM	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03						
<i>O. vulgare</i>	OV	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03						
<i>Eucalyptus globulus</i>	EG	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
<i>E. citriodora</i>	EC	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
Karvakrol	K	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03								
Timol	T	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03								

3.3.2.3. *In vitro* enzim inhibisyon testleri

Numunelerin enzim inhibisyon testleri *in vitro* ortamda, 96'lık plaklarda, inhibisyon tarama kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm enzim inhibisyon testlerinde uçucu yağlar 20 µg/mL, uçucu bileşenler ise 5 µg/mL konsantrasyonda çalışılmıştır.

3.3.2.3.1. Anjiyotensin 2 dönüştürücü enzim (ACE-2) inhibisyonu testleri

Numunelerin ACE-2 inhibisyon aktiviteleri ACE2 inhibisyon tarama kiti kullanılarak yapılmıştır.

In vitro ACE2 enzim inhibisyonu testi yapılırken, uçucu yağlar DMSO (<%1, v/v) da çözülmüştür. Test maddeleri ilgili kuyucuklara eklenmiştir. Ardından hazırlanan enzim solüsyonu (0.5 ng/µL ACE2) kör hariç tüm kuyucuklara eklenmiştir. Deney süresinin ardından multiplate okuyucunun (Spectra Max i3) te floresans modunda Ex/Em= 320/420 nm dalga boyunda okunmuştur. Enzim inhibisyonu kitin içeriğinde yer alan standartla karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Deney sırasında izlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

Protokol:

1. ACE2 enzim çalışma solüsyonu hazırlanması: 198 µL ACE2 seyreltme tamponu ACE2 enzim vialinin içine eklenmiş, her kuyucuk için 50 µL ACE2 enzim çalışma solüsyonu aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanarak karıştırılıp kuyucuklara ilave edilmiştir.
 - Enzim kontrol, test materyali, inhibisyon kontrol ve çözücü kontrol kuyucukları için 48 µL ACE2 deney tamponu + 2 µL seyreltilmiş ACE2 enzim solüsyonu
 - Arka plan kontrol kuyusu için 50 µL ACE2 deney tamponu

2. Test materyali, inhibisyon kontrol ve enzim kontrollerinin hazırlanması: Test materyalleri final konsantrasyonunun 100 kat fazlası olacak şekilde tercih edilen çözücüde çözdürülmüş, deney tamponu ile 10 kat seyreltilmiştir.
3. 10 µL test materyali ya da tampon çözeltisi, enzim kontrol ve arka plan kontrol kuyucuklarına eklenmiştir. İnhibitör kontrol vialine 50 µL test tamponu eklenerek inhibisyon kontrol hazırlanmış ve ACE2 enzimi içeren kuyucuk ya da kuyucuklara eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir.
4. ACE2 substrat karışımı: Her kuyucuk için 40 µL substrat karışımı (38 µL ACE2 deney tamponu + 2 µL ACE2 substratı) hazırlanmış, arka plan kontrol, enzim kontrol/solvent kontrol, inhibisyon kontrol, test materyali kuyucuklarına eklenerek iyice karıştırılmıştır.
5. Floresans (ex/em: 320/420 nm)'de oda sıcaklığında 1 saat kinetik ölçüm yapılmıştır.

Tüm deneyler üç kez tekrarlanmış ve % inhibisyon (%I) değerleri ortalamalar alınarak hesaplanmıştır.

3.3.2.3.2. *Transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) enzim inhibisyon testleri*

Numunelerin TMPRSS2 inhibisyon özelliklerinin tayini proteaz tarafından bölündüğünde floresans yayan spesifik bir florojenik substrattan yararlanan TMPRSS2 florojenik deney kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney prosedürü TMPRSS2 florojenik test kiti içeriğinde yer alan aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır.

Protokol:

1. TMPRSS2 buz içerisinde çözdürülmüş, tek kullanım için gerekli olan miktarlara bölünmüş, daha sonra kullanılmak üzere ayrılan kısımlar -80'de saklanmıştır.
2. TMPRSS2, 1x TMPRSS2 test tamponu kullanılarak 5 ng/µL (150 ng/reaksiyon)'ye seyreltilmiştir. Kullanılmayan seyreltilmiş enzimler atılmıştır.
3. 500 µg kamostat 20 µL distile su ile önce 50 mM'a seyreltilmiştir.
4. 1X TMPRSS2 Tahlil Tamponu kullanılarak seri dilusyon ile 1000 kat seyreltilmiştir (50 µM).
5. Testteki son kamostat konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde inhibisyon kontrol kuyucuklarına 10 µL kamostat eklenmiştir.

6. Test edilecek inhibisyon maddelerin uygun konsantrasyonları, uygun çözücülerde çözünerek hazırlanmış, her kuyucuğa 10 µL olacak şekilde eklenmiştir.
7. Kör hariç diğer kuyucuklara 30 µL seyreltik TMPRSS2 (5 ng/µL) eklenmiş, köre ise 30 µL test tamponu eklenmiştir.
8. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
9. TMPRSS2 fluorojenik substrat oda sıcaklığında substratın direkt ışığa maruziyeti engellenerek çözülmüştür.
10. TMPRSS2 fluorojenik substrat, TMPRSS2 test tamponu kullanılarak 10 kat seyreltilmiştir (50 µM).
11. Tüm kuyucuklara 10 µL seyreltik TMPRSS2 fluorojenik substrat (50 µM) eklenerek test reaksiyonu başlatılmıştır. Test sırasında mikropate kuyucuklarında yer alan içeriklerin özeti Tablo 3.5'te yer almaktadır.

Tablo 3.5. *In vitro* TMPRSS2 enzim inhibisyonu karışımı

İçerik	Kör	Pozitif Kontrol	Test inhibitörü	Kamostat (Standart)
1x TMPRSS2 Test tamponu	30 µL	-	-	-
Test inhibitörü	-	-	10 µL	-
Kamostat	-	-	-	10 µL
Seyreltme solüsyonu	10 µL	10 µL	-	-
TMPRSS2 enzim (5ng/µL)	-	30 µL	30 µL	30 µL
TMPRSS2 substratı (50 µM)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Toplam	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

12. Alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunan plate oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona tabi tutulmuştur.
13. Floresans $\lambda_{ex} = 383 (\pm 10)$ nm ve $\lambda_{em} = 455 (\pm 10)$ nm dalga boylarında plate okunmuştur. Körün değeri tüm kuyucuklardan çıkarılarak hesaplamalar yapılmıştır.

3.3.2.3.3. Nöraminidaz (NA) enzim inhibisyon testleri

Numunelerin *in vitro* nöraminidaz enzim inhibisyon testleri nöraminidaz aktivite kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney 96'lık formatta gerçekleştirilmiş, sonuçlar mikropate okuyucu ile okunmuş, kitin içeriğinde yer alan standart inhibitör ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Deney sırasında izlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

Protokol:

1. Standartların hazırlanması: 10 mM standarttan 20 µL ve 480 µL su kullanılarak 400 µM standart çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çalışma solüsyonundan 0, 15, 30 ve 50 µL tüplere konulmuş ve her tüpün hacmi 50 µL olacak şekilde su eklenerek 0 (kör), 120, 240 ve 400 µM standartlar elde edilmiştir. Plakadaki ilgili kuyucuklara 20 µL bu standartlardan eklenmiştir.
2. Test materyallerinin hazırlanması: Her örnekten 20 µL alınarak plakadaki ikişer kuyucuğa biri örnek aktivitesi, diğeri örnek körü olacak şekilde eklenmiştir.
3. Deney reaksiyonu: Aşağıda verilen Tablo 3.6'ya göre ana reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Her test materyali, kör ve standart reaksiyon kuyucu için 80 µL ana reaksiyon karışımı gereklidir.

Tablo 3.6. *In vitro* nöraminidaz enzim inhibisyonu reaksiyon karışımı

Reaktif	Test materyali ve standartlar	Örnek kontrolü
Test tamponu	30 µL	85 µL
Substrat	55 µL	--
Kofaktör	1 µL	1 µL
Enzim	1 µL	1 µL
Boya reaktifi	0.5 µL	0.5 µL

4. 80 µL uygun reaksiyon karışımından kuyucuklara eklenmiş, karıştırılmış, 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince ışıksız ortam kullanılmıştır.
6. Test materyalinin ve standartların ölçümleri kolorimetrik olarak 570 nm'de yapılmış, % inhibisyonlar hesaplanmıştır.

3.3.2.4. *In vitro* toksisite testleri

Test materyallerinin ve antimikrobiyal etkiye sahip kombinasyonların etkinliklerindeki selektivite makrofaj hücrelerinde MTT yöntemi ile belirlenmiştir (Mosman, 1983; Sylvester, 2011).

Makrofaj hücresi olarak murine makrofaj hücre hattı olan RAW264.7, besiyeri olarak ise DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – low glucose), %10 fetal bovine serum, %1 penisilin-streptomisin ve %1 l-glutamin kullanılmıştır.

In vitro sitotoksosite testlerinde kullanılan tüm malzemeler 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 20 dakika otoklav ortamında steril edilmiştir.

Test konsantrasyonları seçilirken test materyallerinin antibakteriyel etki taramasında elde edilen tek başlarına MİK ve FİKİ değerleri en düşük olan ilk 7 kombinasyonun konsantrasyon değerleri seçilmiştir.

Deneylerde kullanılan makrofaj hücreleri (ATCC- TIB 71) -80 °C'de soğuk zincir ile temin edilmiştir. Donmuş hücreler vialden alınarak 15 mL'lik steril flakona aktarılmıştır. Üzerine 4 mL besiyeri eklenerek 500 rpm'da 3 dk santifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üstteki besiyeri dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Falkonda kalan hücrelerin üzerine 2 mL besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Ardından hücreler 7 mL besiyeri içeren hücre kültürüne uygun Petri kabına aktarılmış, inkübatöre kaldırılmıştır (%5 CO₂, %95 nem ve 37 °C).

Raw264.7 hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2 günde bir rutin pasajlama yapılmıştır. İnkübatörden alınan hücre kültürü Petri kabı ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesi için hafifçe çalkalanmış sonrasında pipetle fazla besiyeri uzaklaştırılmış, hücre kazıyıcı ile hücreler kaldırılmıştır. Üzerine yeni besiyeri eklenerek hücreler süspansiyon edilmiş ve yeni Petri kaplarına alınarak inkübatöre bırakılmıştır.

İnkübatörden alınan hücre kültürü Petri kabı, ölü hücrelerin besiyerine geçmesi için hafifçe çalkalanmış, sonrasında pipetle fazla besiyeri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Hücre kazıyıcı ile kaldırılan hücreler steril flaska aktarılarak thoma lamında hücre sayımı yapılmıştır.

Hücre süspansiyonu her kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde 96'lık plakalara ekilmiş, 24 saat inkübatörde inkübasyona tabi tutulmuştur. 24 saatin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır.

Steril vialler içerisine hazırlanan stok test solüsyonları besiyeri ile seyreltilmiş ve 12 tekrarlı olacak şekilde plakalara uygulanmış, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Toz halindeki MTT'den uygun miktarda tartılıp PBS (1x) içerisinde çözünerek 5 mg/mL konsantrasyonda stok MTT solüsyonu hazırlanmıştır. Stok solüsyonu 0.2 µL'lik steril filtreden süzülerek sterilize edilmiş, steril viallere aktarılıp -20 °C'de saklanmıştır.

MTT final konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde stok solüsyondan uygun miktarda MTT alınıp üzeri besiyeri ile tamamlanarak her kuyucuğa 200 µL MTT solüsyonu eklenmiş, 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatlik inkübasyon sonunda hücre

kültürlerinin üst kısmı uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µL DMSO koyularak formazon kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.

Plakaların optik dansite değerleri 570 ve 690 nm’de okunmuştur. Arka planda yer alan kirliliklerin deney sonucunu etkilememesi için 570 nm’de elde edilen absorbanslardan 690 nm’de elde edilen absorbanslar çıkartılarak test maddelerinin her bir konsantrasyonu için % canlılık değerleri hesaplanmış ve maddelerin MİK değerlerine göre sitotoksik etkileri yorumlanmıştır.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Absorbans örnek} \times 100}{\text{Absorbans kontrol}}$$

3.3.3. İstatistiksel analiz

Enzim inhibisyonu ve *in vitro* toksisite çalışmalarının istatistiksel analizlerinde GraphPad Prism 7.02 programı kullanılmıştır. Farklı gruplar, tek yönlü varyans analizi ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi uygulanarak karşılaştırılmış ve *P* değerinin 0.05’ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.3.4. *In silico* yöntemler

3.3.4.1. Enzim inhibisyon testleri

Bu çalışmada karvakrol, timol, 1,8-sineol, (*R*)-(+)-sitronellal, (*S*)-(-)-sitronellal uçucu bileşenlerinin bilgisayar ortamında ACE-2, TMPRSS2 ve nöraminidaz enzimleriyle kenetlenmesi değerlendirilmiştir. Ligandların proteinlerin bağlanma bölgelerindeki etkileşimleri aydınlatmak için Schrödinger Maestro v13.3 arayüzündeki arayüzündeki bir dizi gelişmiş araç tarafından kolaylaştırılan kapsamlı bir moleküler yerleştirme yöntemi kullanılmıştır (Schödinger, 2023).

3.3.4.1.1. Ligand ve protein hazırlanması

Ligandların yani karvakrol (PubChem CID: 10364), timol (PubChem CID: 6989), 1,8-sineol (PubChem CID: 2758), (*R*)-(+)-sitronellal (PubChem CID: 75427) ve (*S*)-(-)-sitronellal (PubChem CID: 443157), enerji minimizasyonu açısından optimum 3D yapıları LigPrep aracılığıyla sağlanmıştır.

Proteinler, ACE2 (PDB ID: 1R4L), TMPRSS2 (PDB ID: 7MEQ) ve NA (PDB ID: 3TI5), ilgili ko-kristal ligandları (ORE-1001, 4-Guanidinbenzoik asit ve Zanamivir) ile

birlikte, Protein Hazırlama İş Akışı (Protein Preparation Workflow) aracı kullanılarak hazırlanmıştır.

Reseptör Grid Generation aracı, proteinler içindeki ko-kristal ligandlara göre bağlanma bölgelerini tanımlamak için kullanılmıştır.

3.3.4.1.2. Ligand ve protein kenetlenmesi

Moleküler kenetleme GlideSP kullanılarak yapılmıştır. Maestro's Glide'in bir bileşeni olan Glide SP aracından yararlanılarak ligandlar hedef proteinlerin aktif bölgelerine kenetlenmiştir.

Ligand tabanlı ve yapı tabanlı skorlama fonksiyonlarını entegre eden Glide SP, ligand bağlama konformasyonlarının ve etkileşimlerinin tahminini sağlamıştır (Repasky vd., 2012).

3.3.4.1.3. Etkileşimlerin görselleştirilmesi ve analizi

Protein-ligand etkileşimleri, ligand oryantasyonları ve etkileşimleri hakkında sezgisel bilgiler sunan ChimeraX v1.4 ile oluşturulan şekiller aracılığı ile görsel olarak tasvir edilmiştir. Ayrıca ligand etkileşimlerinin karmaşık ayrıntılarını ortaya çıkaran protein-ligand etkileşimi profil oluşturucu (PLIP) aracı ile daha titiz bir şekilde etkileşimler incelenmiştir (Adasme vd., 2021).

3.3.4.2. Farmakokinetik ve toksisite çalışmaları

Ücretsiz olarak kullanılan ve internet tabanlı yazılımlar olan SwissADME ve pkCSM yardımıyla *in silico* yaklaşımlar kullanılarak potansiyel antimikrobiyal ilaçlar olan uçucu bileşenlerin farmakokinetik profilleri ve toksisitesi tahmin edilmiştir. İlgili tahminler yapılırken PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) web sunucusu ile uçucu bileşenlerin SMILES formatlarına erişilmiştir.

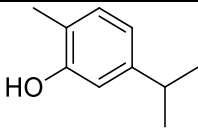
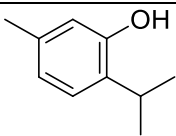
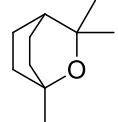
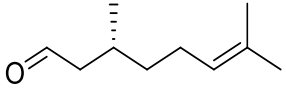
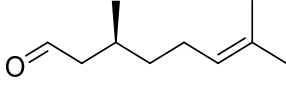
SwissADME: SwissADME bir maddenin oral bir ilaç olabilmesi olasılığının fizikokimyasal özellikleri göz önüne alınarak değerlendirildiği, Lipinski kurallarının da entegre edildiği ücretsiz bir internet aracıdır. Kullanım kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.

SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) kullanılarak bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri, farmakokinetiği, ilaç olma potansiyeli ve farmasötik kimya benzerliği değerlendirilmiştir.

pkCSM: Farmakokinetik ve toksisite özelliklerini tahmin etmek için ise pkCSM web sunucusu kullanılmıştır. pkCSM ilaç geliştirmede kimyasalların farmakokinetik (ADME) ve toksisite (T) profillerini tahmin ederek ilaç adaylarını taramaya yarayan bir sistemdir.

pkCSM web sunucusuna <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction> internet adresi üzerinden ücretsiz erişim sağlanabilmektedir. ADME profilleri ve toksisitesi araştırılan bileşiklerin yapıları Pubchem aracılığı ile SMILES formatına çevrililerek bu kodlar web sitesi üzerinden sisteme yüklenerek tahmini ADME/T özelliklerine erişilmiştir. Tez kapsamında araştırılan bileşimlerin yapıları ve SMILES kodları Tablo 3.7’de listelenmiştir.

Tablo 3.7. *In silico* analizler için bileşik listesi

Bileşik no	Bileşik ismi	Kimyasal Yapı	SMILES kodu	PubChem numarası
1	Karvakrol		<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(C)C(O)</chem>	10364
2	Timol		<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem>	6989
3	1,8-sineol		<chem>CC1(C2CCC(O1)(CC2)C)C</chem>	2758
4	(R)-(+)-Sitronellal		<chem>C[C@H](CCC=C(C)C)CC=O</chem>	75427
5	(S)-(-)-Sitronellal		<chem>C[C@@H](CCC=C(C)C)CC=O</chem>	443157

4. BULGULAR VE YORUM

4.1. Kromatografik- Spektroskopik Bulgular

4.1.1. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GK/KS) Analizi

Ticari kaynaklardan temin edilen *Origanum* (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis, *Origanum onites* L., *Origanum vulgare* L.) ve *Eucalyptus* (*Eucalyptus globulus* Labill ve *Eucalyptus citriodora* Hook.) uçucu yağlarının fitokimyasal analizleri GK ve GK/KS sistemi ile gerçekleştirilmiş, uçucu bileşiklere ait sonuçlar Tablo 4.1 ve 4.2’de karşılaştırmalı olarak listelenmiştir.

Tablo 4.1. *Origanum* uçucu yağlarına ait uçucu bileşenler

RRI	Bileşik	<i>O. vulgare</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. minutiflorum</i>
1032	α -pinen	1.1	0.4	0.3
1035	α -tuyon	0.6	0.2	0.3
1076	kamfen	0.6	0.2	0.2
1118	β -pinen	0.2	0.1	0.1
1159	γ -3-karen	0.1	0.1	0.1
1174	mirsen	1.8	0.9	0.7
1176	α -felandren	0.4	0.1	0.2
1188	α -terpinen	1.5	0.7	0.6
1203	limonen	0.5	0.1	0.1
1213	1,8-sineol	0.9	0.1	0.1
1218	β -felandren	-	0.2	0.1
1255	γ -terpinen	4.7	1.8	1.9
1280	<i>p</i> -simen	11.5	4	3.1
1290	terpinolen	0.2	-	0.1
1452	1-octen-3-ol	0.6	0.1	0.1
1474	(<i>E</i>)-sabinen hidrat	0.2	0.2	0.2
1532	kafur	1	-	-
1553	linalool	2	4.4	7.7
1556	(<i>Z</i>)-sabinen hidrat	0.1	0.1	0.2
1565	linalil asetat	0.1	0.1	0.1
1571	(<i>E</i>)- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	-	e	0.1
1591	bornil asetat	0.1	-	-
1611	terpinen-4-ol	1.4	0.8	0.8
1612	β -karyofilen	4.5	0.8	1
1628	aromadendren	-	0.1	0.2
1687	α -humulen	0.4	-	0.1
1706	α -terpineol	0.2	0.4	0.5
1719	borneol	1.3	0.7	0.9
1741	β -bisabolen	0.4	1.4	1.6
1751	karvon	-	-	0.1
1773	γ -kadinen	-	-	e
1784	(<i>E</i>)- α -bisabolen	0.2	-	0.1

Tablo 4.1. (Devam) *Origanum* uçucu yağlarına ait uçucu bileşenler

RRI	Bileşik	<i>O. vulgare</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. minutiflorum</i>
1864	<i>p</i> -simen-8-ol	-	-	e
1890	karvasiril asetat	0.1	-	0.1
2008	karyofilen oksit	0.8	0.1	0.2
2030	metilöjenol	-	0.1	0.1
2144	spatulenol	e	-	-
2157	(<i>Z</i>)- <i>p</i> -Ment-4-en-1.2-diol	-	e	e
2198	timol	0.4	0.8	0.9
2239	karvakrol	61.8	80.9	77.3

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: relatif yüzde FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (< %0.1)

Yapılan analiz sonucunda *Origanum* uçucu yağlarının ana bileşeni karvakrol (%61.8-80.9) olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatürde daha önce yapılmış olan *Origanum* uçucu yağlarının analizleri ile uyumludur (Başer vd., 1993; Kokkini, 1997).

Tablo 4.2. *Eucalyptus* uçucu yağlarına ait uçucu bileşenler

RRI	Bileşik	<i>E. globulus</i>	<i>E. citriodora</i>
1032	α -pinen	11.4	-
1076	kamfen	0.1	-
1118	β -pinen	11.4	-
1174	mirsen	-	0.4
1176	α -felandren	4.8	-
1203	limonen	5	-
1213	1,8-sineol	30.9	0.4
1255	γ -terpinen	4.5	0.7
1280	<i>p</i> -simen	10	-
1290	terpinolen	0.4	-
1485	sitronellal	-	79.9
1497	α -kopanen	0.1	-
1544	α -gurjunen	0.1	-
1553	linalool	e	-
1586	pinokarvon	e	-
1592	fenkil alkol	0.3	0.1
1611	terpinen-4-ol	1.8	-
1612	β -karyofilen	0.7	0.3
1628	aromadendren	1.4	0.4
1661	alloaromadendren	0.3	-
1664	(<i>E</i>)-pinokarveol	0.4	-
1682	γ -terpineol	e	0.2
1687	α -humulen	0.2	0.2
1700	limonen-4-ol	0.3	-
1706	α -terpineol	3.1	-
1709	α -terpinil asetat	0.8	-
1755	bisiklogermakren	0.2	0.2
1773	γ -kadinen	0.3	0.3
1804	mirtenol	e	-
2250	α -ödesmol	0.9	-
2257	β -ödesmol	1.3	0.3

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: relatif yüzde FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (< %0,1)

Eucalyptus uçucu yağlarının ana bileşeni *E. globulus* için 1,8-sineol (%30.9) ve *E. citriodora* için sitronellal (%79.9) olarak belirlenmiştir. Ticari olarak temin edilen uçucu yağların, kalitelerinin devamlılığının sağlanması açısından fitokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2. In Vitro Yöntemler

4.2.1. Antimikrobiyal etkinlik bulguları

4.2.1.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları

Ticari uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin antimikrobiyal aktiviteleri CLSI (2012) standartlarına uygun olarak yapılmıştır. Aktivite, Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve Gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 suşlarına karşı denenmiştir. Siprofloksasin ve ampicilin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Test materyallerinin ve standart antimikrobiyal maddelerin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Test materyalleri MİK değerleri

Test materyali	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>
<i>Origanum onites</i>	0.25-0.5	0.25-0.5	0.25-0.5	0.25-0.5
<i>O. minutiflorum</i>	0.25-0.5	0.5	0.25-0.5	0.5
<i>O. vulgare</i>	0.5	0.5	0.25-0.5	0.5
<i>Eucalyptus globulus</i>	32	32-64	>128	>128
<i>E. citriodora</i>	64	64-128	16	64
Saf maddeler				
Karvakrol	0.25	0.25	0.25	0.25
Timol	0.5	0.5	0.5	0.5
1,8-sineol	>256	>256	>256	>256
Siprofloksasin	0.015-0.03	0.06- 0.125	0.125-0.25	0.25-1
Ampisilin	4-8	---	0.25-0.5	1-2

*Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL verilirken, siprofloksasin ve ampicilin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite sonuçları değerlendirildiğinde üç *Origanum* uçucu yağı da denenilen tüm suşlara karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *O. vulgare* ve *O. minutiflorum* uçucu yağlarının antimikrobiyal etkisi benzer bulunmuştur (MİK= 0.5 mg/mL). *Origanum* uçucu yağları arasında karvakrol oranı (%80.9) en yüksek olan *O. onites* kullanılan tüm suşlara karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir

(MİK= 0.25-0.5 mg/mL). Karvakrol (MİK= 0.25 mg/mL) denenen tüm suşlara karşı timolden (MİK= 0.5 mg/mL) daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Literatür bilgileri incelendiğinde uçucu yağların içerdiği karvakrol oranı ile antimikrobiyal etkinlik arasındaki doğru orantı kekik uçucu yağları ve karvakrolün etki mekanizmasının benzer olmasıyla açıklanabilmektedir (Lambert 2001). Karvakrolün yapısal izomeri timolün antimikrobiyal aktivitesi test edilen tüm suşlarda karvakrole göre daha azdır. *S. aureus* üzerine yapılan bir çalışmada benzer şekilde timolün antimikrobiyal etkisinin karvakrole göre daha az olduğu görülmüştür (Nostro vd., 2004).

Deneysel verilerimize göre *Eucalyptus* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi *Origanum* uçucu yağlarına göre zayıf bulunmuştur. *E. globulus* uçucu yağının ana maddesi olan 1,8-sineolun antimikrobiyal etkisinin kullanılan yöntem ile oldukça fazla az bulunması (MİK= >256 mg/mL), *E. globulus*'un antimikrobiyal etkisinin *E. citriodora*'ya ve *Origanum* uçucu yağlarına göre daha az olmasını destekler niteliktedir.

4.2.1.2. Kombinasyon çalışmaları

Yapılan tüm kombinasyon çalışmalarında literatürde yaygın olarak kullanılan dama tahtası yöntemi uygulanmıştır (Van Vuuren vd., 2009).

Uçucu yağlar siprofloksasin ve ampisilin standart antimikrobiyal maddeleriyle ve daha önce yapılmış olan antimikrobiyal aktivite çalışmalarıyla değerlendirilerek yüksek aktivite gösteren uçucu bileşenlerle kombine edilmiştir.

Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 ve Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşları hedef patojenler olarak kullanılmış, orantısal etkiyi belirlemek üzere kombinasyonların fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) hesaplanmıştır.

Tüm *Origanum* uçucu yağlarının siprofloksasin ve ampisilin ile kombinasyonları yapılmıştır. Ayrıca *Origanum* uçucu yağlarının, bu yağların ana maddesi olan karvakrol ve karvakrolün yapısal izomeri olan timol ile kombinasyonları oluşturulmuştur.

Origanum uçucu yağlarının kombinasyon sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.4. *Origanum onites* kombinasyonları

Origanum onites ve Siprofloksasin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Siprofloksasin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.5	1	0.03	0.03	1	2	Bağımsız
<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.5	1	0.06	0.06	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	0.25	0.25	1	0.25	0.25	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.5	1	1	1	1	2	Bağımsız
Origanum onites ve Ampisilin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Ampisilin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.5	1	4	4	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	0.25	0.25	1	0.25	0.25	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.25	0.5	1	0.5	0.5	1	Aditif
Origanum onites ve Karvakrol kombinasyonları								
Bakteri	Uçucu yağ			Karvakrol			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.25	0.002	0.008	0.25	0.125	0.5	0.51	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.125	0.5	0.25	0.6	0.24	0.74	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.25	0.125	0.5	0.25	0.06	0.25	0.75	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.25	0.06	0.25	0.25	0.125	0.5	0.75	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.25	0.06	0.25	0.25	0.06	0.25	0.56	Aditif
Origanum onites ve Timol kombinasyonları								
Bakteri	Uçucu yağ			Timol			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	1	0.06	0.06	1	0.5	0.5	0.56	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.125	0.25	0.5	0.25	0.5	0.75	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.5	0.125	0.25	0.5	0.25	0.5	0.75	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	1	Aditif

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** numunelerin kombinasyondaki MİK değeri. Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL olarak verilirken siprofloksasin ve ampisilin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Tablo 4.5. *Origanum vulgare* kombinasyonları

Origanum vulgare ve Siprofloksasin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Siprofloksasin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.25	0.5	0.03	0.004	0.133	0.633	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.5	1	0.06	0.06	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	0.5	0.5	1	0.125	0.125	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.5	1	1	1	1	2	Bağımsız
Origanum vulgare ve Ampisilin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Ampisilin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.25	0.5	4	2	0.5	1	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.125	0.5	1	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.5	1	1	1	1	2	Bağımsız
Origanum vulgare ve Karvakrol kombinasyonları								
Bakteri	Uçucu yağ			Karvakrol			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.006	0.24	0.74	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.125	0.25	0.25	0.125	0.5	0.75	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.015	0.06	0.56	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.125	0.5	1	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.062	0.25	0.75	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.125	0.25	0.25	0.125	0.5	0.75	Aditif

Tablo 4.5. (Devam) *Origanum vulgare* kombinasyonları

Origanum vulgare ve Timol kombinasyonları								
Bakteri	Uçucu yağ			Timol			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.06	0.12	0.25	0.125	0.5	0.62	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.125	0.5	0.5	0.25	0.5	1	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.25	0.125	0.5	0.5	0.25	0.5	1	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	1	Aditif

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** numunelerin kombinasyondaki MİK değeri. Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL olarak verilirken siprofloksasin ve ampisilin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Tablo 4.6. *Origanum minutiflorum* kombinasyonları

Origanum minutiflorum ve Siprofloksasin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Siprofloksasin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.25	0.5	0.03	0.015	0.5	1	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.5	1	0.06	0.06	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	0.5	0.5	1	0.125	0.125	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.25	0.5	1	0.06	0.06	0.56	Aditif
Origanum minutiflorum ve Ampisilin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Ampisilin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.5	0.5	1	4	4	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	0.5	0.5	1	0.25	0.25	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.25	0.5	1	0.5	0.5	1	Aditif
Origanum minutiflorum ve Karvakrol kombinasyonları								
Bakteri	Uçucu yağ			Karvakrol			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.25	0.03	0.12	0.25	0.125	0.5	0.62	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.6	0.24	0.25	0.125	0.5	0.74	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.125	0.5	1	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.125	0.5	1	Aditif
Origanum minutiflorum ve Timol kombinasyonları								
Bakteri	Uçucu yağ			Timol			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.25	0.03	0.12	0.25	0.125	0.5	0.62	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.6	0.24	0.5	0.25	0.5	0.74	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.25	0.03	0.12	0.25	0.125	0.5	0.62	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.5	0.06	0.12	0.5	0.25	0.5	0.62	Aditif

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** numunelerin kombinasyondaki MİK değeri. Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL olarak verilirken siprofloksasin ve ampisilin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Test edilen suşlara karşı *Origanum* uçucu yağı ile oluşturulan siprofloksasin kombinasyonları değerlendirildiğinde; Tablo 4.5 ve 4.6'da görüldüğü üzere *O. minutiflorum* uçucu yağı, siprofloksasinin *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkisini ve *O. vulgare* uçucu yağı, siprofloksasinin *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisini önemli ölçüde arttırmıştır. *Origanum* uçucu yağlarının ampisilin ile birlikte etkisine bakıldığında ise, oluşturulan 12 kombinasyonun 4'ünde aditif antimikrobiyal etki ölçülmüştür, antagonizma ya da sinerjik etki görülmemiştir.

Literatürde daha önce *O. vulgare* uçucu yağı, karvakrol ve timolün standart antimikrobiyal maddeler olan eritromisin, tetrasiklin ve norfloksasin ile kombinasyonlarının *S. aureus* üzerine etkisi incelenmiş ve *O. vulgare* uçucu yağının tetrasiklin MİK değerinin dört kata kadar düştüğü gösterilmiştir (Cirino vd., 2015).

Sonuç olarak bilginiz dahilinde daha önce siprofloksasin ve ampisilin ile *Origanum* uçucu yağları ve karvakrol kombinasyonunun test edilen suşlar üzerine aktivitesi çalışılmamıştır bu nedenle elde edilen sonuçlar özgündür.

Ayrıca *Origanum* uçucu yağlarının, yağların ana bileşeni olan karvakrol ve karvakrolün yapısal izomeri timol ile kombinasyonu incelendiğinde, üç *Origanum* uçucu yağının da karvakrol ve timol kombinasyonları aditif antibakteriyal etki göstermiştir (Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6).

Uçucu yağların etkileri içerdikleri sekonder metabolitler ile doğrudan ilişkilidir. Karvakrol ve timolde bulunan hidroksil grubunun ve delokalize elektron sisteminin varlığının bu maddelerin aktivitesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Veldhuizen vd., 2006). Bulduğumuz sonuç, karvakrol ve timolün benzer kimyasal yapıya sahip olduğu için benzer antimikrobiyal etkinliğe sahip olmaları ve uçucu yağlarımızda bulunan karvakrol ve timol oranı arttıkça etkinliğin artmasını destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Tablo 4.7. *Eucalyptus globulus* kombinasyonları

<i>Eucalyptus globulus</i> ve Siprofloksasin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Siprofloksasin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E.coli</i>	32	16	0.5	0.015	0.0075	0.5	1	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	32	16	0.5	0.03	0.015	0.5	1	Aditif
<i>S. aureus</i>	>128	>128	H	0.125	0.125	1	>1	H
<i>E. faecalis</i>	>128	>128	H	0.5	0.5	1	>1	H
<i>Eucalyptus globulus</i> ve Ampisilin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Ampisilin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E.coli</i>	32	32	1	8	8	1	2	H
<i>S. aureus</i>	>128	64	<0.5	0.5	0.25	0.5	<1	H
<i>E. faecalis</i>	>128	>128	1	2	2	1	2	Bağımsız

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** numunelerin kombinasyondaki MİK değeri, **H:** Hesaplanamadı. Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL olarak verilirken siprofloksasin ve ampisilin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Tablo 4.8. *Eucalyptus citriodora* kombinasyonları

<i>Eucalyptus citriodora</i> ve Siprofloksasin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Siprofloksasin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E.coli</i>	64	64	1	0.015	0.015	1	2	Bağımsız
<i>K. pneumoniae</i>	128	128	1	0.06	0.06	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	16	16	1	0.25	0.25	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	64	64	1	1	1	1	2	Bağımsız

<i>Eucalyptus citriodora</i> ve Ampisilin kombinasyonu								
Bakteri	Uçucu yağ			Ampisilin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E.coli</i>	64	64	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	16	16	1	0.5	0.5	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	64	32	0.5	2	1	0.5	1	Aditif

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** numunelerin kombinasyondaki MİK değeri. Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL olarak verilirken siprofloksasin ve ampisilin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Eucalyptus uçucu yağlarının da siprofloksasin ve ampisilin ile kombinasyonlarının antimikrobiyal etkileri test edilmiştir. *Eucalyptus* uçucu yağları kullanılarak oluşturulan kombinasyonlar ve kombinasyon sonuçları Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmektedir.

Eucalyptus uçucu yağlarının, ana bileşenlerinden biri olan 1,8-sineol’ün çalışmada kullanılan antimikrobiyal test yöntemi ile MİK değerini saptamak mümkün olmamıştır (>256 mg/mL). Bu nedenle kombinasyonlar oluşturulurken 1,8-sineol test numuneleri arasında dahil edilmemiştir.

Eucalyptus uçucu yağlarının ve 1,8-sineolün test edilen suşlara karşı yüksek antimikrobiyal etki göstermeme sebebinin, söz konusu uçucu yağların polar sıvı besiyerinde yeterince çözünmediği ve inkübatörde bekleme süresinde sıvı fazdan buhar fazına geçmesinden dolayı etki yerinde yeterli konsantrasyona ulaşmadan etkinlik göstermemesi olduğu düşünülmektedir. Bu veriler sonrasında, diğer çalışmalarda 96’lık plakların üzerinin özel, steril, içeriden dışarı buhar çıkışını engelleyen steril geçirgen film kaplamalar kullanılmasıyla bu sorunun önüne geçilebilmiştir.

E. globulus uçucu yağının siprofloksasinle kombinasyonunda Gram negatif bakterilerde aditif etki gözlenirken, Gram pozitif bakterilerde FİKİ değeri 1’den büyük olarak hesaplanmıştır. *E. globulus* uçucu yağının ampisilin ile kombinasyonunda *S. aureus*’da aditif etki gözlenirken diğer bakterilerde bağımsız etki gözlenmiştir.

E. citriodora uçucu yağının antibiyotiklerle oluşturulan kombinasyonları incelendiğinde, sadece ampisilinle olan kombinasyonunda *E. faecalis* üzerine aditif etki gösterirken (FİKİ= 1) diğer tüm siprofloksasin ve ampisilin kombinasyonlarında bağımsız etki gözlenmiştir.

Uçucu yağların birbiri ile ve antibiyotiklerle kombinasyonlarından verimli sonuçlar alındığında, uçucu yağlar yerine uçucu bileşenlerle kombinasyonlar oluşturmanın daha pratik olduğuna dair görüşler mevcuttur. Bu görüşler, uçucu yağların içerinin mevsime, toplanan yöreye, hasat ve uçucu yağ elde yöntemine göre değişiklik göstermesi ve mekanizma araştırmalarının daha kolay ve aydınlatıcı olması adına uçucu bileşenlerin kullanımının daha doğru olabileceğine dayanmaktadır (Langeveld vd. 2014). Ancak uçucu yağlarda standart kalitenin devamlılığı sağlandığında bu kaygıların önüne geçilebilmektedir.

Ancak deneysel çalışmalarda bir sonraki aşama olan etkiden sorumlu bileşiğin saptanması ve etki mekanizması aydınlatma anlamında uçucu yağların yanı sıra, bileşimde bulunan uçucu bileşenlerle de çalışmak gerekmektedir. Bu bağlamda uçucu yağların yanı sıra karvakrolün de standart antimikrobiyal maddeler (siprofloksasin ile ampisilin) ve kendi izomeri timol ile kombinasyonlarının antimikrobiyal etkileri test edilmiştir. Oluşturulan kombinasyonların sonuçları Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Saf madde kombinasyonları

Karvakrol ve Siprofloksasin kombinasyonu								
Bakteri	Karvakrol			Siprofloksasin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.25	0.125	0.5	0.015	0.015	1	1.5	Bağımsız
<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.125	0.5	0.03	0.015	0.5	1	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.25	0.125	0.5	0.125	0.06	0.5	1	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.25	0.06	0.24	0.5	0.25	0.5	0.74	Aditif
Karvakrol ve Ampisilin kombinasyonu								
Bakteri	Karvakrol			Ampisilin			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.25	0.25	1	2	2	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	0.25	0.125	0.5	0.03	0.0075	0.25	0.75	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.25	0.125	0.5	0.25	0.06	0.24	0.74	Aditif
Karvakrol ve Timol kombinasyonu								
Bakteri	Karvakrol			Timol			FİKİ	SONUÇ
	T	K	FİK	T	K	FİK		
<i>E. coli</i>	0.25	0.125	0.5	0.5	0.03	0.06	0.56	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.125	0.5	0.5	0.06	0.12	0.62	Aditif
<i>S. aureus</i>	0.25	0.06	0.24	0.5	0.125	0.25	0.51	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0.25	0.06	0.24	0.5	0.25	0.5	0.74	Aditif

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** numunelerin kombinasyondaki MİK değeri. Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL olarak verilirken siprofloksasin ve ampisilin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Karvakrolün siprofloksasin ve ampisilin ile kombinasyonunda *E. coli* hariç diğer suşların tamamında aditif etki gösterdiği, ampisilin etkisini 4 kata kadar arttırdığı

ölçülmüştür. En düşük FİKİ değerlerine (0.51-0.74) karvakrol ve timol kombinasyonunda erişilmiştir (Tablo 4.9).

Literatürde karvakrol, timol kombinasyonu Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı daha önce de çalışıldığı ve aditif etkili (FİKİ=0.75) olduğu bulunduğu görülmüştür (Gavaric, vd., 2015).

Karvakrol ve timol kombinasyonunun *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger* üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, söz konusu kombinasyonun sinerjik inhibisyon etkisine sahip olduğu gösterilmiştir (Guarda vd., 2011). Ayrıca karvakrol ve timolün eflüks pompası inhibitörü olduğu ve bu sebeple ilaç direncini modüle edebileceklerini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Cirino vd., 2015).

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar, farklı mikroorganizma suşları kullanılmasına rağmen, literatürle uyumludur. Deneysel bulgular ve literatürde yer alan çalışmalar birleştirildiğinde karvakrol ve timolün birlikte kullanımının antimikrobiyal etkiyi anlamlı düzeyde arttırdığı söylenebilir.

4.2.2. *In vitro* enzim inhibisyon sonuçları

Antibakteriyel etkinlik sonuçları doğrultusunda gerçekleştirilen *in vitro* enzim inhibisyon çalışmasında uygun konsantrasyonlarda hazırlanan uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin, antiviral mekanizmalarda etkin rol oynayan enzimler olan ACE2, TMPRSS2 ve nöraminidazı inhibe etme oranları ölçülmüştür. Ticari enzim kitleri deneysel kısımdaki detaylı protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sınırlı sayıda deney kitinden dolayı uçucu yağlar 20 saf bileşenler ise 5 µg/mL konsantrasyonlarda tekrarlı olarak denenmiştir.

4.2.2.1. ACE2 enzim inhibisyon sonuçları

ACE2 enzim inhibisyon deneylerinde test edilecek olan uçucu yağlar ve uçucu bileşenler uygun konsantrasyonlarda ayarlanmıştır. Deney kitinde yer alan prosedüre göre *in vitro* enzim inhibisyon deneyleri yapılmıştır.

Origanum uçucu yağlarının ve uçucu bileşenlerinin (karvakrol ve timol) sonuçları Tablo 4.10'da yer almaktadır.

Tablo 4.10. *Origanum* türleri ACE2 inhibisyon sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon ± SS
<i>Origanum onites</i>	20	42.79 ± 0.55
<i>O. minutiflorum</i>	20	79.07 ± 0.15
<i>O. vulgare</i>	20	74.31 ± 0.22
Karvakrol	5	90.70 ± 0.15
Timol	5	65.96 ± 0.55

SS: Standart sapma

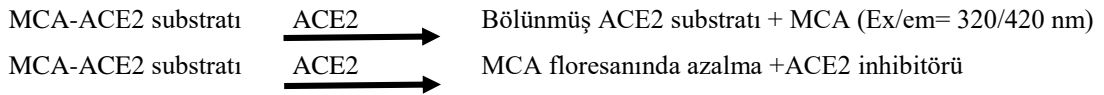
Eucalyptus uçucu yağlarının ve 1,8-sineolün ACE2 inhibisyon sonuçları Tablo 4.11’de yer almaktadır.

Tablo 4.11. *Eucalyptus* türleri ACE2 inhibisyon sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon ± SS
<i>Eucalyptus globulus</i>	20	94.91 ± 0.37
<i>E. citriodora</i>	20	83.37 ± 0.13
1,8-sineol	5	89.21 ± 0.32

SS: Standart sapma

Gerçekleştirilen deneyin prensibi ACE2’nin sentetik metoksikumarin (MCA) bazlı bir peptidi (substrat) parçalayarak serbest floroforların salınmasını sağlamasına, ACE2’ye özgü bir inhibitör varlığında ise enzimin peptidaz aktivitesinin azalması ve dolayısı ile floresan yoğunluğunda bir azalma oluşmasına dayanmaktadır. Oluşan MCA floresans mikropate okuyucu ile ölçülmüş, buna bağlı olarak da inhibisyon aktivite ile ilgili hesaplamalar yapılmıştır.



ACE2 enzim inhibisyon sonuçları değerlendirildiğinde, *Origanum* uçucu yağları arasında en yüksek enzim inhibisyonunu *O. minutiflorum* (%79.1) gerçekleştirmiştir. Uçucu bileşen olarak test edilen karvakrolün (%90.7) timole (%65.96) göre ACE2 enzim inhibisyon kapasitesi Tablo 4.10’de görüldüğü üzere nispeten fazla olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.11’de karşılaştırmalı olarak gösterildiği gibi *E. globulus* uçucu yağının %94.3 inhibisyon değeri ve uçucu bileşen olarak test edilen 1,8-sineol’ün %89.2’lik ACE2 enzim inhibisyon kapasitesi oldukça yüksek değerlerde belirlenmiştir. *E. citriodora*’nın enzim inhibisyonu da %83.4’lik oranla nispeten yüksek bulunmuştur.

In vitro hücre kültürü ortamında gerçekleşen bir çalışmada *E. globulus* uçucu yağının 50 µg/mL konsantrasyonda, %70 ACE2 inhibisyon aktivitesi gösterdiği

ölçülmüştür (Kumar vd., 2020). Yaptığımız çalışma ile literatürde yer alan çalışma arasındaki etkinlik farkının yöntem farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle hücre ortamı dışında yapılan enzim inhibisyon deneyleri öncelikle *in vitro* hücre kültürlerinde daha sonra *in vivo* yöntemlerle test edilerek zenginleştirilmelidir.

Kumar vd.'nin (2020) yaptığı aynı çalışmada *E. globulus* uçucu yağının %70 ACE2 inhibisyon aktivitesi gösterdiği konsantrasyonda (50 µg/mL) epitel hücreler üzerine sitotoksik etkisi olmadığı da gösterilmiştir (Kumar vd., 2020).

Yakın zamanda 1,8-sineol ve α -pinenin kombinasyon halinde bulunduğu ticari bir preparatın ACE2 inhibisyon yeteneği ve aynı zamanda *in vitro* antiviral aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan çalışmada 1,8-sineol ve α -pinen kombinasyonunun hem virüs ile doğrudan temasta antiviral etkinlik gösterdiği hem de ACE2 inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (Başer vd., 2023).

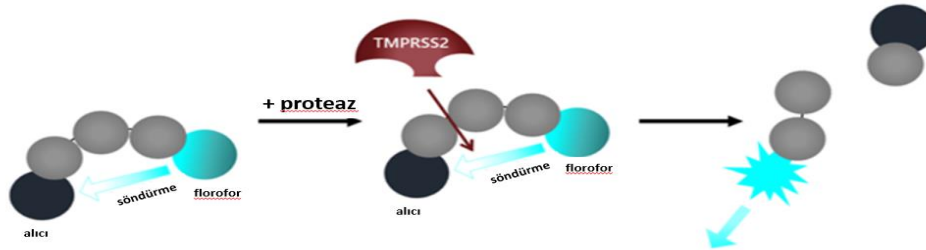
Ticari uçucu yağlar ve standart ticari ACE2 enzim inhibisyon kiti ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar bilginiz dahilinde ilk defa yapılmıştır.

Tez projesi kapsamında *Origanum* ve *Eucalyptus* uçucu yağları ve ana bileşenlerinin ACE2 inhibisyon sonuçları, bağlanma modellerinin *in silico* sonuçlarıyla da desteklendiği iki ayrı makale olarak yayımlanmıştır (Ak-Sakalli vd., 2022; Demirci vd., 2023).

4.2.2.2. TMPRSS2 enzim inhibisyon sonuçları

Uygun konsantrasyonda hazırlanan uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin enzim inhibisyon testleri kit prosedürüne sadık kalınarak yapılmıştır.

Testin mekanizması bir ucunda florofor diğer ucunda alıcı ile etiketlenmiş peptidin proteaz varlığında ayrılması ve alıcıdan ayrılan peptitteki floresan miktarının artmasına dayanmaktadır, Şekil 4.1'de mekanizma gösterilmiştir (http-2).



Şekil 4.1. TMPRSS2 enzim inhibisyonu testi prensibi (http-2)

Pozitif kontrol olarak kitin içerisinde yer alan, TMPRSS2 inhibe edici etkinliği bilinen kamostat kullanılmıştır. Uçucu yağ ve uçucu bileşenlerin TMPRSS2 enzim inhibisyon sonuçları Tablo 4.13 ve 4.14'te yer almaktadır.

Origanum türleri arasında en yüksek inhibisyon *O. vulgare* (%80.4) uçucu yağında gözlenmiştir. *E. globulus*, TMPRSS2 aktivitesini %74.8 inhibe ederken *E. citriodora* daha az (%60.6) inhibisyon aktivitesi göstermiştir.

Saf bileşenlerin *in vitro* TMPRSS2 enzim inhibisyonları değerlendirildiğinde karvakrolün (%92.6) TMPRSS2 inhibisyonu timol (%70.6) ve 1,8-sineol (89.1)'a göre nispeten daha yüksek bulunmuştur (bkz. Tablo 4.12 ve Tablo 4.13).

Tablo 4.12. *Origanum* türleri TMPRSS2 enzim inhibisyon sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon ± SS
<i>Origanum onites</i>	20	53.91 ± 0.98
<i>O. minutiflorum</i>	20	72.05 ± 0.97
<i>O. vulgare</i>	20	80.39 ± 1.05
Karvakrol	5	92.57 ± 0.99
Timol	5	70.61 ± 1.16
Pozitif kontrol	10 µM (3.984 µg/mL)	96.02 ± 0.81

SS: Standart sapma

Tablo 4.13. *Eucalyptus* türleri TMPRSS2 enzim inhibisyon sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon ± SS
<i>Eucalyptus globulus</i>	20	74.82 ± 2.05
<i>E. citriodora</i>	20	60.55 ± 1.45
1,8-sineol	5	89.10 ± 1.03
Pozitif kontrol	10 µM (3.984 µg/mL)	96.02 ± 0.81

SS: Standart sapma

4.2.2.3 Nöraminidaz enzim inhibisyon sonuçları

Origanum ve *Eucalyptus* uçucu yağları ile ilgili uçucu bileşenler uygun konsantrasyonda hazırlandıktan sonra nöraminidaz enzim inhibisyonu aktivite kitinde yer alan prosedüre uygun enzim inhibisyonları test edilmiştir.

Uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin nöraminidaz inhibisyon aktivitesi incelendiğinde *Origanum* uçucu yağları içerisinde en yüksek inhibisyonu *O. minutiflorum*'un (%74.2) yaptığı gözlenmiştir (bkz. Tablo 4.14).

E. globulus'un ise %67.6 inhibisyon sağladığı ölçülmüştür. *E. citriodora* uçucu yağının inhibisyon potansiyeli olan %60.6 diğer test numunelerine oranla nispeten düşük olduğu tespit edilmiştir. Uçucu bileşenler arasında en yüksek inhibisyonu %89.9 ile karvakrol göstermiştir. İnhibisyon sonuçları Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.14. *Origanum* türleri nöraminidaz enzim inhibisyon sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% İnhibisyon \pm SS
<i>Origanum onites</i>	20	45.49 \pm 2.38
<i>O. minutiflorum</i>	20	76.30 \pm 1.03
<i>O. vulgare</i>	20	74.22 \pm 0.98
Karvakrol	5	89.87 \pm 0.89
Timol	5	68.17 \pm 1.98
Pozitif kontrol		97.08 \pm 0.90

SS: Standart sapma

Tablo 4.15. *Eucalyptus* türleri nöraminidaz enzim inhibisyon sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% İnhibisyon \pm SS
<i>Eucalyptus globulus</i>	20	67.59 \pm 0.97
<i>E. citriodora</i>	20	43.64 \pm 1.05
1,8-sineol	5	82.26 \pm 0.86
Pozitif kontrol		97.08 \pm 0.90

SS: Standart sapma

Ancak test edilen tüm enzimlerde karvakrolün tek başına enzim inhibisyon özelliği son derece fazla olmasına rağmen, karvakrol oranı en yüksek uçucu yağ (*O. onites*) en düşük enzim inhibisyonu göstermiştir. TMPRSS2 inhibisyonundan ise üç *Origanum* uçucu yağının da içerdikleri karvakrol oranları ile enzim inhibisyon yetenekleri ters orantılı olarak bulunmuştur. Söz konusu etkilerin karvakrolün yüksek affinite ile enzimin aktif bölgesine bağlanıp, uçucu yağ içerisinde yer alan diğer minör bileşenlerin bağlanmasına engel olması sonucunda gözlemlendiği düşünülmektedir. Ayrıca uçucu yağlarda karvakrolden daha etkin ancak miktarı daha az bir madde bulunuyor olabileceği, karvakrol enzimin aktif bölgesine bağlandığı için bu madde potansiyelini gösteremiyor olabileceği, ya da uçucu yağlarda enzim inhibisyonu açısından karvakrol ile kompetitif antagonist başka potansiyel bileşenler olabileceği düşünülmektedir.

Eucalyptus uçucu yağlarında ise, her üç enzimde de *E. globulus*'un enzim inhibe edici aktivitesi *E. citriodora*'ya göre fazla olduğu ölçülmüştür. *E. globulus* uçucu yağının ana bileşeni olan 1,8-sineol de aynı şekilde oldukça aktif bulunmuştur.

Bilgimiz dahilinde *Eucalyptus* ve *Origanum* uçucu yağları ile karvakrol, timol ve 1,8-sineolün deneysel *in vitro* ACE2, TMPRSS2 ve nöraminidaz inhibisyon aktivitesi bu proje kapsamında ilk defa çalışılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda *E. globulus* uçucu yağının H1N1, HSV1 ve adenovirüslere karşı hücre kültürü deneylerinde antiviral etkinliği gösterilmiştir (Cermelli vd., 2008) (Brochot vd., 2017). Rinosinüzit virüslerine karşı etkinliği bilinen 1,8-sineol'ün, antiviral mekanizmalarla ilişkili enzimleri inhibe

etme yeteneği, literatürde yer alan çalışmalar ile uyumlu ve bildiğimiz kadarıyla alanında ilk olması açısından özgündür (Müller vd., 2016; Demirci vd., 2022).

4.2.3. *In vitro* toksisite bulguları

Etkinlik selektivitesini belirlemek amacıyla test materyallerinin ve seçilen kombinasyonların *in vitro* toksisite testleri, hücre kültüründe makrofaj hücreleri (Raw264.7) üzerinde MTT yöntemi ile yapılmıştır.

Test materyallerinin antimikrobiyal aktivite deneyleri sonucunda bulunan MİK değerlerinin toksisite ve FİKİ değeri düşük olan kombinasyonlardan seçilen 7 kombinasyonun toksisitesi test edilmiştir. Test edilen kombinasyonların içerikleri ve FİKİ değerleri Tablo 4.16’da yer almaktadır.

Tablo 4.16. *Kombinasyon kodları ve FİKİ değerleri*

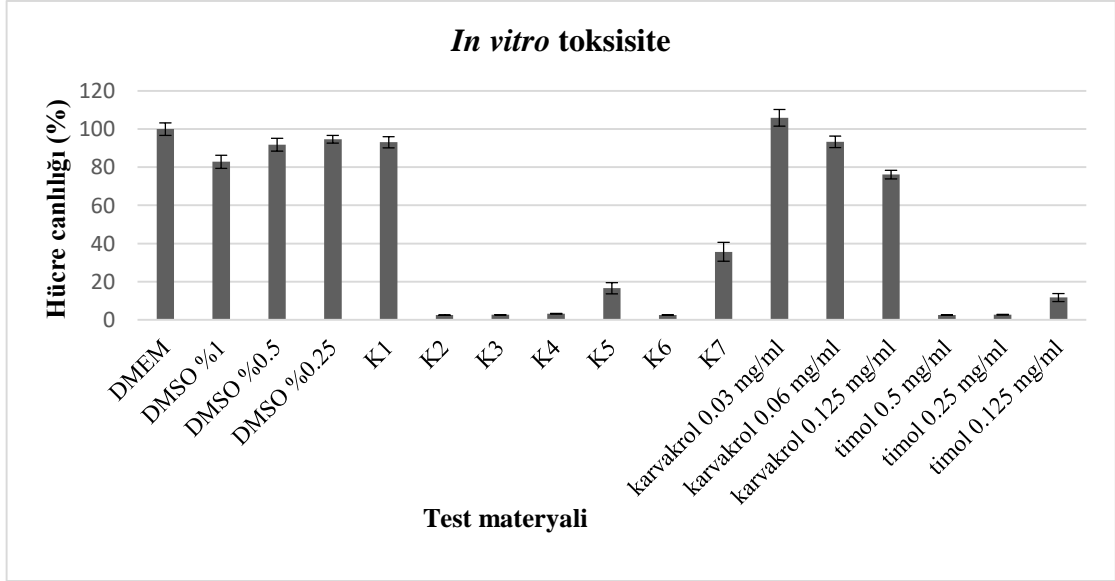
Kombinasyon kodu	Kombinasyon (konsantrasyon mg/mL*)	FİKİ değeri
K1	<i>O. onites</i> (0.06) / Karvakrol (0.06)	0.56
K2	<i>O. onites</i> (0.06) / Timol (0.5)	0.56
K3	<i>O. vulgare</i> (0.06) / Timol (0.125)	0.62
K4	<i>O. minutiflorum</i> (0.03) / Timol (0.125)	0.62
K5	<i>O. minutiflorum</i> (0.03) / Karvakrol (0.125)	0.62
K6	Karvakrol (0.06) / Timol (0.25)	0.51
K7	Karvakrol (0.125) / Ampisilin (0.06)	0.75

*Uçucu yağ ve bileşenlerin konsantrasyonları mg/mL olarak verilirken standart antimikrobiyal maddelerin konsantrasyonları mg/L verilmiştir.

Ampisilin ve siprofloksasin hariç diğer test materyallerinin tekil MİK değerleri neredeyse tüm hücreleri öldürmüşken, kombinasyonlarla erişilen MİK değerleri test edildiğinde daha yüksek hücre canlılığına erişilmiştir. Hücre canlılık oranları kontrol maddeleri ile birlikte Şekil 4.2’de yer almaktadır.

Kombinasyon 1 (*O. onites* 0.06 mg/mL + Karvakrol 0.06), kombinasyon 5 (*O. minutiflorum* 0.03 mg/mL + Karvakrol 0.125 mg/mL) ve kombinasyon 7 (Karvakrol 0.125 mg/mL + Ampisilin 0.06 mg/L) kombinasyonların tamamında tekil MİK değerlerinin üzerinde hücre canlılığı saptanmıştır.

Şekil 4.2’de, karşılaştırıldığında en yüksek hücre canlılığı kombinasyon 1’de, yani *O. onites* 0.06 mg/mL + Karvakrol 0.06 mg/mL kombinasyonunun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Hücre canlılık oranları

Hücre kültüründe gerçekleşen toksisite çalışmasında elde edilen veriler ışığında kombinasyon çalışmalarının toksisiteyi nispeten azaltma anlamında faydalı olduğu görülmüştür.

4.3.3. *In silico* yöntemler

4.3.3.1. *In silico* enzim-inhibitör kenetleme testleri

Moleküler yerleştirme/kenetleme bir molekülün diğerine kararlı bir kompleks oluşturmak için bağlanma yönelimini tahmin eden bir yöntemdir. Tercih edilen oryantasyon bilgisi, skorlama fonksiyonları kullanılarak iki molekül arasındaki ilişkinin veya bağlanma afinitesinin kuvvetini tahmin etmek için kullanılabilir.

Bilgisayar destekli kenetleme çalışmalarında enzimlerin ve ligandların üç boyutlu yapılarının olası kenetlenmeleri, pozisyonları ve bağ enerjileri hesaplanarak geniş ölçekli hedef molekül taraması yapılabilir. Aynı zamanda *in silico* çalışmalar sayesinde *in vitro* ya da *in vivo* çalışmalarda görülen etkinin mekanizmasını aydınlatmak, etkiden sorumlu olabilecek potansiyel madde konusunda da yorum yapabilmek mümkün olmaktadır.

Bilgisayar ortamında kenetlenmelerde birden fazla olası sonuç verilir, bu sonuçlar arasından en uygun sonucu seçmek ligandın enzimin hangi bölgesine ne şekilde (hangi aminoasitlerle hangi bağları yaparak) bağlandığı bilgisine bağlıdır. Programlardan alınan

sonuçları incelerken bu yorumu yapabilmek enzim yapısına hakim olmanın yanı sıra derin bir biyokimya ve kimya bilgisine sahip olmayı gerektirir.

Tez çalışmasında *in vitro* enzim aktivitesi bilinen uçucu yağların ana bileşenleri karvakrol, 1,8-sineol ve timolün ACE2, TMPRSS2 ve NA proteinlerinin bağlanma bölgeleri içindeki etkileşimlerine ve bağlanma tercihlerine ışık tutmak amacıyla, hedef enzimlerle kenetlenerek, uçucu yağların gösterdiği enzim inhibisyon etkisi ile uçucu bileşen arasındaki etkinin ilişkisi *in silico* protein-ligand kenetlemesi ve etkileşim profili incelenmiştir. Bu işlemler yapılırken kullanılan LigPrep, Protein Hazırlama İş Akışı (Protein Preparation Workflow), Reseptör Izgara Üretimi (Receptor Grid Generation), Ligand Docking SP, ChimeraX ve protein-ligand etkileşimi profil oluşturucunun (PLIP) bir arada kullanımı yalnızca ligand konformasyonlarının ve etkileşimlerinin tahminini kolaylaştırmakla kalmamış, aynı zamanda potansiyel ligand hedefinin daha derin bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır.

In silico deneylerde ayrıca, yeniden kenetleme yoluyla ACE2, TMPRSS2 ve NA bağlanma bölgeleri için yürütülen moleküler kenetleme simülasyonlarının doğruluğunu ve tahmin kabiliyetini doğrulamak amacıyla bilinen bağlanma afiniteleri ve yönelimleri olan ko-kristal ligandlar, Glide SP kullanılarak yeniden yerleştirme için referans ligandlar olarak kullanılmıştır. Kenetleme skorlarının ve protein-ligand etkileşimlerinin değerlendirilmesi ile kullanılan metodolojinin güvenilirliğine ilişkin bilgi edinilmiştir.

Kenetleme protokolünün doğruluğunu ve güvenilirliğini konfirme etmek üzere ko-kristal haldeki referans alınmıştır. Proteinlerle etkileşim halinde olan bu ligandlar yerlerinden çıkartılıp proteinlerin aynı bölgesine yeniden kenetleme işlemi yapılmış ve iki durum arasındaki bağlanma pozları değerlendirilmiştir. Evrensel kabul gören bir ilke olarak ko-kristal ligandın doğal bağlanma pozu ile yeniden kenetlenen ligandın öngörülen bağlanma pozu arasındaki kök-ortalama-kare sapma (RMSD) değerinin $< 2 \text{ \AA}$ olması beklenmektedir. İlgili protein-ligand kompleksleri ve pozlar arasındaki farklılıklar sırasıyla, ACE2 (PDB ID: 1R4L, ko-kristal ligand: ORE-1001, RMSD: 0.91 Å), TMPRSS2 (PDB ID: 7MEQ, ko-kristal ligand: 4-Guanidinobenzoik asit, RMSD: 1.07 Å) ve NA (PDB ID: 3TI5, ko-kristal ligand: Zanamivir, RMSD: 1.05 Å) olarak bulunmuştur. İlaçlarda ve diğer biyoaktif moleküllerde, izomerlerin aktivitelerinin farklı olması yani stereoselektif aktivite görülmesi olasılığı genelde yaygın bir durumdur. Bu nedenle *in silico* bağlanma enerjileri hesaplanırken (*R*)-(+)-Sitronellal ile (*S*)-(-)-Sitronellal'ın bağlanma enerjileri ayrı ayrı hesaplanmış, ancak sonuçlar birbirine yakın bulunmuştur.

İncelenen uçucu bileşiklerin hedef enzimlere bilgisayar ortamında kenetlenmesi Şekil 4.3'te topluca gösterilmektedir. Bu gösterim aynı zamanda protein-ligand muhtemel kenetlenmesini de görsel olarak doğrulamaktadır.

ACE2'nin bağlanma bölgesi Şekil 4.3-A-C'de verilmiştir. Etkileşimi oluşturan atomlar arasındaki uzaklık parantez içerisinde belirtilmektedir. Karvakrol, Leu144 (3.44 Å) ve Glu145 (3.44 Å) ile hidrofobik etkileşimlerde bulunmanın yanı sıra Tyr127 (1.80 Å) ile hidrojen bağı kurmuştur. Timol, Phe504 (3.98 Å), Tyr510 (3.56 Å) ve Tyr515 (3.67 Å) ile hidrofobik etkileşim gösterirken, Glu375 (1.72 Å) ile hidrojen bağıyla bağlanmıştır. 1,8-Sineol, Thr347 (4.00 Å), Phe504 (3.98 Å) ve Tyr510 (3.76 Å) ile hidrofobik etkileşimler göstermiştir. Ayrıca Tyr515 (2.05 Å) ile hidrojen bağı kurmuştur. 1,8-Sineolün eter oksijeni, His-374, His-378'in imidazole imido nitrojeni ve Glu-402'nin karboksilat oksijeni ile koordine edilen ve katalitik aktif bölgedeki esansiyel iyon ko-faktörü olan Zn⁺² iyonu ile tetrahedral geometriyi tamamlıyor gibi görünmektedir.

Kenetleme skorları ve protein-ligand etkileşimleri Tablo 4.17'de özetlenmiştir.

Tablo 4.17. Uçucu bileşenlerin hedef proteinlerle bağlanma enerjileri (kcal/mol)

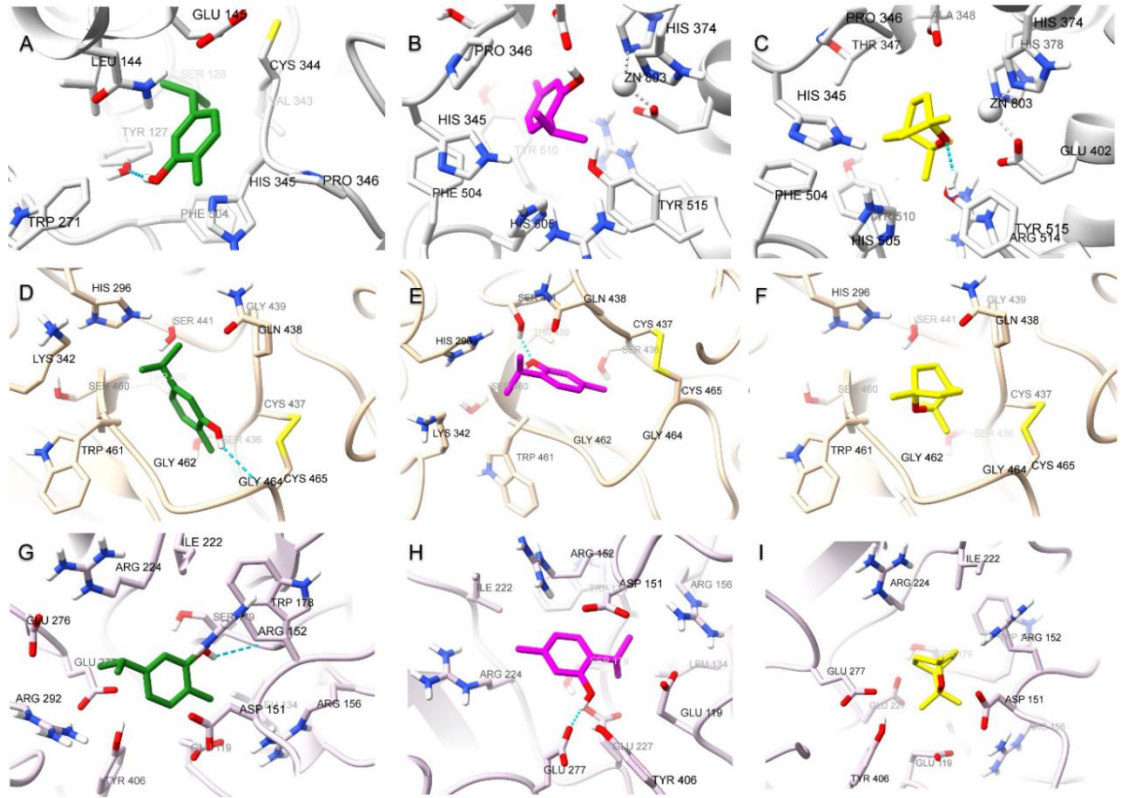
Bileşik	PubChem ID	ACE2		TMPRSS2		NA	
		SP GScore (kcal/mol)	Glide emodel	SP Gscore (kcal/mol)	Glide emodel	SP GScore kcal/mol	Glide emodel
Karvakrol	10364	-4.737	-29.217	-4.404	-32.038	-2.751	-28.261
Timol	6989	-1.979	-33.795	-4.987	-27.772	-2.648	-20.926
1,8-Sineol	2758	-2.732	-16.124	-3.538	-22.218	-1.924	-24.193
(R)-(+)-Sitronellal	75427	-3.473	-25.441	-3.188	-25.524	-1.560	-21.856
(S)-(-)-Sitronellal	443157	-3.089	-25.274	-2.933	-23.264	-1.581	-19.333
ORE-1001	448281	-12.506	-91.411				
4-Guanidinobenzoik asit	159772			-3.673	-32.901		
Zanamivir	60855					-9.760	-51.521

ACE2: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim-2, TMPRSS2: Transmembran Serin Proteaz 2, NA: Nöraminidaz

TMPRSS2'nin bağlanma alanı Şekil 4.3-D-F'de gösterilmiştir. Karvakrol, Trp461 (4.00 Å) ile hidrofobik etkileşimlerde bulunurken, Gly464 (1.86 Å) ile hidrojen bağı oluşturmuştur.

Timol, Ser441 (1.89 Å) ve Ser460 (1.88 Å) ile hidrojen bağı kurmuş ve Trp461 (3.96 Å) ile hidrofobik etkileşimlerde bulunmuştur. 1,8-Sineol, Thr459 (4.00 Å) ve Trp461 (3.88 Å) ile hidrofobik etkileşimlerde bulunurken ek olarak Gly462 (2.38 Å) ile hidrojen bağı meydana getirmiştir.

Nöraminidaz bağlanma alanı Şekil 4.3-G-I'da gösterilmektedir. Karvakrol, Asp151 (4.00 Å) ile hidrofobik etkileşimler kurarken Trp178 (2.07 Å) ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Timol, Glu119 (3.57 Å), Leu134 (3.49 Å) ve Arg152 (3.91 Å) ile hidrofobik etkileşimlerde bulunurken, Glu277 (1.48 Å) ve Tyr406 (2.20 Å) ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. 1,8-Sineol Glu119 (3.63 Å), Asp151 (3.74 Å), Arg152 (3.76 Å), Trp178 (3.55 Å) ve Arg224 (3.93 Å) ile hidrofobik etkileşimlerde bulunmaktadır.



Şekil 4.3. Karvakrol (yeşil), timol (mor) ve 1,8-sineolün (sarı) bağlanma pozları, (A-B-C) ACE2 (PDB ID: 1R4L), (D-E-F) TMPRSS2 (PDB ID: 7MEQ), (G-H-I) Nöraminidaz (PDB ID: 3T15).

Bu tez kapsamında yapılan *in vitro* deneylerden elde edilen, test materyallerinin inhibisyon potansiyelleri ile *in silico* deneylerden elde edilen kenetleme skorları tutarlı ve birbiri ile uyumlu sonuçlar vermiştir.

Ek olarak, *in silico* deneyler yardımı ile inhibitörlerin özellikle bağlanmayı tercih ettiği enzim alt bölgeleri tahmini olarak belirlenmiştir. Örneğin; karvakrolün üç enzimin aktif bölgelerinin üçünde de kararlı etkileşimler kurma potansiyeline sahip olabileceği bulunmuştur. Etkileşimler incelendiğinde ise, karvakrolün yaptığı ACE2'de Leu144 ve Glu145, TMPRSS2'de Trp461 ve NA'da Asp151 gibi önemli aminoasitlerle gözlemlenen hidrofobik etkileşimler, ligand bağlanmasında hidrofobik temasların önemini

vurgulamaktadır. Ek olarak, karvakrolün ACE2'de Tyr127, TMPRSS2'de Gly464 ve NA'da Trp178 ile yaptığı spesifik hidrojen bağlarının oluşumu, ligand tanımada polar etkileşimlerin de rolü olduğuna işaret etmektedir.

Karvakrolün yapısal izomeri olan timol, *in silico* testlerde kenetleme skorları ile uyumlu sayıda ve karakterde etkileşimler kurabileceğini göstermiştir. Özellikle, ACE2 ile kenetlenmesinde Glu375, TMPRSS2'de Ser441 ve Ser460 ve NA'da Glu277 ve Tyr406 ile oluşturulan hidrojen bağları, bu tür etkileşimlerin önemini yeniden doğrulamıştır. Ayrıca, ACE2'de Phe504, Tyr510 ve Tyr515, TMPRSS2'de Trp461 ve NA'da Glu119, Leu134 ve Arg152 gibi kritik aminoasitlerle önemli hidrofobik etkileşimlerin varlığı, yerleştirme sonuçlarının güvenilirliğini bir kez daha desteklemektedir.

1,8-Sineol de diğer iki uçucu bileşen gibi kenetlenme skoru tahminlerine uygun etkileşimler sergilemiştir. ACE2'de Thr347, Phe504 ve Tyr510, TMPRSS2'de Thr459 ve Trp461 ile ve NA'da Glu119, Asp151, Arg152, Trp178 ve Arg224 gibi rezidüer ile yaptığı hidrofobik etkileşimler, bu etkileşimlerin bağlanma stabilitesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu fikrini güçlendirmiştir.

Çinkoya bağımlı metaloenzimleri hedefleyen FDA onaylı ilaçların, diğerlerinin aksine karboksilat, tiyol veya hidroksamat gibi çinko bağlayıcı bir grup aracılığıyla Zn^{+2} iyon kofaktörü ile koordine edildiği kabul edildiği için özellikle Zn^{+2} iyonu ile yapılan etkileşimler önem kazanmaktadır (Hou vd., 2021). Zn^{+2} koordinasyonu ile ACE2 inhibisyonu ilişkisi daha önce yayınlanmış olan MLN-4760 isimli güçlü inhibitörün bağlanma modeli ile örneklendirilmiştir (Towler vd., 2004). Hem karvakrol hem de 1,8-sineolün ACE2 ile bağlanma özellikleri, bağ enerjileri ve Zn^{+2} iyonu ile yaptığı etkileşimler, *in vitro* koşullarda gözlenen yüksek inhibisyon ile tutarlıdır.

Son zamanda yapılan *in silico* çalışmalarda uçucu yağların içerdikleri uçucu bileşenler sayesinde SARS-CoV-2'ye karşı etkili olabileceği gösterilmiştir (Pillaiyar vd., 2022). Mekanizma özelinde incelendiğinde ise doğal kaynaklı maddelerin SARS-CoV-2'nin konak hücrelere geçişi üzerine etkilerini inceleyen *in silico* çalışmalar mevcuttur (Elfiky, 2021). Karvakrol ve 1,8-sineolün SARS-CoV-2 enzimleri olan ana proteaz (SARS-CoV-2 Mpro), endoribonükleaz (SARS-CoV-2 Nsp15/NendoU), ADP-riboz-1"-fosfotaz (SARS-CoV-2 ADRP), RNA-bağımlı RNA polimeraz (SARS-CoV-2 RdRp), spike proteinin bağlanma bölgesi (SARS-CoV-2 rS), ve insan anjiyotensin dönüştürücü enzim (hACE2) ile *in silico* kenetlenmeleri daha önce

incelenmiştir (Da Silva vd., 2020). Karvakrol ve timolün Mısırlı hastalardan izole edilen SARS-CoV-2 zincirleri üzerine *in vitro* etkileri ve SARS-CoV-2 RdRp, SARS-CoV-2 rS ve ana proteazı (M^{pro}) ile bağlanma potansiyelleri değerlendirilmiş ve enzimlerin aktif bölgelerine bağlanma potansiyelleri olduğu sonucuna varılmıştır (Seadawy vd., 2020). Daha önce yapılmış olan *in silico* bir çalışmada karvakrolün TMPRSS2 ile yoğun bir şekilde etkileşime girebileceği öngörülmüştür (İstifli vd., 2020). Bu bağlamda tez kapsamında yapılan *in vitro* enzim aktivitesi sonuçları ile elde edilen *in silico* kenetleme sonuçları ve literatürde yer alan sonuçlar uyumlu ve tutarlıdır.

4.3.3.2. *In silico* farmakokinetik ve toksisite sonuçları

SwissADME web sunucusunda moleküllerin SMILES formatındaki iki boyutlu temsilleri ile yapılan *in silico* çalışmada; fizikokimyasal yapı ve lipofillik, boyut, polarite, çözünürlük, doyumluk ve esneklik özelliklerini içeren biyoyararlanım radarı sonuçları bulunmuştur. Bulunan sonuçlar Tablo 4.18'de yer almaktadır.

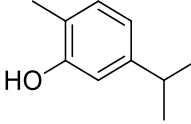
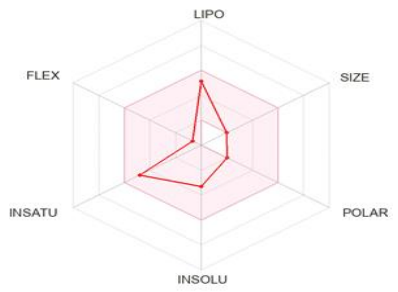
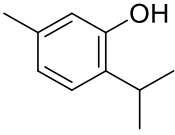
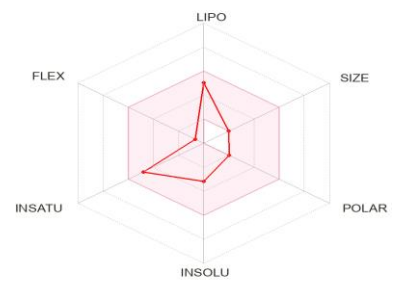
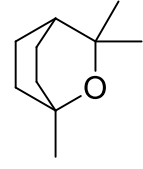
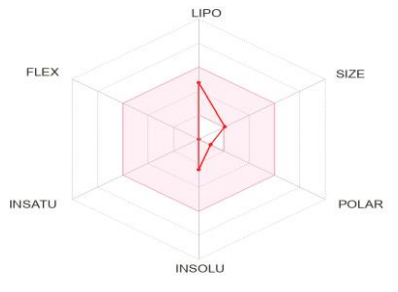
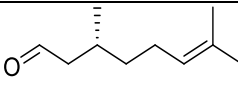
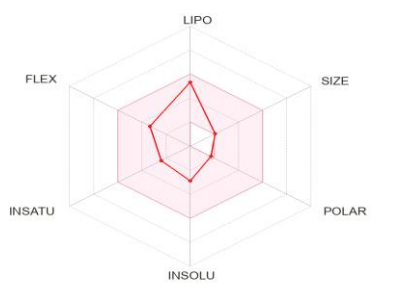
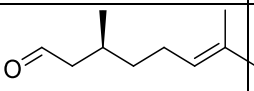
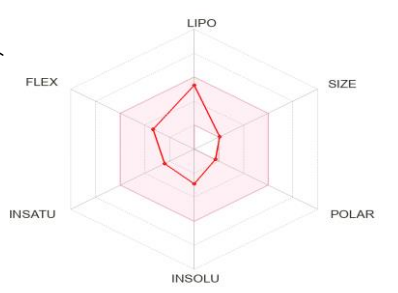
Biyoyararlanım radarı sonuçlarında altıgen olarak gösterilen bileşik grafiğinin köşeleri, ilaç aday moleküllerin biyoyararlanımlarını etkileyen karakteristik bir özelliğini göstermektedir:

- Lipofilite (LIPO): $-0,7 < XLOGP3 < +5,0$
- Molekül ağırlığı (SIZE): $150 \text{ g/mol} < MW < 500 \text{ g/mol}$
- Polarite (POLAR): $20 \text{ \AA} < TPSA < 130 \text{ \AA}$
- Çözünürlük (INSOLU): logS 6'dan büyük olmamalı
- Doygunluk (INSATU): sp³ hibritleşmesinde olan karbon fraksiyonları 0.25'ten az olmamalı
- Esneklik (FLEX): molekülün en fazla 9 dönebilen bağ içermesi

Pembe ile gösterilen alan ise tüm özellikler için ideal alanı işaret etmektedir. SwissADME programından alınan tahmini verilerine göre, test edilen uçucu bileşenlerin hiçbirinin ideal oral biyoyararlanıma sahip olmadığı görülmüştür.

Aynı şekilde hesap verilerine göre ideal oral biyoyararlanıma en yakın olan bileşenler ise (*R*)-(+)-sitronellal ve (*S*)-(-)-sitronellal olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.18. Uçucu bileşenlerin kimyasal yapısı ve biyoyararlanım radarı

Bileşik ismi	SMILES Kodu	Kimyasal Yapısı	Biyoyararlanım Radarı
Karvakrol	<chem>CC1=C(C=C(C=C1)C(C)C)O</chem>		
Timol	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem>		
1,8-Sineol	<chem>CC1(C2CCC(O1)(CC2)C)C</chem>		
(R)-(+)-Sitronellal	<chem>C[C@H](CCC=C(C)C)CC=O</chem>		
(S)-(-)-Sitronellal	<chem>C[C@@H](CCC=C(C)C)CC=O</chem>		

Biyoyararlanım radarı sonuçlarına ek olarak SwissADME web sunucusu kullanılarak elde edilen diğer veriler Tablo 4.19’da özetlenmiştir.

Tablo 4.19. *SwissADME web sunucusu kullanılarak elde edilen veriler*

		Karvakrol	Timol	1,8- Sineol	Sitronellal
Fizikokimyasal özellikler	Molekül ağırlığı	150.22 g/mol	150.22 g/mol	154.25 g/mol	154.25 g/mol
	Dönebilir bağlar	1	1	0	5
	Hidrojen bağı alıcı say.	1	1	1	1
	Hidrojen bağı verici say.	1	1	0	0
Lipofillik	iLOGP	2.24	2.32	2.58	2.49
	XLOGP3	3.49	3.3	2.74	3.83
	WLOGP	2.82	2.82	2.74	2.96
	MLOGP	2.76	2.76	2.45	2.59
Suda çözünürlük	ESOL Log S	-3.31	-3.19	-2.52	-2.88
	ESOL sınıfı	çözünür	çözünür	çözünür	çözünür
Farmakokinetik	GI emilim	yüksek	yüksek	yüksek	yüksek
	Kan-beyin bariyeri geçirgenliği	evet	evet	evet	evet
	Pgp substrat	hayır	hayır	hayır	hayır
	CYP1A2 inhibitör	evet	evet	hayır	hayır
	CYP2C19 inhibitör	hayır	hayır	hayır	hayır
	CYP2C9 inhibitör	hayır	hayır	hayır	hayır
	CYP2D6 inhibitör	hayır	hayır	hayır	hayır
	CYP3A4 inhibitör	hayır	hayır	hayır	hayır
	log Kp (cm/s)	-4.74 cm/s	-4.87 cm/s	-5.3 cm/s	-4.52 cm/s
İlaç benzerliği	Lipinski ihlal	0	0	0	0
	Ghose ihlal	1 MW<160	1 MW<160	1 MW<160	1 MW<160
	Veber ihlal	0	0	0	0
	Egan ihlal	0	0	0	0
	Muegge ihlal	2 *MW<200 *heteroatom <2	2 *MW<200 *heteroatom <2	2 *MW<200 *heteroatom <2	2 *MW<200 *Heteroatom<2

SwissADME internet sunucusu kullanılarak yapılan *in silico* değerlendirilmede, sitronellalın stereoizomerleri için tek bir sonuç alınmıştır. Değerlendirme yapılırken kullanılan SwissADME parametreleri ve sonuçların yorumu aşağıda listelenmiştir:

Fizikokimyasal özellikler: Moleküllerin kapalı formülü, moleküler ağırlıkları (MW), aromatik ağır atom sayısı ile ağır atom sayısı, fraksiyon Csp³, dönebilir bağ sayısı, hidrojen bağı alıcı ve verici sayısı, moleküler kırılma (MR) ve topolojik polar yüzey alanı (TPSA) gibi basit moleküler ve fizyokimyasal özellikleri bu bölümde yer almaktadır.

Lipofillik: İlaç olma adına aday molekülleri elerken kullanılan oldukça önemli bir özellik olan lipofillik için klasik tanımlayıcı n-oktanol ve su arasındaki bölünme katsayısı olan logpo/w’dır. Bu tahminin doğruluğunu arttırmak için birden fazla parametre

kullanılmaktadır. SwissADME yazılımı iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP ve SILICOS-IT olmak üzere beş tahmine dayalı modele erişim sağlamaktadır. Ortalama log Po/w ise tüm modellerin aritmetik ortalamasıdır (Daina vd., 2017).

Suda çözünürlük: Moleküllerin suda çözünürlükleri formülasyon oluşturma ve kullanım kolaylığı açısından önemli bir parametredir. Suda çözünürlüğü tahmin etmek için birden fazla model kullanılmaktadır. SwissADME suda çözünürlüğü tahmin etmek için ESOL, Ali ve SILICOS-IT olmak üzere toplamda üç model kullanılmaktadır. Her üç model de tahmin edilen değerler mol/l ve mg/mL olarak sudaki molar çözünürlüğün ondalık logaritmasıdır (log S). Log S değerlerinin aralığına göre (çözünmez < -10 < zayıf < -6 < orta derecede < -4 < çözünür < -2 < çok < 0 < çok iyi) çözünürlük sınıfı tahmin edilmektedir (Daina vd., 2017).

Absorpsiyonu etkileyen parametrelerden fizikokimyasal özellikler, moleküler ağırlığı, lipofilik ve su çözünürlüğünün dört madde için de yakın olduğu öngörülmüştür.

Farmakokinetik: Gastrointestinal absorpsiyon, kan-beyin bariyeri (BBB) geçirgenliği, P-glikoprotein substrat ve Sitokrom P450 enzimleri ile etkileşimi farmakokinetik özelliklerde gösterilmektedir.

Dört maddenin de gastrointestinal absorpsiyonu yüksek olarak tahmin edilmiştir. Moleküllerin düşük molekül ağırlıkları ve lipofilik özellikleri göz önüne alındığında elde edilen sonuç tutarlıdır.

LogKp deri geçirgenliğini göstermektedir, Kp, molekül büyüklüğü ve lipofilik ile doğrudan ilişkilidir. LogKp değeri ne kadar negatifse deri geçirgenliği o kadar az olmaktadır. Deri geçirgenliği en az olan molekül 1,8-sineol olarak tahmin edilmiştir.

Farmakokinetik özellikleri tanımlarken kullanılan bir diğer parametre olan Sitokrom P450 enzimleri, metabolik biyotransformasyon yoluyla ilaç eliminasyonunda oldukça önemli rol oynamaktadır. Terapötik amaçla kullanılan maddelerin % 50-90'ının ilaç-ilaç etkileşimlerinin başlıca nedeni olan CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 Sitokrom enzimlerinin substratı olduğu tahmin edilmektedir. SwissADME programında maddelerin izoenzim türüne göre inhibitör olup olmadığı tahmin edilmektedir (Daina vd., 2017).

Sitokrom P450 (CYP) enzimleri doğrudan metabolizma üzerine etkili olan enzimlerdir. CYP enzimlerinin metabolizması ilaç-ilaç, ilaç-besin etkileşimlerinde önemli yer tutmaktadır (Omura and Sato, 1962; 1964a; 1964b). Karvakrol ve timolün CYP1A2 inhibitörü olduğu, 1,8-sineol ve sitronellalın CYP1A2 inhibitörü olmadığı, buna

ek olarak tüm uçucu bileşenlerin CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 ve CYP3A4 enzimlerinin inhibitörü olmadığı öngörülmüştür.

Dağılımı etkileyen kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin ise her dört madde için de geçirgen olduğu ve dört maddenin de P-glikoprotein (P-gp) substratı olmadığı sonucuna varılmıştır.

İlaç benzerliği: Bir maddenin biyoyararlanım açısından oral ilaç olma şansı bu başlık altında değerlendirilmektedir. Değerlendirme yapılırken bileşiklerin yapısal veya fizikokimyasal özellikleri niteliksel olarak analiz edilerek farmakokinetik profili ile uyumsuz özelliklere sahip olan moleküller elenmektedir. Molekülün oral biyoyararlanımını 5 farklı (Lipinski, Ghose, Veber, Egan ve Muegge) yöntemle dayanarak değerlendirmektedir.

Bir molekülün sıçanda en az %10 oral biyoyararlanımı olup olmadığını veya ölçülebilir CaCO₂ geçirgenliğine sahip olup olmadığını gösteren Abbot skoru da değerlendirmede kullanılmaktadır (Daina vd., 2017).

SwissADME yazılımından elde edilen sonuçlara göre 4 maddenin de ilaç benzerliği açısından hiçbir Lipinski kuralını ihlal etmedikleri ve diğer modellere de uyumlu oldukları dolayısı ile ilaç molekülü olarak değerlendirilebilecekleri öngörülmüştür. Değerlendirmede kullanılan modeller, değerlendirme parametreleri ve limit değerler Tablo 4.20'de listelenmiştir.

Tablo 4.20. *SwissADME yazılımında kullanılan modeller*

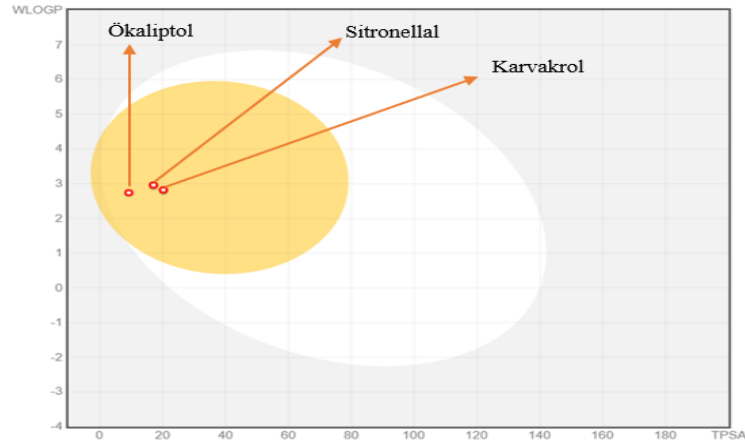
Model	Değerlendirme parametreleri	Değerler
Lipinski	Moleküler ağırlık Lipofillik Hidrojen bağ alıcı Hidrojen bağ verici	≤ 500 ≤ 5 ≤ 10 ≤ 5
Ghose	Moleküler ağırlık (MW) Lipofillik Molar kırılabilirlik (MR) Toplam atom sayısı	$160 \leq MW \leq 480$ $-0,4 \leq WLOGP \leq 5,6$ $40 \leq MR \leq 130$ $20 \leq \text{atom} \leq 70$
Veber	Dönebilir bağ sayısı TPSA	≤ 10 ≤ 140
Muegge	Moleküler ağırlık Lipofillik TPSA Halkasal yapı sayısı Karbon atom sayısı Heteroatom sayısı Dönebilir bağ sayısı Hidrojen bağ alıcı Hidrojen bağ verici	$200 \leq MW \leq 600$ $-2 \leq WLOGP \leq 5$ ≤ 150 ≤ 7 > 4 > 1 ≤ 15 ≤ 10 ≤ 5

Tablo 4.20. (Devam) *SwissADME yazılımında kullanılan modeller*

Egan	Lipofilik TPSA	$\leq 5,88$ $\leq 131,6$
------	-------------------	-----------------------------

SwissADME yazılımı ayrıca beyin veya bağırsak ilaç geçirgenliğini incelemek için geliştirilmiş BOILED-Egg grafik modeline sahiptir. Bu grafik modelinde sarı bölge kan-beyin bariyeri (BBB) geçirgenliğini, beyaz bölge insan bağırsak emilimini (HIA), gri bölge ise düşük absorpsiyon ve sınırlı beyin geçirgenliği kategorisine giren molekülleri temsil etmektedir. Ayrıca aynı düzlemde ile merkezi sinir sisteminden veya gastrointestinal lümene aktif akış P-gp substratları olan moleküller için mavi noktalar ve P-gp substrat olmayan moleküller için kırmızı noktalarla gösterilmektedir (Daina ve Zoete, 2016).

BOILED-Egg modeli kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te yer almaktadır.



Şekil 4.4. *BOILED-Egg modeli gösterimi. (sarı bölge kan-beyin bariyeri (BBB) geçirgenliğini, beyaz bölge insan bağırsak emilimini (HIA), gri bölge ise düşük absorpsiyon ve sınırlı beyin geçirgenliğini, kırmızı noktalar P glikoproteinninin substratı olmadığını temsil etmektedir.)*

BOILED-Egg modelinde sadece 1,8-sineol, sitronellal ve karvakrol için sonuç alınmıştır. Modele göre her üç maddenin de kan-beyin-bariyerinden geçebilen dolayısı ile merkezi sinir sisteminde etki gösterebilen, bağırsak emilimi olan ve P-gp substratı olmayan moleküller oldukları tahmin edilmiştir.

P-gp, moleküllerin biyolojik membranlardan aktif geçiş yeteneklerini tahmin etmek için kullanılan önemli bir parametredir. Bir maddenin P-gp substratı olup olmadığı bilgisi, gastrointestinal duvardan lümene ya da beyine geçiş gibi biyolojik membranlardan aktif akışı değerlendirmek için anahtar görevi görmektedir (Daina vd., 2017). Elde edilen *in*

silico sonuçlar tahmin niteliğinde olup daha detaylı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir.

PkCSM sunucusunda bileşiklerin atomları ve yaptıkları bağlar göz önüne alınarak üç boyutlu grafik yapıları sezgisel olarak tahmin edilmekte ve yorumlar buna dayalı olarak yapılmaktadır. PkCSM web sunucusu kullanılarak elde edilen toksisite değerlendirme sonuçları Tablo 4.21’de verilmiştir.

Tablo 4.21. PkCSM kullanılarak tanımlanan moleküllerin *in silico* toksisite değerlendirme sonuçları

	Birim	Karvakrol	1.8-Sineol	Sitronellal
Ames toksisitesi	Kategori (Evet/Hayır)	Hayır	Hayır	Hayır
Maksimum tolere edilebilen doz (insan)	log mg/kg/day	1.007	0.553	0.59
hERG I inhibisyonu	Kategori (Evet/Hayır)	Hayır	Hayır	Hayır
hERG II inhibisyonu	Kategori (Evet/Hayır)	Hayır	Hayır	Hayır
Oral Rat Akut Toksikite (LD_{50})	mol/kg	2.074	2.01	1.634
Oral Rat Kronik Toksikite (LOAEL)	log mg/kg_bw/day	2.212	2.029	2.128
Hepatotoksosite	Kategori (Evet/Hayır)	Evet	Hayır	Hayır
Deri hassasiyeti	Kategori (Evet/Hayır)	Evet	Evet	Evet
<i>T. pyriformis</i> toksisitesi	log ug/L	0.387	0.171	0.804
Minnow toksisitesi	log mM	1.213	1.735	0.825

PkCSM sistemine girilen molekülden iki temel bilgi alınmaktadır; moleküllerin mesafe tabanlı graf imzaları ile bileşiğin moleküler özellikler, toksifor ve farmakofor gruplar gibi genel özellikleri. Moleküllerin farmakokinetik ve toksisite profilleri tahmin edilirken absorpsiyon için yedi belirleyici parametre, dağılım için dört belirleyici parametre, metabolizma için yedi belirleyici parametre, eliminasyon için iki belirleyici parametre ve toksisite için 10 belirleyici parametre kullanılmaktadır (Pires vd., 2015).

pkCSM’den alınan sonuçlar iki gruba ayrılmaktadır, birinci grup farmakokinetik veya toksisite özelliğinin sayısal niceliğini tahmin etmeyi amaçlayan regresyon modelleri içerirken, ikinci grup tahminler ise sonuçları evet/hayır diye iki kategoride değerlendiren tahminlerdir.

PkCSM sunucusundan elde edilen sonuçlara dayanarak, maddelerin mutajenik ve hepatotoksik olmadıkları ve LD_{50} değerlerinde göre yutulması halinde kısmen zehirli oldukları ve bu nedenle güvenli olarak değerlendirilebilecekleri tahmin edilmektedir. Ancak toksisite tahmin sonuçları yapay zeka kullanılarak elde edildiği için *in vitro* ve *in vivo* testler ile desteklenmelidir.

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında ticari olarak temin edilen *Origanum* sp. ve *Eucalyptus* sp. uçucu yağları ile karvakrol, timol ve 1,8-sineol uçucu bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerinde farklı oranlardaki kombinasyonları sinerjik/antagonistik etkileşmeler açısından siprofloksasin ve ampisilin ile birlikte değerlendirilmiştir. Ayrıca uçucu yağlar ve maddeler viral enzim inhibisyonları ile ilişkili hedef enzimlere kimyasal bağlanma özellikleri *in vitro* ve *in silico* yöntemler ile test edilmiştir. Söz konusu uçucu yağlar ve uçucu yağların kombinasyonları, etkin konsantrasyonlara göre belirlenen bir konsantrasyon aralığında güvenlilik için *in vitro* toksisite testleri hücre kültüründe test edilmiştir. Uçucu yağların ana bileşenleri ADME ve toksisite özellikleri açısından *in silico* değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan *Eucalyptus* sp. ve *Origanum* sp. uçucu yağları, geniş antibakteriyel etkinliklerinin halk arasında bu amaçla kullanılması nedeniyle sürdürülebilirlik açısından tercih edilerek seçilmiştir.

Test numunelerini model olarak önce Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerine antimikrobiyal etkinlikleri açısından denenmiştir. MİK değerleri belirlenen uçucu yağlar, ana bileşenleri ile kombine edilerek potansiyelleri incelenip, ayrıca uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin sentetik antimikrobiyal maddelerle kombinasyonları değerlendirilmiştir.

Hem *Origanum* hem *Eucalyptus* uçucu yağlarının çeşitli enfeksiyon durumlarında kullanımı ve antiviral etkileri bilinse de söz konusu uçucu yağların birbiriyle ve sentetik maddelerle kombinasyonlarının antimikrobiyal etkileri ve sinerjik/antagonist etkileri bakımından değerlendirilmesi yapılmamıştır. Yapılan tez çalışması ile literatürdeki bu bilgi eksikliğinin giderilmesi amaçlanmıştır.

Ayrıca uçucu yağların ve yağların ana bileşenlerinin antiviral etkileri üzerine yapılan çalışmalar genellikle *in silico* çalışmalar şeklindedir. Karvakrol, timol ve 1,8-sineolün viral hayat döngüsünde önemli enzimler olan, ACE2, Nöraminidaz ve TMPRSS2 ile *in vitro* inhibisyonlarına paralel olarak *in vitro* enzim inhibisyonlarında görülen etkilerden sorumlu bileşikler ve etki mekanizmalarını aydınlatma adına *in silico* moleküler kenetleme yapılması ve uçucu bileşenlerin *in silico* farmakokinetik ve toksisite değerlendirmelerinin yapılması açısından da özgündür. Uçucu bileşenler yeni inhibitör madde olarak literatürde ve uygulamalarda değerlendirilebilir.

Tez çalışmamızda kullandığımız *in silico* veriler oldukça günceldir. Örneğin hedef enzimlerimizden biri olan ACE2'nin kullandığımız formunun 3 boyutlu yapısı 2004 yılında yayınlanmışken, nöraminidazın kullandığımız formu olan zanamivir ile kompleks halindeki yapısı (PDB ID: 3TI5) ve bağlanma bölgesinin özellikleri 2011 yılında, TMPRSS2'nin nafamostat ile kompleks haldeki yapısı (PDB ID: 7MEQ) ve bağlanma bölgesinin özellikleri 2022 yılında yayınlanan çalışmalarla aydınlatılmıştır (Towler vd., 2004; Vavricka vd., 2011; Fraser vd., 2022).

Daha önce belirtilen hususların yanı sıra *in silico* veriler deneysel veriler ile desteklendiğinde tekrarlanabilirlik açısından önemli veriler sağlamaktadır. Çalışmamızda *in vitro* deneyler ve *in silico* deneyler paralel yürütülmüştür.

Elimizdeki sonuçlara dayanarak *Origanum* ve *Eucalyptus* uçucu yağlarının *in vivo* deneylerle de desteklenerek, virüslere ve özellikle de H1N1 ve koronavirüslere karşı potansiyel bir antiviral ürün olarak değerlendirilebileceği söylenebilmektedir. Deneyler ticari olarak temin edilen uçucu yağlarla yapılmış olup, Farmakope kalitesinde uçucu yağlar olmasalar dahi etkinlik görülmüştür. Ayrıca *Origanum* uçucu yağlarının ve karvakrolün siprofloksasin ve ampisilin ile birlikte kullanıldığında, antimikrobiyal maddelerin etkisini arttırdığı, dolayısı ile direnç gelişimini engelleme potansiyellerinin olduğu ve ayrıca söz konusu kombinasyonların kombinasyon halinde toksisiteyi arttırmadığı bulunmuştur.

Tez kapsamında yapılan çalışmaların yanı sıra geniş spektremlü birçok bakteriyel enfeksiyona karşı etkili olan uçucu yağların yaygın kullanımlarına bakıldığında genelde inhalasyon yoluyla kullanıldıkları görülmektedir. Özellikle dönemsel solunum yolu epidemilerinde, kısa süre içerisinde solunum yolu mukozasında yüksek konsantrasyona erişip etki göstermeleri ve yine vücuttan solunum yolu ile uzaklaştırılmaları beklendiği için ciddi bir sistemik ilaç etkileşimine girmeksizin kullanılabilen ön görülmektedir. Bu sebeple *Origanum* ve *Eucalyptus* uçucu yağları ile karvaktol ve timol, kullanılan antibiyotik ve diğer medikal tedavileri etkilemeden dönemsel epidemilerde hem antibakteriyel etkileri hem de antiviral potansiyelleri nedeniyle tercih edilerek kullanılabilirlerdir.

Bulgular doğrultusunda gelecekte yapılması önerilen çalışmalar, söz konusu uçucu yağların fraksiyonlanarak karvakrolce zengin ve diğer alt fraksiyonlarının da sistematik olarak incelenmesidir. Mevcut tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen etkin ve toksik

olmayan antimikrobiyal kombinasyonun daha kapsamlı *in vivo* çalışmalarla da test edilmesidir.

Genel olarak günümüzde uçucu yağlarla klinik çalışma eksikliği, klinik olarak uygulanabilir farmasötik formların bulunmaması ve orta düzeyde klinik etkililik nedeniyle ciddi sistemik enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin yerini tutamasa da lokal enfeksiyonların tedavisi için kullanımları daha sistematik ve bilimsel olarak çalışılmalıdır. Bu alanda hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmaların yaygınlaşması gerekmektedir.

Doğal ürünler/preparatlar ve bu doğal ürünlerden izole edilen bileşikler çeşitli hastalıkların tedavisinde kilit rol oynasa da bitkisel ürünlerin etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamadığı için, doğal ürünlerde sıklıkla gözlenen, bitkilerden izole edilen etken maddelerin hedef farmakolojik etki anlamında bitkisel üründen daha az etkili olduğu durumlarda bu durumun sebebinin sinerjiyle güçlendirilmiş biyoyararlanım mı, kümülatif etki mi, aditivite mi yoksa farmakokinamik başka özelliklerden mi kaynaklandığı tam anlamıyla aydınlatılamamaktadır (Williamson, 2001). Söz konusu soru işaretlerini gidermek için izole edilen bileşenlerin ayrı ayrı mekanizmalarının aydınlatılması ve kombinasyon halinde mekanizmalarının aydınlatılması önerilmiştir (Wagner, 1999). Bu nedenle ileride planlanacak çalışmalarda *in silico* tekniklerin de yardımıyla mekanizmaların aydınlatılması üzerinde planlı ve detaylı incelenmesine ihtiyaç vardır.

Tekrarlayan ciddi kronik enfeksiyonlar da dahil olmak üzere bulaşıcı hastalıkların gelişmesine karşı mücadele etmek için bağışıklık sisteminin etkin işlevselliğine ihtiyaç duyulmaktadır. Araştırmalar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok modern yaygın hastalığın inflamatuvar süreçlerle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bağışıklık sisteminin tepkisini artıracak ve modüle edecek yeni maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Uçucu yağların patojenler üzerine etkileri üzerine çalışılan ve gelecek vadeden bir konu olmakla birlikte, uçucu yağların aynı zamanda, antikorlar, sitokinler ve dendritik hücreler gibi bileşenlerinin kullanımı yoluyla bağışıklık sistemini uyarabileceği ve uçucu yağ bileşenlerinin anti-enflamatuvar ve antimikrobiyal ilaçlarla birlikte kullanımda olumlu etkileşimler gösterebileceği belirtilmiştir (Orhan vd., 2016; Grazul vd., 2023). Bu nedenle, klinik anlamda tıbbi kullanım için uçucu yağlar ve bunların aktif bileşenleri arasındaki olası sinerjilerin *in vivo* ortamda araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Tezin bütününde, doğal kaynaklardan elde edilen *Origanum* ve *Eucalyptus* uçucu yağ ve bileşenlerinin çeşitli kombinasyonlarının antimikrobiyal etkilere sahip olduğu, söz konusu uçucu yağ ve bileşenlerin aynı zamanda antiviral etkinlik potansiyellerinin olduğu sistematik olarak gösterilmiştir. Elde edilen yeni sonuçlar bilim dünyasında giderek daha fazla uygulama alanı bulan *in silico* tekniklerle desteklenmiştir. Bu sayede uçucu yağlar ve uçucu bileşenlerin sağlık alanında oldukça önemli bir konu olan yeni antimikrobiyal ve antiviral maddeleri/kombinasyonlarını tedavi sistemine kazandırma, antibakteriyel direnci engelleme anlamında önemi bir kez daha vurgulanmıştır. Saf ve karışım olarak uçucu bileşenler yeni enzim inhibitör maddeleri olarak literatürde ve uygulamalarda değerlendirilme potansiyeline sahiptir. Tez kapsamında elde edilen bulgular alanında ilk olma özelliği taşıdığından daha ileri çalışmalar için veri sağlamaktadır.

KAYNAKÇA

- Abdelli, I., Hassani, F., Brikci, S. B., and Ghalem, S. (2021) In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by *Ammoides verticillata* components harvested from Western Algeria. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (9), 3263-76.
- Abulrob, A-N., Suller, M.T.E, Gumbleton, M., Simons, C., and Russell, A.D. (2004). Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. *Phytochemistry*, 65, 3021–7.
- Aelenei, P., Rimbu, C. M., Guguianu, E., Dimitriu, G., Aprotosoai, A. C., Brebu, M., ... and Miron, A. (2019). Coriander essential oil and linalool–interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in applied microbiology*, 68(2), 156-164.
- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., and Schroeder, M. (2021). PLIP 2021: Expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic acids Research*, 49 (W1), W530-4.
- Ak-Sakallı, E., Teralı, K., Karadağ, A. E., Biltekin, S. N., Koşar, M., Demirci, B., and Demirci, F. (2022). In vitro and in silico evaluation of ACE2 and LOX inhibitory activity of *Eucalyptus* essential oils, 1, 8-cineole, and citronellal. *Natural Product Communications*, 17 (6), 1934578X221109409.
- Alabboud, M., Javadmanesh, A. (2020). *In silico* study of various antiviral drugs, vitamins, and natural substances as potential binding compounds with SARS-CoV-2 main protease. *DYSONA-Life Science*, 1(2), 44-63.
- AlMatar, M., Albarri, O., Makky, E.A. and Köksal, F. (2021). Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacological Reports*, 73, 1–16.
- Astani, A., Reichling, J., and Schnitzler, P. (2010). Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24 (5), 673-9.
- Baell, J.B., and Holloway, G.A. (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 2719-40.
- Başer, K.H.C., Özek, T., Tümen, G., and Sezik, E. (1993). Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 619–623.
- Başer, K.H.C., Demirci, B., Kirimer, N., Satil, F., Tümen, G. (2002). The essential oils of *Thymus migricus* and *T. Fedtschenkoi* var. *handelii* from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 41-5.

- Başer, K.H.C. ve Demirci, F. (2007). Chemistry of Essential Oils. R. G. Berger (Ed.) *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* içinde (43-86). Springer, Berlin.
- Başer, K.H.C. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14 (29), 3106-3119.
- Başer, K.H.C. ve Demirci, F. (2011). Essential Oils. C. Ley (ed) *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* içinde (1-37). John Wiley & Sons.
- Başer, K.H.C. (2012). Bitkisel Droğların Standart / Farmakope Monografları. MISED Dergi, 27-28, 45-48.
- Başer, K.H.C. ve Kırimer, N. (2022). Uçucu yağlar. *Farmakognozi ve Fitoterapi* içinde (356-376). İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri.
- Başer, K.H.C., Karadağ, A.E., Biltekin, S.N., Ertürk, M. and Demirci, F. (2023). *In Vitro* Antiviral Evaluations of Coldmix[®]: An Essential Oil Blend against SARS-CoV-2. *Current Issues in Molecular Biology*, 45, 677-684.
- Batish, D.R., Singh, H. P., Kohli, R. K., and Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256, 2166-2174.
- Berenbaum, M.C. (1978). A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. *The Journal of Infectious Disease*, 137(2), 122–130.
- Bertram, S., Heurich, A., Lavender, H., Gierer, S., Danisch, S., Perin, P., Lucas, J. M., Nelson, P. S., Pöhlmann, S., and Soilleux, E. J. (2012). Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts. *PLoS ONE*, 7 (4), 1–8.
- Beşirik, N.Ş., and Göger, G. (2023). Antimicrobial evaluation of the Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) leaf essential oil combination with standard antimicrobial compounds. *International Journal of Secondary Metabolite*, 10(3), 385-393.
- Biltekin, S. N., Karadağ, A. E., Demirci, B., and Demirci, F. (2022). ACE2 and LOX Enzyme Inhibitions of Different Lavender Essential Oils and Major Components Linalool and Camphor. *ACS omega*, 7(41), 36561-36566.
- BMJ (2020). A living WHO guideline on drugs for COVID-19. *The Bmj*, 370, m3379.
- Bolla, JM., Alibert-Franco, S., Handzlik, J., Chevalier, J., Mahamoud, A., Boyer, G., Kieć-Kononowicz, K., and Pagès, J.M. (2011). Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 585 (11), 1682-90.
- Bosnić, T., Dženita, S., and Jela, G.V. (2006). Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. *Acta Medica Academica*, 35, 19–22.

- Boukhatem, M. N. (2020) Effective antiviral activity of essential oils and their characteristic terpenes against coronaviruses: An update. *Journal of Pharmacology and Clinical Toxicology*, 8, 1138.
- Bouin, A.S., Wierer, M. (2014). Quality standards of the European Pharmacopoeia, *Journal of Ethnopharmacology*, 158 (B), 454-7.
- Brochot, A., Guilbot, A., Haddioui, L., and Roques, C. (2017). Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen*, 6 (4), e00459.
- Brooker, I. (2002). Botany of the eucalypts. John J. W. Coppen (Editör), *Eucalyptus The Genus Eucalyptus* içinde (s.9-12). Taylor and Francis Grup, USA ve Kanada
- Burmeister, W.P., Ruigrok, R.W., Cusack, S. (1992). The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *The EMBO Journal*, 11 (1), 49
- Buszko, M., Nita-Lazar, A., Park, J.H., Schwartzberg, P. L., Verthelyi, D., Howard A. Young, H. A. and Rosenberg, A.S. (2021). Lessons learned: New insights on the role of cytokines in COVID-19. *Nature Immunology*, 22, 404–411.
- Cermelli, C., Fabio, A., Fabio, G., and Quaglio, P. (2008). Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Current Microbiology*, 56 (1), 89–92.
- Chapman, R. L. and Andurkar, S. V. (2022) A review of natural products, their effects on SARS-CoV-2 and their utility as lead compounds in the discovery of drugs for the treatment of COVID-19. *Medicinal Chemistry Research*, 31, 40–51.
- Cheung, C-L., Rayner, J.M., Smith, G.J.D., Wang, P., Naipospos, T.S.P., Zhang, J., Yuen, K-Y., Webster, R.G., Peiris, J.S.M., Guan, Y., Chen, H. (2006). Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia. *The Journal of Infectious Diseases*, 193, 1626–9.
- Chey, W. D. and Wong, B. C.(2007). Practice parameters committee of the American college of gastroenterology. American college of gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *The American Journal of Gastroenterology*, 102, 1808- 1825.
- Cirino, I. C. S., Menezes-Silva, S. M. P., Silva, H. T. D., de Souza, E. L., and Siqueira-Júnior, J. P. (2015). The essential oil from *Origanum vulgare* L. and its individual constituents carvacrol and thymol enhance the effect of tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, 60 (5-6), 290-3.
- CLSI. (2012). M07-A10 methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-tenth edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32 (2) 17-18. www.clsi.org.
- Coimbra, A., Miguel, S., Ribeiro, M., Coutinho, P., Silva, L., Duarte, A. P., and Ferreira, S. (2022). *Thymus zygis* essential oil: phytochemical characterization, bioactivity

- evaluation and synergistic effect with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 11(2), 146.
- Colman, P. M., Varghese, J. N., and Laver, W. G. (1983). Structure of catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, 303, 41–4.
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (CSG of ICTV) (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544.
- Cumming, J. G., Davis, A. M., Muresan, S., Haeberlein, M., Chen, H. (2013). Chemical predictive modelling to improve compound quality. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, 948–962
- Da Silva, J. K. R., Figueiredo, P. L. B., Byler, K. G., and Setzer, W. N. (2020). Essential oils as antiviral agents, potential of essential oils to treat SARS-CoV-2 infection: an *in-silico* investigation. *International Journal of Molecular sciences*, 21 (10), 3426.
- Daina, A. and Zoete, V. (2016). A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *Chem Med Chem.*, 11, 1117–21.
- Daina., A., Michielin, O., and Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, 1–13.
- Das, S., Sarmah, S., Lyndem, S. ve Roy, A. S. (2021). An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (9), 3347-57.
- Davis, P.H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 7, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Davis, P.H., Mill, R.R, and Tan, K. (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 10 (Supplement), Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Demirci, F., Paper, D. H., Franz, G. And Başer, K.H.C. (2004). Investigation of the *Origanum onites* L. Essential Oil Using the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2), 251-254.
- Demirci, F., Karadağ, A. E., Biltekin, S. N. and Demirci, B. (2021). *In vitro* ACE2 and 5-LOX enzyme inhibition by menthol and three different mint essential oils. *Natural Product Communications*, 16(11), 1934578X211055014.
- Demirci, F., Karadağ, A. E., Biltekin, S. N., and Demirci, B. (2022). *In vitro* ACE2 and 5-LOX inhibition of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil and its major component 1, 8-cineole. *Records of Natural Products*. 16 (2), 194-9.

- Demirci, F., Teralı, K., Karadağ, A. E., Biltekin, S. N., Sakallı, E. A., Demirci, B., and Başer, K. H. C. (2023). *In vitro* and *in silico* evaluation of ACE2 and LOX inhibitory activity of *Origanum* essential oils and Carvacrol. *Planta Medica*, 89(08), 790-9.
- Deyde, V.M., Xu, X., Bright, R.A., Shaw, M., Smith, C.B., Zhang, Y., Shu, Y., Gubareva, L.V., Cox, N.J., Klimov, A.I. (2007). Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *The Journal of Infectious Diseases*, 196, 249–57.
- Dharan, N.J., Gubareva, L.V., Meyer, J.J., Okomo-Adhiambo, M., McClinton, R. C., Marshall, S.A., George, K., Epperson, S., Brammer, L., Klimov, A.I., Bresee, J. S., Fry, A. H. (2009). Infections With Oseltamivir-Resistant Influenza A(H1N1) Virus in the United States. *JAMA*. 301(10), 1034-41.
- Easson, L. H. and Stedman, E. (1933). Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity. *The Biochemical Journal*, 27(4), 1257-1266.
- Eddershaw, P. J., Beresford, A. P., and Bayliss, M. K. (2000). ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. *Drug Discovery Today*, 5, 409– 14
- Elaissi, A., Rouis, Z., Salem, N.A.B., Mabrouk, S., ben Salem, Y., Salah, K.B.H., Aouni, M., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F., and Khouja, M. L. (2012). Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12, 81.
- Elfiky, A. A. (2021). Natural products may interfere with SARS-CoV-2 attachment to the host cell. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3194-3203.
- EMA (European Medicines Agency). (2008). Guideline on fixed combinations. pp. 1-7. London https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-fixed-combination-medicinal-products-revision-1_en.pdf (Erişim tarihi: 04.09.2023).
- EMA (European Medicines Agency). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2014a). Assessment report on *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R. T. Baker and / or *Eucalyptus smithii* R.T. Baker, aetheroleum. In European Medicines Agency (Vol. 44, Issue March). www.ema.europa.eu Erişim tarihi: 01.05.2023
- EMA (European Medicines Agency). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2014b). Community herbal monograph on *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker and/or *Eucalyptus smithii* R.T. Baker, aetheroleum. In European Medicines Agency (Vol. 44, Issue March). <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-eucalyptus-globulus-labill-eucalyptus-polybractea-rt-baker/eucalyptus-smithii-rt-baker->

[aetheroleum_en.pdf%0Ahttp://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herba](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herba) (Erişim tarihi: 01.05.2023)

- Ergene, B., Haddur, D., Karaaslan, M., İleri-Özler, K., Saltan-İşcan, G.(2023). Piyasada Bulunan Bazı Uçucu Yağların Farmakope Uygunluğunun Değerlendirilmesi *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 47(1), 157-167.
- Feriotto, G., Marchetti, N., Costa, V., Beninati, S., Tagliati, F., Mischiati, C. (2017). Chemical Composition of Essential Oils from *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, and *Rosmarinus officinalis*, and Their Effects on the HIV-1 Tat Protein Function. *Chemistry and Biodiversity*, 15 (2).
- Fraser, B. J., Beldar, S., Seitova, A., Hutchinson, A., Mannar, D., Li, Y., and Bénard, F. (2022). Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation. *Nature Chemical Biology*, 18 (9), 963-971.
- Fröhlich, H., Wegner, J. K., Sieker, F., and Zell, A. (2006). Kernel Functions for Attributed Molecular Graphs-A New Similarity-Based Approach to ADME Prediction in Classification and Regression. *QSAR Combinatory Science*, 25, 317-326.
- Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N., and Bozin, B. (2015). Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils, thymol and carvacrol and their possible synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18 (4), 1013–1021.
- Gill, A.O. and Holley, R.A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750-5.
- Glowacka, I., Bertram, S., Müller, M. A., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I., Tsegaye, T. S., He, Y., Gnirss, K., Niemeyer, D., Schneider, H., Drost, C., and Pöhlmann, S. (2011). Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *Journal of Virology*, 85 (9), 4122–4134.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., and Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2), 144–50.
- Grazul, M., Kwiatkowski, P., Hartman, K., Kilanowicz, A., Sienkiewicz, M. (2023). How to Naturally Support the Immune System in Inflammation—Essential Oils as Immune Boosters. *Biomedicines*, 11, 2381.
- Gubareva, L.V. (2004) Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Research*, 103(1),199–203.
- Guner, A., Ozhatay, N., Ekim, T., and Baser, K.H.C. (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 11 (Suppl 2), Edinburgh, University Press.

- Guner, O. F. and Bowen, J. P. (2013). Pharmacophore modeling for ADME. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13, 1327-1342.
- Gunst, J. D., Staerke, N. B., Pahus, M. H., Kristensen, L. H., Bodilsen, J., Lohse, N., Dalgaard, L. S., Brønnum, D., Frøbert, O., Hønge, B., Johansen, I. S., Monrad, I., Erikstrup, C., Rosendal, R., Vilstrup, E., Mariager, T., Bove, D. G., Offersen, R., Shakar, S., Cajander, S., Jørgensen, N. P., Sriharan, S. S., Breining, P., Jespersen, S., Mortensen, K. L., Jensen, M. L., Kolte, L., Frattari, G. S., Larsen, C. S., Storgaard, M., Nielsen, L. P., Tolstrup, M., Sædder, E. A., Østergaard, L. J., Ngo, H. T. T., Jensen, M. H., Højen, J. F., Kjolby, M., and Søgaard, O. S. (2021). Efficacy of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesilate in patients hospitalized with Covid-19-a double-blind randomized controlled trial., *EClinicalMedicine*, Volume 35, 100849.
- Gürdal, B., and Kültür, Ş. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 146 (1), 113-126.
- Han, Y., and Král, P. (2020). Computational Design of ACE2-Based Peptide Inhibitors of SARS-CoV-2. *ACS Nano*, 14 (4), 5143–7.
- Harisna, A. H., Nurdiansyah, R., Syaifie, P. H., Nugroho, D. W., Saputro, K. E., Firdayani, Prakoso, C. D., Rochman, N. T., Maulana, N. N., Noviyanto, A., and Mardiyati, E. (2021). In silico investigation of potential inhibitors to main protease and spike protein of SARS-CoV-2 in propolis. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100969.
- Hauge, S. H., Dudman, S., Borgen, K., Lackenby, A., Hungnes, O. (2009). Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 155-162.
- Hay, A.J., Collins, P. J., and Russell, R.J. (2008). Antivirals and resistance. H.W. Doerr (ed.) *Avian influenza içinde* (s. 252-271). Frankfurt: Karger Publishers.
- Helander, I.M. Alakomi, H.L. Latva-Kala, K. Mattila-Sandholm, T. Pol, I. Smid, E.J. Gorris, L.G.M. Wright, A.V. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590–5.
- Hemaiswarya, S. and Doble, M. (2010). Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 1469–76.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. and Williamson, E. M. (2012) *What makes phytomedicines unique?* In *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone Elsevier, chapter 11, 166-173.
- Heurich, A., Hofmann-Winkler, H., Gierer, S., Liepold, T., Jahn, O., and Pöhlmann, S. (2014). TMPRSS2 and ADAM17 Cleave ACE2 Differentially and Only Proteolysis by TMPRSS2 Augments Entry Driven by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein. *Journal of Virology*, 88 (2), 1293–1307.

- Hill, K. D. and Johnson, L. A. S. (1995). Systematic studies in the *Eucalypts* 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). *Telopea*, 6 (388), 185–504.
- Ho, T.Y., Wu, S.L., Chen, J.C., Li, C.C. and Hsiang, C.Y. (2007) Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral research*, 74, 92–101.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., and Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181 (2), 271-280.e8.
- Horrevorts, A. M., De Ridder, C. M., Poot, M. C., De Jonge, M. J. A., Degener, J. E., Dzoljic-danilovic, G., Michel, M. F., and Kerrebijn, K. F. (1987). Checkerboard titrations: The influence of the composition of serial dilutions of antibiotics on the fractional inhibitory concentration index and fractional bactericidal concentration index. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 19 (1), 119–125.
- Hou, R., He, Y., Yan, G., Hou, S., Xie, Z., and Liao, C. (2021). Zinc enzymes in medicinal chemistry. *Chem Med Chem.*, 226, 113877.
- Hsieh, M. H., Yu, C. M., Yu, V. L. and Chow, J. W. (1993). Synergy assessed by checkerboard a critical analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 16 (4), 343-349.
- http-1:** <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K310.pdf> (Erişim tarihi: 06.11.2023)
- http-2:** https://bpsbioscience.com/media/wysiwyg/coronavirus/78083_3.pdf (Erişim tarihi: 06.11.2023)
- http-3:**
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/19/072/mak121pis-mk.pdf> (Erişim tarihi: 09.11.2023)
- Humphries, R. (2016). Synergism testing: Broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods. *Leber AL (ed). Clinical Microbiology Handbooks 4th Edition içinde SM Press.*
- Iseppi, R., Mariani, M., Benvenuti, S., Truzzi, E., and Messi, P. (2023). Effects of *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. essential oils on antibiotic-resistant bacterial biofilms. *Molecules*, 28(4), 1671.
- Iuliano, A.D., Roguski, K.M., Chang, H.H., Muscatello, D.J., Palekar, R., Tempia, S., et al. (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*, 391(10127), 1285-1300.
- İstifli, E. S., Tepe, A. Ş., Sarikürkcü, C., and Tepe, B. (2020). Interaction of certain monoterpene hydrocarbons with the receptor binding domain of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2),

- cathepsin B, and cathepsin L (CatB/L) and their pharmacokinetic properties. *Turkish Journal of Biology*, 44 (7), 242-264.
- Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., and Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*, 53 (05), 395-398.
- Javed, H., Nagoor Meeran, M. F., and Ojha, S. K. (2021). Carvacrol, a plant metabolite targeting viral protease (Mpro) and ACE2 in host cells can be a therapeutic candidate for COVID-19. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2237.
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., and Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582 (7811), 289–293.
- Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., and Yao, W. (2020) Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (7), 1740-1751.
- Juergens, U.R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Repges, R., and Vetter, H. (2003) Anti-inflammatory activity of 1,8-cineole (eucalyptol) in bronchial asthma: A double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*, 97, 250–6.
- Juergens, L.J., Worth, H., and Juergens, U.R. (2020). New perspectives for mucolytic, anti-inflammatory and adjunctive therapy with 1,8-cineole in COPD and asthma: Review on the new therapeutic approach. *Advances in Therapy*, 37, 1737–53.
- Jusoh, N., Zainal, H., Abdul Hamid, A. A., Bunnori, N. M., Abd Halim, K. B., and Abd Hamid, S. (2018). In silico study of carvone derivatives as potential neuraminidase inhibitors. *Journal of molecular modeling*, 24, 1-13.
- Kalan, L., and Wright, G. (2011). Antibiotic adjuvants: Multicomponent anti-infective strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13, E5.
- Kalemba, D. A. A. K., and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kawase, M., Shirato, K., van der Hoek, L., Taguchi, F., and Matsuyama, S. (2012). Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *Journal of Virology*, 86(12), 6537–45.
- Kazius, J., McGuire, R., and Bursi, R. (2005). Derivation and validation of toxicophores for mutagenicity prediction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 312–20.
- Kesharwani, R. K., Kumari, S., Singh, D. B., and Tripathi, S. (2020). A Docking Simulation Study of Some Herbal Molecules Against Influenza A Virus by Targeting Neuraminidase. *Current Traditional Medicine*, 6(2), 147-154.

- Kim, T. S., Heinlein, C., Hackman, R. C., and Nelson, P. S. (2006). Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (3), 965–975.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.M., and Vigenschow, H. (1986). Action of terpenoids on energy metabolism. Brunke EJ (Ed), *Progress in essential oil research* içinde (429-445). Berlin, Walter de Gruyter.
- Kobasa, D., Kodihalli, S., Luo, M., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Suzuki, Y., Suzuki, T., and Kawaoka, Y. (1999). Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *Journal of Virology*. 73(8):6743–51.
- Koenig, W., Joulain, D., and Houchmuth, D. H. (2004). *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*. MassFinder 3.
- Kokkini, S. (1997). Taxonomy, Diversity, and Distribution of *Origanum* species. Padulosi, S., (Ed), *Oregano* içinde, 2-12. IPGRI: Rome.
- Kola, I., and Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 711-5.
- Kollanoor Johny, A.K., Hoagland, T., and Venkitanarayanan, K. (2010). Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens Dis.* 7, 1165–70.
- Kon, K. V., and Rai, M. K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10 (7), 775-790.
- Kon, K. V., and Rai, M. K. (2013). Combining Essential Oils with Antibiotics and other Antimicrobial Agents to Overcome Multidrug-Resistant Bacteria. M.K. Rai and K.V. Kon (Ed), *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components* içinde, 149–164. Academic Press.
- W.A. König. (1997). Adulteration or natural variability? Enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, 55–61.
- König, W. A. and Hochmuth, D. H. (2004). Enantioselective Gas Chromatography in Flavor and Fragrance Analysis: Strategies for the Identification of Known and Unknown Plant Volatiles. *Journal of Chromatographic Science*, 42, 423-439.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., Shutsky, A.S., Liu, D., Qin, C., Jiang, C., and Penninger, J. M. (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus–induced lung injury. *Natural Medicine*, 11, 875–9.

- Kubinyi, H. (2003). Drug research: myths, hype and reality. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(8), 665-668.
- Kumar, K. J. S., Vani, M. G., Wang, C. S., Chen, C. C., Chen, Y. C., Lu, L. P., Huang, C. H., Lai, C. S., and Wang, S. Y. (2020). Geranium and lemon essential oils and their active compounds downregulate angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain, in epithelial cells. *Plants*, 9 (6), 1–12.
- Lai, C. C., Shih, T. P., Ko, W. C., Tang, H. J., and Hsueh, P. R. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 55 (3) 105924.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., and Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (3), 453-462.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., and Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40 (1), 76-94.
- Lorenzi, V., Muselli, A., Bernardini, A.F., Berti, L., Pagès, J.M., Amaral, L., and Bolla, J.M. (2009). Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gramnegative species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2209–11.
- Li, G., and De Clercq, E. (2020). Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nature Reviews. Drug Discovery*, 19 (3), 149–150.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., and Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426, 450–454.
- Li, Y., Lai, Y., Wang, Y., Liu, N., Zhang, F., and Xu, P. (2016). 1,8-Cineol protect against Influenza-virus-induced pneumonia in mice. *Inflammation*, 39 (4), 1582-93.
- Lill, M. A. (2007). Multi-dimensional QSAR in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 12, 1013-7.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26.
- Luqman, S., Dwivedi, G. R., Darokar, M. P., Kalka, A., and Khanuja, S.P.S. (2008). Antimicrobial activity of Eucalyptus citriodora essential oil. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 2, 69-75.
- Ma, L., Yao, L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: An updated review. *Molecules*, 25(11), 2627.

- Majumder, R., and Mandal, M. (2022). Screening of plant-based natural compounds as a potential COVID-19 main protease inhibitor: an *in silico* docking and molecular dynamics simulation approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40 (2), 696-711.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., and Kuipers, E. J. (2007). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56, 772- 781.
- Marquez, B. (2005). Bacterial efux systems and efux pumps inhibitors. *Biochimie*. 87(12), 1137-47.
- Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., and Taguchi, F. (2010). Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. *Journal of Virology*, 84 (24), 12658-12664.
- Mckimm-Breschkin, J. L. (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7 (1 SUPPL.1), 25-36.
- McLafferty, F. W., and Stauffer, D. B. (1989). *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*. J Wiley and Sons.
- Merghni, A., Noumi, E., Hadded, O., Dridi, N., Panwar, H., Ceylan, O., Mastouri, M., and Snoussi, M. (2018). Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogenesis*, 118, 74-80.
- Merlot, C. (2010). Computational toxicology-a tool for early safety evaluation. *Drug Discovery Today*, 15, 16-22.
- Moleyar, V., and Narasimham, P. (1992). Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, 16 (4), 337-42.
- Monto, A.S., McKimm-Breschkin, J.L., Macken, C., Hampson, A.W., Hay, A., Klimov, A., Tashiro, M., Webster, R.G., Aymard, M., Hayden, F.G., Zambon, M. (2006). Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 50, 2395-2402.
- Moroy, G., Martiny, V. Y., Vayer, P., Villoutreix, B. O., and Miteva, M. A. (2012). Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 17, 44-55.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.

- Mukesh, B., and Rakesh, K. (2011). Review Article molecular docking: a review Bachwani Mukesh, Kumar Rakesh. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2 (6), 1746-1751.
- Müller, J., Greiner, J. F., Zeuner, M., Brotzmann, V., Schäfermann, J., Wieters, F., and Kaltschmidt, C. (2016). 1, 8-Cineole potentiates IRF3-mediated antiviral response in human stem cells and in an ex vivo model of rhinosinusitis. *Clinical Science*, 130 (15), 1339-52.
- Najar, I.A., Sachin, B.S., Sharma, S.C., Satti, N.K., Suri, K.A., and Johri, R.K. (2010). Modulation of Pglycoprotein ATPase activity by some phytoconstituents. *Phytotherapy Research*. 24, 454–8.
- Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., and Alonzo, V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, 230 (2), 191-5.
- Obrezanova, O., Csanyi, G., Gola, J. M., and Segall, M. D. (2007) Gaussian processes: A method for automatic QSAR modeling of ADME properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47, 1847-57.
- Ogunyemi, O. M., Gyebi, G. A., Elfiky, A.A, Afolabi, S.O., Ogunro, O. B., Adengunloye, A. P., and Ibrahim, I. M. (2020). Alkaloids and flavonoids from African phytochemicals as potential inhibitors of SARS-Cov-2 RNA-dependent RNA polymerase: an in silico perspective. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 28, 1-15.
- Omura ,T. and Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 1375–6.
- Omura, T. and Sato, R. (1964a). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370–8.
- Omura, T. And Sato, R. (1964b). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 2379–85.
- Orhan, I.E., Ozcelik, B., Kan, Y., and Kartal, M. (2011). Inhibitory effects of various essential oils and individual components against extended spectrum beta-lactamase (ESBL) produced by *Klebsiella pneumoniae* and their chemical compositions. *Journal of Food Science*, 76, 538–46.
- Orhan, I.E., Mesaik, M.A., Jabeen, A., and Kan, Y. (2016). Immunomodulatory properties of various natural compounds and essential oils through modulation of human cellular immune response. *Industrial Crops and Products*, 81, 117–122.
- Ozdemir, N., Ozgen, Y., Kiralan, M., Bayrak, A., Arslan, N., Ramadan, M. F. (2018). Effect of different drying methods on the essential oil yield, composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* L. and *Origanum onites* L. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 820–5.

- Pandey, P., Rane, J. S., Chatterjee, A., Kumar, A., Khan, R., Prakash, A., and Ray, S. (2021). Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: An *in silico* study for drug development. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (16), 6306-16.
- Park, I.K., and Shin, S.C. (2005). Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11), 4388-92.
- Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K. S. , Gomes, M.D.M., Lima, F.C., Lahlou, S., Magalhaes, P.J.C., Ceccatto, V. M., Coelho-de-Souza, A.N., Leal-Cardoso, J.H. (2010). Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24, 341-350.
- Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 629–36.
- Pires, D.E., Blundell, T.L., and Ascher, D.B. (2015). pkCSM: predicting small molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 4066-72.
- Ph. Eur. 7.0, 1880 (01/2011).
- Paul, D., Sanap, G., Shenoy, S., Kalyane, D., Kalia, K., Tekade, R.K. (2021). Artificial intelligence in drug discovery and development. *Drug Discov Today*, 26(1):80-93.
- Ramezani, H., Singh, H. P., Batish, D. R., and Kohli, R. K. (2002). Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia*, 73, 261-2.
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils, *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., and Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. *Complementary Medicine Research*, 16 (2), 79–90.
- Repasky, M. P., Murphy, R. B., Banks, J. L., Greenwood, J. R., Tubert-Brohman, I., Bhat, S., and Friesner, R. A. (2012). Docking performance of the glide program as evaluated on the Astex and DUD datasets: a complete set of glide SP results and selected results for a new scoring function integrating WaterMap and glide. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26, 787-799.
- Richardson, L. A. (2017). Understanding and overcoming antibiotic resistance. *PLoS Biology*, 15 (8), e2003775.
- Rios, J. L., and Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1-2), 80-84.

- Robson, B. (2020). COVID-19 Coronavirus spike protein analysis for synthetic vaccines, a peptidomimetic antagonist, and therapeutic drugs, and analysis of a proposed achilles' heel conserved region to minimize probability of escape mutations and drug resistance. *Computers in Biology and Medicine*, 121, 103749.
- Romo-Castillo, M., Flores-Bautista, V. A., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Reyes-Chilpa, R., León-Santiago, M., and Luna-Pineda, V. M. (2023). Synergy of Plant Essential Oils in Antibiotic Therapy to Combat *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Pharmaceuticals*, 16(6), 839.
- Rosato, A., Sblano, S., Salvagno, L., Carocci, A., Clodoveo, M. L., Corbo, F., & Fracchiolla, G. (2020). Anti-biofilm inhibitory synergistic effects of combinations of essential oils and antibiotics. *Antibiotics*, 9(10), 637.
- Schelz, Z., Hohmann, J., and Molnár, J. (2010). Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. In: Chattopadhyay D (ed) *Ethnomedicine: A source of complementary therapeutics* içinde (179-201). Kerala, India: Research Sigpost.
- Schrödinger Release 2023-1: Maestro, LLC, New York, NY2023
- Schweim, J.K. and Schweim, H.G. (2014). Status quo and future developments of combinations of medicinal products. *Synergy*, 1, 70–5.
- Seadawy, M. G., Gad, A. F., Elhoseny, M. F., Elharty, B. E., Shamel, M. D., Elfiky, A. A., and Zekri, A. R. N. (2020). *In vitro*: natural compounds (Thymol, Carvacrol, Hesperidine, and Thymoquinone) against Sars-Cov2 strain isolated from Egyptian patients. *bioRxiv*, 2020-11. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 34 (3), 26750-7.
- Sezik, E., Tümen, G., Kırırmer, N., Özek, T., and Baser, K. H. C. (1993). *Journal of Essential Oil Research*. 5, 425-431.
- Shahhamzehei, N., Abdelfatah, S., and Efferth, T. (2022). *In Silico* and *In Vitro* Identification of Pan-Coronaviral Main Protease Inhibitors from a Large Natural Product Library. *Pharmaceuticals*, 15 (3), 308.
- Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C. and Na, D. (2021). In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*, 137.
- Shapira, T., Monreal, I.A., Dion, S.P., Buchholz, D. W., Imbiakha, B., Olmstead, A. D., Jager, M., Désilets, A., Gao, G., Martins, M., Vandal, T., Thompson, C. A. H., Chin, A., Rees, W. D., Steiner, T., Nabi, I. R., Marsault, E., Sahler, J., Diel, D. G., Walle, G. R. V., August, A., Whittaker, G. R., Boudreault, P., Leduc, R., Aguilar, H. C., and Jean, F. (2022). A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature* 605, 340–348.
- Shree, P., Mishra, P., Selvaraj, C., Singh, S. K., Chaube, R., Garg, N., and Tripathi, Y. B. (2022) Targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytochemicals of ayurvedic medicinal plants – *Withania somnifera* (Ashwagandha), *Tinospora cordifolia* (Giloy) and *Ocimum sanctum* (Tulsi) – a

- molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40 (1), 190-203.
- Si, H., Hu, J., Liu, Z., and Zeng, Z-L. (2008). Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 53, 190–4.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., and Matos, F.J.A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Bioresource Technology*, 89, 277-283
- Singh, H. P., Kaur, S., Negi, K., Kumari, S., Saini, V., Batish, D. R., Kohli, R. K.(2012) Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT- Food Science and Technology*. Volume 48, Issue 2, 237-241
- Singh, S., Fulbabu Sk, Md., Sonawane, A., Kar, P., and Sadhukhan, S. (2021). Plant-derived natural polyphenols as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: an insilico analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (16), 6249-64.
- Stanturf, J. A., Vance, E. D., Fox, T. R., and Kirst, M. (2013). Eucalyptus beyond Its Native Range: Environmental Issues in Exotic Bioenergy Plantations. *International Journal of Forestry Research*, 1, 1–5.
- Stefanovic, O., Stankovic, M. S., and Comic, L. (2011). *In vitro* antibacterial efficacy of *Clinopodium vulgare* L. extracts and their synergistic interaction with antibiotics. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (17), 4074–9.
- Strope, J. D., Chau, C. H. and Figg, W. D. (2020). TMPRSS2: Potential biomarker for COVID-19 outcomes. *Journal of Clinical Pharmacology*, 60 (7), 801–7.
- Sui, H., Yu, Q., Zhi, Y., Geng, G., Liu, H. and Xu, H. (2010). Effects of apigenin on the expression of angiotensin-converting enzyme 2 in kidney in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hygiene Research*, 39, 693–696
- Sylvester, P.W. (2011). Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. Satyanarayanajois, S. (ed) *Drug Design and Discovery* içinde (s 157-168).
- Takeda, M., Pekosz, A., Shuck, K., Pinto, L. H., and Lamb, R. A. (2002). Influenza a virus m 2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *Journal of Virology*, 76 (3), 1391–9.
- TİTCK (2016). Kronik Hastalıklarda Kullanılan Sabit Doz Kombine İlaçlara İlişkin Maliyet Değerlendirmesi ve Bütçe Etkisi Analizi <https://titck.gov.tr/Dosyalar/Ilac/SaglikTeknolojileriDegerlendirme/STDRaporu3.pdf> (Erişim tarihi: 22.05.2023)
- Toncer, O., Karaman, S., Kızıl, S., Dıraz, E. (2009). Changes in Essential Oil Composition of Oregano (*Origanum onites* L.) due to Diurnal Variations at

- Different Development Stages. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37 (2), 177-181.
- Tongnuanchan, P., and Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231-49.
- Towler, P., Staker, B., Prasad, S. G., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Ryan, D., Fisher, M., Williams, D., A Dales, N., A Patane, M., and Pantoliano, M. W. (2004). ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (17), 17996-18007.
- Trott, O., and Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31 (2), 455-461.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., and Moezelaar, R. J. A. E. M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4), 1561-8.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., and Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606-10.
- Uno, Y. (2020). Camostat mesilate therapy for COVID-19. *Internal and Emergency Medicine*, 15 (8), 1577-8.
- Van Vuuren, S. F., Suliman, S., and Viljoen, A. M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (4), 440-6.
- Vavricka, C. J., Li, Q., Wu, Y., Qi, J., Wang, M., Liu, Y., and Gao, G. F. (2011). Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathogens*, 7 (10), e1002249.
- Veldhuizen, E. J., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L., Zweijtzer, C., Burt, S. A. And Haagsman, H. P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1874-9.
- Yuan, Y., Jiao, B., Qu, L., Yang, D., Liu, R. (2023). The development of COVID-19 treatment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1125246.
- Wagner, H. (1999). New targets in the Phytopharmacology of Plants. *Herbal medicine, a concise overview for healthcare professionals*. Butterworth-Heinemann, 34-42.
- Wagner, H. and Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, 97-110
- Walsh, S.E., Maillard, J.-Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E. Charbonneau, D.L. Bartolo, R.G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on

- Gram-positive and -negative bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 94 (2), 240–7.
- Wang, Y., and Perlman, S. (2022). COVID-19: Inflammatory Profile. *Annual Review of Medicine*, 73 (1), 65-80.
- Ward, P., Small, I., Smith, J., Suter, P., Dutkowski, R. (2005). Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (Suppl. 1), i5-i21.
- Waring, M. J., Arrowsmith, J., Leach, A. R., Leeson, P. D., Mandrell, S., Owen, R. M., Pairaudeau, G., Pennie, W. D., Pickett, S. D. and Wang, J. (2015). An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 475–486.
- Webber, M. and Piddock, L. (2003). The importance of efux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11.
- WHO. (2004). WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome (SARS) (WHO/CDS/CSR/ARO/2004.1) Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004 https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/health-topics/who-cds-csr-aro-2004-18fcdaab9-a1ca-42f7-adaf-d5c624b54b76.pdf?sfvrsn=949080e3_1&download=true (erişim tarihi 20.08.2023).
- WHO. (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1 (Erişim tarihi: 26.08.2023)
- WHO. (2019). WHO MERS-CoV Global Summary and Assessment of Risk, July 2019 (WHO/MERS/RA/19.1). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/326126/WHO-MERS-RA-19.1-eng.pdf> (Erişim tarihi: 20.08.2023)
- WHO. (2020a). *WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19- 11 March 2020*. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (Erişim tarihi: 13.05.2022)
- WHO. (2022b). *WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard*. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAiAiML-BRAAEiwAuWVggoUUeohE7-KELf0htA5tzqFyvRlezEdXdWz4ZHEaBs3RCwflT_EB9xoCkMsQAvD_BwE&fbclid=IwAR1a9CtF1pKgPdGmSoP4UrkZWnWRZMjsKzVBI7tqviLA3MUdx0e15HOrOII (Erişim tarihi: 15.09.2022)
- WHO. (2022) Global COVID-19 Vaccination Strategy in a Changing World: July 2022 update. <https://www.who.int/publications/m/item/global-covid-19->

[vaccinationstrategy-in-a-changing-world--july-2022-update](#) (Erişim tarihi: 20.11.2023)

- Williams, D. A. (2013). Drug Metabolism. T. Lemke, D. Williams, V. Roche, W. Zito (Ed.), *Foye's Principles of Medicinal Chemistry 7th edition* içinde (29-60). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins
- Williamson, E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8 (5), 401–9.
- Williamson, E. M. (2009). Synergy and other interactions in phytomedicines. W. Evans (Ed) *Trease and Evans Pharmacognosy* içinde (53-61). Edinburgh: Elsevier.
- Wong, J. P. and Damania, B. (2021). SARS-CoV-2 dependence on host pathways. *Science* 371, 884–5.
- Worth, H., Schacher, C., and Dethlefsen, U. (2009). Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: A placebo-controlled double-blind trial. *Respiratory Research*, 10.
- Zavod, R. M. and Knittel, J. J. (2013). Drug Desing and Relationship of Functional Groups to Pharmacologic Activity. T. Lemke, D. Williams, V. Roche, W. Zito (Ed.), *Foye's Principles of Medicinal Chemistry 7th edition* içinde (29-60). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins
- Zhang, M. Q. and Wilkinson, B. (2007). Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 478-88.
- Zheljazkov, V. D., Cantrell, C. L., Astatkie, T., Jeliaskova, E. (2013). Distillation Time Effect on Lavender Essential Oil Yield and Composition. *Journal of Oleo Science*, 62 (4), 195-9.
- Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., and Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579 (7798), 270-3

***In vitro* and *in silico* Evaluation of ACE2 and LOX Inhibitory Activity of *Eucalyptus* Essential Oils, 1,8-Cineole, and Citronellal**

Natural Product Communications
Volume 17(8): 1–8
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1934578221109409
journals.sagepub.com/home/npc



Ezgi Ak Sakallı^{1,2}, Kerem Teralr³, Ayşe Esra Karadağ^{2,4},
Sevde Nur BİLtekin^{5,6}, Müberra Koşar¹, Betül Demirci⁷,
K. Hüsnü Can Başer⁸, and Fatih Demirci^{1,7}

Abstract

Eucalyptus essential oils are well-known and used especially in upper respiratory tract pathologies or diseases as herbal drug preparations. In the present study, the *in vitro* angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and lipoxygenase (LOX) enzyme inhibitory potentials of commercial *Eucalyptus globulus* Labill. and *Eucalyptus citriodora* Hook. essential oils were evaluated for their potential anti-coronavirus disease 2019 (COVID-19), and anti-inflammatory effects. In addition, the major components, 1,8-cineole and citronellal, were evaluated for their ability to bind at the active site of either human ACE2 or human 5-LOX using an *in silico* setting. Before activity evaluation, *Eucalyptus globulus* and *E. citriodora* essential oils were analysed by GC/FID and GC/MS, where 1,8-cineole (30%), and citronellal (80%) were identified as the major components, respectively. The *in vitro* ACE2 inhibition was calculated as 94.9% for *E. globulus*, and that of *E. citriodora* essential oil as 83.4%. *In vitro* LOX inhibition experiments for essential oils in the same order showed inhibitions of 71.3 and 91.4%, respectively, at 20 µg/mL test concentrations in microplate-based fluorometric assays. In addition, protein–ligand docking, and interaction profiling was used to gain structural and mechanistic insights into the *in silico* ACE2 and LOX inhibitory potentials of the major *Eucalyptus* essential oil constituents, 1,8-cineole as well as citronellal. The resulting data supported the *in vitro* findings; however, further *in vivo* studies are needed to confirm the activity.

Keywords

Eucalyptus, essential oil, ACE2, LOX, 1,8-cineole, citronellal

Received: April 18th, 2022; Accepted: June 7th, 2022.

Introduction

Eucalyptus L. species, family Myrtaceae, as well as their preparations, are well known and have been used as aromatic and medicinal plants for centuries. *Eucalyptus* essential oils are used due to their antimicrobial and antioxidant activities, especially in pharmaceuticals and cosmetic products, as well as for flavorings and food preparations.

Eucalyptus globulus Labill. is the main source of commercial *Eucalyptus* essential oil, which is used as an antiseptic and to treat cough, cold, sore throat, and other related conditions. Both the leaf oil and extract have been reported for their antibacterial activity on respiratory system pathogenic bacteria and viruses.¹ Cineole-rich essential oils are inhaled to treat pharyngitis, bronchitis, and sinusitis. A number of *in vitro* and *in vivo* 1,8-cineole studies demonstrated anti-inflammatory, antimicrobial² and antiviral^{3,4} properties. Also, a double-blind placebo-controlled trial using the monoterpene 1,8-cineol demonstrated mucolytic, bronchodilation, and anti-inflammatory activities.^{5,6}



Creative Commons Non-Commercial CC BY-NC. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access page (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

In Vitro and In Silico Evaluation of ACE2 and LOX Inhibitory Activity of *Origanum* Essential Oils and Carvacrol[#]

Authors

Fatih Demirci^{1,2}, Kerem Teralı³, Ayşe Esra Karadağ^{4,5}, Sevdâ Nur Biltelkin^{6,7}, Ezgi Ak Sakallı², Betül Demirci¹, Müberra Koşar², K. Hüsnü Can Başer⁸

Supplementary material is available under
<https://doi.org/10.1055/a-1828-2479>

ABSTRACT

Origanum spp. are used both for culinary purposes and for their biological activities. In this study, commercial *Origanum majorana*, *Origanum minutiflorum*, *Origanum vulgare*, and *Origanum onites* essential oils and their prominent constituent carvacrol were evaluated for their *in vitro* and *in silico* angiotensin-converting enzyme 2 and lipoxigenase enzyme inhibitory potentials. The essential oils were analysed by gas chromatography-flame ionisation detection and gas chromatography-mass spectrometry, where carvacrol was identified as the major component (62–81%), confirming the quality. *In vitro* enzyme inhibition assays were conducted both with the essential oils (20 µg/mL) and with carvacrol (5 µg/mL). The comparative values of angiotensin-converting enzyme 2 percent inhibition for *O. majorana*, *O. minutiflorum*, *O. vulgare*, and *O. onites* essential oils were determined as 85.5, 79.1, 74.3, and 42.8%, respectively. As a result of the enzyme assays, carvacrol showed 90.7% *in vitro* angiotensin-converting enzyme 2 inhibitory activity. The *in vitro* lipoxigenase inhibition of the essential oils (in the same order) was 89.4, 78.9, 81.1, and 73.5%, respectively, where carvacrol showed 74.8% inhibition. In addition, protein–ligand docking and interaction profiling was used to gain structural and mechanistic insights into the angiotensin-converting enzyme 2 and lipoxigenase inhibitory potentials of major *Origanum* essential oil constituents. The *in silico* findings agreed with the significant enzyme inhibition activity observed *in vitro*. Further *in vivo* studies are suggested to confirm the safety and efficacy of the oils.

Key words

Lamiaceae, *Origanum* spp., essential oil, ACE2, LOX, carvacrol

received

December 1, 2021

accepted after revision

April 8, 2022

published online

April 19, 2022

Bibliography

Planta Med 2023; 89: 790–799

DOI 10.1055/a-1828-2479

ISSN 0032-0943

© 2022, Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,

70469 Stuttgart, Germany

Correspondence

Prof. Fatih Demirci

EK-3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler; 15th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, November 2-5- Antalya, Türkiye

OP21. IN VITRO AND IN SILICO EVALUATION OF THE ANTIVIRAL POTENTIAL OF EUCALYPTUS ESSENTIAL OILS

Ezgi AK-SAKALLI¹ , Ayşe Esra KARADAĞ² , Kerem TERALI³ , İsmail ÇELİK⁴ , Müberra KOŞAR¹ , Fatih DEMİRCİ^{4,5,6} 

The members of the genus *Eucalyptus* L. belonging to the Myrtaceae are well-known and have been utilized for millennia as aromatic and medicinal plants. Due to their antibacterial and antioxidant properties, eucalyptus essential oils are frequently used in flavorings, culinary preparations, as well as in medicinal and cosmetic applications. In the present study, *in vitro* enzyme inhibition assays were conducted for neuraminidase (NA), transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) to explore the antiviral potential of two different essential oils from *Eucalyptus* species. European-Pharmacopoeia-quality essential oils from *E. globulus* and *E. citriodora* were employed in the enzyme assays. The inhibitory activities of essential oils at 20 µg/mL against ACE2, TMPRSS2 and NA were measured using commercial kits. *E. globulus* essential oil inhibited ACE2, TMPRSS2 and NA by 94.3%, 74.82% and 67.59%, respectively. *E. citriodora* essential oil inhibited ACE2, TMPRSS2 and NA by 83.4%, 60.55% and 43.64%, respectively. Although both essential oils from the *Eucalyptus* species demonstrated good enzyme inhibitory activity, our *in vitro* results indicated that *E. globulus* essential oil possesses greater antiviral activity potential than *E. citriodora*. Furthermore, protein-ligand docking and interaction profiling studies were utilized to gain structural and mechanistic insights into the *in silico* ACE2, TMPRSS2 and NA inhibitory potentials of the major constituents of *Eucalyptus* essential oil, 1,8-cineole and citronellal. The results corroborated the *in vitro* findings. In conclusion, based on the results obtained in this study, both eucalyptus essential oils exhibit antiviral potential, making them viable candidates against cold, flu, and coronavirus. Further *in vivo* studies are required to confirm their activity.

Keywords: Eucalyptus; essential oil; antiviral; *in vitro* enzyme assay; molecular docking.

Acknowledgements: This PhD and research project was supported by Anadolu University Scientific Research Projects Commission BAP 2005S058. [_____](#)