



**LAMIACEAE FAMILYASINA AİT *LAVANDULA OFFICINALIS* MILL.,
MELISSA OFFICINALIS L., *MENTHA PIPERITA* L., *SALVIA
OFFICINALIS* L. VE *SCUTELLARIA ORIENTALIS* L. TÜRLERİNİN ANTI-
İNFLAMATUAR YOLAK ENZİMLERİ LİPOKSİJENAZ (LOX) VE
SİKLOOKSİJENAZ (COX) ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kübra ŞENER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Kübra ŞENER

07/12/2021

LAMIACEAE FAMILYASINA AİT *LAVANDULA OFFICINALIS* MILL., *MELISSA OFFICINALIS* L., *MENTHA PIPERITA* L., *SALVIA OFFICINALIS* L. VE *SCUTELLARIA ORIENTALIS* L. TÜRLEİNİN ANTİ-İNFLAMATUAR YOLAK ENZİMLERİ
LİPOKSİJENAZ (LOX) VE SİKLOOKSİJENAZ (COX) ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Kübra ŞENER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2021

ÖZET

Bu çalışmada Lamiaceae familyasından seçilen *Mentha piperita* L., *Salvia officinalis* L., *Lavandula officinalis* Mill., *Scutellaria orientalis* L. ve *Melissa officinalis* L. bitkilerinin inflamasyon yolağında önemli yere sahip LOX ve COX enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri belirlenip, ticari ve yan etkileri fazlasıyla bulunan inhibitör ilaçlara alternatif olabilmeleri yönünden incelenmiştir. Bu kapsamda ekstrelerin DPPH⁺ radikalini süpürücü etkileri incelenmiş ve EC₅₀ değerleri sırasıyla 32,03±13,52; 38,35±12,66; 108,70±8,12; 65,88±12,11 ve 25,75±13,41 µg/mL olarak bulunmuştur. Kontrol olarak kullanılan kuersetinin EC₅₀ değeri (±SEM) ise 2,92±8,54 µg/mL'dir. Kontrole göre ekstrelerin radikali süpürücü etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (p<0,05). DPPH⁺ radikalini süpürme kapasiteleri zamana bağlı olarak incelendiğinde ekstrelerin etkilerinin, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin total antioksidan kapasiteleri TAC metodu ile incelenmiş olup en yüksek antioksidan kapasiteye sahip ekstrenin *M. piperita* L. olduğu belirlenmiştir (50 µg/mL ekstre; 726,62±0,02 nmol/µL Trolox ekivalen değeri). Ekstrelerin COX-2 enzimi üzerine aktiviteleri incelendiğinde IC₅₀ değerleri (±SEM) değerleri sırasıyla 69,98±13,70; 26,44±17,68; 6,23±13,25; 30,43±12,32 ve 16,65±9,09 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ekstrelerin 12/15-LOX enzimi üzerine aktiviteleri incelendiğinde IC₅₀ değerleri (±SEM) değerleri sırasıyla 14,98±9,23; 42,54±37,70; 329,48±44,77; 96,63±55,70 ve 35,73±16,75 µg/mL şeklinde bulunmuştur. *S. officinalis* L. ve *L. officinalis* Mill. ekstrelerinin COX-2 inhibitör mekanizması incelendiğinde, ekstrelerin kompepetitif inhibitör özelliği gösterdiği belirlenmiştir. *M. piperita* L. ve *S. officinalis* L.'in 12/15-LOX enzim ile ilişkisi incelendiğinde ise, ekstrelerin nonkompepetitif inhibitör davranışı belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde seçilen ekstrelerin potansiyel anti-inflamatuar ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Lamiaceae, İnflamasyon, LOX, COX
Sayfa Adedi : 78
Danışman : Prof. Dr. Murat EKİCİ
İkinci Danışman : Prof. Dr. Ebru BODUR

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *LAVANDULA OFFICINALIS* MILL.,
MELISSA OFFICINALIS L., *MENTHA PIPERITA* L., *SALVIA OFFICINALIS* L. AND
SCUTELLARIA ORIENTALIS L. SPECIES BELONGING TO LAMIACEAE FAMILY
 ON ANTI-INFLAMMATORY PATHWAY ENZYMES LIPOXYGENASE (LOX) AND
 CYCLOOXYGENASE (COX).

(M. Sc. Thesis)

Kübra ŞENER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2021

ABSTRACT

In this study, the effects on the activities of LOX and COX enzymes, which have an important place in the inflammation pathway, of *Mentha piperita* L., *Salvia officinalis* L., *Lavandula officinalis* Mill., *Scutellaria orientalis* L. and *Melissa officinalis* L. plants selected from the Lamiaceae family were determined. They have been examined in terms of being an alternative to inhibitor drugs which have side effects that are found in excess. In this context, the DPPH⁺ radical scavenging effects of the extracts were investigated and their EC₅₀ values were found as 32,03±13,52; 38,35±12,66; 108,70±8,12; 65,88±12,11 and 25,75±13,41 µg/mL, respectively. The EC₅₀ value (±SEM) of quercetin used as a control was found as 2,92±8,54 µg/mL. There was a statistically significant difference between the radical scavenging effects of the extracts compared to the control (p<0.05). When the time dependent scavenging capacities of DPPH⁺ radicals were examined, it was found that reliant on the extracts, time and concentration the effects were varied.. In addition, the total antioxidant capacities of the extracts were examined by the TAC method and the extract with the highest antioxidant capacity was *M. piperita* L. (50 µg/mL extract, 726.62±0.02 nmol/µL Trolox equivalent value). The IC₅₀ values of (IC₅₀±SEM) extracts on COX-2 enzyme activity was calculated as 69,98±13,70, 26,44±17,68; 6,23±13,25; 30,43±12,32 and 16,65±9,09 µg/mL, respectively. IC₅₀ values of (IC₅₀±SEM) of extracts on 12/15-LOX enzyme activity was found as 14,98±9,23; 42,54±37,70; 329,48±44.77; 96,63±55,70 and 35,73±16,75 µg/mL, respectively. Analysis of crude *S.officinalis* L. and *L.officinalis* Mill. Extracts as inhibitors and their behavior on COX-2 enzyme determined that the extracts exhibited competitive inhibitory effect. When the 12/15-LOX enzyme with *M. piperita* L. and *S. officinalis* L. were examined, the extracts were found to display non-competitive inhibitory properties. Our combined results lead us to consider that the extracts have potential use as anti-inflammatory agents.

Science Code : 20309

Key Words : Lamiaceae, Inflammation, LOX, COX

Page Number : 78

Supervisor : Prof. Dr. Murat EKİCİ

Co-Supervisor : Prof. Dr. Ebru BODUR

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezinin gerçekleşmesine vesile olan, bu süreçte hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Murat EKİCİ'ye; kendisini lisans dönemimden beri tanıdığım, bu süreçten itibaren gerek akademik gerek manevi desteklerini hiç esirgemeyen, tanıdığım süreç boyunca bilgi birikim ve yardımları ile iyi bir akademisyen olma yolunda ilerlememi sağlayan, bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde büyük emeği olan ve kendisinden çok şey öğrendiğim ve öğrenmeye devam edeceğim değerli hocam Prof. Dr. Ebru BODUR'a ve bu süreçte yardımlarını ve desteğini asla esirgemeyen ve bu tez çalışması kapsamında bitki örneklerini temin edip ekstralarını hazırlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ekrem Murat GÖNÜLALAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarım kapsamında deneylerime büyük katkısı olan ve kendisinden çok şey öğrendiğim, zorlandığım zaman çekinmeksizin kapısını çalabildiğim, her zaman yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Müslüm GÖK'e çok teşekkür ederim. Bu çalışma kapsamında laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan H.Ü. Tıbbi Biyokimya ABD'a şükranlarımı sunuyorum.

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, gece-gündüz fark etmeksizin her zaman yanımda olan kardeşten farksız can dostlarım Psk. Murat ÇATI, Psk. Dan. Dilara BEDEN, Hamide Sena KAPKİNER, Bilim Uzmanı Sena ÖZBAY, Elif Naz ALVER, Araş. Gör. Duygu Seren ÖZYILMAZ, Gökçe HASDEMİR, Araş. Gör. Sena GÖRMAN ve Öğr. Gör. Ofcan OFLAZ'a; bu süreçte her konuda fikir danıştığım ve yardımlarını asla esirgemeyen Öğr. Gör. Ecem KURAL-MANGIT, Araş. Gör. Dr. Betül AYDIN ve Araş. Gör. Dr. Sinem Tuğba ŞAHİN TEKİN'e çok teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca ve tez çalışmasının her aşamasında sabır, sevgi ve anlayış ile her daim yanımda olan canım ailem Ahmet TAN, Ayşegül TAN ve Yusuf TAN'a ve sevgili eşim Yiğit ŞENER'e sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışmasına maddi destek sağladığı için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim (Proje No: 05/2020-23).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. İnflamasyon ve Yağ Asidi Peroksidasyonu	3
2.2. Lipoksijenazlar.....	7
2.2.1. LOX enzimlerinin yapısı	8
2.2.2. 5-Lipoksijenaz	10
2.2.3. 12/15-Lipoksijenazlar	13
2.3. Siklooksijenazlar.....	16
2.3.1. COX enzimlerinin yapısı	17
2.3.2. COX reaksiyonunun mekanizması	21
2.4. İnflamasyonda Bitkilerin Yeri ve Önemi.....	22
2.5. Lamiaceae Familyası	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	29
3.1.2. Kullanılan aletler ve cihazlar	30
3.1.3. Bitki örnekleri ve temini	30

	Sayfa
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Bitki ekstralarının hazırlanması	31
3.2.2. Ekstrelele uygun çözücünün/çözücülerin seçilmesi	31
3.2.3. Ekstrelerin <i>in vitro</i> çalışmalar için hazırlanması	32
3.2.4. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin DPPH+ metodu ile belirlenmesi..	32
3.2.5. Ekstrelerin total antioksidan kapasitelerinin Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TAC) ile belirlenmesi	33
3.2.6. Ekstrelerin anti-inflamatuar yolak enzimleri üzerine etkilerinin belirlenmesi ve enzimlerin kinetik davranışlarının belirlenmesi.....	33
3.2.7. İstatistiksel analizlerin değerlendirilmesi	36
4. DENEYSEL BULGULAR	37
4.1. Ekstrelele Uygun Çözücünün Belirlenmesi.....	37
4.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivitelerinin DPPH+ Metodu ile Belirlenmesi	38
4.3. Ekstrelerin DPPH+Radikalini Süpürücü Etkilerinin Zamana Bağlı Belirlenmesi	40
4.4. Ekstrelerin Total Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	43
4.5. Ekstrelerin Anti-İnflamatuar Yolak Enzim Aktivitelerine Olan Etkilerinin İncelenmesi ve Enzimlerin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	44
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. İnsan lipoksijenaz izoformları	8
Çizelge 3.1. Deney sırasında kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi	30
Çizelge 3.2. Deney sırasında kullanılan cihazların listesi	30
Çizelge 3.3. Deneyde kullanılacak bitkilere ait herbaryum örneklerinin numaraları.....	31
Çizelge 3.4. <i>In vitro</i> çalışmalar için ekstrelerden stok çözeltilerin hazırlanışı.....	32
Çizelge 4.1. Ekstrelerin DPPH ⁺ radikalini süpürücü etkisinin incelenmesi.....	40
Çizelge 4.2. Ekstrelerin DPPH ⁺ radikalini süpürücü etkisinin zamana bağımlı olarak incelenmesi	43
Çizelge 4.3. Ekstrelerin total antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi.....	44
Çizelge 4.4. Ekstrelerin COX-2 enzimi üzerine etkilerinin incelenmesi	46
Çizelge 4.5. COX-2'nin 10-80 µM AA ile substrat kinetiği parametreleri.....	46
Çizelge 4.6. Seçilen ekstrelerin COX-2 enzim kinetiği parametrelerinin değerlendirilmesi	47
Çizelge 4.7. Ekstrelerin 12/15-LOX enzimi üzerine etkilerinin incelenmesi.....	49
Çizelge 4.8. 12/15-LOX'un 10-100 µM LA ile substrat kinetiği parametreleri	49
Çizelge 4.9. Seçilen ekstrelerin 12/15-LOX enzim kinetiği parametrelerinin değerlendirilmesi	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Enzimatik olmayan yağ asidi peroksidasyonu aşamaları	5
Şekil 2.2. İnflamasyon yolağının şematize gösterimi	7
Şekil 2.3. LOX enziminin 3D yapısı	10
Şekil 2.4. Lökotrien biyosentezinin basamakları.....	11
Şekil 2.5. 12/15-LOX enziminin izlediği (yer aldığı) yolakların gösterimi	14
Şekil 2.6. Soya fasulyesi LOX-3'ün 3D yapısı	15
Şekil 2.7. COX-2 enzimi 3D yapısı.....	17
Şekil 2.8. COX-2 enzimi dimer yapılarının 3D görüntüsü.....	18
Şekil 2.9. COX-2 enziminde membran bağlanma bölgesi ile katalitik bölgeyi birbirinden ayıran rezidüler	19
Şekil 2.10. COX enziminin allosterik ve katalitik alt birimleri	20
Şekil 2.11. oCOX-1'in aktif bölgesine bağlanan arasıdonik asit Hem grubu kırmızı ile belirtilmiştir	20
Şekil 2.12. Siklooksijenaz yolağı.....	21
Şekil 3.1. Tezde yapılan çalışmaların şematik gösterimi	29
Şekil 4.1. Ekstrelerin farklı çözücüler ile çözünürlüklerinin değerlendirilmesi MeOH (B) DMSO (C) EtOH (D) DMSO+ 100 mM Tris-HCl (pH:8)	37
Şekil 4.2. Ekstrelerin EC ₅₀ değerleri	38
Şekil 4.3. EC ₅₀ hesaplaması için kullanılan örnek doz-cevap eğrilerine ait grafikler	39
Şekil 4.4. Ekstrelerin radikal süpürücü etkilerinin zamana bağlı gösterilmesi	41
Şekil 4.5. Trolox standart grafiği.....	44
Şekil 4.6. COX-2 enzimi IC ₅₀ hesaplaması için kullanılan doz-cevap eğrilerine ait grafikler	45
Şekil 4.7. COX-2 enziminin 0-80 µM AA ile Michealis-Menten grafiği	46
Şekil 4.8. Ekstrelerin Lineweaver Burk grafikleri.....	47
Şekil 4.9. 12/15-LOX enzimi IC ₅₀ hesaplaması için kullanılan doz-cevap eğrilerine ait grafikler	48

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. 12/15-LOX enziminin 0-100 μ M LA ile Michealis-Menten grafiği.....	49
Şekil 4.11. Ekstrelerin Lineweaver Burk grafikleri.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µg/mL	Mikrogram/Mililitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µM/dk	Mikromolar/Dakika
dk	Dakika
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/Kilogram
mg/mL	Miligram/Mililitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar	Açıklamalar
AA	Araşidonik asit
COX	Siklooksijenaz
cPLA	Sitozolik fosfolipaz
CYP	Sitokrom
CysLT	Sistinil lökotrien
EET	Epoksieikosatetraenoik asit
EO	Esansiyel yağ
FLAP	5-LOX aktive edici protein
HETE	Hidroksiyeikosatetraenoik asit
HNE	Hidroksineonal
HODE	Hidroksioktadekadienoik asit

Kısaltmalar**Açıklamalar****HPETE**

Hidroperoksiieikosatetraenoik asit

HPODE

Hidroperoksioktadekadienoik asit

IL

İnterlökin

LA

Linoleik asit

LOX

Lipoksijenaz

LT

Lökotrien

MDA

Malondialdehit

MGST₂

Mikrozomal glutatyon-S transferaz

NSAID

Non steroidal anti-inflamatuvar ilaç

PG

Prostaglandin

POX

Peroksizom

PUFA

Çoklu doymamış yağ asitleri

TAC

Total antioksidan kapasite

TX

Tromboksan

 α

Alfa

 β

Beta

1. GİRİŞ

Kronik inflamasyon, büyük doku hasarı ve yıkımı ile uzun süreli ve kalıcı enfeksiyon ile karakterizedir. Kontrolsüz inflamatuvar yanıtın durdurulması, hem sitokin kaynaklı gen ekspresyonunu azaltabilen steroidal glukokortikoidleri hem de siklooksijenaz (COX) enzim izoformlarını hedef alan steroidal olmayan anti-inflamatuvar (NSAID) ilaçların varlığı ile gerçekleştirilir [1]. Bu ilaçların uzun süreli kullanımı mide ülseri, böbrek toksisitesi, eklem yıkımı ve kardiyovasküler rahatsızlıkları içeren istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır [2-6]. Araşidonik asit metabolizmasındaki herhangi bir tek yolun inhibisyonu, yağ asidinin lipoksijenaz (LOX) yolunun devamlılığına yol açarak zararlı lökotrienlerin oluşumuna ve yan etkilere neden olur [7]. Daha az toksisiteye sahip ikili LOX/COX inhibitörlerin keşfi, bu dezavantajların ortadan kalkması için çok büyük önem arz etmektedir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler; gıda, ilaç, kozmetik ve baharat gibi birçok kullanım amaçları olan ve insanlık tarihinin başlangıcından itibaren benzeri amaçlarla kullanıldıkları bilinen bitkilerdir. İnsanlık tarihinin başlangıcından beri tıbbi, aromatik ve tıbbi bitkiler kozmetikten gıda sektörüne kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Bu bitkilerin en dikkat çekici özellikleri yüzyıllardır tedavi amaçlı olarak kullanılmalarıdır. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanıldığına dair ilk kayıtlara M.Ö. 5000’lerde Mezopotamya uygarlığında rastlanmıştır [8].

Lamiaceae (Labiatae) familyası, otsu, çalimsı ya da ağaç formlarındaki bitkileri içeren, dünyanın birçok yerinde ekonomik olarak oldukça büyük öneme sahip kozmopolitan bir familyadır. Çoğunlukla Akdeniz ve Orta Asya’da yayılış göstermektedir [9]. Lamiaceae familyasının, Boissier’in “Flora Orientalis” adlı eserinde 66 cins, yaklaşık 1100 kadar türü bulunmaktadır. Lamiaceae familyasının takson sayısı ortalama 200-250 cins, 3200-4000 türdür [10]. Fakat bu sayı Thonner’e göre 250 cins, 7000 tür olarak farklılık göstermektedir [11].

Eski çağlardan günümüze kadar Lamiaceae familyası türleri halk arasında tıbbi ve baharat amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde fitoterapide kullanılan pek çok örnekte de bu familya bitkilerinin yer aldığı görülmektedir [12, 13].

Ülkemiz florası, Lamiaceae ailesi için önemli bir yer oluşturmaktadır. Ülkemizde endemizm oranı açısından % 44,2 olan bu familya, Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası durumundadır [14]. Lamiaceae familyası bitkileri zengin sekonder metabolit içeriğine sahiptir [15, 16]. Bu sekonder metabolitler, antibakteriyel, antifungal [17], antioksidan [18], antimikrobiyal [19], anti-inflamatuvar [20] ve özellikle LOX ve COX enzimlerinin inhibitörü [21-24], radikal süpürücü etkisi [25-27] dahil olmak üzere farklı biyolojik aktivitelerde rol aldığı bilinmektedir.

Tez çalışmasının amacı ve kapsamı

Bu tez çalışmasında Lamiaceae familyasından seçilen *Mentha piperita* L., *Salvia officinalis* L., *Lavandula officinalis* Mill., *Scutellaria orientalis* L. ve *Melissa officinalis* L. bitkilerinin inflamasyon yolağında önemli yere sahip LOX ve COX enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri belirlenip, ticari olarak bulunan ve yan etkileri fazlasıyla bulunan inhibitör ilaçlara alternatif ekstreler olabilmeleri yönünden incelenecektir.

Bu kapsamda, bitki örnekleri toplandıktan sonra literatür bilgileri ışığında toprak üstü bölümleri toplanıp metanol ekstreleri elde edilmiştir. İlk önce ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için DPPH⁺ radikali süpürücü etkileri taranmış ardından da bu radikali zamana bağlı olarak süpürme kapasiteleri incelenmiştir. Daha sonra ekstrelerin toplam antioksidan kapasiteleri total antioksidan kapasite metodu (TAC) ile tayin edilmiştir.

Ekstrelerin inhibitör aktivitelerinin belirlenmesi için önce kullanılacak enzimlerin kinetik karakterizasyonu yapılması gerekmektedir. Bu kapsamda, hem soya fasulyesi kökenli lipoksijenaz (LOX) enzimi hem de rekombinant insan siklooksijenaz (COX) enziminin substratları ile Michealis-Menten kinetiği yapılmıştır. Bu çalışmalardan belirlenen uygun substrat konsantrasyonu ile ekstrelerin 12/15-LOX ve COX-2 enzimleri üzerine inhibitör etkileri olup olmadığı taranmıştır. Son olarak, seçilen ekstrelerin LOX ve COX enzimi üzerine olası inhibisyon mekanizmaları yatışkın durum yaklaşımı ile belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İnflamasyon ve Yağ Asidi Peroksidasyonu

İnflamasyon, vücudun farklı içsel ve dışsal uyaranlara karşı kendiliğinden meydana gelen koruyucu bir tepkisidir [28, 29]. İnflamasyon, doku yapısının ve fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesini sağlayan, özünde faydalı bir süreçtir. İnflamasyonun akut fazı, tipik olarak nötrofillerin hızlı akışı ile karakterize edilir. Bu aşamayı monositlerin makrofajlara olgunlaşması takip etmektedir. Oluşan makrofajlar çoğalarak yerleşik doku makrofajlarının fonksiyonlarını etkiler. İnflamatuar süreç sırasında meydana gelen önemli mikro-dolaşım olayları arasında vasküler geçirgenlik değişiklikleri, lökosit alımı ve birikimi ve inflamatuvar mediatör salınımı yer almaktadır [30]. Bu süreç, akut inflamasyonun başlıca belirtileri olan kızarıklık, ısı artışı, şişme ve ağrı ile karakterize edilir [31, 32]. Genellikle, akut inflamatuvar yanıtlar sırasında oluşan hücrel ve moleküler olaylar ve etkileşimler, olası yaralanma veya enfeksiyonu etkin bir şekilde en aza indirir. Bu süreç, doku homeostazının yeniden düzenlenmesine ve akut inflamasyonun ortadan kaldırılmasına katkıda bulunur. Bahsedilen bu aşamalarda herhangi bir aksaklık meydana geldiğinde oluşan akut inflamasyon süreci kontrolsüz bir şekilde seyir ederek kronikleşebilir ve çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklara sebep olabilir [33]. Kronik inflamasyon tüberküloz, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ateroskleroz ve nörodejeneratif ve metabolik hormonal bozukluklar gibi kalıcı enfeksiyonlara yol açtığı bilinmektedir [34].

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, birçok inflamatuvar hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynar [34]. Tüm biyolojik sistemler redoks dengesinde bulunma eğilimindedir. Redoks homeostazındaki bozulmalar, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi veya hücrel redoks yeteneğinin kaybı nedeniyle oksitleyici moleküllerin birikmesinden kaynaklanır. Her iki durumda da, biriken oksitleyici maddeler DNA'yı, proteinleri ve lipitleri oksitleyebilir. Böylece bu moleküllerin yapılarını, aktivitelerini ve fiziksel özelliklerini değiştirebilir. Oluşan oksidatif hasarın şiddeti göz önüne alındığında, redoks dengesinin bozulması, hastalığa veya ölüme yol açan biyolojik homeostazda ciddi bozulmalara neden olabilir [35].

Kontrolsüz oksidatif stresin sonuçlarından biri oksidatif hasarın neden olduğu hücreler, dokular ve organların yaralanmasıdır. Yüksek seviyelerde serbest radikallerin veya ROS'un yağ asitlerine doğrudan zarar verebileceği uzun zamandır bilinmektedir. Endojen ROS

üretiminin birincil kaynakları mitokondri, plazma zarı, endoplazmik retikulum ve peroksizomlardır [36].

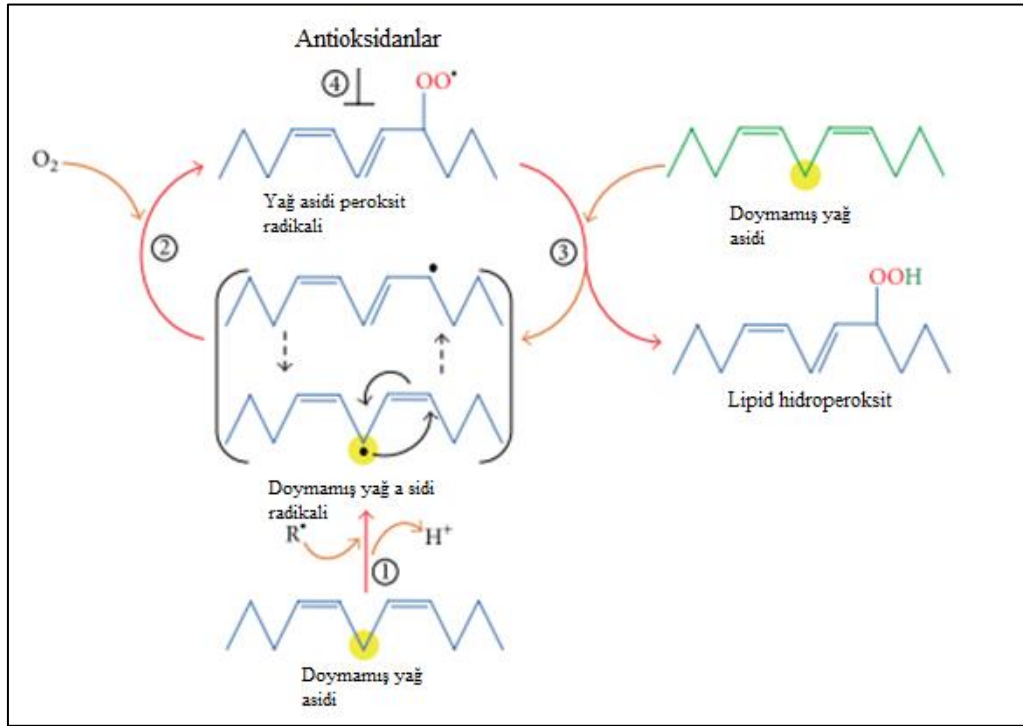
Reaktif oksijen türleri hücrelerdeki en yaygın oksidanlardan bazılarıdır. ROS, moleküler oksijenin süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), yağ asidi peroksitleri ($ROOH^{\cdot}$), hidroksil ($HO^{\cdot}$) veya peroksil radikallerine ($ROO^{\cdot}$) kısmi indirgenmesiyle oluşur. Oluşan ROS inflamasyon, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve yağ asidi peroksidasyonunun yanı sıra oküler ve böbrek dejenerasyonu gibi birçok patolojik durumun anahtar aracılığı olarak ilişkilendirilmektedir [35].

Yağ asidi peroksidasyonu, yağ asidi radikallerinin oluşumunu ve çoğalmasını, oksijen alımını, doymamış yağ asitlerinde çift bağların yeniden düzenlenmesini ve kalıcı olarak membran yağ asitlerinin ortadan kaldırılmasını ve ayrıca alkol, keton, alkan, aldehid ve eterler dahil olmak üzere çeşitli yıkım ürünlerinin üretimini içerir [37]. Yağ asidi peroksitler, toksik etkilerini iki genel mekanizma ile gösterirler. İlk olarak yağ asitleri, hücre zarlarının bütünlüğünü korumaktan sorumlu olduğu için, peroksidasyonu ile membranların bileşimi, yapısı ve dinamiklerini değiştirir. İkincil olarak kuvvetli reaktif bileşikler olarak yağ asidi peroksitler, yeni nesil ROS üretebilir veya DNA ile proteinleri çapraz bağlayabilen reaktif bileşiklere ayrışabilir [35].

Yağ asidi peroksidasyonu, hidrojenin ayrılması veya oksijen radikalinin eklenmesi ile başlatılan ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) (örneğin; linoleik asit, araşidonik asit gibi) oksidatif hasarıyla sonuçlanan bir zincir reaksiyonudur [38]. Yağ asidi peroksidasyonu tercihen, PUFA'ları birden fazla çift bağ ile oksitler. Peroksidasyona en duyarlı PUFA'lar bir (1Z, 4Z) pentadien kısmı içerir. Oksidasyonun ilk aşamasında, iki çift bağı köprüleyen metilen karbonundan bir hidrojen atomu çıkarılır [35]. Yağ asitlerinin peroksidasyonu veya oksijenin doymamış yağ asitleriyle reaksiyonu çok çeşitli oksidasyon ürünleri üretir. Peroksidasyon sırasında birincil olarak oluşan yağ asidi hidroperoksitlerinin yanı sıra; malondialdehit (MDA), propanal, heksanal ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi farklı aldehitler ikincil ürünler olarak oluşabilmektedir [39, 40]. MDA, yağ asidi peroksidasyonunun en mutajenik ürünü iken, 4-HNE en toksik üründür [41].

İki çeşit yağ asidi peroksidasyonu mevcuttur; *enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyon*. İki reaksiyonda da yağ asidi peroksidasyonunun genel mekanizması her iki durumda da büyük ölçüde aynıdır [42].

Enzimatik olmayan yağ asidi peroksidasyonu ve lipid peroksitlerin oluşumunda başlatıcı moleküler O_2 'dir. Reaksiyon Fe^{2+} iyonları ile sürdürülür [43]. Bu reaksiyon, karbon ve oksijen merkezli radikallerin aracılık ettiği bir işlemdir. Tüm radikal reaksiyonlar gibi, bu süreç de üç ayrı aşamaya ayrılmaktadır: *başlatma, uzama ve sonlandırma* [35]. Aşamalar Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



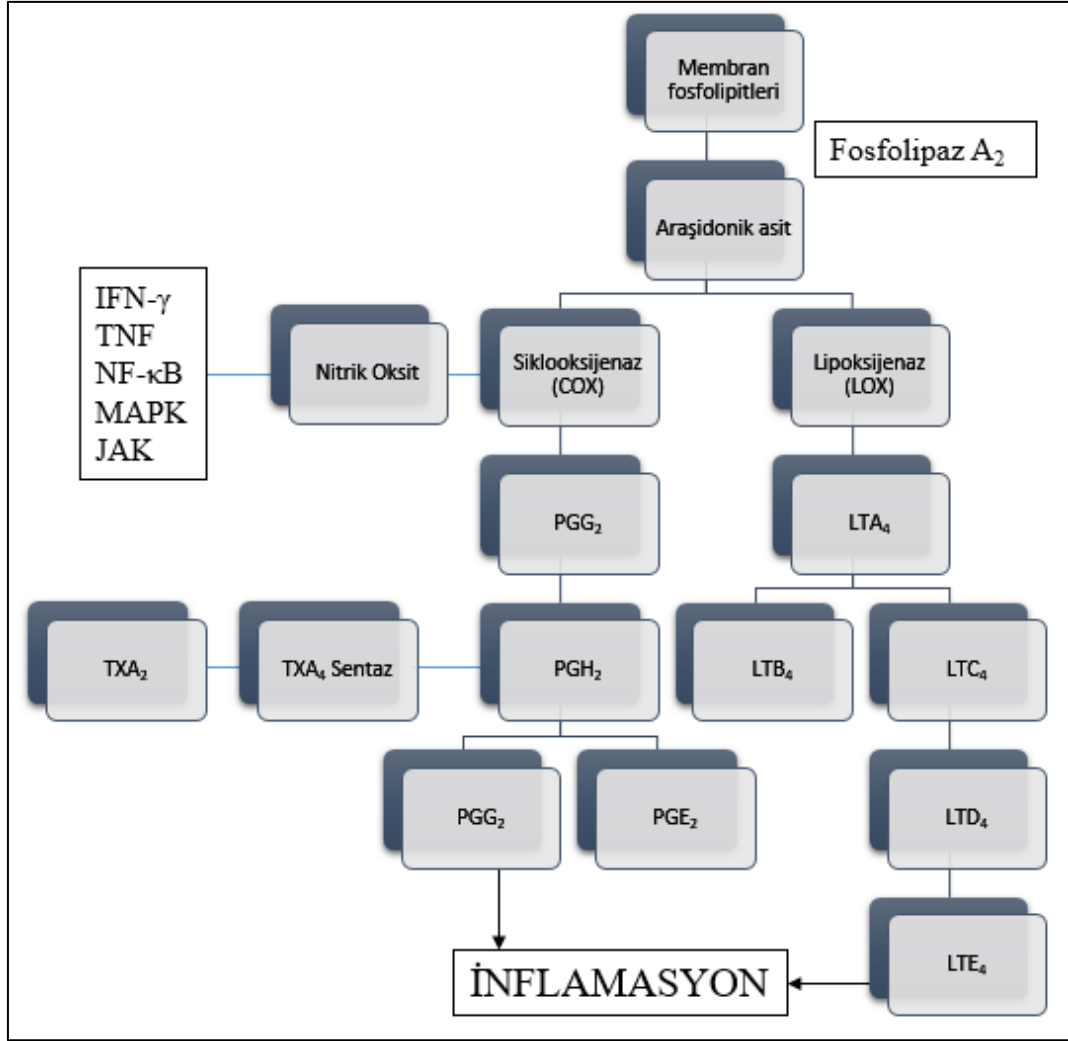
Şekil 2.1. Enzimatik olmayan yağ asidi peroksidasyonu aşamaları [42]

(1) Başlatma basamağında, pro-oksidanlar karbon merkezli yağ asidi radikalini oluşturan alilik hidrojeni çıkarır. Karbon radikali, bir konjuge dien oluşturmak için moleküler bir yeniden düzenleme ile stabilize olma eğilimindedir. Uzama fazında, yağ asidi radikali oksijenle hızla reaksiyona girerek bir yağ asidi peroksil radikali oluşturur (2), bu da başka bir yağ asidi molekülünden bir hidrojeni çıkararak yeni bir yağ asidi radikali ve yağ asidi hidroperoksiti oluşturur (3). Sonlandırma basamağında ise antioksidanlar, yağ asidi peroksil radikal türlerine bir hidrojen atomu ekler (4).

Başlatma aşamasında radikal olmayan moleküllerden radikal bileşikler üretilmektedir. Hücrelerde radikal bileşikler üretebilmek için çoğunlukla demire ve daha az sıklıkla bakıra ihtiyaç duymaktadır. Ferroz demir (Fe^{+2}), hücrelerde sıkı bir düzenleme altındadır. Çoğu demir hem grubu ile bağlanarak FeS kümelerine bağlanır veya demir depolama proteini olan ferritin şeklinde (Fe^{+3}) depolanmaktadır. Ek olarak, gevşek bir şekilde bağlanan kararsız ve redoks reaksiyonlarına katılabilen az miktarda hücresel demir molekülü bulunmaktadır [44]. Kararsız demir havuzu tarafından katalize edilen bu redoks reaksiyonlarına topluca "Fenton kimyası" denir. Bu reaksiyon, kararsız demirin endojen olarak üretilen hidrojen peroksit veya süperoksit ile reaksiyona girerek oksijen merkezli radikaller oluşturması olarak bilinmektedir [35, 43].

Fenton reaksiyonlarında üretilen hidroksil ve peroksil radikalleri, membran PUFA'nın bisillik metileninden bir hidrojen oluşturabilir. Oluşan hidrojen, yağ asidi peroksil radikali ($\text{ROO}\cdot$) oluşturmak için çözeltide moleküler oksijen ile reaksiyona girebilen karbon merkezli bir radikal yaratır. Bu radikal, bir yağ asidi peroksit ve oksijen ile reaksiyona girebilen başka bir karbon merkezli radikal oluşturarak farklı bir bisalilik metilenden yeni bir hidrojen oluşturabilir. Yeni radikallerin oluşmasına neden olan radikal bileşikler, yayılma aşamasının için bir belirteçtir. Radikallerin konsantrasyonu, iki radikalın birbiriyle reaksiyona girebileceği kadar yüksekse, radikalleri ortadan kaldırarak kendi aralarında yeni bir bağ oluştururlar. Bu reaksiyona alternatif olarak kendileri radikal olmadan radikal bileşiklere elektron verebilen moleküller radikal yayılımı sonlandırabilir[35].

Ek olarak yağ asitleri, araşidonik asidin (AA) oksidasyonundan sonra hidroperoksiyeikosatetraenoik asitlere (HPETE'ler), lipoksinlere, lökotrienlere (LTs) veya hepoksilin biyosentezine aracılık eden lipooksijenazlara (LOX) [45, 46], prostaglandin üreten siklooksijenazlara (COX) ve epoksiyeikosatrienoik asit (EET), lökotoksin, tromboksan ve prostasiklin üreten sitokrom P-450 (CYP) gibi yağ asidi sinyal araçları üreten ana enzimler tarafından kontrollü bir şekilde perokside olabilirler [45, 47] Şekil (2.2).



Şekil 2.2. İnflamasyon yolunun şematize gösterimi [48]

2.2. Lipoksijenazlar

Lipoksijenazlar (LOX), membran lipitlerinden serbestleşen çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizleyen ve hem grubu olmaksızın demir içeren enzimlerdir [49-52].

Genel hatları ile reaksiyon döngüsünün ilk basamağı bir hidrojen radikalının serbestleşmesidir. Bu reaksiyon yağ asidinin allilik pozisyonunda iki çift bağ varlığında gerçekleşmektedir. Yani, yağ asidinin LOX substratı olabilmesi için en az iki çift bağ içermesi ve bu iki çift bağ arasında bir metilen grubu taşıması gerekmektedir. İkinci reaksiyon basamağında çift bağlardan biri yeniden düzenlenerek, çift bağlar trans konfigürasyonunda pozisyon alır ve bir konjüge dien sistemi oluşur. Reaksiyonun son basamağı sırasıyla yapıya bir oksijen molekülü ve hidrojen atomunun eklenmesi ile tamamlanır [53].

LOX, karasal yaşamın üç domainin ikisinde (bakteri, ökarya) görülür, ancak arkeadaki oluşumları hakkında yeterince bilgi yoktur [50, 54]. İnsan genomu, altı farklı LOX-izoformunu kodlayan altı fonksiyonel LOX geni (*ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *ALOX5*) içermektedir [55]. 10. kromozom üzerinde bulunan *ALOX5* geni hariç diğer tüm LOX genleri, kromozom 17 üzerindeki bir eklem gen kümesinde lokalizedir [52]. Lipoksijenazlar, araşidonik asidin oksidasyonunun konumsal özgüllüğüne göre adlandırılır ve sınıflandırılır [35]. Araşidonik asit substrat olduğunda, farklı izozimler 5, 12 veya 15 karbonlarında bir hidroperoksil grubu ekleyebilir ve bu nedenle bunlar 5-, 12- veya 15-Lipoksijenazlar olarak adlandırılır (Çizelge 2.1) [56].

Çizelge 2.1. İnsan lipoksijenaz izoformları (Tablodaki bilgiler NCBI’den alınmıştır)

Gen İsmi	Kısaltması	Alternatif isimlendirmesi	Enzim ürünü
Araşidonat 5-lipoksijenaz	ALOX5	LOX-5, Lökotrien A ₄ sentetaz	Lökotrienler
Araşidonat 12-lipoksijenaz	ALOX12	12S-LOX, Platelet tip lipoksijenaz 12	12(S)-HPETE, 12(S)-HETE
Araşidonat 12-lipoksijenaz, 12R tip	ALOX12B	12R-LOX, epidermis tip lipoksijenaz-12	12(R)-HPETE, 12(R)-HETE
Araşidonat 15-lipoksijenaz	ALOX15	15-LOX-1, 12/15-LOX, Araşidonat 12-lipoksijenaz lökosit tip, Araşidonat omega-6 lipoksijenaz	15(S)-HPETE, 15HETE
Araşidonat 15-lipoksijenaz, tip B	ALOX15B	15-LOX-2, 15-LOX-B	15(S)-HPETE, 15HETE
Araşidonat lipoksijenaz 3	ALOXE3	eLOX3, Epidermis tip lipoksijenaz 3	12(R)- HPETE'den Epoksi alkoller (hepoksilinler)

İnsanlar, genel olarak araşidonik asit lipoksijenaz için “ALOX” olarak adlandırılan beş farklı lipoksijenaz (LOX) genine sahiptir. 5-LOX ağırlıklı olarak lökotrienler (LT'ler) üretirken, 12- ve 15-LOX ağırlıklı olarak eikosanoidler hidroperoksieikosatetraenoik asit (HPETE) ve hidroksieikosatetraenoik asit (HETE) üretir.

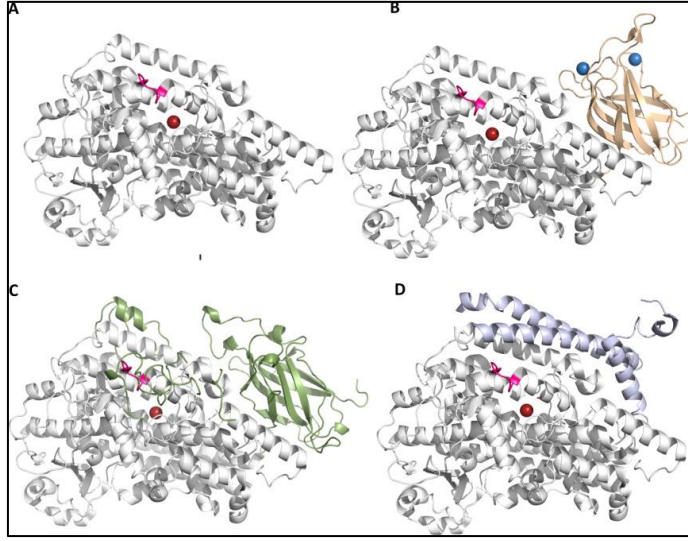
2.2.1. LOX enzimlerinin yapısı

Kararlı ve fazla miktarda elde edilebilmesi sebebi ile soya fasulyesi lipoksijenaz enzimi tüm LOX enzimlerinin yapısını incelenmesi için çok iyi bir modeldir.

Boyington ve ark.(1993), soya fasulyesinden elde edilen L1 izoformu olan LOX'un ilk kristal yapısını tanımlamışlardır. Tanımlanan bu yapı ile birlikte bitki ve hayvan LOX enzimleri

için ortak moleküler çerçeve belirlenmiştir [57]. Prigge ve ark. (1997) önceki çalışmalara tamamlayıcı bir çalışma olarak soya fasulyesi LOX-1 üzerine ayrıntılı bir çalışma ile LOX enzimlerinin yapılarının genel olarak benzer olduğunu ortaya koymuştur. Bu kapsamda LOX enzimlerinin PLAT (Polisistatin-1, Lipoksijenaz, α -toksin) alanı olarak bilinen β -fıçı bir amino terminal bölgeden ve hem grubu olmayan demir atomunu içeren çok daha büyük α -sarmal yapılı bir katalitik alandan oluştuğu gösterilmiştir. PLAT bölgesindeki β -fıçı alanının içi, çoğu aromatik hidrofobik yan zincirlerden oluşmaktadır. Bu bölge katalitik alandan ayrı durarak sadece gevşek bağlar yaparlar. Katalitik alan ise, enzimin ana bölgesi olarak nitelendirilir. PLAT bölgesinin aksine katalitik alanda hidrofobik yan zincirler çok fazla bulunmamaktadır. Fakat bu katalitik alan boyunca birbiriyle temas halinde olan beş triptofanın düzenlemesini içeren kapsamlı bir hidrofobik kümeler ağı içermektedir. Demir, üç histidin (His499 His504 ve His690) proteinin terminal karboksil bölgesine koordine bir şekilde bulunmaktadır. Bu bölge, LOX reaksiyonlarının başlamasına öncülük etmektedir. Bu reaksiyonlar için iki genel mekanizma önerilmiştir. Her iki mekanizmada da LOX'ta bulunan aktif Fe^{+3} formu ile başlamaktadır. Önerilen ilk mekanizma da Fe^{+2} 'nin ürün tarafından Fe^{+3} 'e oksitlendiğini söylemektedir. Demir merkezin iki tarafı, metali molekülün dışına bağlayabilen büyük iç boşluklara bakmaktadır. Tünel şeklinde bulunan birinci boşluktaki histidin alanlarının çoğunun bitki ve hayvan LOX'ların korunduğu bilinmektedir. Birinci boşluk, moleküler oksijenin demir merkezine hareketi için ideal bir yol sunar. İkinci boşluğun, enzimin katalitik olaylarının yeri olduğu öne sürülmüştür. İkinci boşluk ise enzimin katalitik olaylarının gerçekleştiği alan olarak düşünülmektedir [58].

Ayrıca bitki LOX enzimleri, kendilerine özgü spesifik birkaç bölge ile basitçe hayvan LOX enzimlerinden ayrıldığı; bitki LOX enzimlerinin kıyasla daha büyük olduğu rapor edilmiştir [59]. Ayrıca yakın zamanda bakteriyel LOX enzimlerinin yapısı *P. aeruginosa* kullanılarak gösterilmiştir [60]. Bitki, hayvan ve bakteriyel LOX enzimlerinin üç boyutlu yapıları Şekil 2.3'te verilmiştir.



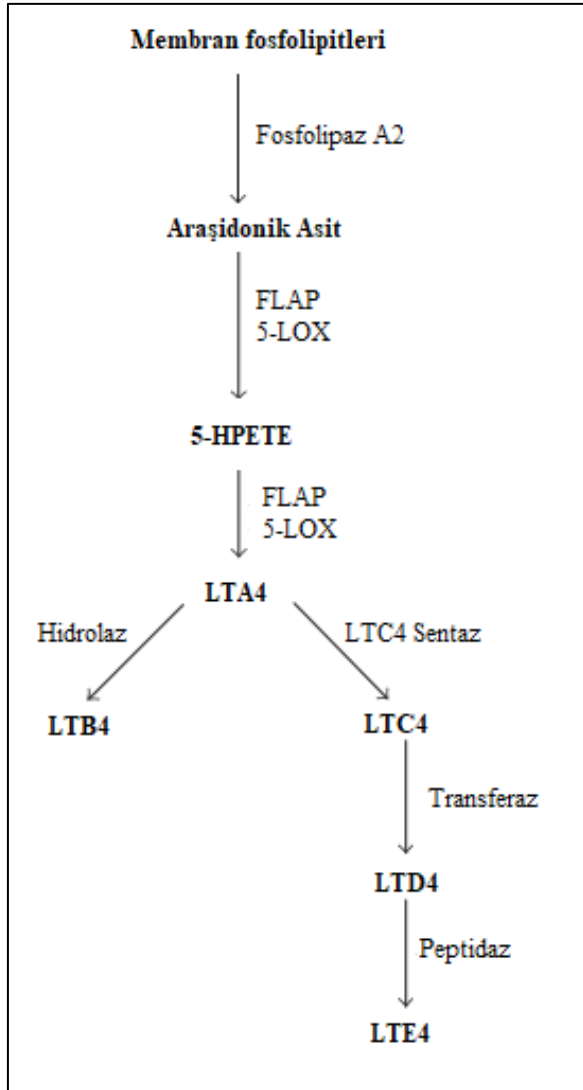
Şekil 2.3. LOX enziminin 3D yapısı [59]

LOX'ların katalitik aktif bölgesi bitki, hayvan ve bakteri ile ortaktır (A). Aktif bölge, katalitik demiri barındıran büyük bir sarmal demetidir. Aktif bölge üzerinde bir yay oluşturup helezona katkıda bulunan grup parlak pembe renkte gösterilmiştir (B). Ca^{2+} barındırabilen amino terminal alanlar (PLAT) hayvan (krem) ve bitki (yeşil) gösterilmiştir (C). Bakteriye LOX, PLAT alanından yoksundur, ancak ek sarmallara sahiptir (D).

2.2.2. 5-Lipoksijenaz

Lökotrienler (LTs), bağışıklık yanıtlarında ve doku homeostazında merkezi rol oynayan fagosit kemotaksisine ve artmış vasküler geçirgenliğe neden olan inflamatuvar lipid habercileridir [55, 61]. İlk olarak 1937'de anafilaksin (SRS-A) yavaş reaksiyona giren maddeleri olarak tarif edilen bu lipid araçları, şu an sisteinil LT'ler (CysLT'ler), LTC_4 , LTD_4 ve LTE_4 olarak bilinmektedir [62].

LT'lerin sentezi iki yola ayrılır: *CysLT oluşturulan yol*, *LTB₄ oluşturulan yol*. LT sentezinin ayrıntılı basamakları Şekil 2.4'te gösterilmiştir [63].



Şekil 2.4. Lökotrien biyosentezinin basamakları [64]

Araşidonik asit, sitozolik fosfolipaz A2'nin (cPLA2) etkisiyle membran fosfolipidlerinden serbestleşir ve FLAP tarafından 5-LO enzimine sunulur. 5-LO enzimi, araşidonik asidi 5-HPETE olarak adlandırılan kararsız bir ara maddeye dönüştürür. Ardından, 5-HPETE, inflamatuvar ve anafilaktik düzenleyicilerin biyosentezinde önemli bir ara ürün olan epoksit LTA₄'ü oluşturmak üzere dehidre edilir. LTA₄'ün LTA₄ hidrolaz tarafından enzimatik hidrolizi, LTB₄'ün oluşumuyla sonuçlanır. Alternatif olarak, LTC₄ sentaz, LTA₄'ün glutatyon ile birleşmesini katalizleyerek LTC₄'ü oluşturur. LTC₄ sırasıyla transferaz ve peptidaz enzimleri ile LTE₄ ve LTE₄'e dönüştürülebilir.

LT biyosentezi ilgili enzimleri, kofaktörlerini ve hücrel dağılımlarını karakterize etme amacıyla ilk çalışmalar, 1930'lu yılların sonlarında başlanmıştır. İlerleyen yıllarda, LT sentezinin başlatılmasında yer alan üç anahtar proteini incelemek için fraksiyonasyon

yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalardan sitozolik fosfolipaz A₂ (cPLA₂), 5-LOX ve 5-LOX aktive edici protein (FLAP) karakterize edilmiştir. [63, 65]. Etki mekanizmaları belirsiz olmakla birlikte, FLAP'ın AA'yı 5-LOX enzimine transfer ettiği düşünülmektedir. LOX enzimi FLAP arasındaki bu etkileşim, hücresel LT biyosentezi için önemli olduğu bilinmektedir [66].

Trombositler, endotel hücreleri, kırmızı kan hücreleri gibi diğer hücre türleri sadece LTA₄H, LTC₄ sentaz veya glutatyon metabolizması süper-ailesi (MAPEG) üyesi mikrozomal glutatyon S- transferaz-2 (MGST₂) içerir ve transselüler LT biyosentezine bu araçlar ile katılır. Endotel hücrelerinde bulunan MGST₂, başta transselüler metabolizma ile sağlanan LTA₄'ten LTA₄ hidrolaz ile dihidroksiasit LTB₄'e ve LTC₄ sentaz aracılığı ile glutatyon konjugatı LTC₄'e dönüştürmektedir [53]. Diğer CysLT'ler, g-glutamin ve glisin LTC₄'ten hidrolitik olarak uzaklaştırılmasıyla oluşur [61]. Proinflamatuvar bağlamlarda, LT'ler tipik olarak hızlı başlangıçlı ve düz kas kasılması, fagosit kemotaksisi, artmış vasküler geçirgenlik gibi kısa süreli hücresel yanıtları uyarmaktadır [67, 68].

5-LO, LT biyosentezinin anahtar enzimi olup bazı hücre türlerinde çekirdekte ve diğerlerin de ise sitozolde bulunur [63]. 5-LOX, 5. konumdaki karbon atomundan araşidonik asidin oksitlenmesinden sorumlu ve 5-HPETE oluşturan, ALOX5 geni tarafından kodlanan bir enzimdir [35]. 5-LOX; polimorfonükleer lökositler (nötrofiller ve eozinofiller), monositler, dendritik hücreler, mast hücreleri ve B lenfositleri gibi çeşitli lökositlerde ifade edilir [53]. 5-LOX; polimorfonükleer lökositler (nötrofiller ve eozinofiller), monositler, dendritik hücreler, mast hücreleri ve B lenfositleri gibi çeşitli lökositlerde ifade edilir [53]. Bu hücre tipleri, 5-LOX ürünlerinin biyosentezi için PLA₂ enzimi, 5-LOX, FLAP, LTA₄H ve/ veya LTC₄ sentazlar gibi bazı yapılara sahiptir. Bu hücre tiplerinde 5-LOX, lökotrien biyosentezini başlatarak 5-HPETE'yi LTA₄'e dönüştürmektedir [69].

LOX aktivitesi özellikle yüksek Ca⁺² seviyeleri ile uyarılırken, Cu⁺² ve Co⁺² gibi diğer metal katyonları 5-HPETE üretimini engellediği bilinmektedir [53, 70]. Ayrıca Ca⁺² iyonlarına göre Mg⁺² daha yüksek konsantrasyonlar gerekli olmakla birlikte *in vitro* olarak 5-LOX aktivitesini uyarabilmektedir. Ca⁺² (veya Mg⁺²) ile enzimin indüklenmesi, çeşitli faktörlere bağlıdır. Reddy, Hammarberg ve Rådmark (2000)'ın yaptığı çalışmada yüksek AA (>20–40 µM) varlığında, lökosit homojenatlarında izole edilmiş 5-LOX veya saf enzim Ca⁺² yokluğunda oldukça aktif olduğu gözlemlenmiştir [71].

5-LOX'un aktivasyonu ayrıca protein kinazlar tarafından regüle edilir. 5-LOX'un p38 MAPK ve ERK1/2 ile fosforilasyonu, hücrelerdeki enzim aktivitesini arttırırken, protein kinaz A ile fosforilasyonu, enzim aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir [53]. 5-LOX aktive edildikten sonra 5-FLAP ve cPLA₂ ile birleşerek nükleer membrana geçer. cPLA₂, araşidonik asidin membran fosfolipidlerinden ayrılmasından sorumludur ve 5-LOX için substrat kullanılabilirliğini arttırır. Bunun yanı sıra FLAP'ın kesin fonksiyonu hala belirsizdir, ancak FLAP'ın araşidonik asidin 5-LOX'a verilmesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. FLAP fonksiyonunun farmakolojik inhibisyonu, endojen araşidonik asidin 5-LOX ile oksidasyonunu önleyen FLAP'ın lipit peroksit oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir [72, 73].

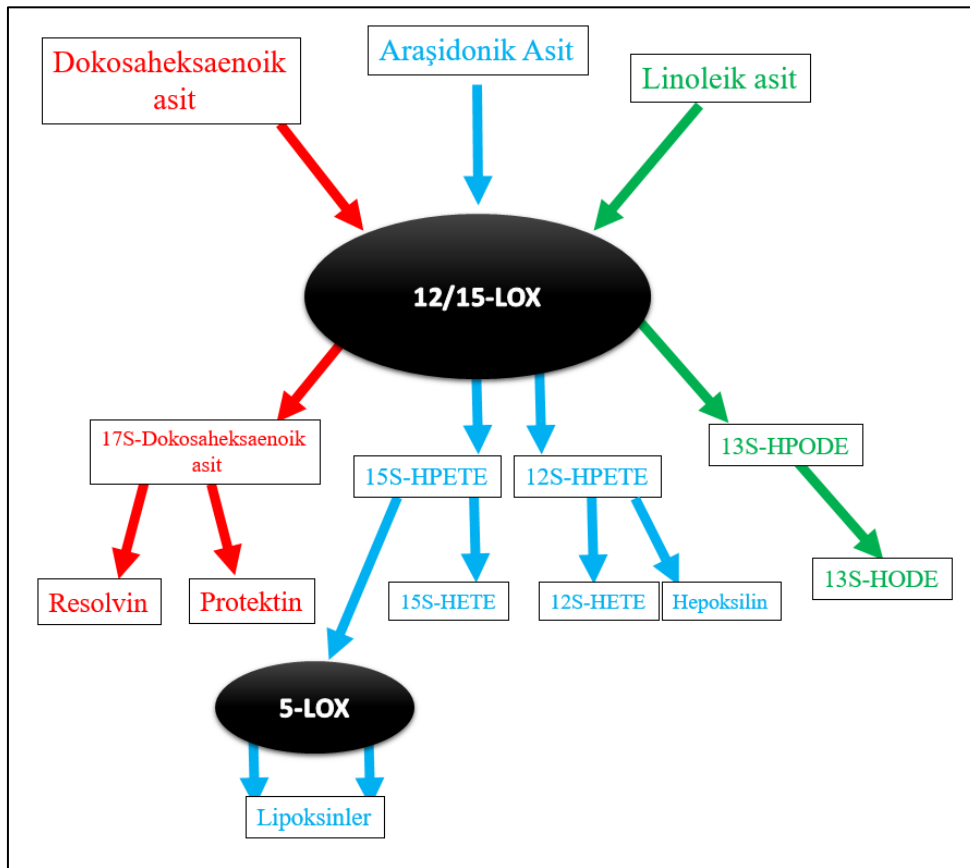
Sitokinler ve diğer bileşenler de 5-LO yolunu etkileyebilir ve 5-LO ve FLAP ekspresyonu spesifik moleküller tarafından kontrol edilebilir. Örneğin, Th2'den türetilen sitokinler, IL-4 ve IL-13'ün, FLAP mRNA ve protein seviyelerini azaltarak LT'nin monositlerden salınmasını inhibe ettiği bildirilirken, IL-1 ve IFN γ 'nin 5-LO ekspresyonunu uyarabildiği gösterilmiştir (Nassar, Montero, Fukunaga ve Badr, 1997). Ayrıca, Coffey ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışma, lipopolisakarite (LPS) uzun süre maruz kalmak nitrik oksit (NO) sentezinin indükleyerek makrofaj 5-LOX metabolizmasını inhibe etmesi sebebiyle 5-LOX aktivitesinin NO ile modüle edilebileceğini göstermektedir [74].

2.2.3. 12/15-Lipoksijenazlar

Lökotrien üreten insan 5-LOX'ları dışında, platelet/lökosit tip olarak adlandırılan 12-Lipoksijenazlar (12-LOX) ve retikülosit/lökosit ve omega-6 tip olarak bilinen 15-Lipoksijenaz Tip 1 (15-LOX-1) ve 15-Lipoksijenaz Tip-2 (15-LOX-2) enzimleri de bulunmaktadır [75, 76]. İnsan 12-LOX ve 15-LOX-1, yaygın substratlardan benzer ürünler oluşturabilme yetenekleri sebebi ile literatürde genellikle 12/15-LOX'lar olarak bilinmektedir [75, 77].

12 ve 15-lipoksijenazlar, insanlarda dört gen (*ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX15* ve *ALOX15B*) tarafından kodlanan bir enzim sınıfıdır (Çizelge 2.1) [35, 78]. Bu enzimler, araşidonik asitten 12 ve 15-hidroperoksiyeikosatetraenoik asidi (12 ve 15-HPETE) sentezler [35, 79]. 15-LOX-1 enzimi ayrıca linoleik asitten (LA) 13-S-hidroksi oktadekadienoik asit (HODE) ve 9-hidroperoksioktadekadienoik asit (9-HPODE) üretir (Şekil 2.5) [80].

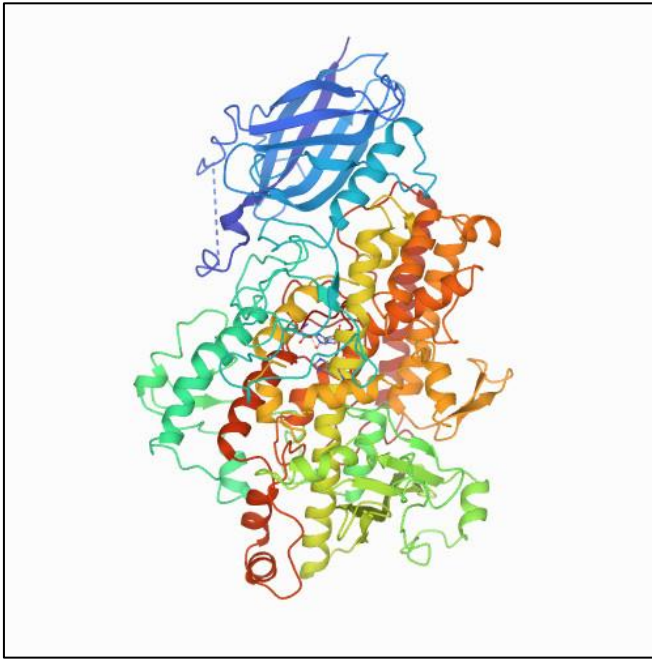
5-LOX'un aksine, bu sınıfın bazı üyeleri lipid peroksitlerin oluşumunda bölgesel seçicilik sergiler. Örneğin, 15-LOX-1 (retikülosit 15-LOX), oksitlediği araşidonik asidin %10-20'sini 12-HETE'ye dönüştürürken, 15-LOX-2 spesifik olarak karbon 15'i okside etmektedir [81]. Alifatik zincir uzunluğu açısından, 15-LOX-1 geniş bir substrat seçiciliği göstermektedir. Doymamış C₁₈, C₂₀ ve C₂₂ yağ asitlerini oksijenlendirebilir [82]. 15-LOX-1 için en uygun substrat, 13(S)- HPODE üreten LA'dır [83]. Buna karşılık, 15-LOX-2 AA'dan sadece 15(S)-HPETE üretir ve LA, 15-LOX-2 için zayıf bir substrattır [79].



Şekil 2.5. 12/15-LOX enziminin izlediği (yer aldığı) yolların gösterimi

12/15 LOX enzimatik peroksidasyon reaksiyonları, birbirini takip eden dört adımdan oluşur: İlk önce, bir hidrojen atomu bisallik metilen gruplarından birinden stereoselektif olarak soyutlanarak enzime bağlı bir radikal oluşturur. İkinci olarak, ilişkili iki cis-çift bağdan biri yeniden düzenlenir ve konjuge bir cis-trans-dien oluşturur. Ardışık olarak moleküler oksijenin eklenmesiyle bir peroksil radikali üretilir. Son olarak radikal, bir hidrojen atomunun yeniden eklenmesiyle indirgenir [50, 78, 84]. Bu peroksidasyon reaksiyonunun ürünü, substrat olarak kullanılan ilgili yağ asidine bağlıdır. [78, 84, 85].

Soya fasulyesi (*Glisin max*) lipoksijenazları olan LOX-1 ve -3, 15-LOX ya da 12/15-LOX olarak bilinir ve farklı türlerin dokularından LOX'ların homolog ailesini incelemek için prototip olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki ve memeli LOX arasında %21-27, bitki dizi çiftleri arasında %43-86 ve memeli dizi çiftleri arasında %39-93 homoloji vardır. Soya fasulyesi 12/15-LOX'ları (LOX-1 ve LOX-3) ve insan 15-LOX-1 ve 15-LOX-2 3 boyutlu yapıları incelendiğinde katalitik bölge demir atomuna yakın kısımda yüksek düzeyde bir koruma gözlenmektedir [56]. Soya fasulyesi LOX-3 3D yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Soya fasulyesi LOX-3'ün 3D yapısı (RCSB Protein Bankası'ndan alınmıştır)

12/15-LOX, çeşitli inflamatuvar ve metabolik patolojilerle ilişkilendirilmiştir. Ancak yakın zamana kadar bu enzimin fizyolojik işlevleri tam olarak anlaşılmamıştır [86]. 12/15-LOX'un inflamasyondaki rolü hala tartışmalı olsa da, bu enzimin ortam şartlarına bağlı olarak etkileri tetiklenen veya inhibe olan ve 12/15-LOX ürünlerinin heterojen spektrumuyla bağlantılı hem pro ve anti-inflamatuvar özellikler sergilediği görülmektedir [78].

12/15-LOX'un ürünleri olan 13-HPODE, 12 (S)-HETE ve 15 (S)-HPETE, insan dokularında çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Örneğin, 12 (S)-HETE ve 15 (S)-HPETE, protein kinaz C (PKC) ve çeşitli hücresel adezyon moleküllerini (CAM) uyararak vaskülatürde monosit bağlanmasında rol oynar [75, 87]. 13-HPODE dahil olmak üzere bazı ürünler pro-

inflatuardır ve NF- κ B da dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri yoluyla etki eder [75].

15-LOX-1 enziminin ekspresyonu, kırmızı kan hücrelerinin olgunlaşması sırasında düzenlenmektedir. Bu enzim, kemik iliğinde ifade edilmemekte ancak geç eritroblasttan erken retikülosit evrelerine geçiş fazında enzimin ekspresyonu başlamadığı bilinmektedir [88]. Hatta, göz merceğinin merkezi fiber hücresinde benzer bir 15-LOX-1 ekspresyonu tespit edilmiştir [89]. Karaciğerde ise 15-LOX-1, peroksizom zarının bozulmasında ve peroksizomların parçalanmasında rol oynamaktadır [90].

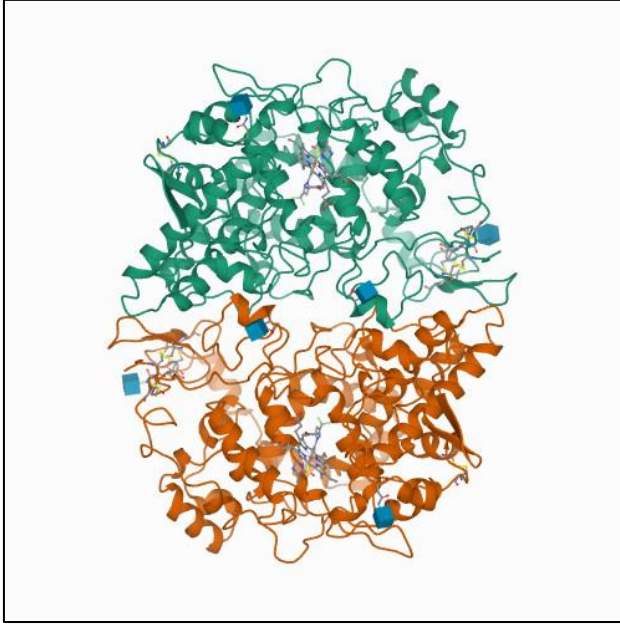
12/15- LOX'un bu etkilerini açıklayan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat çeşitli hücre tiplerinde lipoksinler ve resolvinler gibi 12/15-LOX ürünlerinin pro ve anti-inflatuar özellikler göstermesi ile inflamasyonda önemli bir rol aldığı düşünülmektedir [42, 48,55].

Uderhardt ve Krönke'nin (2012) 12/15-LOX ve makrofaj eksikliği olan fareler ile yaptığı çalışmada, inflamasyon ile birlikte interlökin (IL) IL-1, IL-3, IL-17, IL-6, IL-8 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörün (GM-CSF) seviyesinin arttığı belirtilmiştir. Buna karşılık IL-12 gibi diğer sitokinlerin ise 12/15-LOX enziminin yokluğunda azaldığı gösterilmiştir [91]. İnflamasyonun sonuna doğru 12/15-LOX up-regülasyonu ile muhtemelen artan 12S/15S-HETE, 13-HODE ve lipoksin A₄ gibi anti-inflatuar lipid düzenleyicilerinin üretiminin artmasının inflamasyon cevabı olacağı düşünülmektedir [61, 71–73].

15-LOX-1 yolunun alerjik deneklerden eozinofillerde, mast hücrelerinde ve nazal poliplerde pro-inflatuar eoksinler ürettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte 15-LOX-1 inhibitörlerinin astım, rinit ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi inflamatuvar solunum bozukluklarının tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir [92].

2.3. Siklooksijenazlar

Siklooksijenazlar (COX), araşidonik asidi prostoglandin H₂ (PGH₂)'ye dönüştürerek tüm prostaglandinlerin sentezindeki ilk önemli adımları katalize eder [93]. Bu nedenle COX, hem siklooksijenaz (araşidonik asitten protoglandin G₂ (PGG₂)) hem de peroksidaz (PGG₂'den PGH₂) aktiviteleri gösteren iki işlevli bir enzimdir (Şekil 2.7).



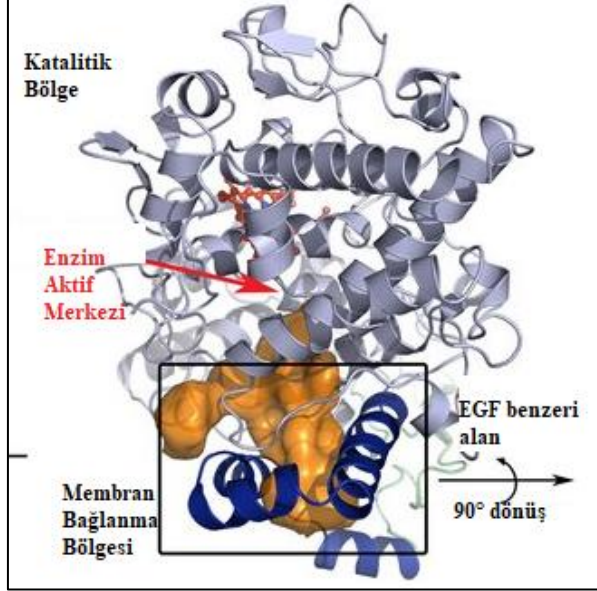
Şekil 2.7. COX-2 enzimi 3D yapısı (RCSB Protein Bankası'ndan alınmıştır)

Bilinen 2 adet COX izoformu bulunmaktadır; COX-1 ve COX-2. COX-1 temel olarak hemen hemen tüm dokularda bir *housekeeping* enzim olarak ifade edilir ve fizyolojik tepkilere aracılık eder. Diğer yandan, COX-2, inflamasyona dahil olan hücreler tarafından eksprese edilir ve patolojik süreçlerin akut ve kronik inflamatuvar durumlarında yer alan prostanooidlerin sentezinden birincil olarak sorumlu izoformudur. COX-2'ye bağlı PG sentezinin inhibisyonu, non steroidal anti inflamatuvar ilaçların (NSAID) anti-inflamatuvar ve analjezik etkilerinden sorumluyken, COX-1'in baskılanması birçok istenmeyen yan etkiye (örn. Gastrointestinal ülserasyon ve kanama, trombosit disfonksiyonları) yol açabilir [94, 95].

2.3.1. COX enzimlerinin yapısı

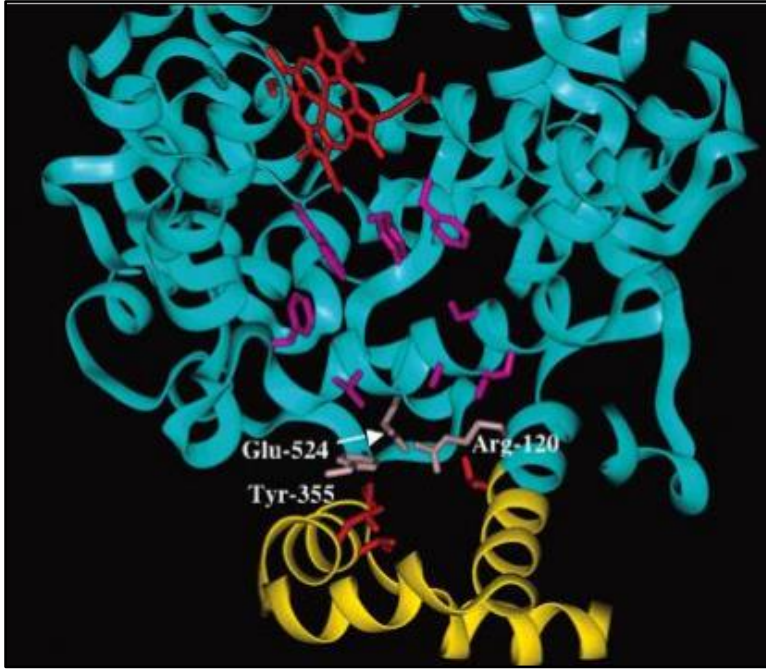
İnsan COX-1 ve COX-2 enzimleri, homodimer yapıdadır. Her iki enzim de, biri protein katlanmasını kolaylaştıran üç adet mannoz oligosakkariti içermektedir. Yalnızca COX-2'de bulunan dördüncü bir oligosakarit, enzimin bozulmasını düzenler. Katalitik alan, COX monomerinin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Katalitik alan aynı zamanda, substrat ve non steroidal anti-inflamatuvar ilaçların (NSAID) bağlanma bölgesidir. COX aktif bölgesi membran bağlama bölgesinin altında bulunmaktadır. Aktif bölge, katalitik alana hidrofobik bir kanal yardımı ile bağlanır (Şekil 2.8) [96]. Bu kanal membran bağlama alanı ile katalitik

alan arasındaki bölgede bir daralmaya sebep olan ve bu bölgeyi aktif bölgeden Arg-120, Tyr-355 ve Glu-524 aminoasitlerinden oluşan bir rezidü ayırmaktadır (Şekil 2.9) [97, 98].



Şekil 2.8. COX-2 enzimi dimer yapılarının 3D görüntüsü [99]

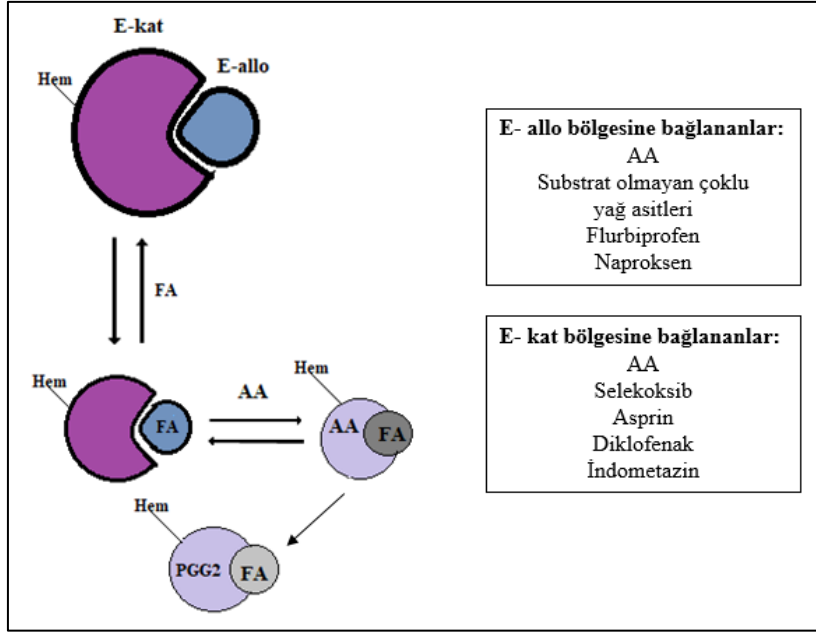
COX-1 ve COX-2 arasında % 60'a yakın benzerlik gözlenmektedir. Enzimlerin benzerliğine rağmen COX-2 enziminin aktif bölgesi COX-1'den %20 daha büyüktür. COX-1 enziminin 523. konumunda bulunan izölösün (Ile) COX-2'de valin (Val) ile yer değiştirmiştir. Val/Ile değişimi ve Phe-518 amino asiti, COX-2 enziminin aktif bölgesinin daha büyük olmasına neden olur. Bu değişimler söz edilen bölgede küçük bir hidrofilik cep oluşturur. COX-1 ve COX-2 enzimlerinde bir başka değişimin His/Arg'dir. COX-2 enziminindeki bu değişim ilaç etkileşim bölgesinin konformasyonunu değiştirmedeği fakat kimyasal ortamı farklılıklar yarattığı gösterilmiştir [98, 100].



Şekil 2.9. COX-2 enziminde membran bağlanma bölgesi ile katalitik bölgeyi birbirinden ayıran rezidüler [101]

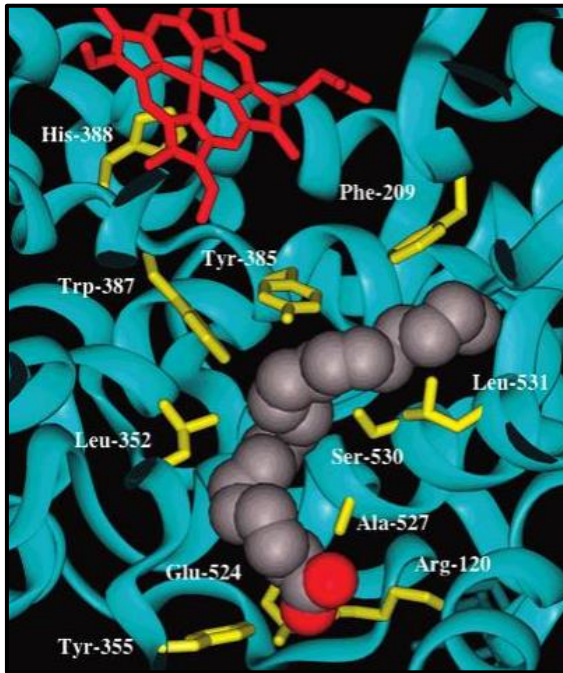
Bu farklılıklara rağmen iki enzimin dimerleri her alt birimi üç bölgeden oluşur: a) N-terminal epidermal büyüme faktörü alanı, b) α helikal zar bağlama alanı, c) C- terminal hem prostetik grubun her iki tarafında COX ve peroksidaz (POX) aktif bölgeleri içeren alan [102-105]. Hem COX hem de POX aktif bölgeleri, proteinin yaklaşık %80'ini oluşturan katalitik alanda bulunur. Katalitik alan, miyeloperoksidaz gibi memeli peroksidazlarına homologdur [96, 106].

Dong ve ark. (2011) yaptığı ayrıntılı çalışma insan COX-2 enzimi bir katalitik monomere (E_{kat}) ve bir allosterik monomere (E_{allo}) sahip bir konformasyonel heterodimer olarak işlev gördüğünü göstermiştir. Bu çalışma ile birlikte aynı zamanda, hem substratların hem de selekoksib gibi belirli inhibitörlerin E_{kat} 'ın COX bölgesine bağlandığı, hem grubunun ise yalnızca E_{kat} 'ın peroksidaz bölgesine bağlandığını göstermiştir. E_{kat} , E_{allo} 'ya hangi ligandın bağlı olduğuna bağlı olarak E_{allo} tarafından düzenlenir. Substrat ve substrat olmayan yağ asitleri ve bazı COX inhibitörleri tercihen E_{allo} 'nun COX bölgesine bağlanır (Şekil 2.10) [107].



Şekil 2.10. COX enziminin allosterik ve katalitik alt birimleri

Malkowski ve ark. (2000) yaptığı modelleme çalışmasında, substrat olarak AA'nın COX-1 (oCOX-1) ve murin COX-2'nin (mCOX-2) enzimlerine bağlandığı bölgenin, substrat iyon çiftlerinin karboksilik asidinin Arg-120'nin guanidinyum grubu ve hidrojen bağlarının Tyr-355'te eşleştiğini göstermektedir (Şekil 2.11) [101, 108].

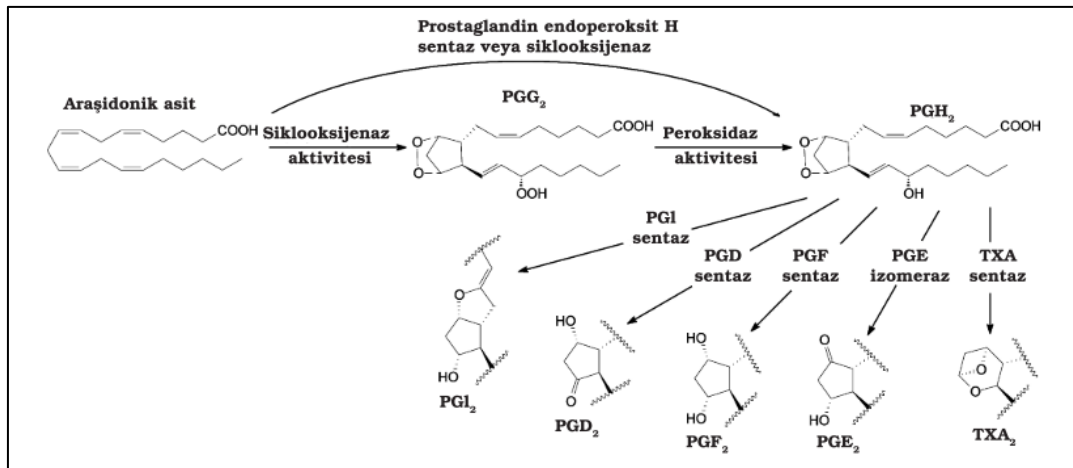


Şekil 2.11. oCOX-1'in aktif bölgesine bağlanan araşidonik asit Hem grubu kırmızı ile belirtilmiştir [101].

2.3.2. COX reaksiyonunun mekanizması

Araşidonik asit metabolitleri, inflamasyon, ovulasyon, implantasyon, anjiyogenez, trombosit agregasyonu ve immünolojik fonksiyon dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik süreç için kritik öneme sahiptir. Eikosanoidler ve protosnoidler, araşidonik asit metabolizmasının ürünleridir ve COX enzimleri bu ürünlerin üretiminde anahtar rol oynar [109].

Siklooksijenaz yolağında COX enzimi, hücreye özgü prostaglandin ve tromboksan sentaz için doğrudan substrat olan araşidonik asidin PGH_2 'ye dönüşümünü katalize eder. Bu, ilk adımın iki oksijen molekülünü araşidonata eklediği ve bisiklik peroksit ara ürünü olan PGG_2 'yi oluşturduğu iki aşamalı bir işlem yoluyla gerçekleşir. İkinci aşama ise, molekülün diğer tarafında yer alan ayrı bir reaktif bölgede gerçekleşir. Bu bölgede peroksidasyon, PGG_2 'nin PGH_2 'ye indirgenmesiyle sonuçlanır [102, 109, 110]. Son olarak oluşan PGH_2 belirli dokularda spesifik enzimlerle prostanoitlere dönüşürken, trombositlerde tromboksan sentaz aracılığı ile tromboksanlara (TXA_2 , TXB_2) dönüşür (Şekil 2.12) [66]. Prostanoitler otokrin ve parakrin fonksiyonlarına sahip olmalarından dolayı hormonlar gibi düşünülürler [111]. TXA_2 oluşumu COX-1 enzimi tarafından regüle edilmektedir. TXA_2 'nin bilinen en önemli etkisi trombositleri aktive ederek trombosit agregasyonuna ve adezyonuna sebep olmalarıdır. TXA_2 , trombosit agregasyonu ve adhezyonuna sebep olan protasiklinleri (PGI_2) aksine vazokonstriktör etkiye sahiptir [66]. Prostanoitler aynı zamanda doku hasarında ve inflamasyona cevabı regüle etmektedir. PGE_2 ve PGI_2 , histamin gibi otokoidler ile sinerjetik etki oluşturarak kuvvetli vazodilatör etki gösterir [112].



Şekil 2.12. Siklooksijenaz yolağı [66]

COX regülasyonunun yanı sıra enzimlerin inhibisyon çalışmaları çok ilgi çekmektedir. İlk olarak Vane ve ark. (1971) yaptığı çalışmada, aspirin ve indometasinin COX enzimatik aktivitesini bloke ederek prostaglandin üretimini inhibe ettiğini göstermiştir [113]. [113]. Bu çalışma ile itibaren, NSAID'lerin ya enzimi kovalent olarak modifiye ederek ya da aktif bölge için substrat ile rekabet ederek COX aktivitesini doğrudan etkilediği bulunmuştur [108, 109]. Prostaglandinler bir dizi normal fizyolojik fonksiyona katıldıkları için, kronik COX inhibisyonunun bazı istenmeyen yan etkilere yol açacağını düşündürmektedir.

Klasik bir COX inhibitörü olan aspirin, COX-1'de Ser-530'un ve COX-2'de Ser-516'nın asetilasyonu yoluyla COX enzimatik aktivitesini kovalent olarak inhibe ettiği gösterilmiştir [114]. Buna karşılık, diğer NSAID'lerin çoğu, aktif bölgede AA ile aynı bölgeye bağlanır.. Saflaştırılmış COX enzim deneylerinde, hem indometasin, ibuprofen ve flurbiprofen gibi seçici olmayan inhibitörler [115] hem de NS-398, DuP-697 ve DFU gibi seçici COX-2 inhibitörleri [116, 117], her iki izoformu da etkili bir şekilde inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

2.4. İnflamasyonda Bitkilerin Yeri ve Önemi

Fitoterapi, hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde tıbbi bitkilerin bütün olarak ya da yaprak, çiçek, tohum, kök gibi kısımlarının kullanımı olarak tanımlanabilir [118]. Ülkemiz keşfedilmeyi bekleyen çok çeşitli bir ekosisteme sahiptir. Güner ve ark. (2012)'nın "Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)" çalışmasında ülkemizde bulunan toplam tür ve tür altı takson sayısı, yabancı kaynaklı ve kültür bitkileri dahil 11 707, endemik takson sayısı 3 649 ve endemizm oranını % 31.82 olarak belirlemişlerdir [119].

Bitki ekstrelerinden elde edilen çeşitli bitkisel ilaçlar, çok çeşitli klinik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ancak etki mekanizmaları hakkında nispeten az bilgi bilinmektedir. Bitkisel tıp alanında araştırma ve geliştirme çalışmalarına ihtiyaç vardır, çünkü sosyal ve ekonomik faydalarının yanı sıra, gelişmekte olan ülkelerde günümüz sağlık hizmetlerinin kalıcı bir yönü haline gelmiştir [120]. Bitkisel doğal kaynaklar, yeni farmakolojik olarak aktif bileşiklerin keşfi ve geliştirilmesi sürecinde önemli ilaç kaynaklarıdır [121, 122].

Piyasada inflamatuvar sonucu meydana gelen bozuklukları tedavi etmek için bir dizi ilaç mevcuttur, ancak çok azı toksisiteden arındırılmıştır. Anti-inflamatuvar ilaçların kullanımıyla ilişkili gastrointestinal sorunları, tıp dünyasında hala süregelen bir ikilemdir. Anti-inflamatuvar ve analjezik özelliklere sahip etnobotanik bitkilerle yapılan araştırmaların, inflamatuvar hastalıklarda yeni ufuklar açabilmesi çok önemlidir. Bitkilerden elde edilen saflaştırılmış doğal bileşikler, düşük toksisiteye ve daha yüksek terapötik değerlere sahip yeni nesil anti-inflamatuvar ilaçların sentezi için bir şablon görevi görebileceğine inanılmaktadır [123]. Bahsedilen yan etkiler nedeni ile inflamasyonda anahtar enzimler olan LOX ve COX üzerinde çifte etkili inhibisyona neden olabileceği düşünülen doğal özütlere kullanımına dair çalışmalar literatürde yerini almaya başlamıştır.

2.5. Lamiaceae Familyası

Lamiaceae (Labiatae) familyası, otsu, çalimsı ya da ağaç formlarındaki bitkileri içeren, dünyanın birçok yerinde ekonomik olarak oldukça büyük öneme sahip kozmopolitan bir familyadır. Çoğunlukla Akdeniz ve Orta Asya’da yayılış göstermektedir [9]. Lamiaceae familyasının, Boissier’in “Flora Orientalis” adlı eserinde 66 cins, yaklaşık 1100 kadar türü bulunmaktadır. Lamiaceae familyasının takson sayısı ortalama 200-250 cins, 3200-4000 türdür [10]. Fakat bu sayı Thonner’e göre 250 cins, 7000 tür olarak farklılık göstermektedir [11].

Ülkemiz florası, Lamiaceae ailesi için önemli bir yer oluşturmaktadır. Familyaya ait 45 cins, 546 tür ve diğer alt birimlerle birlikte toplamda 731 takson olduğu bilinmektedir. Ülkemizde endemizm oranı açısından % 44,2 olan bu familya, Türkiye’nin en zengin üçüncü familyası durumundadır [14].

Eski çağlardan günümüze kadar Lamiaceae familyası türleri halk arasında tıbbi ve baharat amacıyla kullanılmıştır. Bu familyaya ait bitkilerin çoğu halk ilacı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmalarının yanı sıra, tıpta, gıda endüstrisinde, parfümeri ve kozmetikte yer alan bitkilerdir. Ayrıca günümüzde fitoterapide kullanılan pek çok örnekte de bu familya bitkilerinin yer aldığı görülmektedir [12, 13].

Bu familyanın üyeleri çoğunlukla aromatik ve ticari olarak en çok kullanılan nane, biberiye, çözdük, lavanta, fesleğen, dağ çayı, melisa otu, adaçayı ve kekik gibi çeşitli otlar veya

çalılardır [124-127]. Bu familyaya ait türler genellikle ev yemeklerinde, sosis ürünlerinde, deniz ürünlerinde, konserve yiyeceklerde, soslarda, mezelerde ve çorbalarda lezzet verici katkı maddeleri olarak kullanılır [124, 127].

Lamiaceae familyası bitkileri flavonoidler ve benzoik asitler gibi fenolik bileşikler ve mono, seskiterepenoidler ve triterpenoidler ayrıca steroidler ve esansiyel yağlar da dahil olmak üzere zengin sekonder metabolit içeriğine sahiptir [15, 16]. Bu sekonder metabolitler, antibakteriyel, antifungal [17], antioksidan [18], antimikrobiyal [19], anti-inflamatuar [20] ve özellikle LOX ve COX inhibitörü [21-24] radikal süpürücü etkisi [25-27] dahil olmak üzere farklı biyolojik aktivitelerde rol almaktadır.

Salvia officinalis

Yaklaşık 900 tür ile Lamiaceae ailesinin en yaygın üyelerinden *Salvia* L. (adaçayı) ülkemizde 89 türe ait 94 taksonla %50 endemizm ile temsil edilmektedir [23, 128]. Geleneksel halk hekimliğinde *Salvia* L., uçucu yağlarının farmakolojik etkileri, monoterpen hidrokarbonlar, oksijenli monoterpenler, seskiterepen hidrokarbonlar, diterpenler, izoprenoit olmayan bileşikler ve oksijenli seskiterepenler olarak kategorize edilebilen 100'den fazla aktif bileşiğin varlığına dayanmaktadır [129, 130]. Spektrofotometri ve HPLC ile yapılan analizler, *Salvia officinalis* L.'de en fazla bulunan sekonder metabolitlerin kafeik asit, rosmarinik asit ve karnisonik asit olduğunu göstermiştir [131-133].

Rosmarinik asit, *S. officinalis* türlerindeki ana metabolittir ve anti-inflamatuar, antibakteriyel ve antiviral aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [134]. Yapılan son çalıştırmalar ayrıca *S. officinalis* de dahil olmak üzere çeşitli *Salvia* türlerinin şaşırtıcı derecede yüksek sayıda çeşitli katekol bileşiği içerdiğini ve bunların çoğunun kafeik asit oligomerlerini içerdiğini göstermiştir [135-137]. *S. officinalis*, incelenen diğer türlere kıyasla biyolojik olarak aktif ana içerik açısından en değerli türdür, bunu *Salvia verticillata* L. ve *Salvia glutinosa* L. izlemektedir [132].

Ek olarak, klorojenik asit, elajik asit, epikatsin, epigallokateşin gallat, kuersetin, rutin ve luteolin-7 gibi çeşitli flavonoidlerin yanı sıra borneol, sineol, kafur ve tujon gibi çeşitli uçucu bileşenler de *S. officinalis*'te tanımlanmıştır [138, 139].

S. officinalis'in, aşçılık ve halk arasında uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Aroma ve baharat özelliklerinden dolayı bu bitki, birçok gıdanın hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Asya ve Latin Amerika'da *S. officinalis*, ülser, gut, romatizma, iltihaplanma, baş dönmesi, titreme, felç, ishal ve hiperglisemi gibi farklı rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır [140, 141]. Halk arasında *S. officinalis*, hafif hazımsızlık (mide ekşimesi ve şişkinlik gibi), aşırı terleme yaşa bağlı bilişsel bozuklukları ve boğaz ve derideki iltihapları tedavi etmek için kullanılmıştır [142].

Melissa officinalis

Melissa officinalis L. Lamiaceae familyasına ait, çok yıllık limon kokulu bir bitkidir. Ağrı kesici ve kas gevşetici özellikleri yanında deri kızarıklıkları ve iltihaplarında, Alzheimer hastalığının tedavisinde, uykusuzluk, sıkıntı giderici ve rahatlatıcı olarak kullanılmaktadır. Bitkiden aromatik, antimikrobiyal, antioksidan ve antiseptik olarak da yararlanılmaktadır [143-146]. *Melissa officinalis* L. 'in bilinen ana bileşenleri hidroksisinnamik asit türevleridir; özellikle rosmarinik asit, kafeik asitler, klorojenik asit ve metrilik asittir [147, 148]. Sinnamik asit türevlerine ek olarak *M. officinalis*, apigenin, luteolin [149-151], tanenler [152], β -karyofilen ve germakren dahil seskiterpenler ve triterpenler [149, 153] ve sitronelal, sitral a (geraniyal), sitral b (neral), metil sitronelat, okimen, sitronellol, geraniol, nerol, β -karyofilen, β -karyofilen oksit, linalool ve eterik yağ dahil olmak üzere uçucu yağları içermektedir [154].

Lavandula angustifolia (L. *officinalis*)

Halk dilinde “lavanta” olarak bilinen *Lavandula* cinsi, çoğunlukla Arabistan, Akdeniz Kıyıları, Asya, Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da dağılmış 39'dan fazla bilinen türü içerir. *Lavandula officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula hybrida* ve *Lavandula vera*'nın antidepresif, antispazmodik, antifatülan, antiemetik, diüretik, antikonvülsan, antibakteriyel, antiepileptojenik, antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve sedatif etkileri bilinmektedir [155, 156]. Lavanta, aralarında polifenoller,antosiyantinler, flavonoidler, karotenoidler, linalol ve linalil asetat, α -pinen, limonen, 1,8-sineol, *cis* ve *trans*-okimen, 3-oktanon, kafur, karyofilen, rosmarinik asit ve terpinen-4-ol gibi 100'den fazla bileşenden oluşmuştur [157-159].

Lavandula angustifolia Mill. eski adı ile *Lavandula officinalis*, uçucu yağlar (monoterpenik bileşikler, alkoller ve esterler), triterpenik asitler, kumarinler, flavonlar, reçineler ve polifenoller içeren taze veya kuru halde kullanılan en çok bilinen aromatik ve tıbbi bitkilerden biridir [160, 161]. Tıbbi kullanımı açısından *L. angustifolia* ekstreleri veya uçucu yağlarının, antispastik, gaz giderici, analjezik, yatıştırıcı, hipotansif, antiseptik, antimikrobiyal, antifungal, idrar söktürücü etkileri bilinmektedir, ancak literatürde lavantanın analjezik özellikleri hakkında çok az bilgi mevcuttur [162].

Scutellaria orientalis

Scutellaria türleri, Çin ve Japonya'da çeşitli hastalıklara karşı uzun süredir kullanılmaktadır [163]. Seskiterpenler ve özellikle seskiterpen hidrokarbonlar ile çok zengin olan *S. orientalis*, heksahidrofarnesilaseton, heksadekanoik asit, karyofillen, karyofillen oksit 4-vinilguaiakol ve germakren D ile birlikte ana bileşen olarak kabul edilmiştir [164]. Bu bileşenlere ek olarak, Gharari ve ark. (2021) yakın zamanda yaptığı çalışmalar *S.orientalis* subsp. Bornmuelleri'nin apigenin-7-glukosit, wogonin, baicalein ve baicalin içeriğine sahip olduğunu göstermişlerdir [165].

Yimam ve ark. (2012) baicalin ve kateşinin bir kombinasyonunu, yaygın olarak kullanılan üç hayvan ağrı modelinde değerlendirerek bileşenlerin viseral, nosiseptif ve inflamatuvar ağrıda analjezik etkilere sahip olduğunu göstermiştir [166].

Eski çağlardan beri kullanımı bulunan bitkiler anti-inflamatuvar, sedatif, antialerjik, antioksidan, antitrombotik ve sitotoksik etkileriyle bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda *S. orientalis* L. bitkisinin antioksidan, metal şelatör ve alfa-glukozidaz enzim inhbisyonu aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur [167].

Baicaleinin analjezik etkilerininin büyük olasılıkla inflamatuvar süreci modüle ederek gösterdiği düşünülmektedir. Deschamps ve ark. (2006), baicaleinin hem insan 12-LOX'u hem de insan retikülosit 15-LOX-1'i inhibe ettiğini bulmuştur [168]. Ek olarak, Hsieh ve ark. baicaleinin, NK- κ B yolunun modülasyonu yoluyla IL-1 β ve TNF- α 'yı inhibe ettiğini gösterirken [169] diğer çalışmalar, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve COX-2 gen ekspresyonunun protein ekspresyonunu inhibe ettiğini kanıtlar niteliktedir [170, 171].

Mentha piperita

Mentha L., Lamiaceae familyasındaki bir bitki cinsidir ve aralarındaki kesin ayrımın olmadığı tahmin edilen 13 ila 18 türe sahip bir bitki türüdür [172]. En bilinen nane türleri *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Mentha gracilis*, *Mentha arvensis* ve *Mentha suaveolens*'tir. *Mentha* türleri başlangıçta mide ağrısı ve göğüs ağrılarını hafifletmek için şifalı bir bitki olarak kullanılmıştır [173].

Mentha piperita L. (nane), *M. spicata* ve *M. aquatica*'nın bir melezidir. Nane yaprakları ve yağındaki fitokimyasal oluşum bitkinin olgunluğuna, çeşidine, coğrafi kökenine ve işleme yöntemlerinin koşullarına bağlıdır [174, 175]. Yağ asitleri olarak palmitik, linoleik ve linolenik asitler bulunmuştur [176]. Uçucu nane yağında tanımlanan ana bileşenler mentol, menton, izomenton, 1,8-sineol (okaliptol), mentil asetat, mentofuran, limonen, β -mirsen, β -karyofilen, pulegon ve karvon olarak gösterilmiştir [175, 177]. Ayrıca bitki ekstraktlarında karotenoidler, klorofiller, α - ve γ -tokoferoller ve askorbik asit de rapor edilmiştir [178]. Nane yapraklarından izole edilen polifenoller başlıca eriositrin ve rosmarinik asit, luteolin 7-O-rutinosid ve hesperidin içerir [179].

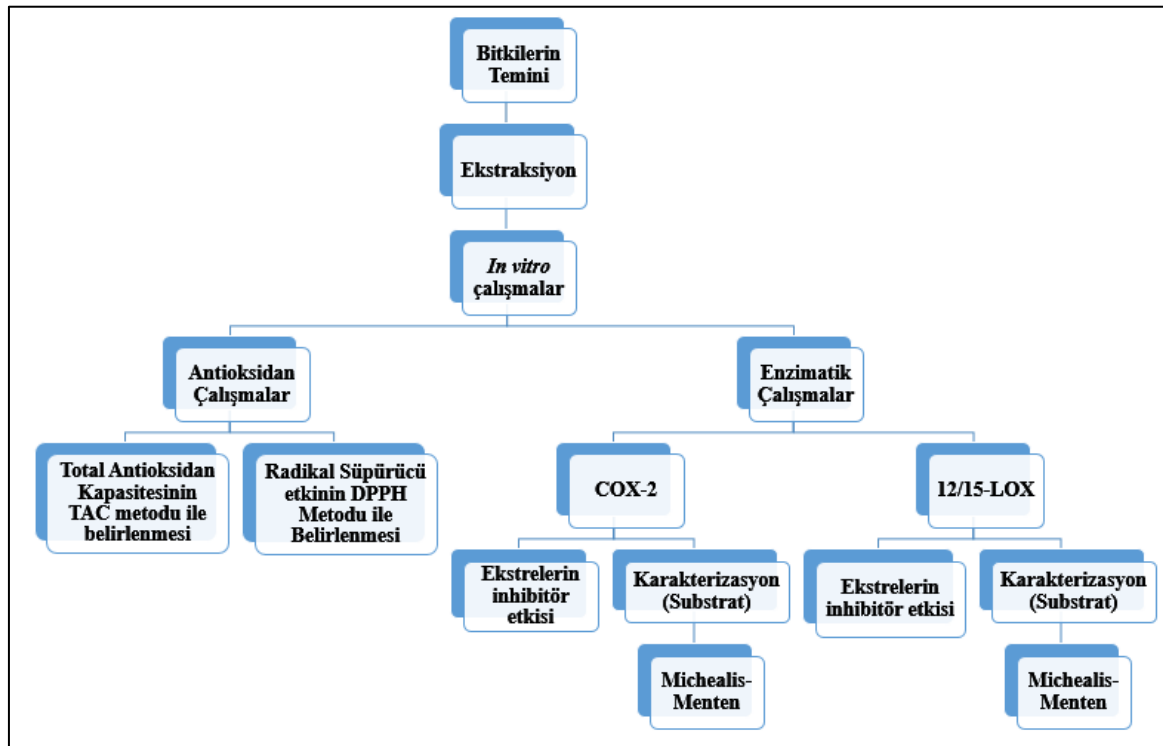
In vitro ve *in vivo* farmakolojik çalışmalar, *M. piperita*'nın birçok terapötik özelliğe sahip etkisini kanıtlar niteliktedir. Antioksidan kapasite (radikal süpürücü kapasitesi) *M. aquatica* veya *M. longifolia*'nininkinden daha yüksek bulunmuştur [180].

Farklı hücre hatlarında anti-tümör aktivitesi [181, 182] anti-alerjenik aktivitesi, anti-viral aktivitesi [183], antibakteriyel aktivitesi [184] ve anti-inflamatuar etkileri olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [185].

LPS ile uyarılan insan monositlerinde Juergens ve arkadaşlarının (1998) yaptığı *in vitro* çalışmada monoterpen mentol ve nane yağının anti-inflamatuar aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda bu elde edilen şifalı yağların LTB₄ ve PGE₂ yollarındaki etkileri ölçülerek hem LOX hem de COX yolları için potansiyel birer inhibitör olduğu gösterilmiştir [186].

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamında, anti-inflamatuar özelliği açısından umut vaat edici olarak düşünülen bitkilerin ekstraları hazırlanmıştır. Ekstrelerin antioksidan kapasiteleri hem DPPH⁺ radikali süpürme metodu hem de total antioksidan kapasite tayini metodu (TAC) ile belirlenmiştir. Bu sayede ekstraların etkinliğini gösteren EC₅₀ değerleri belirlenmiştir. İnflamatuar yolak enzimleri olan COX-2 ve 12/15-LOX enzimlerinin substratları ile Michaelis-Menten kinetiği çalışmaları yapılmıştır. Bu sayede enzimlerin Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Ardından ekstraların COX-2 ve 12/15-LOX enzim aktiveleri üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için inhibisyon çalışmaları yapılmış bu sayede ekstraların IC₅₀ değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tezde yapılan çalışmaların şematik gösterimi

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Deney sırasında kullanılan tüm kimyasalların listesi Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Deney sırasında kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi

Kimyasal Adı	Firma ve Katalog Numarası
Linoleik Asit	Calbiochem, #502718
Trizma hidroklorür ≥ 99	Sigma-Aldrich, #T3253
Hidroklorik asit, %37	Merck, #100314.2500
Borik Asit	Hopkins&Williams, #227000F
Metanol, %99,6	Akkimya, #67-56-1
Sodyum Hidroksit	Sigma-Aldrich, #S5881
Lipoksidaz (<i>Glisin max</i>) Tip-I	Sigma-Aldrich, #L7395
Dimetil sülfoksit	Sigma-Aldrich, #472301
Tween-20	Sigma-Aldrich, #9005-64-5
Kuersetin	Mann Lab., #2539
Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit	Biovision, #K274-100
COX-2 Inhibitor Screening Assay Kit (Fluometric)	Biovision, #K547
Difenil-1-pikrilhidrazil, >97	TCI Chemicals, #1898-66-4

3.1.2. Kullanılan aletler ve cihazlar

Deney sırasında kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Deney sırasında kullanılan cihazların listesi

Cihaz Adı	Üretici Firma
Sonikatör	Braunsonic 1510
Spektrofotometre	Schimaadzu UV1700 UV-Vis
Mikroplaka okuyucu SpectraMax i3	Molecular Devices
Vorteks	Nüve
Analitik terazi	Mettler Toledo
Distile su	Mp Minipure Basic
Geri çeviren soğutucu	Buchi R-210
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-2 LDplus
pH metre	Consart C830

3.1.3. Bitki örnekleri ve temini

Çalışmada kullanılacak bitkiler, Ayfonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dr. Öğr. Üye. Ekrem Murat Gönülalan tarafından hazırlanıp temin edilmiştir. Bitkilerin dört tanesi (*Lavandula officinalis* Mill., *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L.,

Salvia officinalis L.) Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait kültür sahasından, *Scutellaria orientalis* L. ise Ankara-Beytepe bölgesinden çiçeklenme dönemlerinde toplanmıştır.

Bitkilere ait herbaryum örneklerinin numaraları Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Deneyde kullanılacak bitkilere ait herbaryum örneklerinin numaraları

Bitki İsimleri	Herbaryum Numarası
<i>Lavandula officinalis</i> Mill.	TBÇ-L-001
<i>Melissa officinalis</i> L.	TBÇ-M-001
<i>Mentha piperita</i> L.	TBÇ-M-002
<i>Salvia officinalis</i> L.	TBÇ-S-001
<i>Scutellaria orientalis</i> L.	HUEF 20016

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki ekstralarının hazırlanması

Temizleme işleminden sonra bitki örnekleri güneş almayan ortamda oda sıcaklığında, nemden uzak şekilde kurutulduktan sonra, *drog* olarak kullanılacak kısımları ayrılmıştır. Bu kısımlar bir öğütücü yardımıyla toz edilmiştir. Bu çalışmada bitkilerin toprak üstü kısımları kullanılmıştır.

Kurutulmuş ve toz edilmiş bitki örneklerinden 5 gram tartılmış, 40 °C'de, geri çeviren soğutucu altında, 50 mL metanol ile 30 dakika boyunca ekstre edildikten sonra süzümüştür. Süzüntü ayrıldıktan sonra kalan katı faz, aynı sıcaklıkta bu kez 30 mL metanol ile 15 dakika boyunca geri çeviren soğutucu altında olacak şekilde ikinci kez ekstre edilmiştir. Süzüntüler birleştirilecek, çözücü rotary evaporatör kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra liyofilizasyon işlemi uygulanarak kuru ekstre elde edilmiştir.

3.2.2. Ekstrelelere uygun çözücünün/çözücülerin seçilmesi

Deneylere başlamadan önce elde edilen ekstralelere en uygun çözücünün seçimi için denemeler yapıldı. Bu kapsamda ekstraleler, dimetilsülfoksit (DMSO), saf metanol (MeOH), saf etanol (EtOH) ve 100 mM Tris-HCl (pH:8) tamponunda çözünürlükleri karşılaştırıldı.

3.2.3. Ekstrelerin *in vitro* çalışmalar için hazırlanması

Uygun çözücünün seçilmesinin ardından ekstrelerin *in vitro* çalışmalar için stok çözeltileri hazırlandı. Her çalışma için hazırlanan stok çözeltiler ve çözücülerin maksimum final konsantrasyonunun belirtildiği ayrıntılı liste Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. *In vitro* çalışmalar için ekstrelerden stok çözeltilerin hazırlanışı

<i>In vitro</i> çalışma	Ekstrenin hazırlanışı	Çözücünün maksimum final konsantrasyonu
DPPH ⁺ radikali süpürücü aktivitenin belirlenmesi	≥99,6 saflıkta MeOH	
Total Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi (TAC metodu)	≥99,6 saflıkta MeOH	
COX-2 enzim aktivitesinin belirlenmesi ve kinetik çalışmaları	≥99,9 saflıkta DMSO	≤%1
12/15 LOX enzim aktivitesinin belirlenmesi kinetik çalışmaları	≥99,9 saflıkta DMSO	≤%1

3.2.4. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin DPPH⁺ metodu ile belirlenmesi

Bu yöntemde difenil-1-pikrilhidrazil isimli radikal, antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılır. Bu madde az sayıdaki stabil ve satın alınabilir azot radikallerinden olup, 515 nm dalga boyunda absorbands vermektedir. İndirgenme esnasında DPPH çözeltisi rengini kaybetmekte ve spektrofotometrede kolay bir şekilde ölçümü yapılabilir [187].

Bitki ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri, DPPH⁺ radikali süpürme kapasitesi metodu ile belirlenmiştir. Test edilecek ekstrelerin (200-1.56 µg/mL, finalde) ve standardın üzerine DPPH⁺ (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin 1 mM konsantrasyondaki çözeltisinden ilave edilip 30 dakika inkübe edildikten sonra 517 nm'de absorbands ölçümü mikropilaya okuyucu (SpectraMax i3) ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ekstrelerin radikali süpürücü etkileri zamana bağlı olarak incelenmiştir (0-90 dakika). Radikal süpürücü aktivite, ortamda sadece DPPH⁺ ve metanolün bulunduğu körün absorbandsından (A_0), ekstre ve standardın verdiği absorbandsın (A_{madde}) çıkarılması ile hesaplanmıştır. Standart olarak kuersetin kullanılmıştır. Ekstreler, kuersetin ve DPPH çözeltisi saf metanol ile hazırlanmıştır. Ekstrelerle ait IC₅₀ grafikleri ve % inhibisyon grafikleri GraphPad Prism 8.4.2 (San Diego, California, USA) programı ile hazırlanmıştır. Tüm materyallerin antioksidan aktivite

değerleri üç tekrarlı ve en az üç paralelli olacak şekilde yapılmış ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{A_0 - A_{\text{madde}}}{A_0} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.5. Ekstrelerin total antioksidan kapasitelerinin Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TAC) ile belirlenmesi

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu ile, ABTS^{•+} radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır. Moleküllerin kararlı serbest radikali süpürme kabiliyeti, vitamin E'nin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılması yapılır [188].

Ekstrelerin total antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Biovision, Katalog No: #K274-100, ABD) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Standart olarak 0-20 nmol/μL konsantrasyon aralığında değişen Trolox kullanılmıştır. Ekstrelerin total antioksidan kapasiteleri nmol/μL Trolox ekivalen değeri şeklinde verilmiştir. Ayrıca ekstra bir kontrol olarak kuersetin kullanılmıştır (1 mM). Ekstreler ve kuersetin saf metanol ile hazırlanmıştır Trolox standart grafiği GraphPad Prism 8.4.2 (San Diego, California, USA) programı ile yapılmıştır. Tüm materyallerin antioksidan aktivite değerleri üç tekrarlı ve en az üç paralelli olacak şekilde yapılmıştır.

3.2.6. Ekstrelerin anti-inflamatuar yolak enzimleri üzerine etkilerinin belirlenmesi ve enzimlerin kinetik davranışlarının belirlenmesi

COX-2

Ekstrelerin COX-2 enzimi aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için White ve Glassman (1974) ve Jager ve ark. (1999)'nın izlediği protokol ticari COX-2 Inhibitor Screening Kit (Biovision, Katalog No: #K547-100, ABD) kullanılarak küçük modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir [189, 190]. Bu kapsamda ekstrelerin final konsantrasyonları 0-400 μg/mL olacak şekilde kuyulara 10 μL eklenmiştir. Ardından substrat içermeyen aktivite

ortamından kuyulara 80 µL eklenmiştir. Reaksiyon substrat olarak kullanılan araşidonik asitten (AA) 10 µL eklenmesi ile başlatılmıştır.

Floresan şiddetindeki değişim Ex/Em = 535/587 nm dalga boylarında, kinetik olarak 25°C'de 10 dakika boyunca mikroparka okuyucuda (SpectraMax i3) ölçülmüştür. % İnhibisyon değerleri, ekstrelerin olmadığı kontrol kuyusu (K) ve ekstrelerin olduğu örnek kuyuları (E) absorbans değişimi izlenerek hesaplanmıştır. Tüm sonuçlardan ekstrelerin olmadığı kör (blank) kuyusunun absorbans değeri çıkarılmıştır. Tüm ekstrelerin % inhibisyon değerleri üç tekrarlı yapılmış ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon: } \frac{(K-\text{Blank}) \times (E-\text{Blank})}{(K-\text{Blank})} \times 100 \quad (3.2)$$

COX-2 enzim kinetik parametrelerinin belirlenmesinde ise yine ticari COX-2 Inhibitor Screening Assay Kit (Biovision, #K547, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle COX-2 enziminin substrat olarak kullanılan AA ile karakterizasyonunun belirlenmesi için, Michaelis-Menten kinetiği yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında, aktivite ortamı finalde 80 µg/mL COX-2 enzimi ve 0-80 AA µM olacak şekilde hazırlanmıştır.

Daha sonra COX-2 enziminin ekstreler ile gösterdiği kinetik davranışın belirlenebilmesi için seçilen ekstrelerin finalde sabit 0.1 ve 1 µg/mL konsantrasyonlarının, 0-16 µM aralığında değişen substrat konsantrasyonlarında floresan şiddetindeki değişim Ex/Em= 535/587 nm dalga boylarında, kinetik olarak 25°C'de 10 dakika boyunca mikroparka okuyucuda (SpectraMax i3) izlenmiştir. Elde edilen veriler GraphPad Prism 8.4.2 programına aktarılmış ve nonlinear regresyon analizleri ile enzime ait olan kinetik parametreler, Km, Vmax, Ki değerleri ile beraber ekstrelerin COX-2 enzimi üzerindeki inhibisyon mekanizmaları belirlenmiştir. Deney, 3 tekrarlı yapılmıştır.

12/15-LOX

Tüm 12/15-LOX deneylerinde substrat olarak linoleik asit (LA, Calbiochem, #502718, Almanya), enzim olarak da Lipoxidase from *Glycine max* (soybean, Type-1; Sigma-Aldrich, Katalog No: #L7395, Almanya) kullanılmıştır.

Ekstrelerin 12/15-LOX enzimi aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için Tappel ve ark. (1962) ve Orhan ve ark. (2012)'nin izlediği protokol bazı modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir [191, 192]. Bu deney kapsamında enzim aktivite ortamı finalde 1,5 µg/mL enzim, 50 mM Sodyum Borat tamponu (pH: 9) ve 50 µM LA substrat olacak şekilde hazırlanmıştır.

Ekstreler 25°C'de 5 dakika enzim ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda final konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde LA eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Absorbanstaki değişim 234 nm dalga boylarında, kinetik olarak 25°C'de 1 dakika boyunca Shimadzu UV1700 UV-Vis spektrofotometrede quartz küvetleri ile izlenmiştir.

% İnhibisyon değerleri, ekstrelerin olmadığı kontrol kuyusu (K), ekstrelerin olduğu örnek kuyuları (E) absorbans değişimi ölçülerek hesaplanmıştır. Tüm sonuçlardan ekstrelerin olmadığı kör (blank) kuyusunun absorbans değeri çıkarılmıştır. Deney üç tekrarlı ve en az üç paralelli olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen verilere göre tüm kuyuların % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon: } \frac{(K-\text{Blank}) \times (E-\text{Blank})}{(K-\text{Blank})} \times 100 \quad (3.3)$$

12/15-LOX enziminin substrat ile karakterizasyonunun belirlemesi için, Michaelis-Menten kinetiği yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında, aktivite ortamı finalde 15 µg/mL 12/15-LOX enzimi, 50 mM Sodyum borat tamponu (pH: 9) ve 0-100 µM LA olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüm 12/15-LOX deneylerinde substrat olarak kullanılan LA, %2'lik Tween-20 ile 100 W üçer kez 10 saniye sonike edilerek hazırlanmıştır.

Daha sonra 12/15-LOX enzimi ile ekstrelerin kinetik davranışlarının belirlenebilmesi için seçilen ekstrelerin finalde sabit 5, 10 ve 50 µg/mL konsantrasyonları 12/15-LOX enzimi ile 25°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda finalde 0-100 µM aralığında değişen konsantrasyonlarda substrat eklenerek reaksiyon sonlandırılmış ve absorbans değişimi kinetik olarak 234 nm'de Shimadzu UV1700 UV-Vis spektrofotometrede quartz küvetleri ile izlenmiştir. Elde edilen veriler GraphPad Prism 8.4.2 programına aktarılmış ve yapılan nonlineer regresyon analizleri ile enzime ait olan kinetik parametreler, Km, Vmax, Ki değerleri ile beraber ekstrelerin 12/15-LOX enzimi üzerindeki

inhibisyon mekanizmaları belirlenmiştir. Deney üç tekrarlı ve en az üç paralel olacak şekilde yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel analizlerin değerlendirilmesi

Antioksidan aktivite, enzim aktivite ve kinetiklerine ait verilerin hesaplanmasında ve tüm grafikler çizilmesinde ve istatistiksel verilerin hesaplanmasında Graphpad Prism 8.4.2. programı kullanıldı.

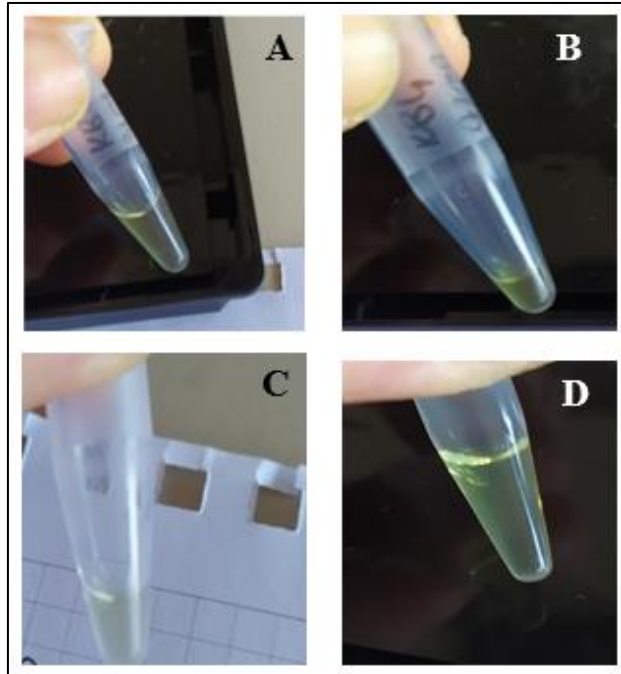
Enzim çalışmalarına ait nonlinear regresyon analizleri (Michaelis Menten kinetiği, $K_i/K_m/V_{max}$ parametrelerinin saptanması), IC_{50} değerlerinin belirlenmesi ve ekstrelerin EC_{50} değerlerinin belirlenmesi GraphPad Prism 8.4.2 (San Diego, California, USA) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart hata ($\pm SEM$) olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırma ve deneylerin günler arası tekrarlarının karşılaştırılması tek yönlü ANOVA ve ardından Post-Hoc Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. $P \leq 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Ekstrelelere Uygun Çözücünün Belirlenmesi

Ekstreler için uygun çözücülerin belirlenmesi için Dimetil sülfoksit (DMSO), Etanol (EtOH), Metanol (MeOH) ve 100 mM Tris-HCl (pH:8) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MeOH ile muamele edildikten sonra ekstrelerin tamamen çözüldüğü, ortamda homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür. Hatta, daha az hacimde DMSO ile muameleden sonra da ekstrelerin homojen bir şekilde çözüldüğü görülmüştür. Fakat ekstrelerin EtOH ile muamelesinde ekstrelerin çözücünde homojen olarak dağılmadığı, bir süre sonra dipte tortu oluşturduğu görülmüştür. DMSO ile çözülen örneklerin aynı zamanda 100 mM Tris-HCl (pH:8) ile karışımından oluşan çözeltinin de çözünürlüğüne bakılınca, homojen bir dağılım gözlenmiştir (Şekil 4.1).

Ekstrelerin çözünürlükleri çözücülere göre DMSO=Tampon>MeOH>EtOH şeklinde bulunmuştur.



Şekil 4.1. Ekstrelerin farklı çözücüler ile çözünürlüklerinin değerlendirilmesi (A) MeOH (B) DMSO (C) EtOH (D) DMSO+ 100 mM Tris-HCl (pH:8)

4.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivitelerinin DPPH+ Metodu ile Belirlenmesi

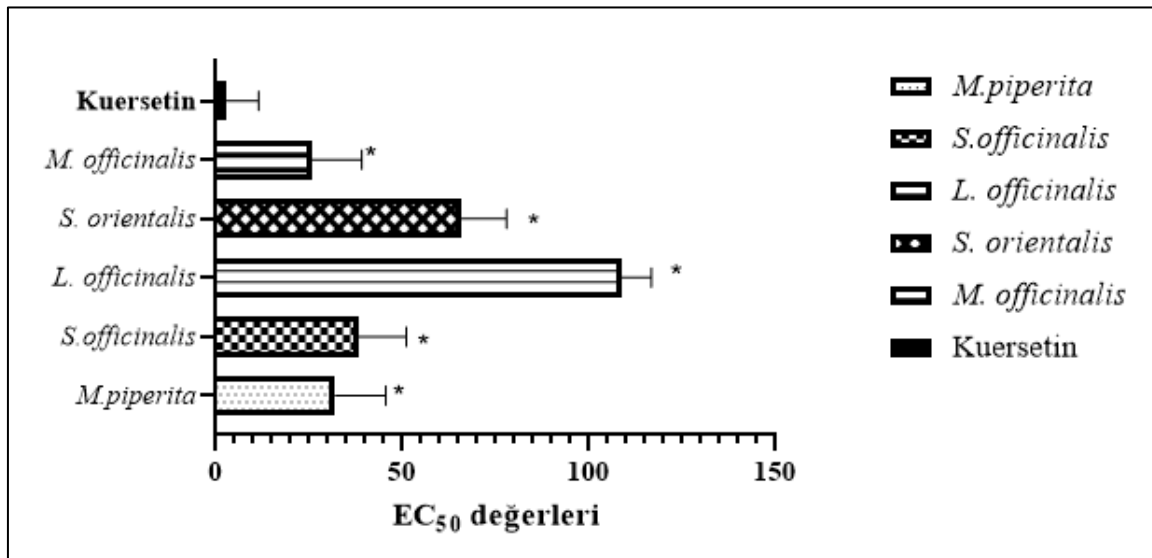
Ekstrelerin belirli konsantrasyonlarının (0-200 $\mu\text{g/mL}$) DPPH⁺ radikalini süpürücü etkileri incelenmiştir. Radikali süpürücü etki, EC₅₀ değeri olarak verilmiştir.

EC₅₀: Ekstrelerin ortamdaki DPPH radikalini %50'sini süpüren doz.

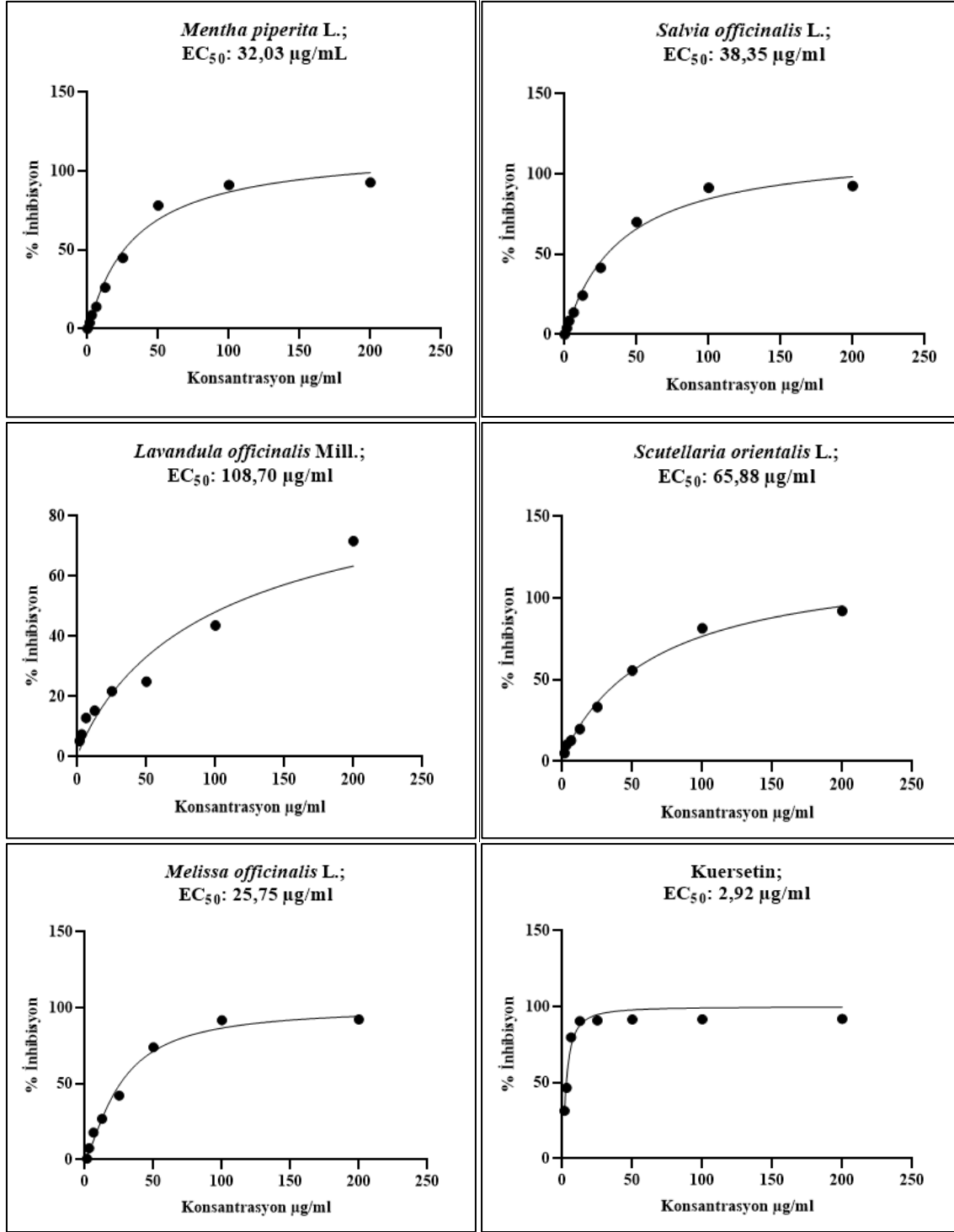
Ekstrelerin EC₅₀ değerlerini gösteren sütun grafiği Şekil 4.2'de, Şekil 4.3'te ekstrelerin EC₅₀ değerlerinin hesaplanabilmesi için kullanılan örnek doz-cevap eğrileri ve Çizelge 4.1'de ise ekstrelerin EC₅₀ değerleri gösterilmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda *M. piperita* L., *S.officinalis* L., *L.officinalis* Mill, *S.orientalis* L. ve *M.officinalis* L. için sırasıyla 32,03±13,52; 38,35±12,66; 108,70±8,12; 65,88±12,11ve 25,75±13,41 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Kontrol olarak kullanılan kuersetinin EC₅₀ değeri ise 2,92±8,54 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

Ayrıca farklı günlerde yapılan deney sonuçlarının Post-Hoc testleri ile istatistikleri yapıldığında her ekstrenin farklı günlerdeki EC₅₀ değerlerinin birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05).



Şekil 4.2. Ekstrelerin EC₅₀ değerleri



Şekil 4.3. EC_{50} hesaplaması için kullanılan örnek doz-cevap eğrilerine ait grafikler

Çizelge 4.1. Ekstrelerin DPPH⁺ radikalini süpürücü etkisinin incelenmesi

	<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lavandula officinalis</i> Mill.	<i>Scutellaria orientalis</i> L.	<i>Melissa officinalis</i> L.	Kuersetin (Kontrol)
EC ₅₀ (µg/mL)	32,03±13,52*	38,35±12,66*	108,70±8,12*	65,88±12,11*	25,75±13,41*	2,92±8,54

Her ekstre için radikal süpürücü aktivite EC₅₀ ortalama değerleri ±Std.Hata şeklinde verilmiştir.

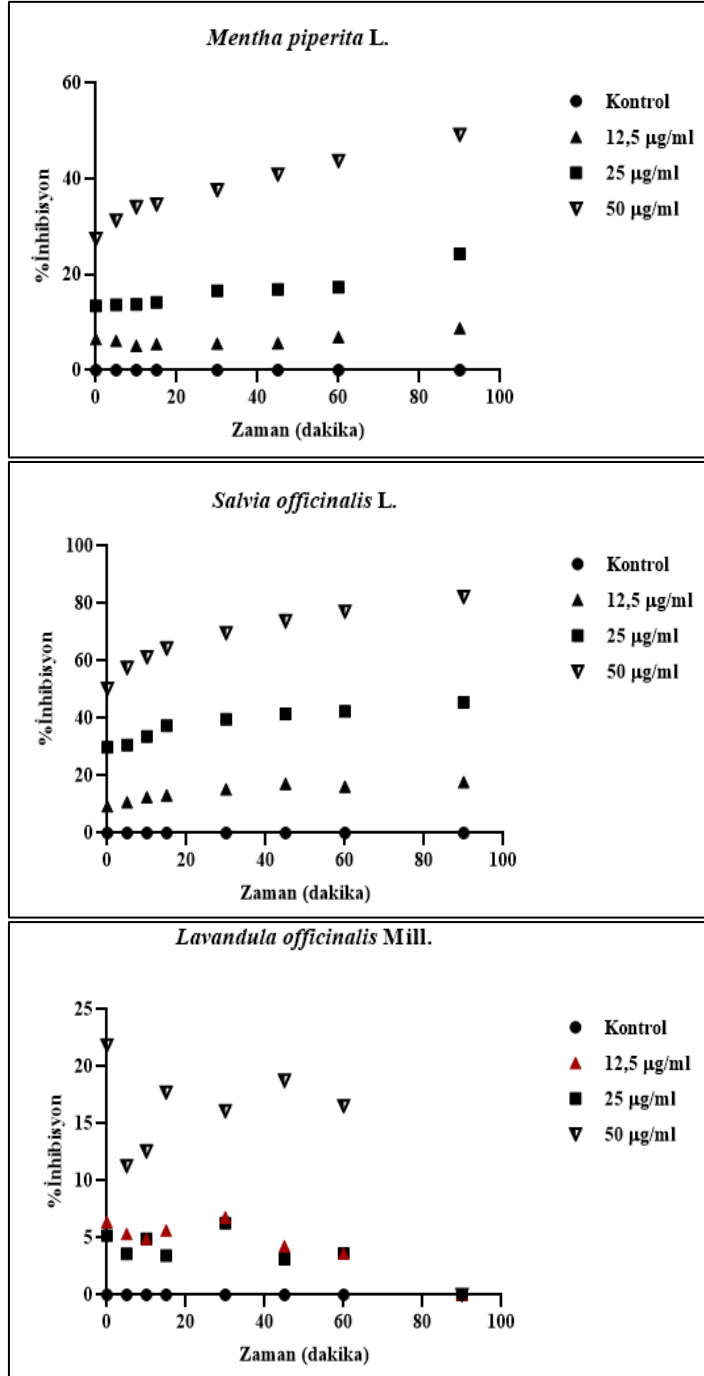
*Kontrolle göre anlamlı bir fark vardır p<0,05.

4.3. Ekstrelerin DPPH⁺ Radikalini Süpürücü Etkilerinin Zamana Bağlı Belirlenmesi

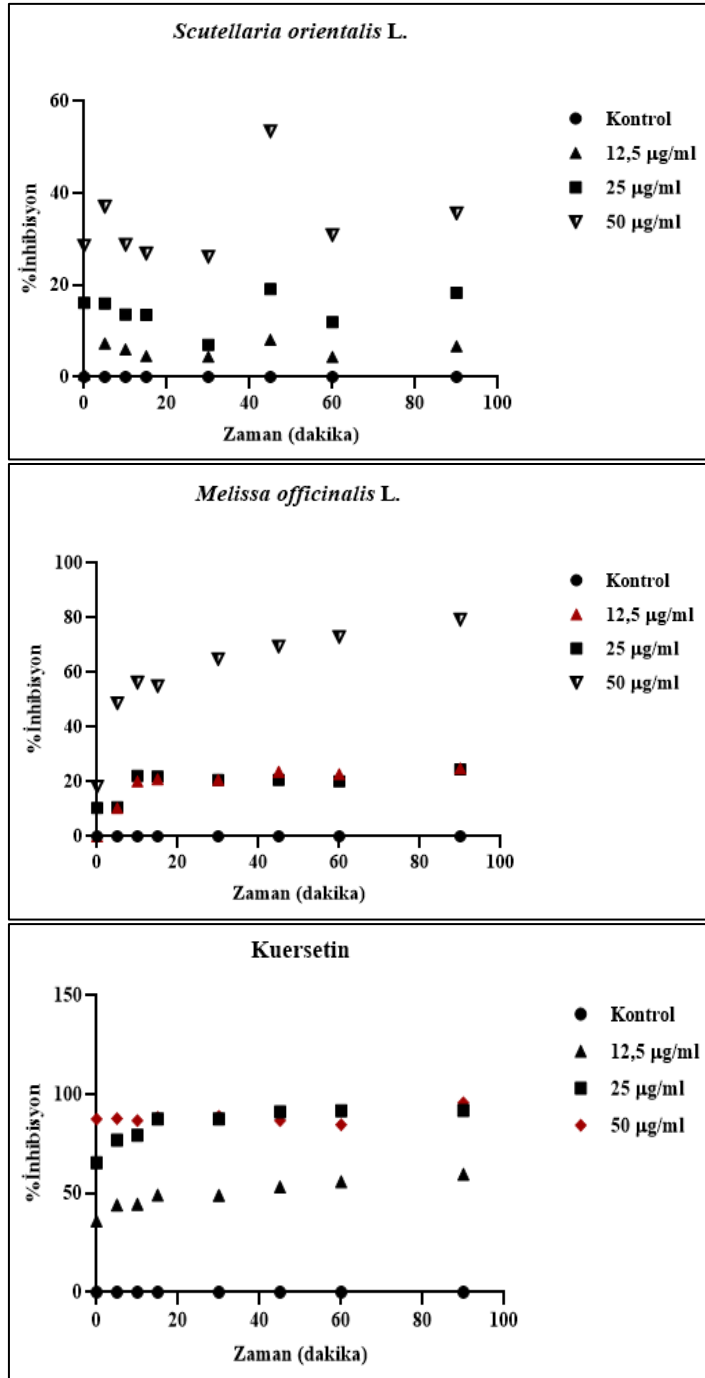
Radikal süpürücü etkilerin doz ve süre açısından incelenmesi amacı ile ekstrelerin DPPH⁺ radikalini süpürücü etkileri hem zamana (0-90 dakika) hem de konsantrasyona (0-200 µg/mL) bağlı olarak incelenmiştir. Bu sistemde kontrol/karşılaştırma yapabilmek için kuersetin kullanılmıştır. Radikali süpürücü etki, EC₅₀ değeri olarak verilmiştir.

Ekstrelerin zamana ve konsantrasyona bağlı radikali süpürücü etkilerinin % İnhibisyon eğrilerine ait örnek grafikler Şekil 4.4'te, ayrıntılı % İnhibisyon değerleri ise Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Ayrıca, *M. piperita* L. ve *S. officinalis* L. için farklı günlerde yapılan deney sonuçları Post-Hoc testleri ile analiz edilmiş, elde edilen bulgular istatistiksel açıdan farklı bulunmamıştır (p>0,05).



Şekil 4.4. Ekstrelerin radikal süpürücü etkilerinin zamana bağlı gösterilmesi



Şekil 4.4. (devam) Ekstrelerin radikal süpürücü etkilerinin zamana bağlı gösterilmesi

Çizelge 4.2. Ekstrelerin DPPH⁺ radikalini süpürücü etkisinin zamana bağımlı olarak incelenmesi

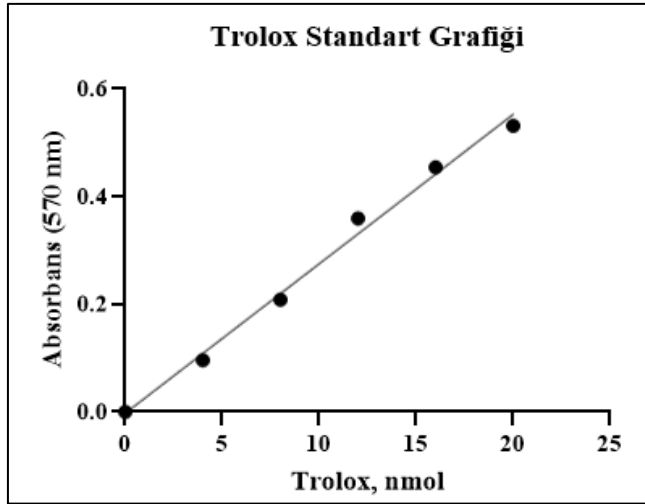
Örnek	Zaman (dk)								
	Konsantrasyon (µg/ml)	0	5	10	15	30	45	60	90
<i>M. piperita</i>	12,5	6,25±0,01	6,19±0,02	5,12±0,02	5,48±0,02	5,56±0,02	5,68±0,02	6,93±0,02	8,77±0,03
	25	13,49±0,02	13,70±0,01	13,76±0,02	14,19±0,02	16,65±0,01	16,86±0,02	17,39±0,02	24,34±0,04
	50	27,45±0,01	31,30±0,02	34,14±0,02	34,69±0,02	37,68±0,02	40,94±0,01	43,77±0,01	49,21±0,02
<i>S. officinalis</i>	12,5	9,39±0,02	10,77±0,01	12,55±0,02	13,21±0,02	15,27±0,02	17,22±0,02	16,23±0,02	17,77±0,02
	25	29,98±0,01	30,71±0,02	33,67±0,01	37,44±0,02	39,61±0,02	41,55±0,01	42,33±0,01	45,53±0,02
	50	27,45±0,01	31,30±0,01	34,14±0,01	34,69±0,01	37,68±0,01	40,94±0,01	43,77±0,01	49,21±0,01
<i>L. officinalis</i>	12,5	6,38±0,01	5,35±0,01	5,18±0,01	5,66±0,02	6,80±0,01	4,26±0,02	3,65±0,02	0
	25	5,18±0,01	4,43±0,01	4,91±0,01	4,87±0,02	6,27±0,01	3,14±0,02	3,65±0,02	0
	50	21,85±0,02	11,30±0,01	12,58±0,02	17,74±0,02	16,11±0,01	18,78±0,01	16,54±0,02	0
<i>S. orientalis</i>	12,5	0,50±0,01	7,34±0,02	6,00±0,02	4,57±0,02	4,43±0,02	8,14±0,02	4,34±0,04	6,72±0,02
	25	16,16±0,02	16,03±0,02	13,62±0,01	13,53±0,01	7,01±0,02	19,11±0,02	11,97±0,02	18,11±0,02
	50	28,65±0,01	37,13±0,01	28,27±0,01	26,93±0,01	26,24±0,01	53,52±0,01	30,93±0,01	35,68±0,01
<i>M. officinalis</i>	12,5	0	10,35±0,03	20,13±0,02	20,97±0,04	20,69±0,03	23,74±0,03	22,82±0,04	24,88±0,02
	25	10,41±0,02	10,74±0,02	22,16±0,03	21,95±0,03	20,59±0,03	20,72±0,02	20,12±0,02	24,50±0,02
	50	18,27±0,01	48,80±0,02	56,34±0,02	55,06±0,02	64,92±0,01	69,51±0,01	73,08±0,01	79,34±0,03
Kuersetin	12,5	36,12±0,02	44,17±0,01	44,52±0,01	49,26±0,01	44,11±0,02	53,28±0,01	55,94±0,01	59,71±0,01
	25	65,44±0,01	76,89±0,01	79,48±0,01	87,67±0,01	87,74±0,02	91,24±0,01	91,82±0,01	91,89±0,01
	50	87,57±0,01	87,82±0,01	86,87±0,01	88,43±0,01	88,98±0,01	86,79±0,01	84,65±0,01	95,75±0,01

Her ekstre için, zamana bağımlı radikal süpürücü aktivite %inhibisyon ortalama değerleri ±Std.Hata şeklinde verilmiştir.

4.4. Ekstrelerin Total Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Ekstrelerin belirli konsantrasyonlarının (6,25; 12,5; 25 ve 50 µg/mL) total antioksidan kapasitelerine bakılmıştır. Standart grafiği elde edilen Trolox ile ekstrelerin total antioksidan kapasiteleri Trolox Ekvaleşi şeklinde verilmiştir (Şekil 4.5). Tez kapsamında yapılan antioksidan deneylerinin kendi içerisinde karşılaştırma olanağı sağlaması için, DPPH⁺ metodundan kontrol olarak kullanılan kuersetin, bu yöntem de ikincil bir kontrol olarak kullanılmıştır (1 mM).

Ekstrelerin ve kuersetinin total antioksidan kapasiteleri Çizelge 4.3’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.5. Trolox standart grafiği

Çizelge 4.3. Ekstrelerin total antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi

Konsantrasyon µg/mL	Ekstre				
	<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Salvia officinalis</i> L.*	<i>Lavandula officinalis</i> Mill.*	<i>Scutellaria orientalis</i> L.*	<i>Melissa officinalis</i> L.
	nmol/ µL Trolox Ekvale				
6,25	128,15±0,01	103,87±0,01	53,06	132,64±0,01	222,57±0,02
12,5	298,08±0,01	171,31±0,01	59,80±0,02	137,14±0,01	312,50±0,01
25	578,24±0,02	336,33±0,01	60,25±0,01	192,00±0,01	553,51±0,01
50	726,62±0,02	400,63±0,02	73,29±0,02	260,34±0,01	676,26±0,01

Her ekstre için antioksidan kapasiteleri Trolox Ekvale ortalama değeri ±Std.Hata şeklinde verilmiştir.

*Kontrol kuersetine göre, ekstrelerin her konsantrasyonunda anlamlı bir fark vardır $p < 0,05$.

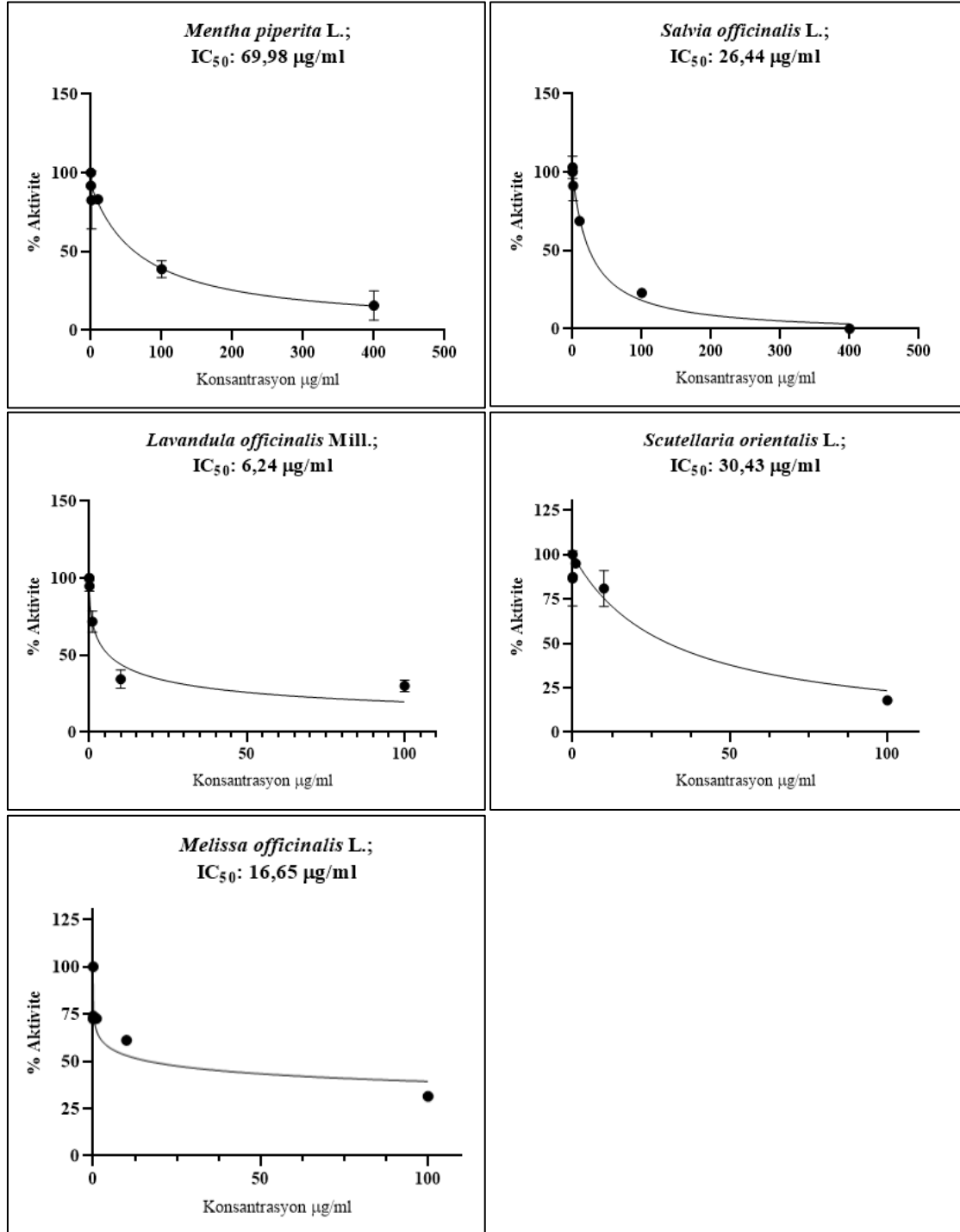
4.5. Ekstrelerin Anti-İnflamatuvar Yolak Enzim Aktivitelerine Olan Etkilerinin İncelenmesi ve Enzimlerin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

COX-2

DMSO'da çözülen ekstrelerin belirli final konsantrasyonlarının (0-400 µg/mL) COX-2 enzimi üzerine aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar IC₅₀ değeri olarak verilmiştir. IC₅₀ hesaplaması için kullanılan doz-cevap eğrilerine ait grafikler Şekil 4.6'da, ekstrelerin IC₅₀ değeri ise Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

IC₅₀: Enzim aktivitesinin %50 azalmaya sebep olan inhibitör konsantrasyonu.

Elde edilen bulgular doğrultusunda *M. piperita* L., *S.officinalis* L., *L.officinalis* Mill, *S.orientalis* L. ve *M.officinalis* L. için sırasıyla $69,98 \pm 13,70$; $26,44 \pm 17,68$; $6,24 \pm 13,25$; $30,43 \pm 12,32$ ve $16,65 \pm 9,09$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir.



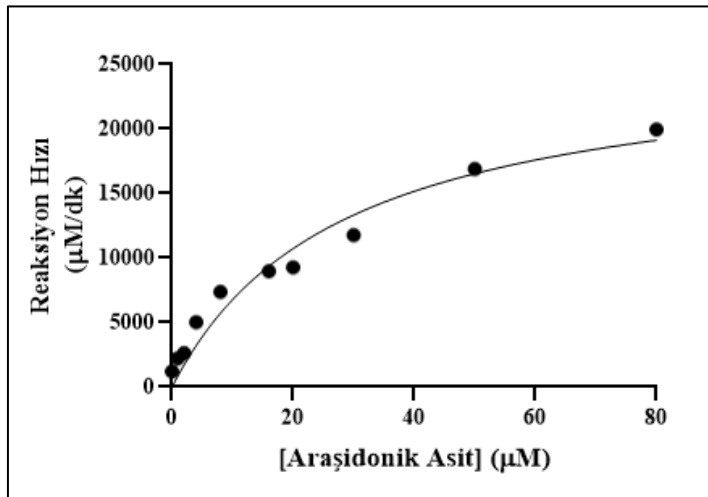
Şekil 4.6. COX-2 enzimi IC_{50} hesaplaması için kullanılan doz-cevap eğrilerine ait grafikler

Çizelge 4.4. Ekstrelerin COX-2 enzimi üzerine etkilerinin incelenmesi

	<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lavandula officinalis</i> Mill.	<i>Scutellaria orientalis</i> L.	<i>Melissa officinalis</i> L.
IC ₅₀ (µg/mL)	69,98±13,70	26,44±17,68	6,23±13,25	30,43±12,32	16,65±9,09

Değerler, üç tekrarın ortalaması ±Std.Hata şeklinde verilmiştir.

COX-2 enziminin kullanılacak substrat ile karakterizasyonunun belirlenmesi için, Michaelis-Menten kinetiği yapılmıştır. Bu kapsamda, substrat olarak kullanılan araşidonik asitin (AA) 0-80 µM arasındaki değişen final konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda COX-2 enziminin çizilen Michealis-Menten grafiği Şekil 4.7’de, enzimin Km ve Vmax değerleri Çizelge 4.5’te ise gösterilmiştir.



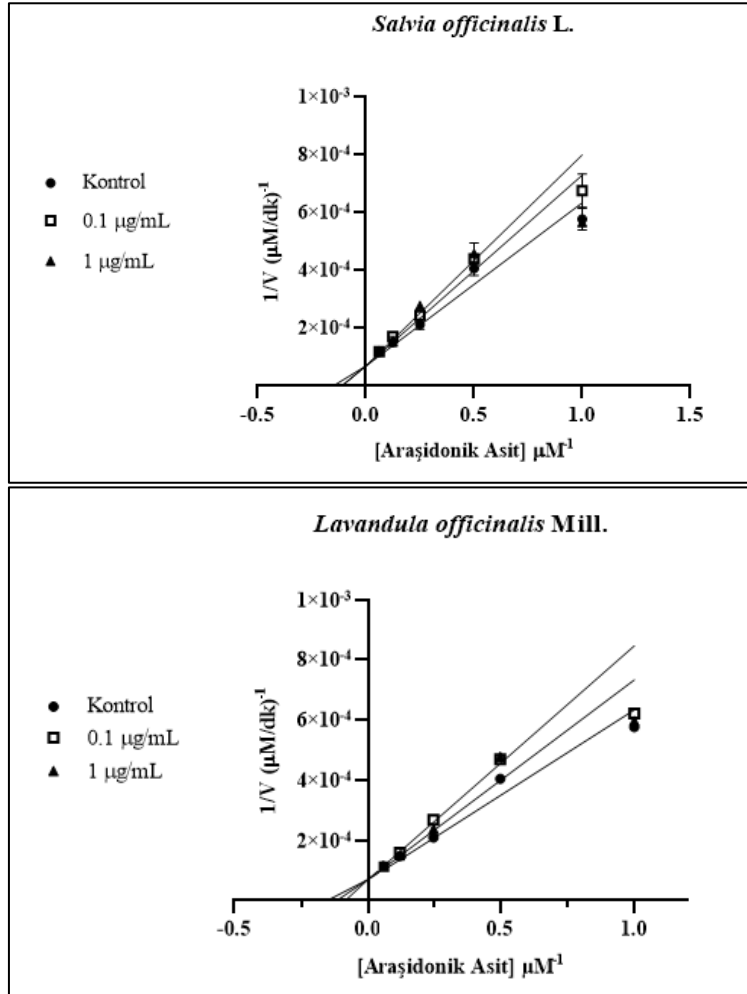
Şekil 4.7. COX-2 enziminin 0-80 µM AA ile Michealis-Menten grafiği

Çizelge 4.5. COX-2’nin 10-80 µM AA ile substrat kinetiği parametreleri

Parametreler	Değerler
Vmax	25869 µM/dk
Km	28,19 µM

Michealis-Menten kinetiği çalışması sonrasında seçilen ekstrelerin COX-2 enzimi ile kinetik parametrelerinin belirlenmesi için uygun AA konsantrasyonu finalde 0-16 µM olarak belirlenmiştir. Uygun substrat konsantrasyonlarında, ekstrelerin belirli final konsantrasyonlarının (0,1 ve 1 µg/mL) Ki değerleri saptanmıştır. Çalışılan ekstrelerin belirli

konsantrasyonlarının Lineweaver Burk grafikleri Şekil 4.8’de, kinetik parametreler ise Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Ekstrelerin Lineweaver Burk grafikleri

Çizelge 4.6. Seçilen ekstrelerin COX-2 enzim kinetiği parametrelerinin değerlendirilmesi

Ekstre	Kinetik Parametreler		
	Ki (µg/mL)	Km (µM)	Vmax (µM/dk)
<i>S.officinalis</i> L.	10,63±7,94	7,60±0,79	12123,97±524,12
<i>L. officinalis</i> Mill.	131,04±951,61	8,58±0,73	13101,74±530,71

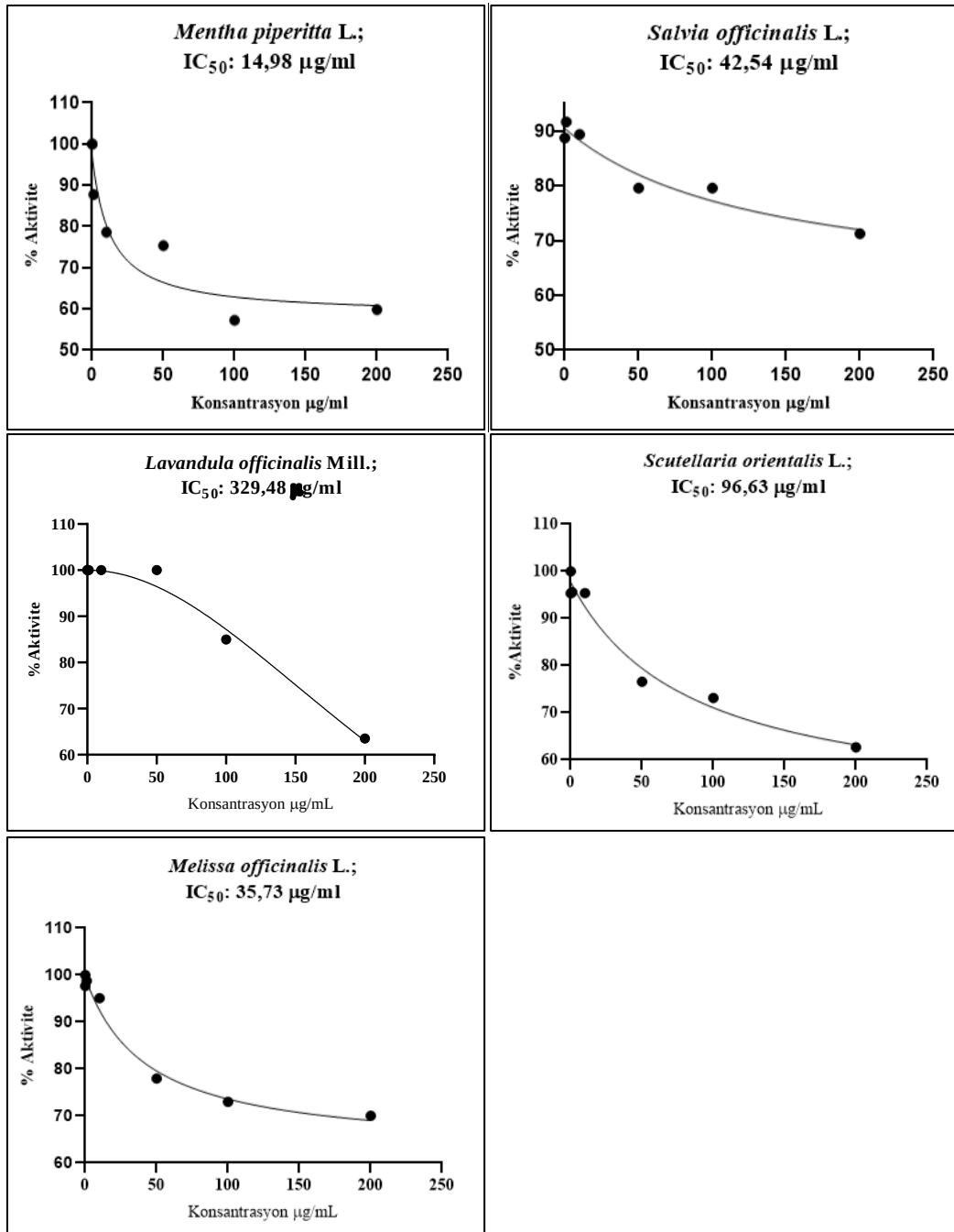
Değerler, üç tekrarın ortalaması ±Std.Hata şeklinde verilmiştir.

12/15-LOX

DMSO’da çözülen ekstrelerin belirli final konsantrasyonlarının (0-200 µg/mL) 12/15-LOX enzimi üzerine aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak

verilmiştir. IC₅₀ hesaplaması için kullanılan doz-cevap eğrilerine ait örnek grafikler Şekil 4.9'da, ekstrelerin IC₅₀ değerleri ise Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda *M. piperita* L., *S.officinalis* L., *L.officinalis* Mill, *S.orientalis* L. ve *M.officinalis* L. için sırasıyla 14,98±9,23; 42,54±37,70; 329,48±44,77; 96,63±55,70 ve 35,73±16,75 µg/mL'dir.



Şekil 4.9. 12/15-LOX enzimi IC₅₀ hesaplaması için kullanılan doz-cevap eğrilerine ait grafikler

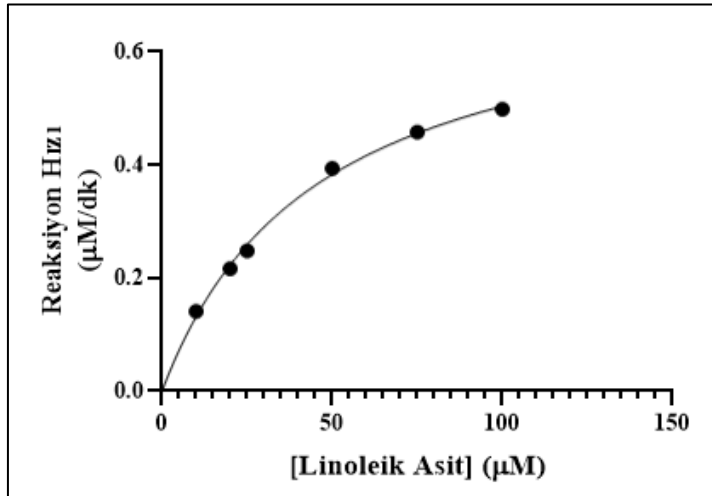
Çizelge 4.7. Ekstrelerin 12/15-LOX enzimi üzerine etkilerinin incelenmesi

	<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lavandula officinalis</i> Mill.	<i>Scutellaria orientalis</i> L.	<i>Melissa officinalis</i> L.
IC ₅₀ (µg/mL)	14,98±9,23	42,54±37,70	329,48±44,77	96,63±55,70	35,73±16,75

Değerler, üç tekrarın ortalaması ±Std.Hata şeklinde verilmiştir.

12/15-LOX enziminin kullanılacak substrat ile karakterizasyonunun belirlenmesi için, Michaelis-Menten kinetiği yapılmıştır. Bu kapsamda, substrat olarak kullanılan linoelik asitin (LA) 0-100 µM arasındaki değişen konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda 12/15-LOX enziminin çizilen Michealis-Menten grafiği Şekil 4.10'da, enzimin Km ve Vmax değerleri ise Çizelge 4.8'de, gösterilmiştir.

Ayrıca, farklı günlerde elde edilen Vmax ve Km değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçların arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05).



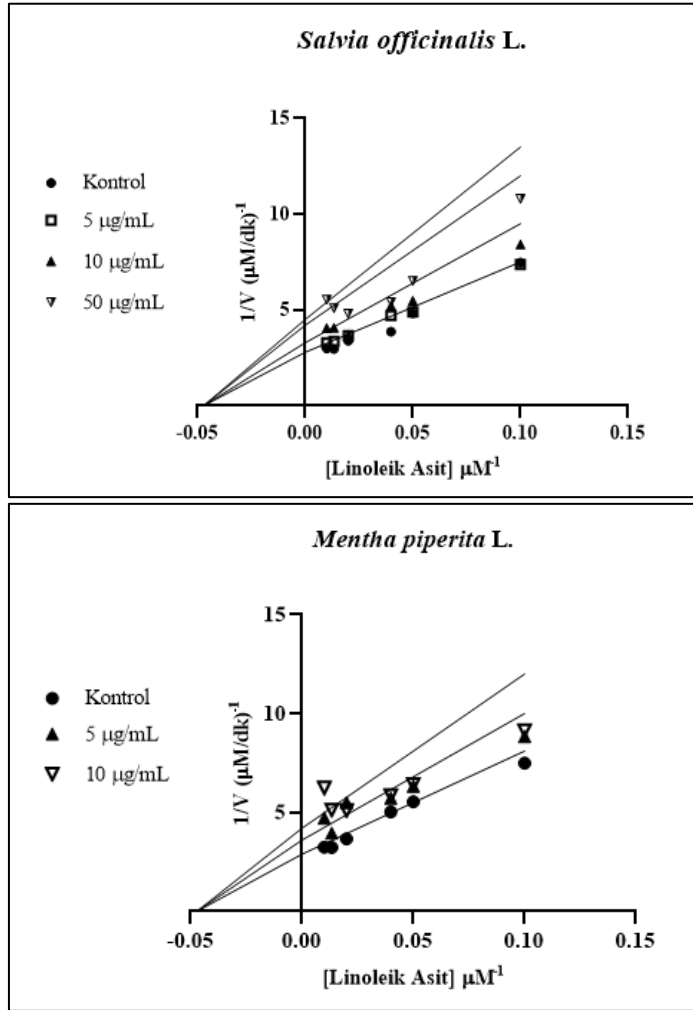
Şekil 4.10. 12/15-LOX enziminin 0-100 µM LA ile Michealis-Menten grafiği

Çizelge 4.8. 12/15-LOX'un 10-100 µM LA ile substrat kinetiği parametreleri

Parametreler	Değerler
Vmax	0,7355 µM/dk
Km	45,98 µM

Michealis-Menten kinetiği çalışması sonrasında seçilen ekstrelerin 12/15-LOX enzimi ile kinetik parametrelerinin belirlenmesi için uygun LA konsantrasyonu finalde 0-100 µM

olarak belirlenmiştir. Uygun substrat konsantrasyonlarında ekstrelerin belirli final konsantrasyonlarının (5, 10 ve 50 $\mu\text{g/mL}$) K_i değerleri saptanmıştır. Çalışılan ekstrelerin belirli konsantrasyonlarının Lineweaver Burk grafikleri Şekil 4.11’de, kinetik parametreler ise Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Ekstrelerin Lineweaver Burk grafikleri

Çizelge 4.9. Seçilen ekstrelerin 12/15-LOX enzim kinetiği parametrelerinin değerlendirilmesi

Ekstre	Kinetik Parametreler		
	K_i ($\mu\text{g/mL}$)	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M/dk}$)
<i>M. piperita</i> L.	$19,61 \pm 2,13$	$13,55 \pm 1,36$	$0,34 \pm 0,01$
<i>S. officinalis</i> L.	$88,36 \pm 9,94$	$14,64 \pm 1,39$	$0,37 \pm 0,01$

Değerler, üç tekrarın ortalaması $\pm$ Std.Hata şeklinde verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Antioksidan aktivite, farklı biyolojik materyalleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Bu aktivite, reaktif oksijen türlerini (ROS) içeren aşırı oksidasyona neden olan proseslerin veya reaksiyonların zararlı etkilerine karşı biyolojik bir sistemi koruyabilen bileşiklerle ilgilidir [193]. Bitkiler, serbest radikalleri nötralize edebilen ve böylece oksidatif stres ve ROS ile ilişkili birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirebilen çok çeşitli antioksidan fitokimyasallar veya biyoaktif moleküller içerir [194]. Bitki ekstralarının fitokimyasal bileşenleri ve etken maddeleri bitkinin olgunluğuna, çeşidine, coğrafi kökenine ve işleme yöntemlerinin koşullarına bağlıdır [174].

Lamiaceae familyası bitkileri zengin sekonder metabolit içeriğine sahiptir [15, 16]. Bu sekonder metabolitlerin birçok antioksidan özelliklerinin olduğu ve birçok anti-inflamatuar yolda etkili oldukları bilinmektedir [17-21]. Bu özellikler esas olarak bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerden, özellikle kafeik asitin esteri olan rosmarinik asitten kaynaklandığı düşünülmektedir. Rosmarinik asit, Boraginaceae ve Lamiaceae familyalarında bulunmaktadır [195, 196]. Tıbbi bitkilerde bulunan rosmarinik asitin varlığı yararlı ve sağlığı geliştirici şekilde nitelendirilmiştir [197]. Yapılan fitokimyasal çalışmalar, *S.officinalis* ve *M. officinalis* yapraklarının içeriğindeki ana bileşenler olan rosmarinik asit ve kafeik asit sayesinde çeşitli farmakolojik aktivitelere olduğunu ortaya koyulmuştur [139, 198-200].

Uçucu yağlar (EO'lar), aromatik bitkilerin buharla damıtılması yoluyla yaygın olarak toplanan uçucu bileşiklerin sıvı karışımlarıdır. Uçucu yağlar, antiviral, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve antioksidan etkileri dahil olmak üzere faydalı biyolojik fonksiyonları için rapor edilmiştir [201-204]. Nane (*Mentha piperita* L.), dünya çapında EO üretiminde en önemli mahsuller arasındadır ve gıda, diş macunu, ilaç ve kozmetikte yaygın olarak tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır [205]. Bol miktarda fenolik bileşik içeriği nedeniyle nane bitkilerinden elde edilen ekstraktlar ve EO'lar, potansiyel doğal antioksidanlardır [205, 206].

Lavandula bitkilerinden izole edilen uçucu aromatik yağlı sıvı olan lavanta esansiyel yağı, antioksidan ve anti-inflamatuar aktiviteleri olmak üzere birçok terapötik özelliğe sahiptir [207]. Lavanta yağının, malondialdehit (MDA) ve karbonil ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzeylerini önemli ölçüde azalttığını, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon

peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ise indüklediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [208].

Bu tez çalışması kapsamında ilk önce ekstrelerin antioksidan aktiviteleri, DPPH⁺ radikalini süpürme etkileri üzerinden incelenmiştir. Daha sonra ekstrelerin total antioksidan kapasiteleri TAC metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en fazla süpürücü etkiye sahip ekstrenin *M. officinalis* L.' ait olduğu (Bkz. Çizelge 4.1); en fazla total antioksidan kapasitesine sahip olan ekstrenin ise *M. piperita* L.'ya ait olduğu gözlemlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.3). Ayrıca *M. piperita* L. [184, 209]; *S. officinalis* L. [210, 211]; *M. officinalis* L. [199, 212] ve *S. orientalis* L.[213] ekstrelerimizin radikal süpürücü etkileri literatür ile karşılaştırıldığında elde ettiğimiz sonuçlar literatür verilerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *L. officinalis* Mill. ekstremizde elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile çok yakın bulunmuştur, Ekstremiz literatüre göre yaklaşık 1,1 kat daha düşük aktiviteye sahiptir [212, 214].

Ek olarak ekstrelerimizin DPPH⁺ radikalini süpürme kapasitelerine zamana bağlı olarak bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, incelenen periyot boyunca *M. piperita* L., *S. officinalis* L. ve *S. orientalis* L.'in radikal süpürme verimliliğinin sabit kaldığı; *L. officinalis* Mill.'in radikal süpürme verimliliğinde ise bir azalma olduğunu göstermiştir. *M. officinalis* L. ve kontrol olarak kullanılan kuersetinin ise zamana ve konsantrasyona bağlı olarak radikali süpürme verimliliklerinin arttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, radikal süpürme verimliliğinin zamana bağlı olarak sabit kaldığı gözlemlenen üç ekstremizin (*M. piperita* L., *S. officinalis* L. ve *S. orientalis* L.) ve verimliliğin zamana konsantrasyona bağlı olarak artan *M. officinalis* L. ekstrelerimizin potansiyel antioksidan ajan olarak devam çalışmalarında umut vaat edeceği düşünülmektedir.

Ekstrelerimizin antioksidan aktiviteleri ve radikal süpürücü aktivitelerindeki verimliliğin yüksek olması, içeriğindeki sekonder metabolit bileşenleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kontrol olarak kullanılan kuersetinin EC₅₀ değerinin yaklaşık 20 katı (Kuersetin EC₅₀±SEM: 2,92±8,54 µg/mL) olması sebebiyle ekstreler umut verici antioksidan potansiyeli sergilemiştir (p<0,05).

Rosmarinik asit ve karnisonik asitçe en zengin olduğu düşünülen olan *S. officinalis* L. ve *M. officinalis* L. ekstrelerimizin COX-2 enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkinliklerinin belirlenmesi için yaptığımız çalışmada ekstrelerimizin IC₅₀ değerlerini sırasıyla 26,44±17,68 ve 16,65±9,09 µg/mL şeklinde bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.4). Aynı ekstrelerin 12/15-LOX enzimi IC₅₀ değerleri sırasıyla 42,54±37,70 ve 35,73±16,75 µg/mL şeklinde bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.7). İki ekstrenin de her iki enzim için gösterdikleri inhibisyon değerleri birbirine çok yakın olduğu görülmektedir.

Ekstrelerimizde sekonder metabolit olarak bulunduğu düşünülen kafeik asidin 5-LOX aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir [215, 216]. Kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenilaktik asidin esteri olan rosmarinik asidin de 5-LOX inhibitörü olduğu bilinmektedir [217]. Rosmarinik asitin anti-inflamatuvar özelliklerinin, LOX ve COX inhibisyonuna ve rosmarinik asidin kompleman kaskadıyla etkileşmesine ve sitokinlerin ekspresyonunun inhibisyonuna dayandığı düşünülmektedir [218-220]. Ayrıca kafeik asidin son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ile 12/15-LOX inhibitörü olabileceği de düşünülmektedir [221]. Bauer ve ark. (2012) A549 hücreleri ile yaptıkları çalışmada karnasol ve karnosonik asit mPGES-1 aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (IC₅₀: 5 µM/mL) [222]. Yakın zamanlarda Alonazi ve ark (2020) *Salvia lanigera* etanol ve su ekstreleri ile yaptıkları çalışmalar inflamasyonda önemli role sahip olan COX-2 ve 5-LOX enzimlerini inhibe ettiği, hatta ekstrelerin en yüksek konsantrasyonlarının (200 µg/mL) insan kolorektal kanser hücre hatlarında (HCT-116 ve Lovo) sitotoksisite göstermediği belirtilmiştir [223]. Ayrıca, Hamza ve ark. (2016)'nın ratlarda yaptığı çalışmada *M. officinalis* L.'in 800 mg/kg dozun dokulardaki COX-2 seviyelerinde %50 inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur [224].

S. officinalis L. ve *M. officinalis* L. ekstrelerimizin her iki enzim üzerine inhibisyon değerleri literatür ile karşılaştırıldığında *in vitro* çalışmaların yetersiz olduğu ve var olan literatür çalışmalarının sonuçlarının elde ettiğimiz inhibisyon değerlerinden daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

S. orientalis L. ekstremizin COX-2 enzimi üzerine etkileri incelendiğinde ekstrenin IC₅₀ değerinin 30,43±12,32 µg/mL olduğu görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.4). Aynı ekstrenin 12/15-LOX enzimi için IC₅₀ değeri ise 96,63±55,70 µg/mL olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.7).

Burnett ve ark. (2007) *S. baicalensis* L. ile yaptığı *in vitro* çalışmada ise ekstrenin COX-2 enzimi için IC₅₀ değeri 15 µg/mL; 5-LOX enzimi için ise 25 µg/mL olarak bulunmuştur [225]. Ayrıca Bhattacharya ve ark. (2014) iskelet kası atrofisinin 12/15-LOX inhibisyonu ile azaltılabileceğini, bu yolağın aktivasyonunun NADPH oksidaz aktivitesinin artmasına neden olduğunu göstermiştir. Bu kapsamda baicaleinin yabancı tip farelerde denervasyonun neden olduğu kas atrofisini azalttığını, ancak 12/15-LOX nakavt farelerde olmadığını gösterdiler. Bu nedenle muhtemelen bu çalışmadaki baicaleinin ana etkisi, 12/15-LOX yolağının NADPH oksidaz aktivitesini ve proteinin ubiquitinleşmesini ve “ubikitin-proteazom aracılı proteolitik degradasyonu” nu inhibe etmesi nedeniyle LOX inhibitörü olduğu düşünülmektedir [226]. Ek olarak Deschamps ve ark. (2006)’nın yaptığı doking ve kinetik çalışmaları baicaleinin katekolik iskelesi nedeniyle indirgeyici bir inhibitör olduğunu kanıtlamaktadır [168].

S. orientalis L. ekstremizin iki enzim üzerine inhibisyon değerleri literatür ile karşılaştırıldığında spesifik olarak kendi türümüz ile olan *in vitro* çalışmaların olmadığı/yetersiz olduğu; *Scutellaria* cinsine ait çalışmaların ise yetersiz olduğu, kendi sonuçlarımızın ise literatürdeki sonuçlara göre çok yakın olduğu görülmektedir.

L. officinalis Mill ve *M. piperita* L. ekstrelerinin COX-2 enzimi IC₅₀ değerleri sırasıyla 6,23±13,25 ve 69,98±13,70 µg/mL şeklinde bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.4). Aynı ekstrelerin 12/15-LOX enzimi için IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 329,48±44,77 ve 14,98±9,23 µg/mL şeklinde olduğu görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.7).

Ökaliptol olarak da bilinen 1-8-sineol, *Lavandula* ve *Mentha* cinsinin uçucu yağlarında en fazla bulunan bileşenlerden biridir. Beer ve ark. (2017) ökaliptol ile selektif COX-2 inhibitörleri olan selekoksib ve indometazinin COX-2 enziminin aktivitesine olan etkilerini incelemiştir. Yapılan çalışma sonucunda, ökaliptolün IC₅₀ değerinin selekoksibin yaklaşık 6 katı, indometazinin ise yaklaşık 22 katı kadar düşük olduğunu bulmuştur. Elde edilen sonuçlar ökaliptolün COX-2 enzimi için selektif bir inhibitör olduğunun göstermektedir [227]. Ökaliptolün literatürde 12/15-LOX üzerine olan çalışmaları ise yetersiz bulunmuştur. LPS ile uyarılan monositler kullanılarak *in vitro* olarak insan monositlerinde Juergens ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmada monoterpen mentol ve nane yağının anti-inflamatuar aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda bu şifalı yağların LTB₄ ve PGE₂ yollarındaki etkileri ölçülerek hem LOX hem de COX yolları için potansiyel birer

inhibitör olduğu gösterilmiştir [186]. Ek olarak Hussein ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, *L. officinalis* hidroalkolik ekstralarının, formalin ve hot-plate testlerini kullanarak farelerde formalin ve COX tip 1 ve 2 aktivitesinin neden olduğu iltihaplanma ve ağrıyı inhibe ettiğini göstermiştir [228].

Uçucu yağlar bakımından zengin olduğunu düşündüğümüz *L. officinalis* Mill. ve *M. piperita* L. ekstralarının bu tez çalışmasında kullanılan COX-2 ve 12/15-LOX anti-inflamatuar yolak enzimleri üzerine inhibisyon değeri literatür ile karşılaştırıldığında *in vitro* çalışmaların yetersiz olduğu; özellikle *L. officinalis* Mill. ekstramızın selektif COX-2 inhibitörü olarak değerlendirilebileceği, sonuçlarımızın literatür değeriinden çok daha yüksek olduğu görölmektedir.

Ki değeri, inhibitörün enzime olan ilgisini belirten bir biyokimyasal parametredir. *S. officinalis* L. ve *L. officinalis* Mill. Ekstrelerinin COX-2 enzimi kinetik parametreleri incelendiğinde ekstraların Ki değeri sırasıyla $10,63 \pm 7,94$ ve $131,04 \pm 951,61$ $\mu\text{g/mL}$ şeklinde bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.6). Elde edilen sonuçlar, ekstraların enzim üzerine kompetitif inhibitör olarak etkili olduğunu göstermektedir. Ancak ekstrede yer alan hangi metabolitin bu etkiye sahip olduğunun belirlenmesi için saf etkenlerin belirlenip denenmesi gerekmektedir.

12/15-LOX enzimi üzerine kinetik parametreleri incelenen *M. piperita* L. ve *S. officinalis* L. ekstralarının Ki değeri sırasıyla $19,61 \pm 2,13$ ve $88,36 \pm 9,94$ $\mu\text{g/mL}$ şeklinde bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.9). Elde edilen sonuçlar ekstraların enzim üzerine nonkompetitif inhibitör olarak etki ettiklerini göstermektedir.

Yapılan tez çalışması sonucunda, ekstralarının antioksidan kapasiteleri incelenmiş ve 12/15-LOX ve COX-2 enzim üzerine inhibisyon etkileri ve kinetik parametreleri incelenmiştir. Elde edilen tez bulguları, ekstralarının anti-inflamatuar ajan olarak kullanılabileceğini, hatta *S. officinalis* L. ve *M. officinalis* L. ekstralarının *in vitro* dual 12/15-LOX/COX-2 inhibitör potansiyeline sahip olabileceklerini göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler *in vivo* çalışmalara ışık tutabilecek niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm ekstrelerimiz yüksek seviyede antioksidan kapasiteye sahip olup, radikal süpürücü etkileri de antioksidan kapasitelerine kıyasla aynı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca DPPH⁺ radikalini süpürme kapasitesi deneyinin farklı günlerde yapılan çalışma sonuçları istatistiksel olarak incelenmiş, elde edilen bulgular neticesinde farklı günlerde elde edilen IC₅₀ değerleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05).

Ekstrelerimizin DPPH⁺ radikalini zamana bağlı olarak süpürme kapasiteleri incelenmiştir. *M. officinalis* L. ekstreminin kontrol olarak kullanılan kuersetine benzer şekilde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak radikali süpürme aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca *M. piperita* L., *S. officinalis* L. ve *S. orientalis* L. ekstrelerimizin ise radikali süpürme aktiviteleri zamana bağlı olarak sabit kaldığı gözlemlenmiştir. Genel olarak ekstrelerimizin antioksidan davranışları göz önüne alındığında potansiyel antioksidan ajanlar olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, *M. piperita* L. ve *S. officinalis* L. için farklı günlerde yapılan deney sonuçları Post-Hoc testleri ile analiz edilmiş, elde edilen bulgular istatistiksel açıdan farklı bulunmamıştır (p>0,05).

Ekstrelerimizin COX-2 enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler özellikle *L. officinalis* Mill. için çok umut vaat edici bulunmuştur (IC₅₀: 6,23±13,25 µg/mL).

Ekstrelerimizin 12/15-LOX enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler özellikle *M. piperita* L. için çok umut vaat edici bulunmuştur (IC₅₀: 14,98±9,23 µg/mL).

Ekstrelerimizin 12/15-LOX ve COX-2 enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendiğinde *S. officinalis* L. ve *M. officinalis* L.'in potansiyel dual 12/-LOX ve COX-2 inhibitörü olabileceği düşünülmektedir.

Ekstrelerimizin COX-2 enzimi ile kinetik parametrelerine bakıldığında *S. officinalis* L. ekstrelerinin enzime olan ilgisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (IC₅₀: 28,00±17,46 µg/mL ve Ki: 10,63±7,94 µg/mL).

12/15-LOX enziminin Michealis-Menten kinetiği çalışması kapsamında farklı günlerde elde edilen Km ve Vmax değerleri Post-Hoc testleri ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar günler arasındaki değerlerin birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Ekstrelerimizin 12/15-LOX enzimi ile kinetik parametrelerine bakıldığında *M. piperita* L. ekstresinin enzime olan ilgisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (IC_{50} : $14,98 \pm 9,23 \mu\text{g/mL}$ ve K_i : $19,61 \pm 2,13 \mu\text{g/mL}$).

COX-2 enzimi ile yapılan tüm çalışmalar ticari kit ile, 12-15-LOX enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar ise manuel olarak gerçekleştirilmiştir. Ticari kit ile sonuçlar daha kolay elde edilmiş olmasına rağmen kit bileşenlerinin kısıtlı sayıda olması yeterli sayıda deney tekrarı yapabilmek olanağını ortadan kaldırmıştır. Buna karşılık manuel olarak yapılan enzim çalışmalarının hem deney tekrar sayılarının daha fazla olabilmesi açısından, hem de manipülasyona daha açık olması sebebi ile ilerleyen çalışmalarda ticari kit yerine tercih edilmesi düşünülmektedir.

Elde ettiğimiz antioksidan aktivite, 12/15-LOX ve COX-2 enzim inhibisyon değerleri sonuçları göze alınarak seçilen ekstrelerin potansiyel anti-inflamatuar ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ekstrelerimizde bulunan primer ve sekonder metabolitler tek başlarına antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitelerden sorumlu olabilirler. Fakat bitki ekstrelerinin göstermiş olduğu bu aktiviteler, tekli aktif metabolitler yerine farklı metabolitlerin sinerjik/antagonistik etkisine de bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçların hücre kültürü çalışmalarına ve hatta *in vivo* çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Bu bağlamda anti-inflamatuar yolak enzimlerini ifade eden hücre hatları kullanıp yaratılacak bir inflamasyon sürecinde ekstrelerin bu yol ve enzimler üzerinde etkileri incelenebilir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde ettiğimiz bulguları desteklemek, ekstrelerin enzim inhibisyonundaki rollerini daha iyi anlamak ve modellemek adına öncelikle ekstrelerin içerik analizlerinin yapılması ve ayrıca seçilen ekstrelerin içinde yer alan metabolitleri ile enzim çalışmalarının tekrar edilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Barnes, P.J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94(6), 557-572.
2. Rostom, A., Dube, C., Wells, G.A., Tugwell, P., Welch, V., Jolicoeur, E., McGowan, J., and Lanus, A. (2002). Prevention of NSAID-induced gastroduodenal ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2002(4), CD002296.
3. Weir, M.R. (2002). Renal effects of nonselective NSAIDs and coxibs. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 69(1), 53-58.
4. Newman, N., and Ling, R. (1985). Acetabular bone destruction related to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Lancet*, 326(8445), 11-14.
5. Huang, W.-F., Hsiao, F.-Y., Tsai, Y.-W., Wen, Y.-W., and Shih, Y.-T. (2006). Cardiovascular events associated with long-term use of celecoxib, rofecoxib and meloxicam in Taiwan. *Drug Safety*, 29(3), 261-272.
6. Baron, J.A., Sandler, R.S., Bresalier, R.S., Lanus, A., Morton, D.G., Riddell, R., Iverson, E.R., and Demets, D.L. (2008). Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial. *The Lancet*, 372(9651), 1756-1764.
7. Gilroy, D.W., Tomlinson, A., and Willoughby, D.A. (1998). Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 355(2-3), 211-217.
8. Demirezer, L. (2010, 5-6 Haziran). *Bitkilerin tipta kullanılması konusundaki sorumluluklarımız*. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu'nda sunuldu. Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği, Zeytinburnu, İstanbul, 5-6.
9. Suddee, S., Paton, A., and Parnell, J. (2004). A taxonomic revision of tribe Ocimeae Dumort.(Lamiaceae) in continental South East Asia II. Plectranthinae. *Kew Bulletin*, 59(3), 379-414.
10. Hedge, I. (1992). A global survey of the Lamiaceae. In Harley, R.M. and Reynolds T (Eds), *Advencis in Labiatae Science*, pp. 7-17.
11. Wagstaff, S.J., Olmstead, R.G., and Cantino, P.D. (1995). Parsimony analysis of cpDNA restriction site variation in subfamily Nepetoideae (Labiatae). *American Journal of Botany*, 82(7), 886-892.
12. Saleem, M. (1998). *Chemical and biological screening of some relatives of lamiaceae (labiatae) family and marine alga codium iyengarii*. Volume PhD. (University Of Karachi), p. 187.
13. Erdem, F. (2013). *Sideritis vulcanica Hub. Mor.(Lamiaceae) türünün (Endemik) taksonomik yönden incelenmesi*, 85, 348497.
14. Baser, K.H.C., and Kırimer, N. (2014). Essential oils of Anatolian Apiaceae-A profile. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 1(1), 1-50.

15. Nabavi, S.M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., and Nabavi, S.F. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 15(173), 339-347.
16. Fecka, I., and Turek, S. (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108(2008), 1039-1053.
17. Bisio, A., Romussi, G., Russo, E., Cafaggi, S., Schito, A.M., Repetto, B., and De Tommasi, N. (2008). Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10468-10472.
18. Dapkevicius, A., van Beek, T.A., Lelyveld, G.P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J.P., and Venskutonis, R. (2002). Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *Journal of Natural Products*, 65(6), 892-896.
19. Kozłowska, M., Laudy, A.E., Przybył, J., Ziarno, M., and Majewska, E. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 72(4), 757-767.
20. Bremner, P., Rivera, D., Calzado, M., Obón, C., Inocencio, C., Beckwith, C., Fiebich, B., Muñoz, E., and Heinrich, M. (2009). Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 295-305.
21. Benrezzouk, R., Terencio, M., Ferrandiz, M., Hernandez-Perez, M., Rabanal, R., and Alcaraz, M. (2001). Inhibition of 5-lipoxygenase activity by the natural anti-inflammatory compound aethiopinone. *Inflammation Research*, 50(2), 96-101.
22. Butenko, I., Gladchenko, S., and Galushko, S. (1993). Anti-inflammatory properties and inhibition of leukotriene C 4 biosynthesis in vitro by flavonoid baicalein from *Scutellaria baicalensis* georgy roots. *Agents and Actions*, 39, 49-51.
23. Demirci, B., Temel, H.E., Portakal, T., Kırmızıbekmez, H., Demirci, F., and Başer, K.H.C. (2011). Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* essential oil on lipoxygenase. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(4), 290-295.
24. Tongol, K.A.J., and Querequincia, J.M.B. (2015). 15-Lipoxygenase Inhibitory Activity of The Extracts From *Clerodendrum Quadriloculare* (Blanco) Merr.(Lamiaceae) Leaves. *International Journal Of Scientific & Technology Research*, 4(9), 269-271.
25. Miri, S. (2018). Phytochemistry, Antioxidant, and Lipid Peroxidation Inhibition of the Essential Oils of *Lavandula Officinalis* L. in Iran. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2550-2556.
26. Nwidi, L.L., Elmorsy, E., and Carter, W.G. (2018). In vitro anti-cholinesterase and anti-oxidant activity of three standardised polyherbal products used for memory enhancing in ethnomedicine of South-East Nigeria. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 25(2), 27.

27. Pereira, O.R., Macias, R.I., Domingues, M.R., Marin, J.J., and Cardoso, S.M. (2019). Hepatoprotection of *Mentha aquatica* L., *Lavandula dentata* L. and *Leonurus cardiaca* L. *Antioxidants*, 8(8), 267.
28. Dinarello, C.A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 140(6), 935-950.
29. Anderson, N., and Borlak, J. (2008). Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacological Reviews*, 60(3), 311-357.
30. Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
31. Ricciotti, E., and Fitzgerald, G.A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 986-1000.
32. Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846-852.
33. Zhou, Y., Hong, Y., and Huang, H. (2016). Triptolide attenuates inflammatory response in membranous glomerulo-nephritis rat via downregulation of NF- κ B signaling pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*, 41(6), 901-910.
34. Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126-1167.
35. Gaschler, M.M., and Stockwell, B.R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419-425.
36. Moldovan, L., and Moldovan, N.I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 395-412.
37. Dianzani, M.U., and Barrera, G. (2008). Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. *Free Radical Pathophysiology*, 19-38.
38. Halliwell, B., and Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1-14.
39. Esterbauer, H., Cheeseman, K., Dianzani, M., Poli, G., and Slater, T. (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, 208(1), 129-140.
40. Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81-128.
41. Esterbauer, H., Eckl, P., and Ortner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238(3), 223-233.

42. Ayala, A., Muñoz, M.F., and Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(360438), 1-31.
43. Repetto, M., Semprine, J., and Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *Lipid Peroxidation*, Volume 1, A. Catala, ed. (InTech). 3-30.
44. Breuer, W., Shvartsman, M., and Cabantchik, Z.I. (2008). Intracellular labile iron. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 350-354.
45. Massey, K.A., and Nicolaou, A. (2011). Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1240-1246.
46. Massey, K.A., and Nicolaou, A. (2013). Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free radical Biology and Medicine*, 59(100), 45-55.
47. Laneuville, O., Breuer, D.K., Xu, N., Huang, Z., Gage, D.A., Watson, J.T., Lagarde, M., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1995). Fatty Acid Substrate Specificities of Human Prostaglandin-endoperoxide H Synthase-1 and- 2: Formation Of 12-Hydroxy-(9z, 13e/Z, 15z)-Octadecatrienoic Acids From A-Linolenic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 270(33), 19330-19336.
48. Ghasemian, M., Owlia, S., and Owlia, M.B. (2016). Review of anti-inflammatory herbal medicines. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2016(9130979), 1-11.
49. Brash, A.R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23679-23682.
50. Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V.B., Kuhn, H., and Walther, M. (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 503(2), 161-174.
51. Haeggström, J.Z., and Funk, C.D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical Reviews*, 111(10), 5866-5898.
52. Kuhn, H., Banthiya, S., and Van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 308-330.
53. Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2015). 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 331-339.
54. Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fusté, M.C., Busquets, M., and Manresa, A. (2013). Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 4737-4747.
55. Funk, C.D., Chen, X.-S., Johnson, E.N., and Zhao, L. (2002). Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 303-312.

56. Sadeghian, H., and Jabbari, A. (2016). 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(1), 65-88.
57. Boyington, J.C., Gaffney, B.J., and Amzel, L.M. (1993). The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260(5113), 1482-1486.
58. Prigge, S., Boyington, J., Faig, M., Doctor, K., Gaffney, B., and Amzel, L. (1997). Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie*, 79(11), 629-636.
59. Newcomer, M.E., and Brash, A.R. (2015). The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science*, 24(3), 298-309.
60. Garreta, A., Val-Moraes, S.P., García-Fernández, Q., Busquets, M., Juan, C., Oliver, A., Ortiz, A., Gaffney, B.J., Fita, I., and Manresa, À. (2013). Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *The FASEB Journal*, 27(12), 4811-4821.
61. Rådmark, O., and Samuelsson, B. (2009). 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *Journal of Lipid Research*, 50, S40-S45.
62. Lewis, R.A., Austen, K.F., and Soberman, R.J. (1990). Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *New England Journal of Medicine*, 323(10), 645-655.
63. Peters-Golden, M., and Brock, T.G. (2001). Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Letters*, 487(3), 323-326.
64. Hedi, H., and Norbert, G. (2004). 5-Lipoxygenase pathway, dendritic cells, and adaptive immunity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(2), 99-105.
65. Miller, D.K., Gillard, J.W., Vickers, P.J., Sadowski, S., Léveillé, C., Mancini, J.A., Charleson, P., Dixon, R.A., Ford-Hutchinson, A.W., and Fortin, R. (1990). Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature*, 343(6225), 278-281.
66. Gökşen, U.S., and Kelekçi, N.G. (2010). Antiinflamatuvar Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Siklooksijenaz ve 5-Lipooksijenazın Dual İnhibitörleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 30(1), 81-117.
67. Dahlén, S.-E. (2006). Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *European Journal of Pharmacology*, 533(1-3), 40-56.
68. Peters-Golden, M., and Henderson Jr, W.R. (2007). Leukotrienes. *New England Journal of Medicine*, 357(18), 1841-1854.
69. Rouzer, C.A., Matsumoto, T., and Samuelsson, B. (1986). Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(4), 857-861.
70. Rådmark, O. (2002). Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 211-234.

71. Reddy, K.V., Hammarberg, T., and Rådmark, O. (2000). Mg^{2+} activates 5-lipoxygenase in vitro: Dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid. *Biochemistry*, 39(7), 1840-1848.
72. Peters-Golden, M., and Brock, T. (2003). 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(2-3), 99-109.
73. Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2007). 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(7), 332-341.
74. Coffey, M.J., Phare, S.M., and Peters-Golden, M. (2000). Prolonged exposure to lipopolysaccharide inhibits macrophage 5-lipoxygenase metabolism via induction of nitric oxide synthesis. *The Journal of Immunology*, 165(7), 3592-3598.
75. Natarajan, R., and Nadler, J.L. (2004). Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(9), 1542-1548.
76. Chen, X.S., and Funk, C.D. (1993). Structure-function properties of human platelet 12-lipoxygenase: chimeric enzyme and in vitro mutagenesis studies. *The FASEB Journal*, 7(8), 694-701.
77. Kuhn, H., Walther, M., and Kuban, R.J. (2002). Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases: structure, function, and biological implications. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 263-290.
78. Ackermann, J.A., Hofheinz, K., Zaiss, M.M., and Krönke, G. (2017). The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(4), 371-381.
79. Brash, A.R., Boeglin, W.E., and Chang, M.S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6148-6152.
80. Shureiqi, I., and Lippman, S.M. (2001). Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Research*, 61(17), 6307-6312.
81. Dobrian, A.D., Lieb, D.C., Cole, B.K., Taylor-Fishwick, D.A., Chakrabarti, S.K., and Nadler, J.L. (2011). Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 115-131.
82. Yamamoto, S. (1992). Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1128(2-3), 117-131.
83. Kühn, H., Barnett, J., Grunberger, D., Baecker, P., Chow, J., Nguyen, B., Bursztyn-Pettegrew, H., Chan, H., and Sigal, E. (1993). Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1169(1), 80-89.

84. Yamamoto, S. (1989). Mammalian lipoxygenases: molecular and catalytic properties. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 35, 219-229.
85. Ochi, H., Morita, I., and Murota, S.-i. (1992). Roles of glutathione and glutathione peroxidase in the protection against endothelial cell injury induced by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(2), 407-411.
86. Kuhn, H., and Thiele, B.J. (1999). The diversity of the lipoxygenase family: many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Letters*, 449(1), 7-11.
87. Sultana, C., Shen, Y., Rattan, V., and Kalra, V.K. (1996). Lipoxygenase metabolites induced expression of adhesion molecules and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is linked to protein kinase C activation. *Journal of Cellular Physiology*, 167(3), 477-487.
88. Nadel, J., Conrad, D., Ueki, I., Schuster, A., and Sigal, E. (1991). Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(4), 1139-1145.
89. Van Leyen, K., Duvoisin, R.M., Engelhardt, H., and Wiedmann, M. (1998). A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature*, 395(6700), 392-395.
90. Yokota, S., Oda, T., and Fahimi, H.D. (2001). The role of 15-lipoxygenase in disruption of the peroxisomal membrane and in programmed degradation of peroxisomes in normal rat liver. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(5), 613-621.
91. Uderhardt, S., and Krönke, G. (2012). 12/15-lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance. *Journal of Molecular Medicine*, 90(11), 1247-1256.
92. Feltenmark, S., Gautam, N., Brunnström, Å., Griffiths, W., Backman, L., Edenius, C., Lindbom, L., Björkholm, M., and Claesson, H.-E. (2008). Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), 680-685.
93. Malik, J., Tauchen, J., Landa, P., Kutil, Z., Marsik, P., Kloucek, P., Havlik, J., and Kokoska, L. (2017). In vitro antiinflammatory and antioxidant potential of root extracts from Ranunculaceae species. *South African Journal of Botany*, 109, 128-137.
94. Brahmachari, G., Jash, S., Mandal, L., Mondal, A., and Roy, R. (2008). Cyclooxygenase (Cox)-inhibitory flavonoid from *Limnophila heterophylla*. *Rasāyan Journal of Chemistry*, 1(2), 288-291.
95. Takeda, S., Misawa, K., Yamamoto, I., and Watanabe, K. (2008). Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(9), 1917-1921.
96. Picot, D., Loll, P.J., and Garavito, R.M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H 2 synthase-1. *Nature*, 367(6460), 243-249.

97. Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., and Browner, M.F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature Structural Biology*, 3(11), 927-933.
98. Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Penning, T.D., Seibert, K., and Isakson, P.C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644-648.
99. Blobaum, A.L., Xu, S., Rowlinson, S.W., Duggan, K.C., Banerjee, S., Kudalkar, S.N., Birmingham, W.R., Ghebreselasie, K., and Marnett, L.J. (2015). Action at a distance: mutations of peripheral residues transform rapid reversible inhibitors to slow, tight binders of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), 12793-12803.
100. Fu, J.-Y., Masferrer, J., Seibert, K., Raz, A., and Needleman, P. (1990). The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 16737-16740.
101. Malkowski, M., Ginell, S., Smith, W., and Garavito, R. (2000). The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science*, 289(5486), 1933-1937.
102. Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 145-182.
103. Rouzer, C.A., and Marnett, L.J. (2003). Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chemical Reviews*, 103(6), 2239-2304.
104. Mbonye, U.R., Yuan, C., Harris, C.E., Sidhu, R.S., Song, I., Arakawa, T., and Smith, W.L. (2008). Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8611-8623.
105. Garavito, R.M., Malkowski, M.G., and DeWitt, D.L. (2002). The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and-2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68, 129-152.
106. Kurumbail, R.G., Kiefer, J.R., and Marnett, L.J. (2001). Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 752-760.
107. Dong, L., Vecchio, A.J., Sharma, N.P., Jurban, B.J., Malkowski, M.G., and Smith, W.L. (2011). Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 19035-19046.
108. Blobaum, A.L., and Marnett, L.J. (2007). Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(7), 1425-1441.
109. Williams, C.S., Mann, M., and DuBois, R.N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55), 7908-7916.
110. Van der Donk, W.A., Tsai, A.-L., and Kulmacz, R.J. (2002). The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry*, 41(52), 15451-15458.

111. Smith, W.L., and Marnett, L.J. (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1083(1), 1-17.
112. Samad, T.A., Sapirstein, A., and Woolf, C.J. (2002). Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends in molecular medicine*, 8(8), 390-396.
113. Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, 231(25), 232-235.
114. Wennogle, L.P., Liang, H., Quintavalla, J.C., Bowen, B.R., Wasvary, J., Miller, D.B., Allentoff, A., Boyer, W., Kelly, M., and Marshall, P. (1995). Comparison of recombinant cyclooxygenase-2 to native isoforms: aspirin labeling of the active site. *FEBS Letters*, 371(3), 315-320.
115. Laneuville, O., Breuer, D.K., Dewitt, D.L., Hla, T., Funk, C.D., and Smith, W.L. (1994). Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and-2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(2), 927-934.
116. Copeland, R.A., Williams, J.M., Giannaras, J., Nurnberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S., and Trzaskos, J.M. (1994). Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 11202-11206.
117. Riendeau, D., Percival, M., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Falgoutyret, J.P., and Ford-Hutchinson, A. (1997). Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *British Journal of Pharmacology*, 121(1), 105-117.
118. Parildar, H., Serter, R., and Yesilada, E. (2011). Diabetes mellitus and phytotherapy in Turkey. *JPMA-Journal of the Pakistan Medical Association*, 61(11), 1116.
119. Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., and Babaç, M. (2012). Türkiye bitkileri listesi. *Damarlı Bitkiler*, 262, A. Güner, Ed., İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
120. Igbe, I., Ching, F.P., and Eromon, A. (2010). Anti-inflammatory activity of aqueous fruit pulp extract of *Hunteria umbellata* K. Schum in acute and chronic inflammation. *Acta Pol Pharm*, 67(1), 81-85.
121. Dias, C.N., and Moraes, D.F.C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) larvicides. *Parasitology Research*, 113(2), 565-592.
122. Licá, I.C.L., dos Santos Soares, A.M., de Mesquita, L.S.S., and Malik, S. (2018). Biological properties and pharmacological potential of plant exudates. *Food Research International*, 105, 1039-1053.
123. Anilkumar, M. (2010). Ethnomedicinal plants as anti-inflammatory and analgesic agents. In D. Chattopadhyay (Ed.), *Ethnomedicine: A source of Complementary Therapeutics*, pp. 267-293.

124. Koyuncu, O., Yaylaci, O., Öztürk, D., Potoglu Erkara, I., Savaroglu, F., Akcoskun, O., and Ardic, M. (2010). Risk categories and ethnobotanical features of the Lamiaceae taxa growing naturally in Osmaniye (Bilecik/Turkey) and environs. *Biological Diversity and Conservation*, 3(3), 31-45.
125. Bräuchler, C., Meimberg, H., and Heubl, G. (2010). Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae)—taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2), 501-523.
126. Theodoridis, S., Stefanaki, A., Tezcan, M., Aki, C., Kokkini, S., and Vlachonasios, K.E. (2012). DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from Chios Island (Greece) and the adjacent Çeşme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Molecular Ecology Resources*, 12(4), 620-633.
127. Çinbilgel, İ., and Yusuf, K. (2019). A research on species diversity and ethno botanical utilization of lamiaceae family in Southern Turkey. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23(1), 90-107.
128. Barneby, R.C. (1986). Flora of Turkey and the East Aegean islands. Volume 9. By PH Davis assisted by RR Mill and Kit Tan. *Brittonia*, 2, 161-161.
129. Fu, Z., Wang, H., Hu, X., Sun, Z., and Han, C. (2013). The pharmacological properties of Salvia essential oils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(7), 122.
130. Szentmihályi, K., and Then, M. (2002). Comparative study on tannins, flavonoids, terpenes and mineral elements of some Salvia species. In *XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants 629 Abstracts*.
131. Cuvelier, M.E., Richard, H., and Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 645-652.
132. Pop Cuceu, A.-V., Tofană, M., Socaci, S.A., Nagy, M., Fărcaș, A., Borș, M.D., Salanță, L., Feier, D., and Vârva, L. (2014). Comparative study regarding the chemical composition of essential oils of some salvia species. *Hop and Medicinal Plants*, 1-2, 79-91.
133. Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E.J., Huang, T.-C., and Ho, C.-T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4869-4873.
134. Coisin, M., Necula, R., Grigoras, V., Gille, E., Rosenhech, E., and Zamfirache, M.M. (2012). Phytochemical evaluation of some Salvia species from Romanian flora. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" Din Iasi*, 58(1), 35.
135. Lu, Y., and Foo, L.Y. (2002). Polyphenolics of Salvia—a review. *Phytochemistry*, 59(2), 117-140.
136. Lu, Y., and Foo, L.Y. (2001). Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Letters*, 42(46), 8223-8225.

137. Lu, Y., and Foo, L.Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75(2), 197-202.
138. Lima, C.F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Fernandes-Ferreira, M., and Pereira-Wilson, C. (2005). The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 383-389.
139. Hernández-Saavedra, D., Pérez-Ramírez, I.F., Ramos-Gómez, M., Mendoza-Díaz, S., Loarca-Pina, G., and Reynoso-Camacho, R. (2016). Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity-associated cardiovascular risk. *Medicinal Chemistry Research*, 25, 163-172.
140. Zargari, A. (1990). Medicinal plants. (in Persian), *University of Tehran Press*, 3, 513-514.
141. Garcia, C.S., Menti, C., Lambert, A.P.F., Barcellos, T., Moura, S., Calloni, C., Branco, C.S., Salvador, M., Roesch-Ely, M., and Henriques, J.A. (2016). Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(1), 281-292.
142. Perry, E.K., Pickering, A.T., Wang, W.W., Houghton, P.J., and Perry, N.S. (1999). Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(5), 527-534.
143. Silva, S.d., Sato, A., Lage, C.L.S., San Gil, R.A.d.S., Azevedo, D.d.A., and Esquibel, M.A. (2005). Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. in vitro produced under the influence of growth regulators. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B), 1387-1390.
144. Leung, A.Y. (1980). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, 2nd Edition, New York, NY: John Wiley and Sons, 649.
145. Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., and Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L.(Lamiaceae) essential oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(9), 2485-2489.
146. Baytop, T. (2021). *Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün)*, Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 480.
147. Agata, I., Kusakabe, H., Hatano, T., Nishibe, S., and Okuda, T. (1993). Melitric acids A and B, new trimeric caffeic acid derivatives from *Melissa officinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41, 1608-1611.
148. Triantaphyllou, G.B., Dimitrios Boskou, Kalliopi (2001). Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(4), 313-317.
149. Mikus, J., Harkenthal, M., Steverding, D., and Reichling, J. (2000). In vitro effect of essential oils and isolated mono-and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Medica*, 66(4), 366-368.

150. Mrlianová, M., Tekel'ová, D., Felklová, M., Reinöhl, V., and Tóth, J. (2002). The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba*. *Planta Medica*, 68(2), 178-180.
151. Patora, J., Majda, T., Góra, J., and Klimek, B. (2003). Variability in the content and composition of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) cultivated in Poland. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 60(5), 395-400.
152. Felklova, M., Natherova, L., and Duskova, K. (1969). Tannin compounds in leaves of *Melissa officinalis* L., invaded by *Septoria melissae* Desm. *Ceskoslovenska Farmacie*, 18(9), 457-460.
153. Brieskorn, C., and Krause, W. (1974). Weitere Triterpene aus *Melissa officinalis* L. *Archiv der Pharmazie*, 307(8), 603-612.
154. Sarer, E., and Kökdil, G. (1991). Constituents of the essential oil from *Melissa officinalis*. *Planta Medica*, 57(1), 89-90.
155. Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R.F., Reis, C.P., Roberto, A., and Rijo, P. (2016). Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement*, 89, 328-332.
156. Xiao, Z., Li, Q., Niu, Y., Zhou, X., Liu, J., Xu, Y., and Xu, Z. (2017). Odor-active compounds of different lavender essential oils and their correlation with sensory attributes. *Industrial Crops and Products*, 108, 748-755.
157. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., and Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 67-71.
158. Rabiei, Z., and Rafieian-Kopaei, M. (2014). Neuroprotective effect of pretreatment with *Lavandula officinalis* ethanolic extract on blood-brain barrier permeability in a rat stroke model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1), S421-S426.
159. Sik, B., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., Hanczné, E.L., and Ajtony, Z. (2019). Recent advances in the analysis of rosmarinic acid from herbs in the Lamiaceae family. *Natural Product Communications*, 14(7), 1-10.
160. Pistelli, L., Najar, B., Giovanelli, S., Lorenzini, L., Tavarini, S., and Angelini, L.G. (2017). Agronomic and phytochemical evaluation of lavandin and lavender cultivars cultivated in the Tyrrhenian area of Tuscany (Italy). *Industrial Crops and Products*, 109, 37-44.
161. Chrysargyris, A., Panayiotou, C., and Tzortzakis, N. (2016). Nitrogen and phosphorus levels affected plant growth, essential oil composition and antioxidant status of lavender plant (*Lavandula angustifolia* Mill.). *Industrial Crops and Products*, 83, 577-586.
162. Uritu, C.M., Mihai, C.T., Stanciu, G.-D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M.-M., Stefanescu, R., Bild, V., and Melnic, S. (2018). Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Research and Management*, 2018.

163. Ezer, N., and Renda, G. (2012). Comparative Morphological Studies on *Scutellaria salviifolia* Benth. and *Scutellaria diffusa* Benth.(Lamiaceae) Growing In Turkey. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(4), 197.
164. Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Piozzi, F., and Arnold, N.A. (2011). Analysis of essential oils from *Scutellaria orientalis* ssp. *alpina* and *S. utriculata* by GC and GC-MS. *Natural Product Communications*, 6(9), 1347-1350.
165. Gharari, Z., Aghajanzadeh, M., and Sharafi, A. (2021). *Scutellaria orientalis* subsp. *Bornmuelleri*: phytochemical composition and biological activities. *Natural Product Research*, 1-6.
166. Yimam, M., Brownell, L., Hodges, M., and Jia, Q. (2012). Analgesic effects of a standardized bioflavonoid composition from *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu*. *Journal of Dietary Supplements*, 9(3), 155-165.
167. Zengin, G., Llorent-Martínez, E.J., Molina-García, L., Fernández-de Córdoba, M.L., Aktumsek, A., Uysal, S., Rengasamy, K.R., Aumeeruddy, M.Z., Bahadori, M.B., and Mahomoodally, M.F. (2019). Chemical profile, antioxidant, and enzyme inhibitory properties of two *Scutellaria* species: *S. orientalis* L. and *S. salviifolia* Benth. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(2), 270-280.
168. Deschamps, J.D., Kenyon, V.A., and Holman, T.R. (2006). Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(12), 4295-4301.
169. Hsieh, C.-J., Hall, K., Ha, T., Li, C., Krishnaswamy, G., and Chi, D.S. (2007). Baicalein inhibits IL-1 β -and TNF- α -induced inflammatory cytokine production from human mast cells via regulation of the NF- κ B pathway. *Clinical and Molecular Allergy*, 5(5), 1-10.
170. Wakabayashi, I. (1999). Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages. *Pharmacology & Toxicology*, 84(6), 288-291.
171. Woo, K.J., Lim, J.H., Suh, S.-I., Kwon, Y.-K., Shin, S.-W., Kim, S.-C., Choi, Y.H., Park, J.-W., and Kwon, T.K. (2006). Differential inhibitory effects of baicalein and baicalin on LPS-induced cyclooxygenase-2 expression through inhibition of C/EBP β DNA-binding activity. *Immunobiology*, 211(5), 359-368.
172. Bunsawat, J., Elliott, N.E., Hertweck, K.L., Sproles, E., and Alice, L.A. (2004). Phylogenetics of *Mentha* (Lamiaceae): evidence from chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany*, 29(4), 959-964.
173. McKay, D.L., and Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(8), 619-633.
174. Blanco, M., Ming, L., Marques, M., and Bovi, O. (2000). *Drying temperature effects in rosemary essential oil content and composition*. In I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants 569, 99-103.

175. Gherman, C., Culea, M., and Cozar, O. (2000). Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta*, 53(1), 253-262.
176. Maffei, M., and Scannerini, S. (1992). Seasonal variations in fatty acids from non-polar lipids of developing peppermint leaves. *Phytochemistry*, 31(2), 479-484.
177. Clark, R., and Menary, R. (1981). Variations in composition of peppermint oil in relation to production areas. *Economic Botany*, 35, 59-69.
178. Capecka, E., Mareczek, A., and Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93(2), 223-226.
179. Zheng, W., and Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.
180. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., and Blomhoff, R. (2003). Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1286-1290.
181. Abirami, S.G., and Nirmala, P. (2014). A comparative–invitro study of anticancer effect of *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum* and *Coleus aromaticus* against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEP-2) cell lines. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2, 6-9.
182. Ferreira, P., Cardoso, T., Ferreira, F., Fernandes-Ferreira, M., Piper, P., and Sousa, M.J. (2014). *Mentha piperita* essential oil induces apoptosis in yeast associated with both cytosolic and mitochondrial ROS-mediated damage. *FEMS Yeast Research*, 14(7), 1006-1014.
183. Schuhmacher, A., Reichling, J., and Schnitzler, P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*, 10(6-7), 504-510.
184. Sharafi, S.M., Rasooli, I., Owlia, P., Taghizadeh, M., and Astaneh, S.D.A. (2010). Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 147.
185. Atta, A., and Alkofahi, A. (1998). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 117-124.
186. Juergens, U., Stöber, M., and Vetter, H. (1998). The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. *European Journal of Medical Research*, 3(12), 539-545.
187. Bayala, B., Bassole, I.H.N., Gnoula, C., Nebie, R., Yonli, A., Morel, L., Figueredo, G., Nikiema, J.-B., Lobaccaro, J.-M.A., and Simpore, J. (2014). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *PLoS One*, 9(3), e92122.

188. Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1815-1821.
189. White, H.L., and Glassman, A.T. (1974). A simple radiochemical assay for prostaglandin synthetase. *Prostaglandins*, 7(2), 123-129.
190. Jäger, A.K., Hutchings, A., and van Staden, J. (1996). Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 95-100.
191. Orhan, I.E., Senol, F.S., Ozturk, N., Akaydin, G., and Sener, B. (2012). Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic Salvia species. *Food Chemistry*, 132, 1360-1367.
192. Tappel, A. (1962). Lipoxidase, *Methods in enzymology*, Academic Press, 5, 539-542.
193. López-Alarcón, C., and Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
194. Ani, V., Varadaraj, M., and Naidu, K.A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology*, 224(1), 109-115.
195. Wang, H., Provan, G.J., and Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87(2), 307-311.
196. Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T.S.S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., and Pardossi, A. (2016). Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Industrial Crops and Products*, 83, 241-254.
197. Elufioye, T.O., and Habtemariam, S. (2019). Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108600.
198. Lima, C.F., Valentao, P.C., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Fernandes-Ferreira, M., and Pereira-Wilson, C. (2007). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 167(2), 107-115.
199. Koksall, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., and Gulcin, I. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2), 217-222.
200. Petkova, N., Ivanov, I., Mihaylova, D., and Krastanov, A. (2017). Phenolic acids content and antioxidant capacity of commercially available *Melissa officinalis* L. teas in Bulgaria. *Bulgarian Chemical Communications*, 49(D), 69-74.

201. Baydar, N.G., Özkan, G., and Sağdıç, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15(5), 335-339.
202. Sökmen, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polissiou, M., Tepe, B., Akpulat, H.A., Sahin, F., and Sokmen, A. (2004). In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3309-3312.
203. Dundar, E., Olgun, E.G., Isiksoy, S., Kurkcuglu, M., Baser, K.H.C., and Bal, C. (2008). The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(6), 399-408.
204. Liu, Y., Song, M., Che, T., Bravo, D., and Pettigrew, J. (2012). Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro. *Journal of Animal Science*, 90(8), 2774-2783.
205. Bensabab, F., Houbairi, S., Essahli, M., Lamiri, A., and Naja, J. (2013). Chemical composition and inhibitory effect of the essential oil from *mentha spicata* irrigated by wastewater on the corrosion of aluminum in 1 molar hydrochloric acid. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 31(4), 195-206.
206. Oh, J., Jo, H., Cho, A.R., Kim, S.-J., and Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31(2), 403-409.
207. Silva, G.L., Luft, C., Lunardelli, A., Amaral, R.H., Melo, D.A., Donadio, M.V., Nunes, F.B., Azambuja, M.S., Santana, J.C., and Moraes, C. (2015). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(2), 1397-1408.
208. Wang, D., Yuan, X., Liu, T., Liu, L., Hu, Y., Wang, Z., and Zheng, Q. (2012). Neuroprotective activity of lavender oil on transient focal cerebral ischemia in mice. *Molecules*, 17(8), 9803-9817.
209. Derwich, E., Chabir, R., Taouil, R., and Senhaji, O. (2011). In-vitro antioxidant activity and GC/MS studies on the leaves of *Mentha piperita* (Lamiaceae) from Morocco. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(2), 130-136.
210. Albano, S., Lima, A.S., Miguel, M.G., Pedro, L.G., Barroso, J.G., and Figueiredo, A.C. (2012). Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants. *Records of Natural Products*, 6(1), 35-48.
211. Duletić Laušević, S., Alimpić Aradski, A., Pavlović, D., Marin, P., and Lakušić, D. (2016). *Salvia officinalis* of different origins Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content of extracts. *Agro Food Industry Hi Tech*, 27(1), 52-55.
212. Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C.A., Bodirlau, R., and Armatu, A. (2011). Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*),

- lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Natural Product Research*, 25(17), 1657-1661.
213. Türkoğlu, S. (2010). Determination of antiradical capacity of extracts *Scutellaria orientalis* L. subsp. *bicolor* (hochst.) edmondson. *Ecological Life Sciences*, 5(3), 195-202.
 214. Robu, S., Aprotosoiaie, A., Miron, A., Cioancă, O., Stănescu, U., and Hăncianu, M. (2012). In vitro antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species cultivated in Romania. *Farmacia*, 60(3), 391-401.
 215. Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.
 216. Spady, D.K., and Dietschy, J.M. (1985). Rates of cholesterol synthesis and low-density lipoprotein uptake in the adrenal glands of the rat, hamster and rabbit in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 836(2), 167-175.
 217. Gamaro, G.D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P., and Ardenghi, P. (2011). Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *International Scholarly Research Notices*, 2011(3), 1-6.
 218. Mirzoeva, O., and Calder, P. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55(6), 441-449.
 219. Petersen, M., and Simmonds, M.S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(82), 121-125.
 220. Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K.-i., Kato, Y., Osawa, T., and Yoshikawa, T. (2003). Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free radical Biology and Medicine*, 34(8), 1060-1069.
 221. Kim, S., Jeong, K.J., Cho, S.K., Park, J.W., and Park, W.J. (2016). Caffeic acid, morin hydrate and quercetin partially attenuate sulfur mustard-induced cell death by inhibiting the lipoxygenase pathway. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4454-4460.
 222. Bauer, J., Kuehnle, S., Rollinger, J.M., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H., Werz, O., and Koeberle, A. (2012). Carnosol and carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(1), 169-176.
 223. Alonazi, M.A., Jemel, I., Moubayed, N., Alwhibi, M., El-Sayed, N.N.E., and Bacha, A.B. (2021). Evaluation of the in vitro anti-inflammatory and cytotoxic potential of ethanolic and aqueous extracts of *Origanum syriacum* and *Salvia lanigera* leaves. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), 19890-19900.
 224. Hamza, A.A., Ahmed, M.M., Elwey, H.M., and Amin, A. (2016). *Melissa officinalis* protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats and potentiates its anticancer activity on MCF-7 cells. *PLoS One*, 11(11), e0167049.

225. Burnett, B., Jia, Q., Zhao, Y., and Levy, R. (2007). A medicinal extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation. *Journal of Medicinal Food*, 10(3), 442-451.
226. Bhattacharya, A., Hamilton, R., Jernigan, A., Zhang, Y., Sabia, M., Rahman, M.M., Li, Y., Wei, R., Chaudhuri, A., and Van Remmen, H. (2014). Genetic ablation of 12/15-lipoxygenase but not 5-lipoxygenase protects against denervation-induced muscle atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, 30-40.
227. Beer, A., Zagorchev, P., Filipova, D., and Lukanov, J. (2017). Effects of 1, 8-cineole on the activity of cyclooxygenase and cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 isoforms. *Natural Products Chemistry & Research*, 5(2), 5-11.
228. Husseini, Y., Sahraei, H., Meftahi, G.H., Dargahian, M., Mohammadi, A., Hatef, B., Zardooz, H., Ranjbaran, M., Hosseini, S.B., and Alibeig, H. (2016). Analgesic and anti-inflammatory activities of hydro-alcoholic extract of *Lavandula officinalis* in mice: possible involvement of the cyclooxygenase type 1 and 2 enzymes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 102-108.



GAZİ GELECEKTİR..