T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

Vitex agnus-castus L. ÖZÜTLERİNİN VE YEŞİL SENTEZ YOLUYLA ELDE EDİLEN GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARININ ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayberk YEŞİLADA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MART 2026

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

Vitex agnus-castus L. ÖZÜTLERİNİN VE YEŞİL SENTEZ YOLUYLA ELDE EDİLEN GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARININ ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayberk YEŞİLADA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MART 2026

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Vitex agnus-castus L. ÖZÜTLERİNİN VE YEŞİL SENTEZ YOLUYLA ELDE EDİLEN GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARININ ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayberk YEŞİLADA

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mart 2026

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Vitex agnus-castus L. ÖZÜTLERİNİN VE YEŞİL SENTEZ YOLUYLA ELDE EDİLEN GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARININ ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayberk YEŞİLADA

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez …./……/2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sevil Aksu (Danışman)

Doç. Dr. Sevilay CENGİZ ŞAHİN

Doç. Dr. Ömer KESMEZ

ÖZET

Vitex agnus-castus L. ÖZÜTLERİNİN VE YEŞİL SENTEZ YOLUYLA ELDE EDİLEN GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARININ ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayberk YEŞİLADA

Yüksek Lisans, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sevil AKSU

Mart 2026; 107 sayfa

Alzheimer hastalığı (AH) günümüzde demansın başlıca etkeni olarak bilinen ve tedavisi tam olarak bulunamamış nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütüne göre 2050 yılına gelindiğinde dünya genelinde yaklaşık 106,8 milyon insana AH tanısı konacağı öngörülmektedir. Alzheimer hastalığı patogenezinde, asetilkolinesteraz (AChE) enziminin inhibisyonu kolinerjik hipotez çerçevesinde en sık başvurulan tedavi stratejilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Mevcut tedavilerin yetersiz kalması ve kullanılan ilaçların yan etkilerinin yüksek olması AH tedavisi ve patolojisini anlamak için önem arz etmektedir. İleriye yönelik çalışmalarda bitkisel kaynaklı kimyasalların ve bu kimyasallarla sentezlenen nanoparçacıkların kullanımı mevcut tedavilerin iyileştirilmesi ve daha etkili alternatiflerin sunulabilmesi açısından oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması kapsamında dünyada oldukça geniş bir yayılım gösteren *Vitex agnus-castus* bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstraktlardaki toplam fenolik madde içeriği Folin Ciocalteu metodu, toplam flavonoid madde içeriği ise $AlCl_3$ metodu ile belirlenmiştir. Ekstraktların kullanımı ile biyolojik sentez yöntemiyle gümüş nanoparçacıkların (AgNP) sentezlenmesi üzerine ışığın, pH'ın, ekstrakt konsantrasyonunun ve $AgNO_3$ konsantrasyonunun etkileri değerlendirilmiştir. Seçilen AgNP'lerin bir kısmı doğrudan kullanılırken,bir kısmı ise 2°C/dk ve 10°C/dk ısıtma hızlarında kalsine edilmiştir. Oluşan AgNP'lerin üzerinde kaplama sağlayan fitokimyasalların etkileri tartışılmıştır. Karakterizasyon için dinamik ışık saçılımı (DLS), zeta potansiyel, UV-Visible spektrometrisi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA) ve geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) analizleri kullanılmıştır. Bitki ekstraktları ve ekstraktlardan sentezlenen AgNP'ler AChE enzimi üzerinde çalışılarak inhibisyon etkileri gösterilmiştir.

Buna ek olarak *Vitex agnus-castus* kökenli seçilmiş fitokimyasalların AChE ile etkileşim potansiyelini moleküler düzeyde değerlendirmek amacıyla rekombinant insan asetilkolinesterazın kristal yapısı olan 4EY7 yapısı kullanılarak moleküler docking analizi gerçekleştirilmiştir. Docking sonuçları, rosmarinik asit, luteolin ve klorojenik asit gibi bileşiklerin AChE'nin aktif bölgesine stabil bağlanma gösterdiğini ve burada hidrojen bağı etkileşimleri aracılığıyla tutunduğunu göstermiştir. Rosmarinik asidin Arg287 ve Glu199 ile, luteolinin Arg287 ile ve klorojenik asidin His438 ile kurduğu hidrojen bağları, ekstrakt profilinde yer alan fenolik bileşenlerin AChE inhibisyonuna katkı sağlayabileceğine yönelik mekanistik bir çerçeve sunmuştur.

Bu bulgular, *Vitex agnus-castus* yaprak ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilen AgNP sentezinde ışık koşulu, pH, $AgNO_3$ ve ekstrakt konsantrasyonu gibi parametrelerin UV-Vis spektroskopisi aracılığıyla sistematik biçimde izlenmesine olanak tanımış ve pratik bir optimizasyon haritasının geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Ekstraktların UHPLC-MS/MS profilleri ile sentez davranışları ve AChE inhibisyon sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi kimyasal bileşen fonksiyon ilişkisine dayalı bir bakış açısı sunmuştur. TGA, zeta potansiyeli, FTIR ve TEM analizlerin kombinasyonu ile incelenen AgNP'lerin ısıl, kolloidal ve yüzey özellikleri birlikte değerlendirilmiş, docking analizi ile de deneysel inhibisyon verileri olası moleküler etkileşimler üzerinden desteklenerek sonraki biyolojik uygulamalar için hangi optimizasyon koşullarının daha uygun olabileceğine yönelik ölçülebilir göstergeler sağlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Asetilkolinesteraz, Alzheimer Hastalığı, Enzim İnhibisyonu, Gümüş Nanoparçacık, Moleküler Kenetlenme, Nanoparçacık Optimizasyonu, *Vitex agnus-castus*.

JÜRİ: Doç. Dr. Sevil AKSU

Doç. Dr. Sevilay CENGİZ ŞAHİN

Doç. Dr. Ömer KESMEZ

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES OF *Vitex agnus-castus* L. EXTRACTS AND SILVER NANOPARTICLES OBTAINED BY GREEN SYNTHESIS

Ayberk YEŞİLADA

MSc Thesis in Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sevil AKSU

March 2026; 107 pages

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder known today as the primary cause of dementia, for which no complete cure has been found. According to the World Health Organisation (WHO), it is predicted that approximately 106.8 million people worldwide will be diagnosed with AD by 2050. In the pathogenesis of Alzheimer's disease, inhibition of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme is considered one of the most frequently used treatment strategies within the cholinergic hypothesis. The inadequacy of current treatments and the high incidence of side effects associated with the drugs used make understanding the treatment and pathology of AD crucial. In future studies, the use of plant-derived chemicals and nanoparticles synthesised from these chemicals is crucial for improving existing treatments and offering more effective alternatives.

In this thesis, the total phenolic content in extracts obtained from the leaves of *Vitex agnus-castus*, a plant with a widespread distribution worldwide, was determined using the Folin-Ciocalteu method, whilst the total flavonoid content was determined using the $AlCl_3$ method. The effects of light, pH, extract concentration, and $AgNO_3$ concentration on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) via a biological synthesis method using the extracts were evaluated. Some of the selected AgNPs were used directly, while others were calcined at heating rates of 2°C/min and 10°C/min. The effects of phytochemicals providing a coating on the resulting AgNPs were discussed. Ddynamic light scattering (DLS), zeta potential, UV-Visible spectrophotometry, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and transmission electron microscopy (TEM) analyses were used for characterization. The plant extracts and the AgNPs synthesized from these extracts have been studied for their inhibitory effects on the AChE enzyme.

In addition, molecular docking analysis was performed using the 4EY7 crystal structure of recombinant human acetylcholinesterase to evaluate the interaction potential of selected phytochemicals derived from *Vitex agnus-castus* with AChE at the molecular level. Docking results have shown that compounds such as rosmarinic acid, luteolin, and chlorogenic acid exhibit stable binding to the active site of AChE, where they are held via hydrogen bond interactions. The hydrogen bonds formed by rosmarinic acid with

Arg287 and Glu199, luteolin with Arg287, and chlorogenic acid with His438 provided a mechanistic framework suggesting that the phenolic compounds in the extract profile may contribute to AChE inhibition.

These findings have enabled the systematic monitoring of parameters such as light condition, pH, $AgNO_3$, and extract concentration in AgNP synthesis using *Vitex agnus-castus* leaf extracts via UV-Vis spectrocopy, and contributed to the development of a practical optimization map. The combined evaluation of the synthesis behaviour and AChE inhibition results of the extracts using UHPLC-MS/MS profiles provided a perspective based on the chemical component-function relationship. The thermal, colloidal, and surface properties of AgNPs were evaluated using a combination of TGA, zeta potential, FTIR, and TEM analyses. Furthermore, docking analysis supported experimental inhibition data through, suggesting potential molecular interactions and providing measurable indicators for determining the most suitable optimisation conditions for future biological applications.for subsequent biological applications.

KEYWORDS: Acetylcholinesterase, Alzheimer's Disease, Enzyme Inhibition, Molecular docking, Nanoparticle Optimization, Silver Nanoparticles, *Vitex agnus-castus*

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Sevil AKSU

Assoc. Prof. Dr. Sevilay CENGİZ ŞAHİN

Assoc. Prof. Dr. Ömer KESMEZ

ÖNSÖZ

Tez çalışmam kapsamında *Vitex agnus-castus* bitkisinin ekstraktlarını ve bu ekstraktlardan sentezlenen gümüş nanoparçacıklarını birçok parametrede inceleyerek Alzheimer tedavisindeki potansiyelini değerlendirme imkânı buldum. Yüksek lisans sürecim boyunca 2210/A Yurt içi yüksek lisans bursu programıyla bana maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışma sürecinde bilgi birikimiyle ve deneyimiyle her konuda yardımcı olan bilimsel bakış açısını edinmemi sağlayan sayın danışman Hocam Doç. Dr. Sevil AKSU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her türlü konuda yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi İlknur BİRSEN Hocama teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte, her türlü derdime ortak olan, enerjisiyle çalışma motivasyonumu besleyen "LABMATE"im Arş. Gör. Betül TAŞKIRAN'a ayrıca teşekkür ederim.

Desteklerini esirgemeyen Dr. Ceren ÖZCAN DİKER ve Dr. Timur TONGUÇ hocalarıma ve arkadaşım Kamil ERDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda laboratuvar ve cihaz desteği sunan Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sibel TUNÇ ve Doç. Dr. Ömer KESMEZ hocalarıma teşekkür ederim. Çalışmamın farklı aşamalarında değerli zamanlarını bana ayırarak destek olan Büşra ATKESEN Feride DEMİR ve Zeynep Demre ÇAYKARA'ya teşekkürü borç bilirim.

Bu sürecin her aşamasında varlıklarıyla bana güç veren, üzüldüğümde üzülen sevindiğimde sevinen sevgili annem Naciye KÜÇÜK, babam Ömer YEŞİLADA ve biricik kız kardeşim Aybüke YEŞİLADA'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT iii

ÖNSÖZ v

AKADEMİK BEYAN ix

SİMGELER VE KISALTMALAR x

ŞEKİLLER DİZİNİ xii

ÇİZELGELER DİZİNİ xv

1.GİRİŞ 1

2. KAYNAK TARAMASI 4

2.1 Alzheimer Hastalığı 4

2.1.1. Alzheimer hastalığının patolojisi 5

2.1.2. Tau hipotezi 5

2.1.3. Amiloid kaskad hipotezi 6

2.1.4. Kolinerjik hipotez 6

2.1.5. Kolinerjik sistem ve Alzheimer hastalığı 7

2.1.6. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar 7

2.2 *Vitex agnus-castus* Bitkisi ve Özellikleri 9

2.2.1 Taksonomisi ve morfolojisi 9

2.2.2 Kimyasal içeriği 10

2.2.3 Farmakolojik özelliği 11

2.3 Enzim Kinetiği 12

2.3.1 Enzimlerin temel özellikleri ve çalışma mekanizmaları 12

2.3.2 Michealis-Menten kinetiği 13

2.3.3. Lineweaver-Burk grafiği 13

2.3.4 Enzim İnhibisyonu 14

2.4. Nanoteknoloji ve Nanoparçacıklar 15

2.4.1. Nanoparçacık sentez yöntemleri 15

2.4.2. Fiziksel sentez 15

2.4.3. Kimyasal sentez 16

2.4.4. Biyolojik sentez....16
2.5. AChE İnhibisyonunda Kullanılan Fitokimyasallar ve Nanoparçacıklar....17
2.5.1. Fitokimyasallar ile AChE inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar....17
2.5.2. Yeşil Sentez Yoluyla Elde Edilen AgNP'lerin AChE İnhibisyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar....18
2.6. Moleküler Kenetlenme (Docking) Yöntemi. 19
2.6.1. Moleküler kenetlenme yönteminin algoritmik ve matematiksel temeli....19
2.6.2. AChE aktif bölgesi ve bağlanma bölgelerinin incelenmesi 19
2.6.3 Alternatif moleküler kenetlenme yönteminde kullanılan yazılımlar 20
3. MATERYAL VE METOT 21
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Yazılım Programları 21
3.2. *Vitex agnus-castus* Bitkisinin Toplanması ve Kurutulması 23
3.2.1. *Vitex agnus-castus* bitkisinden özüt eldesi....23
3.2.2. UHPLC-ESI-MS/MS cihazı ile fenolik ve flavonoid bileşiklerinin analizi..24
3.2.3. Toplam fenolik içerik tayini....25
3.2.4. Toplam flavonoid içerik tayini....26
3.3. *Vitex agnus-castus* Bitkisinin Ekstraktlarından AgNP Sentezi....26
3.4. AgNP'lerin Karakterizasyonu....28
3.4.1. UV-Visible spektrofotometre ölçümü....28
3.4.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ölçümü 29
3.4.3 Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyeli ölçümü 29
3.4.4. Termogravimetrik analiz (TGA) ölçümü....29
3.4.5. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ölçümü 29
3.5. *Vitex agnus-castus* ekstraktları ve sentezlenen AgNP'ler ile AChE enzimi inhibisyon çalışmaları 29
3.6. Moleküler kenetlenme (Docking) çalışmaları....31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 38
4.1. *Vitex agnus-castus* Bitkisinin Ekstraktlarının Fenolik İçerik Analizi....38
4.2. Toplam fenolik ve flavonoid içerik analizi 41
4.3. *Vitex agnus-castus* Ekstraktlarından AgNP Sentezi 45
4.3.1. Deneysel tasarım ve UV-Vis bölgede izleme yaklaşımı....46

4.3.2. $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı sentez sonuçları 46
4.3.3. Ekstrakt konsantrasyonuna bağlı sentez sonuçları 49
4.3.4. pH'ya bağlı sentez sonuçları 52
4.3.5. Zaman bağımlı sentez 55
4.4. Yeşil Sentez ile Elde Edilen AgNP'lerin Enstrümental Analizleri 59
4.4.1. Sentezlenen AgNP'lerin TGA analizleri 59
4.4.2. Sentezlenen AgNP'lerin DLS ve zeta potansiyeli analizleri 63
4.4.3. DLS boyut verileri ile UV-Vis parametrelerinin birlikte değerlendirilmesi 66
4.4.4. Sentezlenen AgNP'lerin TEM görüntüleri 68
4.4.5. Bitki ekstraktlarının ve sentezlenen AgNP'lerin FTIR analizleri 69
4.5. AChE İnhibisyonu Çalışmaları ve Kinetik Analizi 72
4.6. Moleküler kenetlenme (Docking) çalışmaları 77
4.6.1. Docking çalışmasında kulanılan ligandların 2D ve 3D görselleştirmeleri 81
5. SONUÇLAR 97
6. KAYNAKLAR 100
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "*Vitex agnus-castus L.* Özütlerinin ve Yeşil Sentez Yoluyla Elde Edilen Gümüş Nanoparçacıklarının Antikolinesteraz Aktivitelerinin Değerlendirilmesi" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

…./…./2026

Ayberk YEŞİLADA

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

[E] : Enzim konsantrasyonu

[ES] : Enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonu

[I] : İnhibitör konsantrasyonu

IC_{50} : %50 inhibisyon oluşturan konsantrasyon

[P] : Ürün konsantrasyonu

[S] : Substrat konsantrasyonu

V : Hız

α : Alfa

µM : Mikro molar

mM : Mili molar

°C : Derece Celcius

Kısaltmalar

ACh : Asetil kolin

AChE : Asetilkolinesteraz

AD : Alzheimer Disease

AgNP : Gümüş Nanoparçacık

AH : Alzheimer hastalığı

ATCI : Asetiltiyokolin iyodür

BChE : Bütirilkolinesteraz

ChE : Kolinesteraz

DTNB : 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

E-NP : Etanol ekstraktından sentezlenmiş AgNP

EC : Enzyme Commission

EE : Etanol ekstraktı

EE-10C: 10 °C'de kalsine edilmiş E-NP

EE-2C : 2 °C'de kalsine edilmiş E-NP

Eks. : Ekstrakt

FC : Folin-Ciocalteu

FTIR : Fourier transform infrared spectroscopy

GA : Gallik asit

GAE : Gallik asit eşdeğeri

LC : Liquid chromatography

MS : Mass spectrometry

QUE : Kuersetin eşdeğeri

QU : Kuersetin

S-NP : Su ekstraktından sentezlenmiş AgNP

SE : Su ekstraktı

SE-10C: 10 °C'de kalsine edilmiş S-NP

SE-2C : 2 °C'de kalsine edilmiş S-NP

TEM : Transmision electron microscopy

TGA : Thermogravimetric analysis

U : Ünite

UHPLC: Ultra high performance liquid chromatography

UV-Vis: Ultraviolet-Visible

V_0 : Başlangıç reaksiyon hızı

V_{max} : Maksimum reaksiyon hızı

WHO : World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. *Vitex agnus-castus* bitkisinin Dünya'daki yayılış. 10

Şekil 2.2. *Vitex agnus-castus* bitkisinin yaprak ve çiçek fotoğrafı. 10

Şekil 2.3. Nanoparçacık sentezinde kullanılan yöntemlere ilişkin diyagram (Khan vd., 2019). 17

Şekil 3.1. Geri soğutucu altında ekstraktlar alınırken kullanılan düzenek. 24

Şekil 3.2. Alınan ekstraktların biriktirilip saklandığı tüpler. 24

Şekil 3.3. $AlCl_3$ metodu ile yapılan toplam flavonoid içerik analizinde kullanılan kuersetin standartları (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 ve 125 µg/mL). 26

Şekil 3.4. Kontrollü bir aydınlık ortamında yapılan AgNP sentezi için kullanılan düzenek. 27

Şekil 3.5. Karanlık ortamda yapılan AgNP sentezi için alüminyum folyo ile sarılan tüpler. 27

Şekil 3.6. a) Protein Data Bank (PDB) veri tabanından alınan insan AChE kristal yapısı (PDB ID: 4EY7) **b)** 4EY7'nin A zincirinin kristal yapısı. 32

Şekil 3.7. Çalışmada 4EY7'nin A zinciri üzerinden seçilen grid box 36

Şekil 3.8. Bütün çalışma boyunca izlenen deneysel akış. 37

Şekil 4.1. FC yönteminde gallik asit ile Folin-Ciocalteu reaktifi arasında gerçekleşen redoks tepkimesi (Dominguez-López vd., 2024). 42

Şekil 4.2. Folin–Ciocalteu (TPC) metodu için gallik asit eşleniği olarak çizilen standart grafiği absorbans sonuçları (760 nm). 42

Şekil 4.3. $AlCl_3$ metodu için kuarsetin eşleniği olarak çizilen standart grafiği absorbans sonuçları (425 nm). 43

Şekil 4.4. Karanlık ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu. 47

Şekil 4.5. Karanlıkta ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu. 47

Şekil 4.6. Aydınlık ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu. 48

Şekil 4.7. Aydınlık ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu. 49

Şekil 4.8. Karanlık ortamda SE konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.....50

Şekil 4.9. Karanlık ortamda EE konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.....50

Şekil 4.10. Aydınlık ortamda SE konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.....51

Şekil 4.11. Aydınlık ortamda EE konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.....52

Şekil 4.12. Karanlık ortamda SE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.....53

Şekil 4.13. Karanlık ortamda EE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.....53

Şekil 4.14. Aydınlık ortamda SE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.....54

Şekil 4.15. Aydınlık ortamda EE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.....54

Şekil 4.16. Karanlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (SK: SE karanlık ortam).....56

Şekil 4.17. Karanlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (EK: EE karanlık ortam). 56

Şekil 4.18. Aydınlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (SA: SE aydınlık ortam).....57

Şekil 4.19. Aydınlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (EA: EE aydınlık ortam). 58

Şekil 4.20. 24s sonunda yapılan bütün sentezlerin UV-Vis spektrumları. 58

Şekil 4.21. Su ekstraktı kaynaklı AgNP'lerin (S-NP) farklı ısıtma hızlarında gerçekleştirilen kalsinasyon koşullarına bağlı TGA kütle kaybı eğrilerinin karşılaştırılması. S-2: 2 °C/dk; S-10: 10 °C/dk.....60

Şekil 4.22. Etanol ekstraktı kaynaklı AgNP'lerin (E-NP) farklı ısıtma hızlarında gerçekleştirilen kalsinasyon koşullarına bağlı TGA kütle kaybı eğrilerinin karşılaştırılması. E-2: 2 °C/dk; E-10: 10 °C/dk.....61

Şekil 4.23. Etanol ekstraktı kaynaklı AgNP (E-NP) ve su ekstraktı kaynaklı AgNP'nin (S-NP) 2 °C/dk ısıtma hızında elde edilen TGA kütle kaybı eğrileri. E-2: 2 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan E-NP; S-2: 2 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan S-NP. 62

Şekil 4.24. Etanol ekstraktı kaynaklı AgNP (E-NP) ve su ekstraktı kaynaklı AgNP'nin (S-NP) 10 °C/dk ısıtma hızında elde edilen TGA kütle kaybı eğrileri. E-10: 10 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan E-NP; S-10: 10 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan S-NP. 63

Şekil 4.25. A) EE'den sentezlenen AgNP'lerin (ENP) TEM görüntüsü (8-26nm) **B)** 2°C/dk hızda kalsine edilen E-NP'lerin (EE-2C) TEM görüntüsü (9-15nm) **C)** 10°C/dk hızda kalsine edilen E-NP'lerin (EE-10C) TEM görüntüsü (11-26nm). 69

Şekil 4.26. D) SE'den sentezlenen AgNP'lerin (SNP) TEM görüntüsü (6-32nm). **E)** 2°C/dk hızda kalsine edilen S-NP'lerin (SE-2C) TEM görüntüsü (10-25nm) **F)** 10°C/dk hızda kalsine edilen S-NP'lerin (SE-10C) TEM görüntüsü (4-21nm). 69

Şekil 4.27. *Vitex agnus-castus* bitkisinin yaprağı, su ekstraktı (SE), SE ile sentezlenen SNP ve kalsinasyon uygulanmış örneklerin (SE-2C ve SE-10C) FTIR spektrumlarının karşılaştırılması. 70

Şekil 4.28. *Vitex agnus castus* bitkisinin yaprağı, %60 etanol ekstraktı (EE), EE ile sentezlenen E-NP ve kalsinasyon uygulanmış örneklerin (EE-2C ve EE-10C) FTIR spektrumlarının karşılaştırılması. 71

Şekil 4.29. 0-420s aralığında kullanılan AChE enzimine ait standart kalibrasyon grafiği 72

Şekil 4.30. AChE enzimi için çizilen Michaelis-Menten grafiği (n:3). 74

Şekil 4.31. AChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (n:3). 75

Şekil 4.32. Ekstrakt ve AgNP'lerin AChE enzim inhisyonları kıyaslaması (Standart hata: SE ±, n:5). 77

Şekil 4.33. Rosmarinik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 82

Şekil 4.34. Luteolinin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 83

Şekil 4.35. Klorojenik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 84

Şekil 4.36. Siyanidin-3-glukozidin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 85

Şekil 4.37. Viteksinin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görseli. 86

Şekil 4.38. Kerasiyaninin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 87

Şekil 4.39. Ferulik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 88

Şekil 4.40. p-Koumarik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 89

Şekil 4.41. Vanilik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 90

Şekil 4.42. 4-hidroksibenzoik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 91

Şekil 4.43. Vanillinin 4EY/ ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 92

Şekil 4.44. Kuinik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görsellerii. 93

Şekil 4.45. Fumarik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri. 94

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. AChE inhibitörü olarak kullanılan FDA onaylı ilaçlar.....8

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi.....21

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi. 22

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan yazılım programlarının listesi. 23

Çizelge 3.4. AChE inhibisyon tayininde kullanılan reaksiyon karışımı içerikleri ve yüzde inhibisyon hesaplamasında kullanılan deneysel gruplar 31

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan13 ligand ve PubChem CID'leri. 33

Çizelge 4.1. *Vitex agnus-castus* bitkisinin etanol ve su ekstraktlarına ait UHPLC-MS/MS analizi sonuçları.....39

Çizelge 4.2. *Vitex agnus-castus* bitkisinin toplam fenolik ve flavonoid bileşen değerleri (n=5).....43

Çizelge 4.3. Farklı pH koşullarında sentezlenen S-NP'lerin DLS, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.....64

Çizelge 4.4. Farklı pH koşullarında sentezlenen ENP numunelerinin DLS (pik boyutu), PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.....65

Çizelge 4.5. Sentezlenmiş AgNP'ler ve TGA ile elde edilen ürünlerin zeta potansiyel ve DLS sonuçları.....66

Çizelge 4.6. pH ve ekstrakt tipine bağlı olarak AgNP'lerin kolloidal (DLS, ζ-potansiyel) ve optik (λ_{max}, A_{max}, FWHM) özellikleri 67

Çizelge 4.7. Ekstrakt ve AgNP'lerin (6,25-100 µg/mL derişim aralığında) AChE enzim üzerinde % inhisyon verileri. 76

Çizelge 4.8. Seçilen ligandarın Vina programı ile hesaplanan ΔG (kcal/mol) değerleri. 78

Çizelge 4.9. DSV ile görselleştirilen bağlar ve etkileşimler.....79

Çizelge 4.10. USCF Chimera ile hesaplanan H-bağları verileri.....80

Çizelge 4.11. DSV ve USCF Chimera çıktılarının kıyaslaması 95

1.GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), ilerleyici nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Hastalık kendini bellek, yürütücü işlevler ve davranış üzerinde yıkıcı sonuçlar doğuran, birey ve toplum düzeyinde ise çok boyutlu yük oluşturan bir klinik tablo şeklinde göstermektedir. AH, demansa en çok neden olan hastalıkların başında gelmekte olup olguların %60-70'inden sorumlusu olduğu düşünülmektedir. Küresel ölçekte 2021 yılında demansla yaşayan kişi sayısının 57 milyon iken her yıl yaklaşık 10 milyon artmaktadır. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde bu artış ciddi bir şekilde görülmektedir. Modern dünyada insan yaşam süresinin uzaması ve yaşlı nüfus oranının artmasıyla birlikte AH'nin prevalansının sürekli olarak artacağı öngörülmektedir. Bu epidemiyolojik eğilim bakım altyapısı, sosyal güvenlik sistemleri ve üretken iş gücünün kaybı nedeniyle makroekonomik etkiler doğurmaktadır (WHO, 2025).

AH'nın ekonomik ve toplumsal maliyeti, doğrudan sağlık harcamalarının ötesinde uzun dönem bakım, informal bakım emeği ve dolaylı üretkenlik kayıplarıyla büyüyen bir toplam yük şeklinde ortaya çıkmaktadır. DSÖ verilerine göre demansın küresel ekonomik maliyeti 2019 yılında yaklaşık 1,3 trilyon ABD dolarına ulaşmıştır (WHO, 2025).

Küresel maliyet tahminleri, yöntem farklılıkları bulunmakla birlikte 2019 yılı için benzer büyüklüklerde raporlanmakta, informal bakımın toplam maliyet içindeki payının yüksek olduğu özellikle belirtilmektedir (Wimo vd., 2023). Ayrıca literatürde, demansla ilişkili maliyetlerin 2030 yılına giderken doğru daha da artacağı ve trilyon dolar ölçeğinde büyüyeceğine dair projeksiyonlar yer almaktadır (Nandi vd., 2022) Ülke ölçeğinde örneklendiğinde, ABD'de 65 yaş üzeri AH'ına bağlı demansı ile yaşayan kişi sayısının 2024 yılı itibarıyla yaklaşık 6,9 milyon olduğu; 65 yaş üzeri demans popülasyonu için 2024 yılı toplam sağlık hizmeti, uzun dönem bakım ve hospis ödemelerinin 360 milyar dolar düzeyinde tahmin edildiği bildirilmiştir (Alzheimer's Association, 2024). Bu veriler, AH'nın sadece bir nörolojik hastalık değil; sürdürülebilirlik ve sağlık politikası açısından yönetilmesi gereken maliyetli bir durum olduğunu ortaya koymaktadır.

AH'de mevcut tedavi yaklaşımlarının temel sınırlılığı, hastalığı tamamen durduran veya geri döndüren bir küratif seçeneğin halen bulunmamasıdır. Klinik pratikte uzun yıllardır kullanılan semptomatik tedaviler, kolinesteraz inhibitörleri (örn. donepezil, rivastigmin, galantamin) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri (örn. Memantin) içermektedir. Bu ajanlar, belirli hasta alt gruplarında bilişsel semptomlarda sınırlı iyileşme veya stabilizasyon sağlayabilmektedir (WHO, 2025). Ancak semptomatik etkinliğe karşın, bu ilaçların tolerabilite sorunları ve yan etki profilleri klinik yönetimde belirleyici olmaktadır. Etken maddelerden donepezil için bulantı, ishal, uykusuzluk, kusma, kas krampları, yorgunluk ve iştahsızlık gibi yan etkileri bilinmektedir. Memantin kullanımının en sık görülen yan etkileri arasında baş dönmesi, baş ağrısı, konfüzyon ve konstipasyon buluınmaktadır. Rivastigmin için özellikle doz başlama ve doz artış dönemlerinde bulantı-kusma gibi gastrointestinal yan etkilerinden dolayı kilo kaybı görülebildiği düzenleyici dokümanlarda vurgulanmaktadır.

Son yıllarda anti-amiloid monoklonal antikorlar gibi hastalık-modifiye edici stratejiler klinik gündeme girse de bu ajanların uygulama ve izleme gereksinimleri ve güvenlilik profili yaygın kullanımın önünde klinik ve sistemik bariyerler oluşturabilmektedir (Honig vd., 2024). Dolayısıyla AH'de mevcut tedavilerin yetersizliği

yalnızca etkinlik düzeyiyle değil aynı zamanda güvenlilik, erişilebilirlik, izlem altyapısı ve maliyet parametreleriyle birlikte değerlendirilmelidir.

Bu çerçevede bitkisel kökenli biyoaktif bileşikler, yani fitokimyasallar, AH patogenezinin çok hedefli doğası sayesinde alternatif ve yeni ilaç keşfi perspektifinden dikkat çekmektedir. AH'de oksidatif stres, nöroenflamasyon, sinaptik disfonksiyon, protein agregasyonu ve kolinerjik iletide bozulma gibi birden fazla mekanizmanın eşzamanlı rol oynadığı kabul edilmektedir. Tek bir hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının kısıtlı kalması nedeniyle, araştırmacıların çoklu mekanizmalar üzerinden etki gösteren aday fitokimyasallara yönelmesi daha doğru bir strateji olarak görülmektedir (Piccialli vd., 2022).

Polifenoller başta olmak üzere çeşitli fitokimyasal sınıflar, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra kolinesteraz hedeflemesi yoluyla bilişsel semptomlara katkı sağlayabilecek biyolojik aktiviteler sergileyebilmektedir. Bu nedenle AChE inhibisyonu açısından farklı polifenollerin aktivite ilişkilerinin üzerine kapsamlı derlemeler bulunmaktadır (Jabir vd., 2018). Ancak fitokimyasalların klinik başarıya ulaşmasının önünde bazı engeller vardır. Bunlardan bazıları düşük biyoyararlanım, hızlı metabolik dönüşüm ve kan-beyin bariyerini aşamama gibi önemli kısıtlamalardır. Nanoteknoloji tabanlı taşıyıcı sistemler, bu engelleri aşarak fitokimyasalların biyomedikal potansiyelini daha uygulanabilir hale getirmektedir.

Nanoparçacıklar, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, ayarlanabilir yüzey kimyası ve fonksiyonlandırma olanakları sayesinde, nörodejeneratif hastalıklarda hedefleme, kontrollü salım ve biyolojik bariyerleri aşma gibi başlıklarda yenilikçi çözümler sunabilmektedir. Altın ve gümüş nanoparçacıklar gibi inorganik nanosistemlerin, uygun yüzey modifikasyonlarıyla kan-beyin bariyerini geçebildiği, oksidatif stres ve amiloid-beta agregasyonu gibi süreçlerde nöroprotektif çıktılarla ilişkilendirilmekle birlikte şekil ve yüzey özelliklerinin biyolojik yanıtı etkileyebildiği bilinmektedir (Scarpa vd., 2023).

AH için geliştirilen nano-tedavi konseptinde, nano-taşıyıcıların hedefli ilaç taşınmasında kullanımı kadar AgNP'ler gibi bazı nanoparçacıkların doğrudan biyolojik aktiviteleri üzerinden de değerlendirmeler mevcuttur (Lekha vd., 2021). Spesifik olarak AgNP'ler, AChE inhibisyonu ve oksidatif stres modülasyonu gibi AH ile ilişkili mekanizmalarda deneysel düzeyde umut verici sonuçlar vermektedir.

Yeşil sentez ile elde edilen AgNP'lerin sporadik Alzheimer sıçan modelinde tanıma ve uzamsal bellek defisitleri üzerinde önleyici etki gösterebildiği bildirilen çalışmalar bulunmaktadır (Zhang vd., 2020). Bununla birlikte, AgNP'lerin nörotoksisite potansiyelinin doz, partikül boyutu ve yüzey kaplamasına bağlı olarak değişebilen önemli bir biyolojik risk olduğu bildirilmektedir. Bu bağlamda, yeşil sentezle üretilen AgNP'lerde dahi doz bağımlı toksisite olasılığına dikkat çekilmektedir (Tareq vd.,2022). Bu nedenle AgNP'lerin AH bağlamındaki kullanılabilirliği, yalnızca etkinlik sinyalleriyle değil aynı zamanda standardize karakterizasyon, güvenlilik profili ve biyouyumluluk değerlendirmeleriyle birlikte ele alınmalıdır (Piccialli vd., 2022; Scarpa vd., 2023; Tareq vd., 2022).

Yeşil sentez yaklaşımları, özellikle biyomedikal uygulama hedefli metal nanoparçacık geliştirmede, toksik indirgeme ajanlarına ve agresif reaksiyon koşullarına

olan bağımlılığı azaltması sayesinde stratejik bir avantaj sunmaktadır. Bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenoidler ve diğer ikincil metabolitler hem indirgeme ajanı hem de kaplayıcı rolü üstlenerek, yüzeyde biyouyumlu bir biyokaplama oluşmasını sağlar. Bu yaklaşım, konvansiyonel kimyasal sentezlerde ortaya çıkabilen toksik reaktif kalıntılarını ve çevresel yükü azaltma potansiyeli sayesinde, yeşil kimya prensipleriyle uyumlu bir üretim yöntemi sunmaktadır (Iravani, 2011). Biyolojik varlıklar aracılığıyla nanoparçacık sentezi yapılırken sert, toksik ve pahalı kimyasalların kullanılmadığı alternatif bir teknoloji olarak sınıflandırılır ve sürdürülebilirlik açısından dikkatleri üzerine çektiği kapsamlı derlemelerde vurgulanmaktadır (Shah vd., 2015).

AH gibi kronik, uzun süreli ve kırılgan hasta popülasyonlarını ilgilendiren bir alanda, üretim sürecinin çevre dostu olması ve ürünün biyouyumluluğunun güçlendirilmesi aynı zamanda yan etki risklerinin minimize edilerek farmasötik standardizasyonun sağlanması kritik hedeflerdir. Bu nedenle, fitokimyasal zenginlik taşıyan bitkisel ekstraktlarla yeşil sentezlenen AgNP'lerin, bir yandan sürdürülebilir nanomalzeme geliştirme yaklaşımı sunarken, diğer yandan kolinerjik hedefler ve oksidatif stres gibi patojenik eksenler üzerinden Alzheimer hastalığına ilişkin biyolojik etki potansiyeli taşıması tez kapsamında hem bilimsel gerekçe hem de uygulama değeri açısından anlamlı bir araştırma hattı oluşturmaktadır (Iravani, 2011).

Bu tez çalışmasının amacı; *Vitex agnus-castus* L. bitkisinden elde edilen etanol ve su ekstraktlarının, ayrıca bu ekstraktlar kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen gümüş nanoparçacıklarının asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerini in vitro koşullarda ortaya koymak ve ekstrakt-AgNP sistemleri arasında inhibisyon düzeyi açısından karşılaştırmalı değerlendirme yapmaktır.

Yeşil sentez sürecinde, ekstrakt içeriğinde bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler ve diğer indirgeyici kompleksler, Ag^+ iyonlarını indirgerken aynı zamanda oluşan AgNP'lerin yüzeyine adsorbe olarak bir kaplama (capping) tabakası meydana getirmektedir. Bu organik kaplama AgNP'lerin fonksiyonel gruplarını, yüzey yükünü, hidrodinamik çapı ve kolloidal sistemin stabilitesini üzerinden belirleyici bir rol oynamaktadır. Nanoparçacıkların AChE ile gerçekleştirdiği etkileşimleri (elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi) AgNP'lerin ettkinliğini etkilemektedir.

Dolayısıyla bu çalışma, elde edilen inhibisyon sonuçlarının hem fitokimyasal içerik hem de AgNP'lerin fizikokimyasal özellikleri ile ilişkili olabileceği hipotezini sınamaktadır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif hastalıkların en yaygın formu olup ekstrasellüler amiloid-β (Aβ) plakları ve hücre içi hiperfosforile tau proteinlerinden oluşan nörofibriler yumakların (NFY) birikimi ile karakterizedir. Bu patolojik yapılar dışında sinaptik ve nöronal kayıp ile belirgin gliyoz da hastalığın tanımınlayıcı özellikleri arasında yer almaktadır (Long & Holtzman, 2019). Alois Alzheimer'ın 20. yüzyılın başlarında yaptığı ilk tanımlamasından bu yana AH hem klinik hem de sosyal açıdan ciddi bir sağlık sorunu hâline gelmiş olup günümüzde hâlâ kesin bir tedavisi bulunmamaktadır.

Klinik yaklaşımlarda Alzheimer hastalığı, başlangıçta kısa süreli bellek bozukluğu ve erken amnestik bilişsel gerilemeyle ilişkilidir. Depresif ruh hali, anksiyete ve apati ile ilerleyen aşamalarla kendini gösterir. Hastalığın orta ve ileri evrelerinde ajitasyon, delüzyon, halüsinasyon ve uyku bozuklukları gibi daha kompleks davranışsal bozukluklar görülmektedir (Livingston vd., 2020; Lyketsos vd., 2011).

Tarihsel olarak AH'nın tanısı, belirgin bilişsel gerileme ve günlük yaşam aktivitelerini etkileyen nörodavranışsal semptomlarla karakterize demans evresine odaklanılarak konulmaktaydı (Scheltens vd., 2021) . Jack ve arkadaşları, AH'yi klinik bir sendrom olarak ele almak yerine Aβ birikimi, patolojik tau ve nörodejenerasyon biyobelirteçlerine dayalı bir biyolojik çerçevesi önermiştir (Jack vd., 2018). Bu modele göre AH tanısı esas olarak Aβ ve fosforile tau varlığı ile doğrulanır. ATN yaklaşımı, AH'nin diğer demans türlerinden biyolojik açıdan ayrılmasını sağlar.

Son yıllarda beyin omurilik sıvısı (BOS) ölçümleri**,** Pozitron Emisyon Tomografisi **(**PET) ve nörogörüntüleme temelli biyobelirteçlerin klinik kullanıma girmesi, hastalığın daha erken ve daha doğru biçimde tanımlanmasına önemli katkı sağlamıştır. Bu bağlamda Jack ve arkadaşları**,** AH'nın yalnızca klinik bir sendrom olarak ele almak yerine Aβ birikimi (A)**,** patolojik tau (T) ve nörodejenerasyon (N) biyobelirteçlerine dayanan AT(N) adlı biyolojik sınıflama çerçevesini önermiştir (Jack vd., 2016; Jack vd., 2018). AT(N) yaklaşımında A, amiloidopatinin (BOS'da Aβ42 düşüklüğü ve amiloid PET pozitifliği), T, tauopatinin (BOS'da fosforile-tau artışı ve tau PET pozitifliği) ve N, nöronal hasarın göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu modele göre, AH'nın biyolojik olarak doğrulanması özellikle Aβ patolojisi ile patolojik tau bulgularının birlikte saptanmasıyla güçlü biçimde desteklenir. Bu nedenle AT(N) yaklaşımı, AH'nin diğer demans türlerinden biyolojik açıdan ayrıştırılmasına olanak sağlamaktadır.

Jack ve arkadaşları ayrıca, sağlıklı bireylerden demans fazına uzanan süreçte biyobelirteçlerin dinamik değişimlerini tanımlayan bir model sunmuşlardır. Bu modele göre AH üç evrede ilerler: semptomsuz evre, prodromal evre (hafif bilişsel bozukluk, MCI) ve demans evresi (Jack vd., 2018). Aβ patolojisi, klinik belirti başlangıcından yaklaşık 15-20 yıl önce ortaya çıkmaktadır (Bateman vd., 2012). Beyin omurilik sıvısında artan tau düzeyleri nöronal hasarı gösterirken, hastalık şiddetiyle ilişkilidir. Ayrıca, F-18-FDG PET (F18-Florodeoksiglukoz-Pozitron Emisyon Tomografisi) görüntüleme sinaptik disfonksiyonun güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Manyetik rezonans

görüntüleme (MRI) ise ilerleyen evrelerde belirginleşen beyin atrofisini nicel olarak göstermektedir (Jack vd., 2010).

2.1.1. Alzheimer hastalığının patolojisi

Alzheimer hastalığının patolojisi, ilerleyici nörodejenerasyonla karakterize olup temel olarak sinaptik kayıp, nöronal ölüm ve serebral korteks ile hipokampusta belirgin atrofi ile tanımlanır (Lyketsos vd., 2011). Hastalığın erken evrelerinde sinaptik disfonksiyonunun klinik belirtilerden önce ortaya çıktığı ve hafıza ile öğrenme süreçlerini bozan temel faktör olduğu kabul edilmektedir (DeKosky ve Scheff, 1990). Patolojik süreçler amiloid-β plaklarının birikimi, hiperfosforile tau proteinlerinden oluşan nörofibriler yumakların artışı ve oksidatif stres mekanizmaları etrafında şekillenmektedir (Querfurth & LaFerla, 2010). Aβ plaklarının ekstrasellüler ortamda birikmesi nedeniyle nöronal iletinin bozulduğu ve inflamatuvar yanıtın tetiklendiği görülmektedir (Hardy ve Selkoe, 2002). Aynı şekilde tau proteinindeki anormal fosforilasyon, mikrotübül stabilitesini ortadan kaldırarak aksonal taşımayı bozmakta ve nöronlarda işlev kaybına neden olmaktadır (Iqbal vd., 2016).

Bunun birlikte beyindeki kolinerjik sistemde belirgin bir bozulma meydana gelmekte ve özellikle bazal ön beyindeki kolinerjik reseptörlerin dejenerasyonu bilişsel kayıpların temel nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir (Francis vd., 1999). Sonuç olarak Alzheimer hastalığı çok faktörlü bir patolojik ilerleyiş göstermekte ve bu nedenle tek bir mekanizma bu hastalığı tam olarak açıklamakta yetersiz kalmaktadır (Long ve Holtzman, 2019).

2.1.2. Tau hipotezi

Tau hipotezi, Alzheimer hastalığının temel patolojik mekanizmalarından birinin hiperfosforile tau proteininin neden olduğu mikrotübül destabilizasyonu olduğunu ileri sürmektedir (Iqbal vd., 2016). Tau proteininin normal koşullarda mikrotübüllere bağlanarak aksonal taşımayı stabilize ettiği, fakat anormal fosforilasyon sonucunda bu işlevini kaybederek toksik agregalara dönüştüğü bilinmektedir (Y. Wang ve Mandelkow, 2015). Bu toksik birikimler nörofibriler yumakları oluşturarak nöronların fonksiyonlarında geri dönüşümü olmayan kayıplara neden olur (Arriagada vd., 1992). Tau patolojisinin beyin bölgelerine yayılımının Braak evrelemesi ile ilişkili olması, hastalığın klinik ilerleyişini açıklamada önemli bir kanıt sağlamaktadır (Braak ve Braak, 1991).

Bazı araştırmalar, tau birikiminin amiloid birikiminden daha güçlü şekilde nörodejeneratif süreçlerle ilişkili olduğunu ileri sürerek tau proteinlerinin modifikasyonu hastalığın doğrudan belirleyicisi olabileceğini öne sürmektedir (Musiek ve Holtzman, 2015). Tau proteininin kendiliğinden yayılma ve yakın nöronlara aktarılma kapasitesi, hastalığın progresyonunu hızlandıran prion-benzeri bir mekanizma varlığını düşündürmektedir (Goedert vd., 2017). Güncel çalışmalar, tau agregasyonunun engellenmesine yönelik terapötik stratejilerin Alzheimer tedavisinde umut verici olduğunu göstermektedir (Congdon ve Sigurdsson, 2018).

2.1.3. Amiloid kaskad hipotezi

Amiloid kaskad hipotezi, Alzheimer hastalığının temel nedeni olarak amiloid-β (Aβ) plaklarının beyinde aşırı birikmesini gösteren en eski ve en çok kabul gören patolojik modeli ifade eder (Hardy ve Selkoe, 2002). Hipoteze göre Aβ42 izoformunun oligomerleşmesi sinaptik toksisiteyi tetikler ve ilerleyen aşamalarda mikrogliyal aktivasyon ile inflamasyon süreçleri başlar (Selkoe ve Hardy, 2016). Bu toksik oligomerler nöronal iletiyi bozarak hafıza merkezlerinde işlev kayıplarına yol açar (Walsh ve Selkoe, 2007). Aβ plak birikiminin tau patolojisini tetiklediği, mikrotübül destabilizasyonunu hızlandırdığı ve nöronal bütünlüğü bozduğu deneysel modellerle gösterilmiştir (Bloom, 2014). Plak birikiminin erken yaşlarda başlamasına rağmen klinik belirtilerin yıllar sonra ortaya çıkması, nörodejenerasyonunun yavaş ve kademeli ilerlediğini desteklemektedir (Jack vd., 2013).

Genetik mutasyonlar (APP, PSEN1, PSEN2) ile ilişkili erken yaşlarda görülen Alzheimer vakaları, hipotezin moleküler temellerini güçlendirmektedir (Goate vd., 1991). Yeni biyobelirteç çalışmaları PET görüntüleme ile amiloid yükünün hastalığın tanısında kritik rol oynadığını ortaya koymuştur (Villemagne vd., 2018). Buna rağmen bazı araştırmacılar amiloid birikiminin tek başına patogenezi açıklamakta yetersiz olduğunu savunarak daha bütüncül modeller geliştirmektedirler (G. P. Morris vd., 2018).

2.1.4. Kolinerjik hipotez

Kolinerjik hipotez, Alzheimer hastalığındaki bilişsel bozulmanın temel nedeninin kolinerjik nöronların kaybı ve asetilkolin düzeyinin azalması olduğunu öne sürmektedir (Bartus vd., 1982). Bazal ön beyindeki nöronlarda görülen belirgin dejenerasyonun, nedeniyle hafıza, dikkat ve öğrenme süreçlerinde ciddi gerilemelere yol açtığı gösterilmiştir (Coyle vd., 1983). Asetilkolin sentezinde görevli kolin asetiltransferaz (ChAT) enziminin aktivitesinde azalma, hastalığın şiddetiyle doğru orantılı bir şekilde seyretmektedir (Perry vd., 1977). Postmortem beyin analizlerine dayanan çalışmalara göre Alzheimer hastalarında kolinerjik reseptör yoğunluklarının azaldığı ve sinaptik iletinin ciddi ölçüde bozulduğu tespit edilmiştir (Francis vd., 1999).

Bu bulgular, günümüzde kullanılan kolinesteraz inhibitörlerinin (donepezil, rivastigmin, galantamin) geliştirilmesine temel oluşturmuştur. Kullanılan ilaçların büyük bir kısmı Alzheimer hastalığında belirginleşen kolinerjik nörotransmisyon kaybını farmakolojik olarak hedefleyerek bilişsel işlevleri korumayı ve geri kazanmayı amaçlamaktadır. Klinik çalışmalar, bu inhibitörlerin özellikle hafif ve orta evre hastalarda semptomatik iyileşme sağladığını ve günlük yaşam aktivitelerinde sınırlı da olsa anlamlı düzeyde bir stabilizasyon yaratabildiğini göstermektedir (Birks, 2006).

Kolinerjik hipotez tek başına hastalığı açıklamakta yetersiz olsa da diğer patolojik süreçlerle ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Schliebs & Arendt, 2011). Özellikle amiloid ve tau patolojisinin kolinerjik sistemi daha da zayıflattığı gösterilmiştir (Hampel vd., 2018). Bu nedenle kolinerjik disfonksiyon Alzheimer patogenezinin multifaktöriyel modelinde önemli bir bileşen olarak yer almaktadır.

2.1.5. Kolinerjik sistem ve Alzheimer hastalığı

Asetilkolinesteraz enzimi merkezi ve periferik sinir sistemlerindeki kolinerjik sinapslarda asetilkolini (ACh) saniyenin çok küçük bir bölümünde parçalayarak sinir iletimini durduran çok önemli bir enzimdir. Enzimin etkinliği, benzersiz üç boyutlu yapısına bağlı difüzyon hızıyla sınırlıdır. Kristal yapı çalışmaları, enzimin α/β hidrolaz katlanma modeline ve yaklaşık 20 Å derinliğinde dar, hidrofobik bir "aromatik boğaza" sahip olduğunu göstermektedir (Sussman vd., 1991). Bu boğazın yüzeyleri boyunca yer alan 14 aromatik amino asit kalıntısı substratın aktif bölgeye yönlendirilmesine yardımcı olur. Trp86 ve Phe330 gibi kalıntılar, pozitif yüklü amonyum grubuna sahip ACh, katyon-π etkileşimleri yoluyla stabilize ederek katalitik bölgeye taşımaktadır (Soreq vd., 2001).

AChE'nin aktif merkez yarığında iki temel etkileşim bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler katalitik aktif bölge (CAS) ve periferik anyonik bölgelerdir (PAS). CAS, substrat hidrolizinin gerçekleştiği derin aktif merkezi ifade eder ve insan AChE enziminde bu bölge Ser203, His440 ve Glu334 kalıntılarından oluşan katalitik üçlüyü içerir. Bu yapıda Ser203, substratın karbonil karbonuna nükleofilik saldırı başlatarak enzim-substrat ara ürününün oluşumunu sağlar. Reaksiyon sırasında oluşan negatif yüklü tetrahedral ara ürün ise Gly121, Gly122 ve Ala204'ün omurga amid grupları tarafından oluşturulan oksianyon deliği aracılığıyla hidrojen bağları ile stabilize edilir. Böylece geçiş durumu enerjisi düşürülerek hidroliz hızı artırılır (Colletier vd., 2006; Tougu, 2001).

CAS bünyesindeki anyonik ve kolin bağlanma alt bölgeleri, enzimin katalitik verimini ve inhibisyon profilini belirleyen kritik unsurlardır. Yarık girişinde yer alan PAS bölgesi ise ligandların enzimle ilk karşıladığı bölge olup Trp286, Tyr72, Tyr124 ile Asp74 gibi kalıntıları içerir. PAS, substratın yarığa girişini kolaylaştırmanın yanı sıra, AH ile ilişkili Aβ agregasyonunu tetikleyebilen bir şablon yüzeyi görevi görerek enzimin kolinerjik olmayan işlevlerini de etkilemektedir (Johnson ve Moore, 2006).

Enzimin substrat seçiciliği, Phe295 ve Phe297 kalıntıları tarafından şekillendirilen açil cebine bağlıdır. Bu bölge, bütiril gibi daha büyük grupların girişini sınırlayan yapısal bir bariyer oluşturarak AChE'yi bütirilkolinesterazdan (BChE) ayırır (Silman ve Sussman, 2005). Bu nedenle modern farmakolojik stratejiler hem CAS hem de PAS bölgelerini eş zamanlı hedefleyebilen çift bağlanma bölgeli moleküllerin tasarımı üzerine yoğunlaşmıştır. Bu yaklaşım, nörotransmitter düzeylerini optimize ederken enzim aracılı amiloid plak oluşumunun azaltılmasına da olanak sağlamaktadır (Munoz-Torrero, 2008).

2.1.6. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar

Günümüzde Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde en yaygın kullanılan farmakolojik yaklaşım, kolinerjik hipoteze dayanan AChE inhibitörlerinin kullanımıdır. çizelge 2.1'de detaylandırıldığı üzere, bu ilaç grubu temel olarak sinaptik aralıktaki AChE enzimini inhibe ederek asetilkolin hidrolizinin azalmasını ve buna bağlı olarak sinaptik boşluktaki kolinerjik iletiyi güçlendirmeyi amaçlamaktadır.

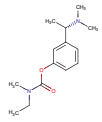
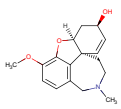
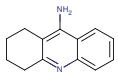
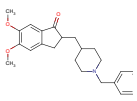
Bu kapsamda FDA onayı alan ilk moleküllerden biri olan Takrin (Cognex), 1993 yılında klinik kullanıma girmiş olsa da belirgin hepatotoksisite riski ve ciddi gastrointestinal yan etkileri nedeniyle günümüzde yerini daha güvenli türevlere

bırakmıştır. 1990'lı yılların sonu ve 2000'li yılların başında onaylanan Donepezil, Rivastigmin ve Galantamin gibi yeni nesil inhibitörler kullanılmaya başlanmıştır.

Rivastigmin hem asetilkolinesteraz hem de bütirilkolinesteraz enzimlerini inhibe ederek kolinerjik fonksiyonu artırırken Galantamin, AChE inhibisyonuna ek olarak nikotinik reseptörler üzerinde allosterik modülasyon sağlayarak iletimi çift yönlü desteklemektedir. Ancak bu ajanların kullanımı sırasında bulantı, kusma, ishal ve iştahsızlık gibi kolinerjik aşırılığa bağlı yan etkiler sıklıkla gözlemlenmektedir. Özellikle bradikardi ve iletim bozukluğu olan hastalarda kardiyak riskler nedeniyle dikkatli bir klinik takip gerekmektedir (Young vd., 2021).

Literatürde bu ilaçların hastalığın progresyonunu tamamen durduramadığı, ancak yaşam kalitesini ve günlük yaşam aktivitelerini sürdürmede kritik bir rol oynadığı vurgulanmaktadır (Weller ve Budson, 2018).

Çizelge 2.1. AChE inhibitörü olarak kullanılan FDA onaylı ilaçlar

İlaç	Etki mekanizması	FDA onay yılı (ABD)	Yan etkiler	Etken kimyasal
Rivastigmin (Exelon; Exelon Patch)	Kolinerjik fonksiyonu artırır; kolinesteraz ile asetilkolin hidrolizini geri dönüşümlü inhibe ederek ACh'i artırır.	2000	Bulantı, ishal, uykusuzluk, kusma, kas krampları, yorgunluk, iştahsızlık ve bradikardi/kalp bloğu riski.	
Galantamin (Reminyl/Razadyne)	Yarışmalı ve geri dönüşümlü AChE inhibitörü; ACh'i artırarak kolinerjik iletimi güçlendirir.	2001	Bulantı, kusma, ishal, iştah azalması, kilo kaybı ve vagotoniye bağlı bradikardi ve negatif iletim etkileri görülebilir.	
Takrin (Cognex)	AChE inhibisyonu ile kolinerjik iletimi artırır	1993	Gastrointestinal, kolinerjik etkiler ve ciddi hepatotoksisite riski nedeniyle bu ilacın kullanımından vazgeçilmiştir.	
Donepezil (Aricept)	Kolinerjik fonksiyonu artırır; AChE ile asetilkolin hidrolizini geri dönüşümlü inhibe ederek sinaptik ACh'i artırır.	1996	Bulantı, ishal, uykusuzluk, kusma, kas krampları, yorgunluk, iştahsızlık; ayrıca bradikardi/kalp bloğu riski.	

Çizelge 2.1'de özetlenen AChE inhibisyonuna bağlı olarak periferik kolinerjik uyarılma, özellikle bulantı-kusma, ishal, abdominal rahatsızlık, iştah azalması ve kilo kaybı gibi gastrointestinal yan etkilerle klinik kullanımı sınırlayabilmektedir. Ek olarak kardiyak iletim üzerindeki etkileri nedeniyle ortaya çıkabilecek bradikardi ve buna eşlik eden düşme riskindeki artış olasılığı, klinik açıdan dikkate alınması gereken bir güvenlilik başlığıdır (Park-Wyllie vd., 2009). Bu çerçevede çizelge 2.1'de bir yandan AChE

inhibitörlerinin klinikte yerleşik semptom kontrolü yaklaşımını ve beklenen yan etki profilini görünür kılarken, diğer yandan daha iyi tolere edilebilen çoklu hedefe yönelen fitokimyasalların ve nanoparçacıkların araştırılmasını gerekçelendiren farmakolojik boşluğu da ortaya koymaktadır.

2.2 *Vitex agnus-castus* Bitkisi ve Özellikleri

Vitex agnus-castus, Lamiaceae familyasına ait, özellikle Akdeniz Havzası, Güney Avrupa ve Batı Asya'da doğal olarak yetişen aromatik bir tıbbi bitki türüdür. Geleneksel tıpta binlerce yıldır kullanılmakla birlikte hormonal düzenleyici etkilerinden dolayı özellikle tercih edilen fitoterapötik bir türdür. Yaprak, meyve ve çiçekleri yüksek miktarda fitokimyasal içerdiğinden dolayı framakolojik çalışmalarda oldukça fazla kullanılmaktadır (Daniele vd., 2005; Niroumand vd., 2018).

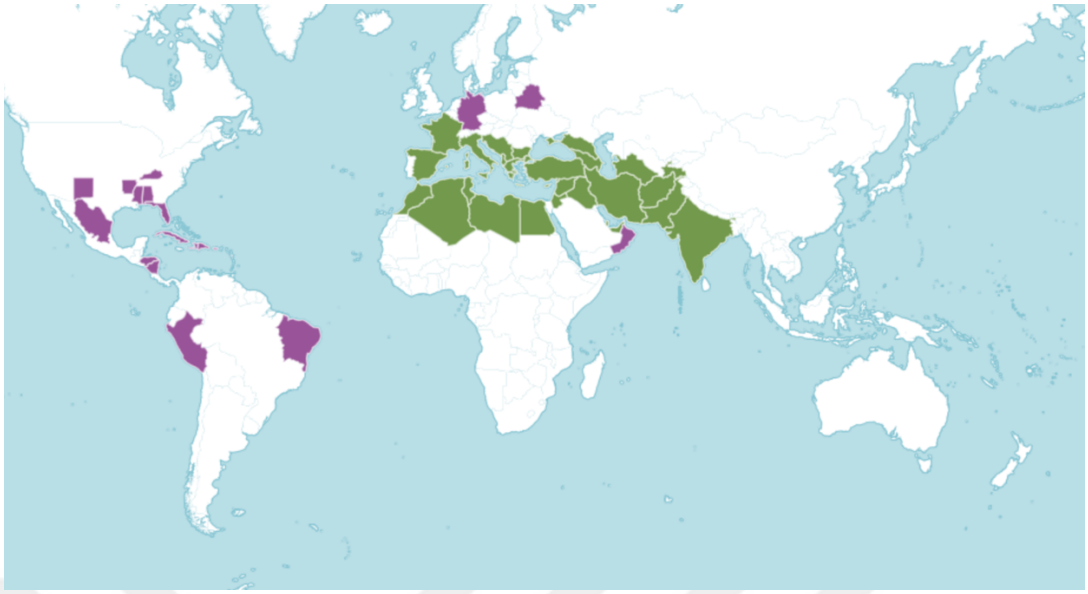
2.2.1 Taksonomisi ve morfolojisi

Vitex agnus-castus, Lamiaceae familyasına ait, çalı formunda gelişen çok yıllık bir bitkidir ve bu türün taksonomik konumu literatürde ayrıntılı biçimde tanımlanmıştır (Cantino ve Sanders, 1986). Taksonomik olarak bitki; Alem: Plantae, Sınıf: Magnoliopsida, Takım: Lamiales, Familya: Lamiaceae, Cins: Vitex, Tür: *V. agnus-castus* şeklinde sınıflandırılmakta olup bu sınıflandırma modern botanik kaynaklarca da doğrulanmaktadır (Chase vd., 2016).

Vitex agnus-castus'un yaprakları şekil 2.2'deki görüldüğü gibi karşılıklı diziliş gösteren çoğunlukla 5–7 yaprakçıktan oluşan elsi (palmat) bileşik yapıdadır ve bitkiye özgü belirgin aromatik koku, uçucu bileşenler ile ilişkilendirilmektedir (Rani ve Sharma, 2013). Ayrıca, ikincil metabolitlerin yaprak ve meyve yüzeyindeki trikom yapılarında lokalize olabildiği bildirilmiş olup bu durum bitkinin kokusal ve biyolojik açıdan aktif kimyasıyla uyumlu bir mikroyapısal özellik olarak değerlendirilmektedir (Heskes vd., 2018).

Türün çiçekleri genellikle ilkbahar sonu ve yaz döneminde belirginleşir. Mor-lila tonlarında çiçekler uzun salkım (panikula) tipi çiçek durumları üzerinde toplanarak dekoratif bir görünüm oluşturur (Adamov vd., 2022). Olgun meyveler küçük, küresel biçimde koyu kahverengi renkli drupa tipinde olmaktadır. Fitoterapötik uygulamalarda "agnus castus fruit" olarak tanımlanan olgun ve kurutulmuş meyve drogunu oluşturmaktadır. Böylelikle farmakope monograflarında yer alan ve klinik preparatların ana hammaddesi kabul edilen bitki kısmıdır (European Medicines Agency [EMA], 2018).

Ekolojik yönden bakıldığında *Vitex agnus-castus*, kuraklığa dayanıklı yapısı, tuzluluk toleransı ve kıyı ekosistemlerine uyum sağlayabilmesi sayesinde şekil 2.1'de görüldüğü gibi Akdeniz ikliminin hâkim olduğu bölgelerde daha geniş yayılım göstermektedir (Christoforidi vd., 2022).



Şekil 2.1. *Vitex agnus-castus* bitkisinin Dünya'daki yayılış.

Bitkinin morfolojik özellikleri ile kimyasal içerikleri arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Özellikle meyvelerde yoğun olarak bulunan diterpenoidler, türün farmakolojik aktivitesinin temelini oluşturmaktadır (Van Die vd., 2013). Bu nedenle *Vitex agnus-castus* hem botanik hem de farmasötik araştırmalarda yüksek bilimsel öneme sahip bir tür olarak değerlendirilmektedir (Meier vd., 2000).



Şekil 2.2. *Vitex agnus-castus* bitkisinin yaprak ve çiçek fotoğrafı.

2.2.2 Kimyasal içeriği

Vitex agnus-castus, Akdeniz iklim kuşağında yetişen ve farmasötik açıdan yüksek öneme sahip tıbbi bir bitkidir. Bitkinin kimyasal bileşenleri, özellikle uçucu yağlar ve

polifenolik ekstraktlar bakımından dikkate değer bir çeşitlilik göstermektedir. GC–MS tabanlı uçucu yağ analizleri, ile biribirinden farklı bölgelerden toplanan *Vitex agnus-castus* örneklerinde 1,8-sineol, sabinen, α-pinen, α-terpinil asetat ve β-karyofillen gibi monoterpen ve oksijenli monoterpenlerin baskın olduğunu ortaya koymaktadır (Gonçalves vd., 2017; Ricarte vd., 2020; Sarikurkcu vd., 2009) Bu bileşiklerin oranları farklı ekolojik bölgelerden toplanan örneklerde değişiklik göstermekle birlikte genel olarak tutarlı kimyasal profile sahiptir.

Vitex agnus-castus ekstraktları üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, fenolik ve flavonoid bileşiklerin zengin bir dağılım ve çeşitlilik sergiledikleri görülmektedir. HPLC-DAD-QTOF-MS yöntemine dayalı kapsamlı analizlerle bitkinin yaprak, çiçek, gövde ve tohum fraksiyonlarında klorojenik asit, luteolin, hesperidin, vanilik asit ve kastisin gibi fenolik bileşenlerin yüksek miktarlarda bulunduğunu göstermektedir (Berrani vd., 2021).

Tohum ekstraktlarına yönelik LC/MS/MS çalışmaları, vanilik asit, luteolin, kuersetin ve kafeik asit gibi bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu ortaya koymuştur (Kavaz vd., 2022). UHPLC–ESI–MS/MS tabanlı analizlerde ise protokatekuik asit, 4-hidroksibenzoik asit ve gentisik asitin yaprak ve çiçek örneklerinde baskın olduğu gösterilmiştir (Özderin, 2021).

Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, *Vitex agnus-castus*'un uçucu yağlarının monoterpen ağırlıklı bir kimyasal yapı sergilediği, ekstrakt fraksiyonlarının ise yüksek düzeyde fenolik asitler ve flavonoidler içerdiği anlaşılmaktadır. Bitkinin farmakolojik etkileri özellikle antioksidan, antimikrobiyal ve antienflamatuvar aktiviteler, bu zengin fitokimyasal çeşitlilik ile açıklanabilmektedir.

2.2.3 Farmakolojik özelliği

Vitex agnus-castus, geleneksel tıpta uzun süredir özellikle jinekolojik yakınmaların yönetiminde kullanılan önemli bir tıbbi bitkidir. Avrupa Birliği bitkisel tıbbi ürün değerlendirmelerinde meyvesinin adet öncesi dönemde görülen hafif semptomların (PMS) giderilmesi amacıyla geleneksel kullanımının bulunduğu; bu endikasyonun ise uzun süreli kullanıma dayalı geleneksel kanıtlarla desteklendiği bildirilmektedir (European Medicines Agency [EMA], 2018).

Vitex agnus-castus'un jinekolojik etkilerinin olası biyolojik temeli çoğunlukla dopaminerjik sistem üzerinden prolaktin salımının modülasyonu ile ilişkilendirilmektedir. EMA'nın değerlendirme raporunda, pituiter hücre modellerinde *Vitex agnus-castus* etanol ekstresinin D2-dopamin reseptör alt tipiyle etkileşime girerek prolaktin salınımını baskılayabildiği ve bu etkiye katkı sağlayan diterpen yapılı bileşik gruplarının bulunduğu aktarılmaktadır.

Klinik literatürde *Vitex agnus-castus* preparatlarının PMS semptomları üzerindeki etkisine ilişkin kontrollü çalışmaların, sistematik derleme ve meta-analizlerin sonucunda etkili olduğu bulunmuştur ancak ürün standardizasyonu, doz, çalışma tasarımları ve sonuç ölçütlerindeki heterojenliğin yorum gücünü etkileyebildiği vurgulanmaktadır (Van Die vd., 2013; Verkaik vd., 2017; Wuttke vd., 2003).

Jinekolojik kullanımının yanı sıra *Vitex agnus-castus* bitkisinin anti-inflamatuvar ve analjezik potansiyeli de deneysel çalışmalarla desteklenmektedir. Tunus'ta yapılan bir çalışmada *Vitex agnus-castus* meyve dekoksiyonunun uygulanan doz aralığında belirgin analjezik ve anti-inflamatuvar etkilere işaret eden sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Ayrıca dekoksiyon ile ön tedavinin, negatif kontrol grubuna kıyasla gastrik mukozal hasarı anlamlı ölçüde azaltabildiği (Boujbiha vd., 2023).

EMA değerlendirme raporuna göre, *Vitex agnus-castus* bileşenlerinin anti-inflamatuvar etkilerine ilişkin in vitro ve in vivo kanıtlar bulunmaktadır. Ayrıca bazı bileşenlerin (örneğin flavonoidler, diterpenler) inflamasyon eksenindeki biyolojik hedeflere etki edebildiği bildirilmektedir ([EMA], 2018).

Vitex agnus-castus bitkisinin farmakolojik profilinde oksidatif stres ile ilişkili mekanizmalar da öne çıkmaktadır. Bitkinin tohumlarının etanol ekstresinin fitokimyasal bileşiminin LC–MS/MS ile değerlendirildiği ve biyolojik aktivitelerin çoklu testlerle incelendiği bir çalışmada, antioksidan kapasite (DPPH/ABTS/indirgeme temelli testler), antibakteriyel aktivite (disk difüzyon ve MIC) ve AChE inhibisyonu birlikte rapor edilmiştir. Aynı çalışmada AChE inhibisyonu için IC_{50} değerinin 36,34 ± 5,6 µg/mL olduğu verilmiştir. Bu bulgu *Vitex agnus-castus* bitkisinin kolinerjik hedefler üzerinden nörobiyolojik uygulamalara aday olabileceğini düşündürmektedir (Kavaz vd., 2022).

Vitex agnus-castus özütlerinin fenolik ve flavonoid içeriği, nanoparçacıkların yeşil sentezinde indirgeme ajanı olarak kullanılabilme potansiyelini desteklemektedir. Ayrıca, özütlerin AChE inhibisyonuna katkı sağlayabilecek bir fitokimyasal profile sahip olduğu gösterilmiştir.

Genotoksisite ve mutajenite perspektifinden *Vitex agnus-castus* bitkisinin bazı fraksiyonlarının koruyucu potansiyele sahip olabileceğini gösteren bulgular da bulunmaktadır. *Ames Salmonella* mikrozom testi kullanılan bir çalışmada, *Vitex agnus-castus* yaprak uçucu yağı ile tohum etanol ekstresinin TA98 ve TA100 suşlarında farklı konsantrasyonlarda antimutajenik etki gösterdiği buna karşın test edilen konsantrasyonlarda esansiyel yağların mutajenik etki sergilemediği gösterilmiştir (Sarac vd., 2015)

Bu tür bulgular, *Vitex agnus-castus* bitkisinin biyolojik güvenlilik profilinin anlaşılması ve çok bileşenli bitkisel preparatların fonksiyonel olarak değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

2.3 Enzim Kinetiği

2.3.1 Enzimlerin temel özellikleri ve çalışma mekanizmaları

Biyokimyasal süreçlerin temelini teşkil eden enzimlerin katalitik aktivitelerini ve reaksiyon hızlarını tanımlamak amacıyla kullanılan en temel yaklaşım Michaelis-Menten kinetiğidir. Bu model, enzim (E) ve substratın (S) geçici bir enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturması ve ardından bu kompleksin ürün (P) ile serbest enzime dönüşmesi prensibine dayanmaktadır. Modelin merkezinde yer alan Michaelis sabiti (K_m) enzim ile substrat arasındaki afiniteyi göstermektedir. Maksimum hız (V_{max}) enzimin aktif bölgelerinin substrat ile tamamen doygunluğa ulaştığı kapasiteyi ifade etmektedir. Bu

kinetik parametreler, enzimatik reaksiyonların davranışlarını matematiksel bir çerçeveye oturtarak, reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna bağımlılığını analiz etmeye olanak tanır. Modern biyokimyada standart bir analiz yöntemi haline gelen bu model, sadece serbest enzimlerin çalışma mekanizmalarını açıklamakla kalmayıp, aynı zamanda farmakodinamik çalışmalar ile çeşitli inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini kantitatif olarak değerlendirmek için de kritik bir referans noktası oluşturmaktadır.

2.3.2 Michealis-Menten kinetiği

Michaelis-Menten kinetiği, tek substratlı enzimatik reaksiyonların hızını tanımlayan klasik ve en yaygın modeldir (Michaelis & Menten, 1913). Model, enzim ve substrat arasındaki kompleksin oluşumu ile ürün oluşumu arasındaki dengeyi temel alır. Reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Nelson vd., 2021). Michaelis sabiti (K_m), enzimin substrata olan ilgisini matematiksel olarak gösterir. Düşük K_m değeri, yüksek ilgiyi temsil eder (Berg, J.M. vd., 2015). V_{max}, enzimin tüm aktif bölgeleri substratla dolduğunda ulaşabileceği en yüksek reaksiyon hızını gösterir (Voet ve Voet, 2011). Bu parametreler, bir enzimin kinetik özelliklerini tanımlamak için temel ölçütlerdir ve inhibitörlerin etkilerini incelemek için sıkça kullanılmaktadır.

Michaelis-Menten modeli, enzim kinetiğinin anlaşılmasını kolaylaştırdı ve modern biyokimyada standart bir analiz aracı haline geldi ve günümüzde bu model hem temel bilim araştırmalarında hem de farmakodinamik çalışmalarda referans işlevi görmeye devam etmektedir (Copeland, 2023; Nelson vd., 2021).

Enzim (E) ve substart (S) arasındaki ilişkiyi gösteren denklem (2.1) ‘de görüldüğü gibidir.

$$\boldsymbol{E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P} \qquad (\mathbf{2.1})$$

Michaelis-Menten kinetiğinde kullanılan formül ise (2.2) de görüldüğü gibidir.

$$\boldsymbol{v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}} \qquad (\mathbf{2.2})$$

2.3.3. Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafiği, Michaelis-Menten denkleminin çift ters dönüşümü kullanılarak oluşturulan doğrusal bir grafiktir. Bu grafik, K_m ve V_{max} değerlerinin daha

kolay hesaplanmasını sağlar. Grafik, 1/V ve 1/[S] değerlerinin bir x-y grafiğine çizilmesiyle elde edilir. Elde edilen doğrunun eksenlerle olan kesişim noktaları, kinetik parametreler hakkında bilgi verir (Copeland, 2023; Nelson vd., 2021).

Lineweaver-Burk grafiği, doğrusal bir form sunduğu için özellikle inhibitör tiplerinin ayırt edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiğinde karakteristik farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar, inhibitörün enzime nereden bağlandığına dair önemli ipuçları sağlar. Ancak grafik, düşük substrat konsantrasyonlarında ölçüm hatalarını artırabileceği için bazı sınırlamalara sahiptir (Berg, J.M. vd., 2015). Yine de farmakolojik araştırmalarda en çok tercih edilen analiz yöntemlerinden biri olmaya devam etmektedir. Grafik, enzim inhibitörlerinin mekanizmasını anlamada temel bir araç olarak görülmektedir (Copeland, 2023; Nelson vd., 2021; Voet ve Voet, 2011)

Lineweaver-Burk grafiği, (2.2)'de verilen Michaelis-Menten hız denkleminin tersinin alınmasıyla elde edilen (2.3) numaralı denklem kullanılarak çizilmektedir.

$$\frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{v}} = \frac{\boldsymbol{K_m}}{\boldsymbol{V_{max}}}\frac{\mathbf{1}}{[\boldsymbol{S}]} + \frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{V_{max}}} \qquad (\mathbf{2.3})$$

2.3.4 Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin inhibisyonu, kimyasal bileşikler kullanılarak enzimlerin fonksiyonlarının azaltılabildiği veya tamamen inhibe edilebildiği yöntemler olarak tanımlanabilir (Copeland, 2000). İnhibitörler, enzimlerin aktif veya allosterik merkezlerine bağlanarak etkileşime girer ve enzim mekanizmasını değiştirebilirler (Nelson ve Cox, 2017). İnhibisyon modları iki geniş tipe ayrılır: geri dönüşümlü inhibisyon ve geri dönüşümsüz inhibisyon. Geri dönüşümlü inhibitörler genellikle geçici etki gösterdiklerinden enzimleri yalnızca belirli bir süre için inhibe ederken, geri dönüşümsüz inhibisyon enzimlerin kovalent bağlarla bağlanması sonucu kalıcı inhibisyona yol açar (Voet ve Voet, 2010).

Enzimlerin inhibisyonu, özellikle ilaç çalışmalarında çok önemlidir, çünkü çoğu ilacın organizmadaki belirli enzimleri hedef alarak çalıştığı bilinmektedir. İnhibisyon tipinin kesin olarak belirlenmesi, inhibitör bileşiğin farmakodinamik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir husustur (Berg, J.M., 2015.; Copeland, 2023).

Enzimler üzerinden yapılan kinetik çalışmalarda inhibisyonlarda (2.4)'deki denklem kullanılmaktadır.

$$\boldsymbol{\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}} \qquad \boldsymbol{(2.4)}$$

- $[I]$: inhibitör derişimi
- K_i: inhibitörün serbest enzime bağlanma sabiti
- K_i': inhibitörün ES kompleksine bağlanma sabiti

Enzim inhibisyon tipleri temelde 3'e ayrılmaktadır. Bunlar yarışmalı (competitive) inhibisyon, yarışmasız (non-competitive) inhibisyon ve karışık (mixed) inhibisyondur.

2.4. Nanoteknoloji ve Nanoparçacıklar

Nanoteknoloji, 1–100 nm boyut aralığında yer alan materyallerin sentezi, karakterizasyonu ve uygulamalarını kapsayan disiplinler arası bir bilim alanıdır. Nano boyuttaki malzemeler, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve boyuta bağlı özgün fizikokimyasal özellikler göstermektedir. Bu özellikler nanoparçacıkları biyomedikal uygulamalar, kataliz, çevresel arıtım ve sensör teknolojileri açısından önemli kılmaktadır.

2.4.1. Nanoparçacık sentez yöntemleri

Nanoparçacıkların sentezinde kullanılan yöntemler, elde edilen partiküllerin boyut dağılımı, şekli, kristal yapısı ve yüzey kimyası üzerinde belirleyici rol oynar. Bu yöntemler genel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik yaklaşımlar altında sınıflandırılmaktadır. Yöntem seçimi, hedef uygulama alanı (biyomedikal, kataliz, sensör uygulamaları vb.), üretim sürecinin ölçeklenebilirliği ve çevresel etkiler göz önünde bulundurularak yapılmaktadır (Khan vd., 2019; Nasrollahzadeh vd., 2020).

2.4.2. Fiziksel sentez

Fiziksel sentez yöntemleri, çoğunlukla kütle halindeki malzemelerden nano boyuta parçalama (top-down yaklaşımı) veya fiziksel süreçlerle atomların üretilip yoğunlaştırılması (bottom-up yaklaşımı) prensibine dayanır. Bu kapsamda bilyalı öğütme (ball milling) gibi mekanik yöntemler, buhar fazı biriktirme (PVD), sputtering, ark-deşarj ve özellikle çözelti içinde yüksek saflıkta kolloit üretmeye imkân tanıyan lazer ablasyon yöntemleri ile yapılan sentezler öne çıkmaktadır. Lazer ablasyon yaklaşımları, indirgeme ajanı gibi kimyasal reaktiflere ihtiyaç duymadan nispeten yüksek saflıkta nanoparçacık üretimi sağlayabildiği için biyomedikal amaçlı materyallerde kontaminasyon riskini azaltabildiği gibi ekipman maliyeti ve ölçeklenebilirlik açısından avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, parçacık boyut dağılımının süreç parametrelerine hassasiyeti pratik sınırlılıklar oluşturur (Baig vd., 2021; Zeng vd., 2012).

2.4.3. Kimyasal sentez

Kimyasal sentez, esas olarak kimyasal indirgeme veya çökelme süreçleri yoluyla metal iyonlarının beslenmesi ve büyümesine dayanan bir yöntemdir. Parçacıkların boyutu ve şekli üzerindeki kontrol, öncüllerin konsantrasyonu, indirgeyici ajanın eklenme gücü ve hızı, sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve stabilizasyon veya kaplama ligandlarının kullanımı gibi faktörlerin değiştirilmesiyle elde edilir (Iravani vd., 2014).

En yaygın örneklerden biri, sitrat ile kolloidal metallerin üretimi ve tiyol türevli ligandlar kullanılarak iki fazlı bir sistemde kararlı altın nanoparçacıkların oluşturulmasıdır (Brust vd., 1994; Turkevich vd., 1951). Kimyasal sentez yöntemleri, yüksek kontrol edilebilirlikleri sayesinde tekdüze boyutlarda nanoparçacık üretimine olanak tanır ve küre, çubuk veya prizma gibi belirli şekillerd büyümeyi yönlendirebilme avantajı sağlar. Bununla birlikte, tıbbi uygulamalarda kalan kimyasalların, çözücülerin veya sentetik ligandların olası toksisitelerinin yanı sıra biyolojik testlere engel teşkil edebilecek etkilerinin de dikkatle izlenmesi gerekmektedir (Iravani vd., 2014).

Metal oksit nanoparçacıkların kristalleşme süreçleri ve faz kontrolü, ürün özelliklerinin çözücü kimyası ve ısıl işlemden büyük ölçüde etkilenmesi nedeniyle, sol-jel gibi kimyasal yöntemler standart hale getirilmiştir (Niederberger, 2007).

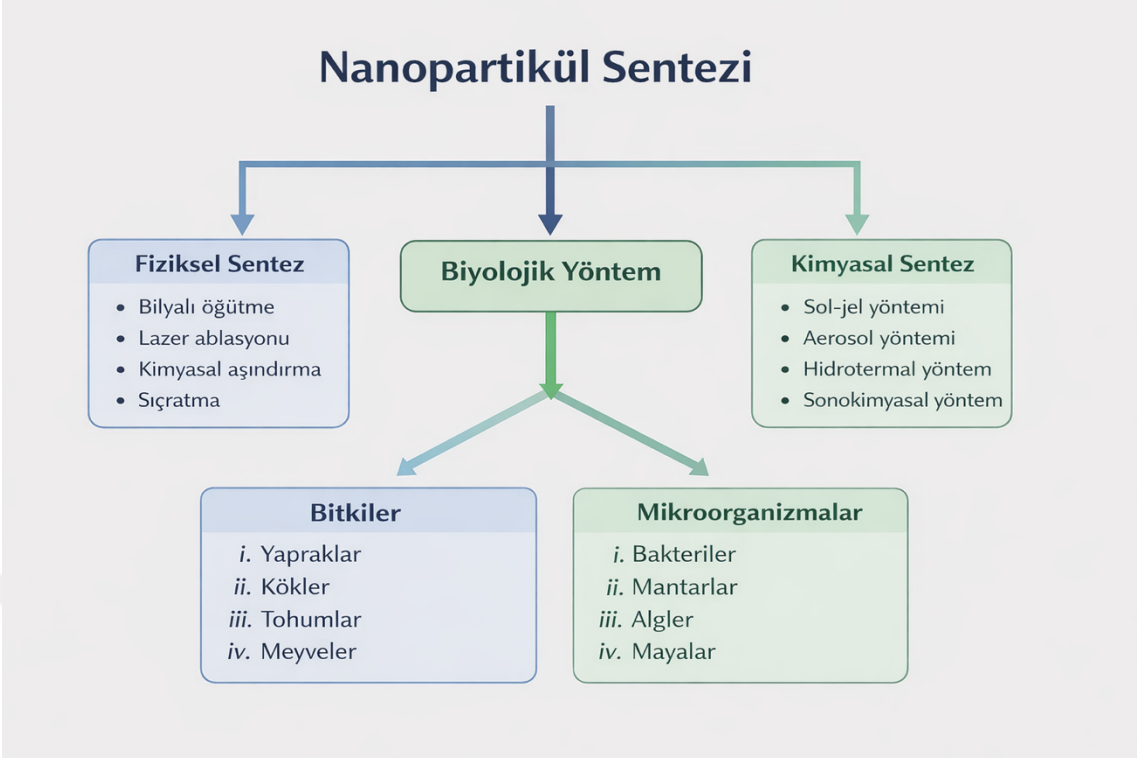
Ayrıca, mikroemülsiyon kalıplama teknikleri, çekirdeklenmeyi miseller veya ters miseller gibi nanoreaktör bölgeleriyle sınırlandırarak boyut kontrolü sağlamaktadır (Lee ve Jun, 2019).

Sol-jel ve hidrotermal yöntemler kristal yapı ve şekil kontrolünde etkilidir. Buna karşın yüksek sıcaklık ve basınç gereksinimleri, toksik çözücü kullanımı gibi sınırlayıcı faktörlere de sahiptirler. Ayrıca, sentez sonrası yüzey stabilizatörlere gereksinim biyouyumluluğu olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle kimyasal yöntemlerle sentezlenen nanoparçacıkların biyomedikal uygulamalarda kullanımı öncesinde kapsamlı toksisite değerlendirmeleri yapılmalıdır (Soltys vd., 2021).

2.4.4. Biyolojik sentez

Biyolojik sentez, nanoparçacıkların bitki ekstraktları, bakteriler, mantarlar veya algler kullanılarak üretilmesini esas alır. Bitki ekstraktlarında bulunan fenolikler, flavonoidler, proteinler ve terpenler hem indirgeme ajanı hem de yüzey kaplayıcı olarak görev yapar. Bu sayede tek basamaklı, düşük enerji gerektiren ve çevre dostu bir sentez süreci sağlanır (Soltys vd., 2021).

Biyolojik sentezle elde edilen nanoparçacıklar, genellikle daha iyi biyouyumluluk ve düşük toksisite sergiler. Özellikle yeşil sentezle elde edilen AgNP'lerin yüksek antioksidan, antimikrobiyal ve enzim inhibitör aktiviteleri sergilediği bildirilmektedir. Bu durum, yüzeyde kalan bitkisel biyoaktif bileşiklerin sinerjik etkisi ile açıklanmaktadır (Singh vd., 2018).



Şekil 2.3. Nanoparçacık sentezinde kullanılan yöntemlere ilişkin diyagram (Khan vd., 2019).

2.5. AChE İnhibisyonunda Kullanılan Fitokimyasallar ve Nanoparçacıklar

2.5.1. Fitokimyasallar ile AChE inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar

Bitkisel kaynaklı AChE inhibitörleri en sık fenolik asitler, flavonoidler, terpenoidler ve bazı alkaloidler arasında yoğunlaşmaktadır. Fenolik bileşiklerin AChE üzerindeki etkisi çoğu zaman tek bir mekanizma ile sınırlı değildir. Etkileşim, enzimin katalitik aktif bölgesiyle doğrudan (yarışmalı veya karışık tip inhibisyon), periferik anyonik bölge (PAS) üzerinden bağlanma ve buna bağlı konformasyonel değişiklikler ile birlikte, antioksidan–antienflamatuvar etkiler yoluyla kolinerjik nöronların dolaylı desteklenmesi gibi çoklu eksenlerde açıklanmaktadır (Tamfu vd., 2021).

Fitokimyasal sınıflar düzeyinde bakıldığında, flavonoidlerin AChE inhibisyonunda öne çıkmasının temel nedenleri, aromatik iskeletin enzim ceplerine uygunluğu, hidroksil gruplarının hidrojen bağı kurabilmesi ve π-π etkileşimlere elverişli olmasıdır. Literatürde yapı-fonksiyon ilişkisi açısından, halkalardaki hidroksilasyon değişimleri, metoksilasyon ve özellikle glikozilasyon (C- ve O-glikozit form) gibi modifikasyonların hem ekstraksiyon verimini hem de hedef enzime bağlanma etkinliğini değiştirebildiği vurgulanmaktadır. Bu nedenle aynı bitkide dahi bitki kısmı, hasat dönemi ve ekstraksiyon koşulları AChE inhibisyon çıktısını belirgin biçimde etkileyebilir (Tamfu vd., 2021).

Flavonoidlerin Alzheimer bağlamında değerlendirildiği daha güncel bir derlemede ise flavonoidlerin AChE ve BuChE inhibisyonu yanında nöroenflamasyon ve oksidatif stres modülasyonu üzerinden de nöroprotektif bir çerçeveye oturduğu,

dolayısıyla in vitro enzim inhibisyonu ile biyolojik sonuçların birlikte yorumlanması gerektiği vurgulanır (Cichon vd., 2024).

Vitex agnus-castus bitkisinin antikolinesteraz aktivitesi, içerdiği fenolik ve flavonoid bileşiklerle yakından ilişkilidir. *Vitex agnus-castus* bitkisinin yapraklarından elde edilen diklorometan ekstraktının anti-enzimatik potansiyelinin incelendiği bir çalışmada, AChE enzim inhibisyonu için IC_{50} değeri 162,0 µg/mL olarak belirlenirken, pozitif kontrol grubu olan galantamin için bu değer 13,51 µg/mL olarak kaydedilmiştir. Aynı araştırmada, *Vitex agnus-castus* tohumlarından elde edilen etanol ekstraktının 36,34 µg/mL gibi çok daha güçlü bir antikolinesteraz yanıt verdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar kullanılan bitki kısmının, tercih edilen çözücünün ve ekstraksiyon parametrelerinin, elde edilen inhibitör profilini ne kadar belirgin şekilde değiştirebildiğini ortaya koymaktadır (Bramki vd., 2025).

Bu çerçevede, kullanılan ekstraktlarda flavon sınıfı bileşiklerinin nicel olarak belirlenmesi, AChE inhibisyon deneylerinizdeki etkinliğin yalnızca toplam fenolik yükle değil, aynı zamanda aktif bileşen havuzunun göreli dağılımıyla da ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

2.5.2. Yeşil Sentez Yoluyla Elde Edilen AgNP'lerin AChE İnhibisyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar

Son yıllarda nanoteknolojinin biyokimyasal sistemlere entegrasyonu ile birlikte, AgNP'ler AChE inhibitörleri olarak yoğun ilgi görmüştür. AgNP'lerin yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve yüzey fonksiyonel grupları, enzimin aktif veya allosterik bölgeleri ile güçlü etkileşimler kurmasına olanak tanımaktadır.

AgNP'ler ile AChE arasındaki etkileşimler çoğunlukla yarışmasız veya karışık tip inhibisyon karakteri göstermektedir. Bu durum, nanoparçacıkların yalnızca aktif bölgeye değil, enzimin farklı bölgelerine bağlanabildiğini düşündürmektedir. Kinetik analizlerde bu etki, Lineweaver-Burk grafiklerinde hem K_m hem de V_{max} değerlerinde değişim olarak gözlenmektedir. İnhibisyon çalışmalarında reaksiyon hızları genellikle farklı inhibitör konsantrasyonlarında ölçülmekte ve Michaelis-Menten eğrileri çizilmektedir. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça maksimum reaksiyon hızının düşmesi, nanoparçacıkların enzimin katalitik etkisini sınırlandırdığını göstermektedir. Yeşil sentez yoluyla elde edilen AgNP'lerin yüzeyinde bulunan bitkisel fenolik ve flavonoid bileşikler, bu inhibitör etkinliğini daha da artırabilmektedir (Elmehbad vd., 2022).

Örnek olarak, bir AgNP-AChE çalışmasında Lineweaver-Burk grafiğinde inhibitörsüz sistem için y-eksenini kesen bir doğru elde edilirken, farklı farklı AgNP derişimlerinin varlığında elde edilen doğruların farklı eğimlerle yukarı kaydığı rapor edilmiştir. Bu durum, nanoparçacıkların yarışmasız veya karma inhibitör karakterini desteklemektedir. Bu tür kinetik veriler, AgNP'lerin Alzheimer hastalığına yönelik potansiyel inhibitör adayları olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Sher vd., 2023).

Yeşil sentezle üretilen AgNP'ler, metal çekirdeğin fizikokimyasal özelliklerinin ötesinde, bitkisel indirgeme ajanlarının sağladığı yüzey kaplaması aracılığıyla biyouyumluluk ve fonksiyonel çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle AChE inhibisyonu,

nanoparçacık yüzeyinin enzime adsorpsiyonu ile buna bağlı konformasyonel değişikliklerve enzimin yüzey yükü dağılımındaki değişiklikler gibi etkiler nedeniyle çoklu hedefli etki mekanizmalar üzerinden gerçekleşebilmektedir. Aynı çalışmada, marin kökenli *Aspergillus niger* kaynaklı naphthopyrone türevleriyle kaplı AgNP'lerin yaklaşık 8–30 nm aralığında elde edildiği ve bu formun, ilgili doğal bileşiklerin AChE üzerindeki inhibitör etkisini belirgin biçimde güçlendirebildiği rapor edilmiştir (Abdelwahab vd., 2021).

2.6. Moleküler Kenetlenme (Docking) Yöntemi.

Moleküler kenetlenme (molecular docking), küçük moleküllerin biyolojik makromoleküllerle olası bağlanma modlarının ve bağlanmaya ilişkin serbest enerji değerlerinin (ΔG_{bind}) öngörülmesini amaçlayan hesaplamalı bir yöntemdir. Docking yaklaşımı iki temel bileşene dayanmaktadır. Bunlar, konformasyonel arama algoritması ve skorlama fonksiyonudur. Arama algoritması, ligandın translasyonel, rotasyonel ve torsiyonel serbestlik derecelerini dikkate alarak çok boyutlu uzayda olası bağlanma pozlarını, yani pozisyonlarını, üretirken; skorlama fonksiyonu ise her bir poz için yaklaşık bağlanma serbest enerjisini (ΔG_{bind}) tahmin etmektedir (Meng vd., 2011; G. M. Morris vd., 2009).

2.6.1. Moleküler kenetlenme yönteminin algoritmik ve matematiksel temeli

Bu çalışmada kullanılan AutoDock Vina programı, global stokastik arama ile gradyan temelli yerel optimizasyonu birleştiren hibrit bir algoritma kullanmaktadır. Vina'da başlangıç konformasyonları rastgele oluşturulmakta ve ardından Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno (BFGS) algoritmasına dayalı yerel enerji minimizasyonu uygulanmaktadır. Bu yaklaşım, hesaplama hızını artırırken aynı zamanda konformasyonel uzayın etkin şekilde taranmasını sağlamaktadır (Trott ve Olson, 2010).

Vina'nın skorlama fonksiyonu ampirik ve bilgi-temelli terimlerin birleşiminden oluşur ve yaklaşık bağlanma serbest enerjisi şu şekilde ifade edilmektedir:

$$\Delta G_{bind} = \sum w_i E_i$$

Burada E_i, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, sterik çakışma ve konformasyonel ceza terimlerini temsil etmekte; w_i ise bu terimlere ait ağırlık katsayılarını ifade etmektedir. Vina skoru tam bir fiziksel serbest enerji hesabı olmayıp, deneysel bağlanma enerjileriyle korelasyon sağlayacak şekilde parametrik olarak optimize edilmiş ampirik bir fonksiyondur (Trott ve Olson, 2010).

2.6.2. AChE aktif bölgesi ve bağlanma bölgelerinin incelenmesi

AChE enzimi, Alzheimer hastalığında kolinerjik hipotez kapsamında en önemli terapötik hedeflerden biri olarak kabul edilmektedir. AChE'nin aktif oluğu; katalitik aktif bölge (CAS) ve periferal anyonik bölge (PAS) olmak üzere iki alt bölgeden oluşmaktadır. Literatürde CAS ve PAS bölgelerine eşzamanlı etkileşim kurabilen bileşiklerin daha

güçlü inhibitör potansiyeline sahip oldukları bildirilmektedir. Bu nedenle docking analizlerinde ligandların hangi alt bölge ile etkileşime girdiğinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır (Colovic vd., 2013; Sussman vd., 1991)

2.6.3 Alternatif moleküler kenetlenme yönteminde kullanılan yazılımlar

AutoDock Vina dışında literatürde yaygın olarak kullanılan docking yazılımları arasında şunlar yer almaktadır:

- **AutoDock4** (Lamarckian Genetic Algorithm tabanlı arama)
- **Glide** (grid-based enerji değerlendirmesi)
- **GOLD** (genetik algoritma tabanlı arama)
- **MOE Dock** (force-field ve bilgi-temelli hibrit yaklaşım)

Bu yazılımlar farklı arama stratejileri ve skorlama fonksiyonları kullanmaktadır. Temel amaç ligand–protein kompleksinin en düşük enerjili konformasyonunu belirlemektir. Yazılım seçimi doğruluk, hız ve erişilebilirlik kriterlerine bağlı olarak değişmektedir (X. Y. Meng vd., 2011).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Yazılım Programları

Bütün deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ve yazılım programları için markaları, modelleri ve özellikleri bu bölünde çizelge şeklinde verilecektir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi.

Kullanılan Kimyasal	Üretici Firma
Metanol	Sigma Aldrich, % 99,9 saflık
Etanol	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck, % 37 saflık
Folin-Ciocalteu (FC) Reaktifi	Sigma Aldrich
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Merck, % 99,9 saflık
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Emboy, % 99,5 saflık
Potasyum Hidroksit (KOH)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Aldrıch, % 99 saflık
Alüminyum Klorür Hekzahidrat ($AlCl_3.6H_2O$)	Riedel
Asetiltiyokolin İyodür (ATCI)	BLDpharm, % 98 saflık
Asetilkolin Esteraz Enzimi (AChE)	Sigma Aldrich, from electric eel , 500U
Gallik Asit	BLDpharm, % 99,98 saflık
Kuersetin	BLDpharm, % 97 saflık
Potasyum Fosfat Dibasic (K_2HPO_4)	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Potasyum Fosfat Monobasic (KH_2PO_4)	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Potasyum İyodür (KI)	Isolab, % 99,5 saflık
İyot (I_2)	Merck
Gümüş Nitrat ($AgNO_3$)	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Filtre kâğıdı	Whatmann No.1

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.

Kullanılan Cihazlar	Marka ve Model
UV-Visible Spektrofotometre	Varian Cary 100 Bio
Evaporatör	IKA RV10 modeli
Soğutmalı sirkülatör	Julabo, F12 modeli
Etüv	Memmert
Vorteks	VWR International
Terazi	RADWAG, PS 750 R2 modeli
Magnetik Karıştırıcı	Stuart, SB 162-3 modeli
pH Metre	Metler Toledo, Five Easy modeli
Su Banyosu	BIBBY RE 100 B modeli
Vakum Pompası	Edwards, 3 modeli
Ultra Saf Su Cihazı	Veolia, Elga modeli
Çalkalayıcı	Edmund Bühler GmbH, SM-30
LC/MS-MS	Agilent 6460 Triple Quadrupole
TEM	FEI TALOS F200S modeli
Zeta Sizer	Malvern Instruments, Malvern, UK
TGA	PerkinElmer STA 8000
FTIR	PerkinElmer Spectrum Two
Lamba	220-240V – 50/60 Hz
Santrifüj	Centurion 8080 Series

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan yazılım programlarının listesi.

Kullanılan programlar	Kullanım amacı
Graphpad prism 10	Grafik çizimi ve istatistik analiz
Excel (Microsoft 360 office)	Grafik çizimi
AutoDock Vina (UCSF Chimera v1.1.7.3)	Moleküler kenetlenme (docking) analizi
BIOVIA Discovery Studio Visualizer (DSV) v25.1.0.0	Molekül görselleştirme

3.2. *Vitex agnus-castus* Bitkisinin Toplanması ve Kurutulması

Çalışmada kullanılan *Vitex agnus-castus* bitkisi Türkiye, C3 Antalya Çitdibi mevkii yol kenarı; N 36’80’6989”, E 30’46’6439” koordinatlarından 460m rakımdan 26.08.2024 tarihinde toplanmıştır. Bitkinin sadece yaprakları toplanıp deneylerde kullanılmıştır.

Toplanan bitki yaprakları aynı gün saf sudan geçirilerek etüvde 40°C’de 7 gün kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruyan bitki yaprakları bir öğütücü yardımı ile küçük parçalara ayrıldı, arada kalan büyük parçaları minimalize etmek için bütün parçalar tokmak ile bir havanda dövülerek toz haline getirildi. *Vitex agnus-castus* bitkisinin yaprağından elde edilen toz oda sıcaklığında, karanlık ve kuru bir ortamda ağzı kapalı bir kap içerisinde çalışmalar için saklandı.

3.2.1. *Vitex agnus-castus* bitkisinden özüt eldesi

Kurutulup toz haline getirilen bitki yapraklarından 5’er g 250 mL’lik balonlara konulup üzerine 100 mL deiyonize saf su eklendi. Şekil 3.1’de görüldüğü gibi geri soğutucu altında kaynayana kadar beklenip kaynama görüldüğü andan itibaren 10 dakika daha tutuldu. Alınan ekstrakt oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi ardından balon içerisindeki bitki ve su karışımı Watmann No.1 filtre kağıdı üzerinden bir Büchner hunisi ve nuçe erleni kullanılarak vakum pompası yardımıyla filtre edildi. Filtreden geçen süzüntü hacimini yarıya düşürmek için rotary evaporatör kullanılarak ekstrakt çözeltisi 120 rpm hızında döndürülerek 100mmHg basınçta 50°C’ye ısıtıldı. Buharlaşan çözgen soğutucu sayesinde geri kazanılmıştır.

Balonda kalan ekstrakt çözeltisi petri kaplarına dökülüp 24 saat 50°C’de etüvde bekletilerek kurutuldu. Bir spatül yardımıyla petri kabındaki kurutulmuş ekstrakt dikkatlice kazınıp hassas terazide tartıldı. Elde edilen kuru ekstraktlar Şekil 3.2’ de görüldüğü gibi cam tüplerin içerisinde deneylerin diğer aşamalarında kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edildi. Aynı yöntemle bu bitkinin yapraklarından etanol ekstraktları da elde edilmiştir. Bunun için toz halindeki numuneye çözgen olarak 100 mL saf su yerine %60’lık etanol çözeltisi eklenmiştir.



Şekil 3.1. Geri soğutucu altında ekstraktlar alınırken kullanılan düzenek.



Şekil 3.2. Alınan ekstraktların biriktirilip saklandığı tüpler.

3.2.2. UHPLC-ESI-MS/MS cihazı ile fenolik ve flavonoid bileşiklerinin analizi

Fenolik ve flavonoid bileşiklerin nitel ve nicel analizi, hizmet alımı kapsamında Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) laboratuvarlarında bulunan Agilent Technologies 1290 Infinity UHPLC sistemi ile gerçekleştirilen sıvı kromatografik ayırmayı takiben, elektrosprey iyonizasyon (ESI)

kaynaklı üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (Agilent 6460 LC-MS/MS) kullanılarak yürütülmüştür. UHPLC-ESI-MS/MS verilerinin toplanması, işlenmesi ve nicel değerlendirmesi için MassHunter Qualitative Analysis B.07 ve MassHunter Quantitative Analysis B.07 yazılımlarından yararlanılmıştır. Çalışma kapsamında SE (su ekstraktı) ve EE (etanol ekstraktı) olmak üzere iki farklı bitki ekstraktı analiz edilmiştir.

Kromatografik ayırma, ters faz C18 analitik kolon üzerinden gerçekleştirilmiştir (Zorbax SB-C18, 4,6 × 100 mm, 3,5 µm). Mobil faz A %0,1 formik asit içeren su, mobil faz B ise %0,1 formik asit içeren asetonitril olarak hazırlanmış ve gradyan elüsyon programı uygulanmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'de sabit tutulmuş ve mobil fazın akış hızı 0,40 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi çalışmada 5 µL olacak şekilde uygulanmış ve ölçümler kuantifikasyona uygun koşullarda yürütülmüştür.

Kütle spektrometrik tespit, ESI kaynağı kullanılarak hedef bileşiklerin özelliklerine göre negatif veya pozitif iyon modunda ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda gerçekleştirilebilmektedir. MRM yöntemi; her bir analit için özgül öncül iyon (Q1) ürün iyonu (Q3) geçişleri seçilerek ve fragmentör ile çarpışma enerjileri (CE) optimize edilerek yapılandırılmıştır. Tipik MS çalışma koşulları şu şekildedir: kurutma gazı (N_2) sıcaklığı 350°C, kurutma gazı akışı 12 L/dk, nebülizatör basıncı 55 psi, sheath gaz ısıtıcısı 250°C, sheath gaz akışı 5 L/dk ve kapiler voltaj 3,5 kV. Kütle aralığı m/z 50–1300 olacak şekilde izlenmiş; veri birikimi ve cihaz kontrolü Agilent MassHunter Workstation üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Fenolik asitler ve flavonoid bileşiklerin tanımlanması, en az iki karakteristik MRM geçişinin gözlenmesi ve alıkonma zamanının referans standartlarla eşleşmesi esasına göre yapılmıştır. Miktar tayini, ilgili referans standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak gerçekleştirilmiş, nicel değerlendirmede analit için en yüksek duyarlılığa sahip geçiş esas alınmıştır.

3.2.3. Toplam fenolik içerik tayini

Vitex agnus-castus bitkisin toplam fenolik miktarını ölçmek için Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi kullanılarak spektrometrik olarak renk değişimi takip edilerek belirlenmektedir. FC reaktifi ışığa hassastır bu sebeple deneyden hemen önce 1:10 oranında distile saf su ile seyreltilerek hazırlanır. Na_2CO_3'ın distile su ile %7,5'luk (w/v) çözeltisi hazırlanarak deneyden hemen önce kullanıma hazır bekletilir. Ayrıca 25 mg gallik asitin 50 mL'lik çözeltisi %95'lik metanol içerisinde çözülerek hazırlanır. Gallik asit 500 µg/mL konsantrasyonunda stok çözelti olarak kullanılmıştır.

Santrifüj tüpüne 0,5 mL ekstrakt çözeltisi ya da kör (metanol) konulur, üzerine 0,5 mL seyreltik FC reaktifi eklenir. Ardından homojen bir çözelti elde edilene kadar 10–15 saniye elle çalkalanır. 3 dakika beklenip üzerine önceden hazırlanmış Na_2CO_3 çözeltisinden 0,5 mL eklenir. Ardından çözeltinin hacmi 5 mL olacak şekilde deiyonize su ile tamamlanır. Reaksiyon karışımı karanlıkta 2 saat bekletilir. Çözeltinin rengi süre sonunda sabitlendiğinde UV-Vis spektrofotometre cihazında 760 nm'de absorbans alınır.

Gallik asit kalibrasyonu için hazırlık aşamasında distile su ile hazırlanan 500 µg/mL derişimindeki stok çözeltiden distile suyla seyreltilerek 6,25, 12,5, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL derişimlerinde 6 tane kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır.

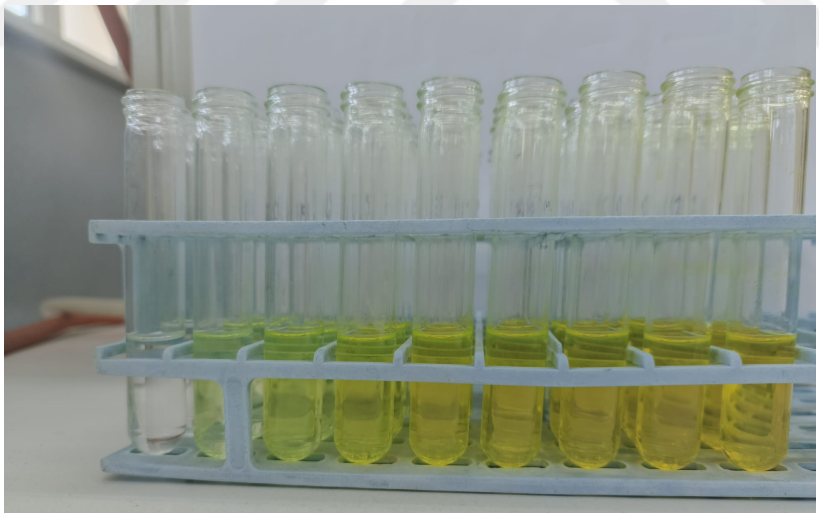
3.2.4. Toplam flavonoid içerik tayini

Vitex agnus-castus bitkisinin %60 etanol ve su ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri, $AlCl_3$ yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

Literatürde önerilen protokol, bazı uyarlamalar yapılarak uygulanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulabilmesi için kuersetin stok çözeltisi, %95'lik metanol içerisinde 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözünmenin tamamlanabilmesi amacıyla stok çözelti sonikatörde 5 dakika tutulmuştur. Kalibrasyon grafiği çizmek için şekil 3.4 de görüldüğü gibi 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50, 75, 100 ve 125 µg/mL derişimlerinde kuersetin çözeltileri kullanılmıştır.

Deneyde seyreltme işlemleri %95'lik metanol çözeltisi kullanılarak yapılmış ve ölçümlerde kör çözeltisi olarak %95'lik metanol kullanılmıştır. Sonuçlar, her bir fraksiyonun 1 g ekstrakt başına mg kuersetin eşdeğeri (QUE) olarak raporlanmıştır.

Cam deney tüplerine önce 2,0 mL %95'lik metanol eklenmiş, ardından 0,5 mL örnek çözeltisi (kuersetin veya örnek) ilave edilmiştir. Buna ek olarak, %10 (w/v) $AlCl_3$ çözeltisinden 0,2 mL eklenmiş ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$, %95'lik metanol içinde hazırlanmıştır) ve karışım vorteksle karıştırıldıktan sonra 3 dakika bekletilmiştir. Ardından 0,2 mL 1 M CH_3COONa eklenip %95'lik metanol ile toplam hacim 5,0 mL olacak şekilde, tamamlanmıştır. Rengin stabilize olabilmesi için tüpler 40 dakika boyunca karanlıkta bırakılmıştır. Hazırlanan örnekler UV-Vis spektrofotometrede 425 nm dalga boyunda tek dalga boyu okuması yapılarak absorbanslar kaydedilmiştir.



Şekil 3.3. $AlCl_3$ metodu ile yapılan toplam flavonoid içerik analizinde kullanılan kuersetin standartları (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 ve 125 µg/mL).

3.3. *Vitex agnus-castus* Bitkisinin Ekstraktlarından AgNP Sentezi

Elde edilen kuru etanol ve su ekstraktları kullanılarak 10 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Gümüş nitrat ($AgNO_3$) çözeltisi ise 10 mM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanarak NP sentezinde farklı hacimlerde kullanılmıştır.

Yapılan sentezlerde 15 mL'lik deney tüpleri kullanılmıştır. Her sentez tüpünün son hacmi 10 mL olacak şekilde deneyler tasarlanmıştır. Şekil 3.4.'de resmi görülen kontrollü bir fotoreaksiyon ortamı oluşturmak amacıyla, iç yüzeyi yüksek yansıtma özelliğine sahip alüminyum folyo ile kaplanmış bir reaksiyon kabini (karton muhafaza) tasarlanmıştır. Homojen aydınlatma koşullarını sağlamak için kabin üzerine konumlandırılan 7W gücündeki ışık kaynağı ile numuneler arasındaki mesafe ve ışık şiddeti sabitlenmiştir. Nanoparçacık sentezi, hazırlanan bu düzenek içerisinde, 120 rpm çalkalama hızında ve 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca sürekli karıştırma altında gerçekleştirilmiştir. Karanlıkta yapılan sentezler için ise, şekil 3.5.'de görüldüğü gibi, tüpler alüminyum folyo ile sarılarak ışık etkisi elimine edilmiştir.



Şekil 3.4. Kontrollü bir aydınlık ortamında yapılan AgNP sentezi için kullanılan düzenek.



Şekil 3.5. Karanlık ortamda yapılan AgNP sentezi için alüminyum folyo ile sarılan tüpler.

3.3.1.AgNP sentezi üzerinde pH'ın etkisi

Etanol ve su ekstraktlarından 10 mg/mL derişiminde 5 mL'lik çözeltiler hazırlanmak üzere beherde pH ayarlamaları yapılmıştır. Bitki ekstraktlarının pH değerleri sırasıyla 3, 5, 7, 9 ve 11 olacak şekilde, 1 M'lık HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Bu çözeltiler, 5 mL 10 mM'lık $AgNO_3$ çözeltileri ile 1:1 oranında karıştırılmıştır. Belirlenen pH'lar için oda sıcaklığında karanlıkta ve kontrollü ışık kaynağı altında olmak üzere 24 saat çalkalayıcıda bırakılmıştır. Bütün pH çalışmaları körleriyle birlikte 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. $AgNO_3$ konsantrasyonunun etkisi

Tüplere 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan bitki ekstraktlarından 5mL'lik çözeltiler konulmuştur. Üzerlerine sırayla 4, 3, 2 ve 1 mL dH_2O eklenerek seyreltme yapılmıştır.

Gümüş nanoparçacık sentezi üzerine $AgNO_3$ çözeltisinin konsantrasyonunun etkisini belirlemek için gümüş nitrat çözeltisi 1, 2, 3, 4 ve 5 mL hacimlerde 10 mM'lık olarak hazırlanan $AgNO_3$ çözeltisinden çekilip son hacmi 10 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan örnekler hem karanlık ortamda hem de kontrollü aydınlık ortamda çalkalayıcıda 24 saat bekletilmiştir. UV-Vis ölçümleri yapılmadan önce 1:10 oranında ddH_2O ile seyreltme yapılmıştır. Ölçümler 200-800 nm dalga boyu taranarak alınmıştır.

3.3.3. Ekstrakt konsantrasyonunun etkisi

Hazırlanan stok 10 mg/mL ekstrakt çözeltisinden sırayla 1, 2, 3, 4 ve 5 mL'lik hacimler çekilip ayrı cam tüplere konmuştur. Bütün tüplerin hacmi 5 mL olacak şekilde dH_2O ile tamamlanıp üzerlerine 10 mM'lık $AgNO_3$ çözeltisinden her bir tüpe 5 mL eklenerek toplam hacimler 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hem karanlık hem de kontrollü aydınlık ortamda çalkalayıcı üzerinde 24 saat bekletilmiştir. Ölçümlerden önce 1:10 oranında dH_2O ile seyreltme yapılarak UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu arası taranarak ölçümleri alınmıştır.

3.4. AgNP'lerin Karakterizasyonu

Çalışmada sentezlenen AgNP'lerin ve farklı sıcaklık artış hızlarında kalsine edilmiş AgNP'lerin yapısını aydınlatmak için UV-Vis spektrofotometre, DLS, FTIR, TGA ve TEM ölçümleri yapılmıştır.

3.4.1. UV-Visible spektrofotometre ölçümü

pH'ın, ekstrakt ve $AgNO_3$ konsantrasyonunun etkilerini incelemek için hazırlanan çözeltiler ile AgNP'ler elde edildikten sonra 1:10 oranında seyreltilmiş ve vortex ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Bunun ardından UV-Vis ölçümlerinde Varian Cary 100 Bio cihazı kullanılarak 200-800 nm arasında tarama yapılarak ölçümler alınmıştır.

3.4.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ölçümü

Modifikasyon ve ikame gruplarının tespit edilmesi amacıyla örneklerin fonksiyonel grup analizleri PerkinElmer Spectrum Two marka Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrumlar üzerinden karakteristik bantlar değerlendirilerek örneklerin fonksiyonel grup içerikleri yorumlanmıştır.

3.4.3 Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyeli ölçümü

Elde edilen nanoparçacıkların tane boyut dağılımı ve kolloidal kararlılığın belirlenmesi amacıyla zeta potansiyel ölçümleri Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Boyut dağılımı Dinamik Işık Saçılımı (DLS) yöntemiyle, yüzey yükü ve kararlılık değerlendirmesi ise zeta potansiyel ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Termogravimetrik analiz (TGA) ölçümü

Sentezlenen AgNP'lerin termal davranışları termogravimetrik analiz (TGA) yöntemi ile belirlenmiştir. Analizler PerkinElmer STA 8000 termal analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler hava atmosferinde ve 20 mL/dk gaz akış hızı ile yapılmıştır. Numuneler 30–700 °C sıcaklık aralığında 2 °C/dk ve 10 °C/dk ısıtma hızlarında sıcaklığa maruz bırakılmıştır. TGA verileri sıcaklığa bağlı % kütle değişimi eğrileri olarak kaydedilmiştir.

3.4.5. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ölçümü

Sentezlenen AgNP'lerin morfolojik özelliklerinin ve parçacık boyutu dağılımının belirlenmesi amacıyla Geçirimli Elektron Mikroskopisi (Transmission Electron Microscopy, TEM) analizi gerçekleştirilmiştir. TEM ölçümleri, Bayburt Üniversitesi Bilimsel Uygulama ve Araştırma Merkezi (BÜMER) bünyesinde hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Numune hazırlığı için elde edilen AgNP süspansiyonu ultra saf su ve etanol gibi uygun bir çözücüde disperse edilerek kısa süreli sonikasyon uygulanmıştır. Daha sonra süspansiyondan alınan bir hacim örnek, karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. TEM görüntülemeleri FEI TALOS F200S TEM cihazı kullanılarak 200 kV hızlandırma gerilimi ile gerçekleştirilmiştir.

3.5. *Vitex agnus-castus* ekstraktları ve sentezlenen AgNP'ler ile AChE enzimi inhibisyon çalışmaları

AChE enziminin aktivitesinin belirlenmesi için spektroskopik bir yöntem olan Ellman yöntemi kullanılmıştır. AChE enzimi asetiltiyokolin iyodür (ATCI) substratı ile etkileşime girerek tiyokolin ürününü oluşturur. Oluşan tiyokolin 5,5'- ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli bir kompleks oluşturur. UV-Vis spektrofotometre ile 412 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda oluşan ürünün miktarı belirlenerek, enzim ile ilgili kinetik çalışmaların takibi mümkün hale gelmektedir.

Ellman metodu için KH2PO4 (0,362 g) ve K2HPO4 (8,245 g) kullanılarak her seferinde 500 mL 0,1 M'lık pH'ı 8 olan fosfat tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'ının ayarlanması oda sıcaklığında ve 1 M KOH ve 1 M HCl çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. Enzimin stabil çalışabilmesi için hazırlanan fosfat tamponunun yeni hazırlanmış olması gerekmektedir.

Deneyde kullanmak için DTNB, ATCI ve AChE çözeltileri hazırlanıp alikotlanarak -20°C'da saklanmıştır. Deneyden hemen önce çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenip deneyde kullanılmıştır. Ellman reaktifi olan DTNB için 0,396g ve 0,15g Na_2CO_3 tartılıp ultra saf suda çözündürüp 100 mL'ye tamamlanmıştır. 1,5 mL olacak şekilde tüplere aktarılıp -20°C'de saklanmıştır. ATCI için ise 0,075M'lık çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 0,5 mL olacak şekilde mikro santrifüj tüpüne aktarılarak -20°C'de saklanmıştır.

AChE için 500 ünite eşdeğer miktarda enzim 100 mL fosfat tamponu içerisinde çözündürülerek 5 U/mL konsantrasyonda olacak şekilde stok enzim çözeltisi hazırlanmıştır. 0,8 mL'lik hacimler halinde 1,5 mL'lik tüplere aktarılıp -20°C'de saklanmıştır. Çalışmadan önce 0,8 mL fosfat tamponu eklenerek toplam hacmi 1,6 mL'ye çıkarılıp 2,5 U/mL enzim ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında AChE inhibisyonunun belirlenmesi amacıyla Ellman yöntemine dayalı reaksiyon karışımı sırasıyla hazırlanmıştır. DTNB çözeltisi alüminyum folyo ile sarılı halde bekletilir. Önce 3 mL fosfat tamponu bir cam tüpe konulup sırasıyla 100 µL AChE enzimi ve 100 µL inhibitör eklenir. 15 dk oda sıcaklığında aydınlıkta inkübasyona bırakılıp her 5 dk'da bir karıştırılır. İnkübasyon süresi bittikten sonra 100 µL DTNB ajanı konularak vortekslenir. Son aşamada cam tüpteki örnek alınarak kuvartz küvete aktarılıp 20 µL ATCI dikkatlice eklenerek 2-3 kere çek-bırak yapılarak iyice karışması sağlanır. 10 saniyelik bir gecikme ile küvet UV-Vis spektrofotometresine yerleştirilip ölçüme başlanır.

Bitki ekstraktları ve NP'ler sırasıyla 6,25, 12,5, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda dH2O ile hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler 5 tekrar olacak şekilde körleriyle birlikte UV-Vis spektrofotometre cihazı ile 412 nm'de toplam 420 saniye boyunca her 15 saniyede bir okuma alınacak şekilde ölçülmüştür.

Çizelge 3.4. AChE inhibisyon tayininde kullanılan reaksiyon karışımı içerikleri ve yüzde inhibisyon hesaplamasında kullanılan deneysel gruplar

	FOSFAT TAMPONU	**DTNB**	**AChE**	**ATCI**	**İNHİBİTÖR (ekstrakt, AgNP ve rivastigmin)**	**ddH_2O**
A	3mL	100µL	100µL	20µL	-	100µL
B	3mL	100µL	100µL	20µL	100µL	-
C	3mL	100µL	-	20µL	100µL	100µL
D	3mL	100µL	-	20µL	-	200µL

A: Sadece inhibitörün olmadığı örnek

B: Enzim ve inhibitörün olduğu örnek

C: Sadece enzimin olmadığı örnek

D: Enzimin ve inhibitörün olmadığı örnek

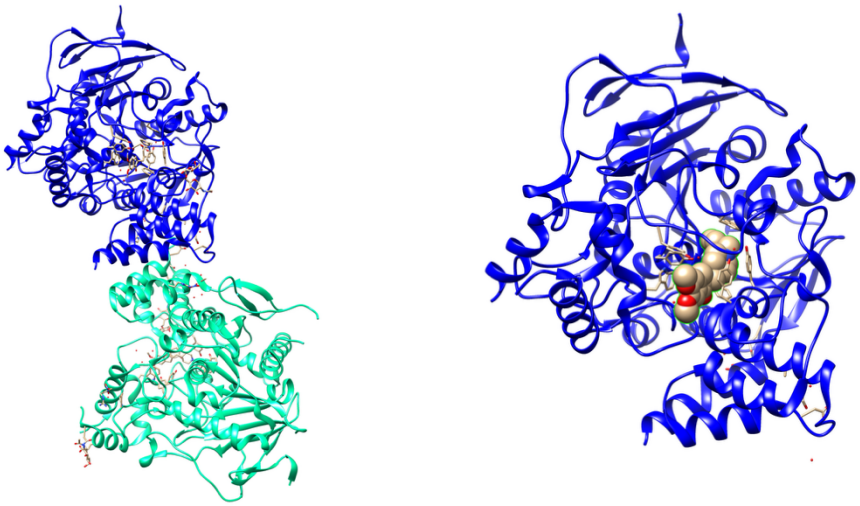
$$\%\ \textbf{İnhibisyon} = \frac{(\boldsymbol{D}-\boldsymbol{A}) - (\boldsymbol{C}-\boldsymbol{B})}{(\boldsymbol{D}-\boldsymbol{A})} \times \mathbf{100} \qquad (\mathbf{3.1})$$

- Denklem (3.1) kullanılarak yapılan AChE enzimi için %inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

3.6. Moleküler kenetlenme (Docking) çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında, *Vitex agnus-castus* yaprak ekstraktlarında bulunan fitokimyasal bileşiklerin arasında 13 tanesi seçilerek AChE enzimi ile olası bağlanma davranışlarının öngörülmesi amacıyla moleküler docking analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi hedef protein olarak Protein Data Bank (PDB) veri tabanında yer alan insan AChE kristal yapısı (PDB ID: 4EY7) kullanılmış ve docking hesaplamaları yalnızca A zinciri (Chain A) üzerinden yürütülmüştür.

a) **b)**

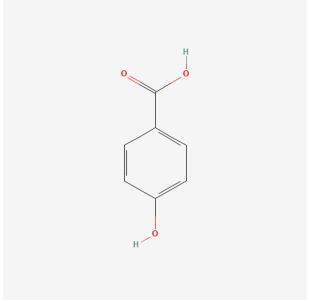
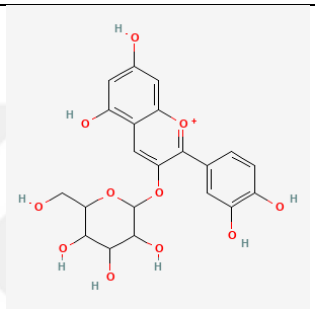
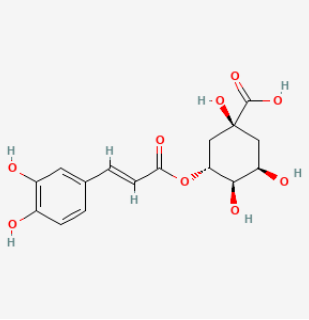
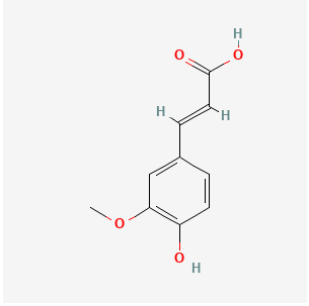


Şekil 3.6. a) Protein Data Bank (PDB) veri tabanından alınan insan AChE kristal yapısı (PDB ID: 4EY7) **b)** 4EY7'nin A zincirinin kristal yapısı.

AChE enzimine ait 4EY7 yapısı RCSB PDB protein veri tabanından PDB formatında indirilmiştir. Kristal yapıda ko-kristal inhibitör olarak bulunan Donepezil (E20) molekülü docking öncesinde yapıdan uzaklaştırılmıştır. Preparasyon aşamasında yapıda bulunan tüm çözücü ve su molekülleri silinmiş ve protein docking hesaplamalarına uygun hale getirilmiştir. Protein hazırlığı sırasında fizyolojik koşulların temsil edilmesi amacıyla pH 7.4 esas alınmıştır. Protein yapısı, AutoDock Vina'nın UCSF Chimera entegrasyonu aracılığıyla docking'e hazırlanmıştır. Gasteiger kısmi yükleri atanarak reseptör dosyası PDBQT formatında üretilmiştir.

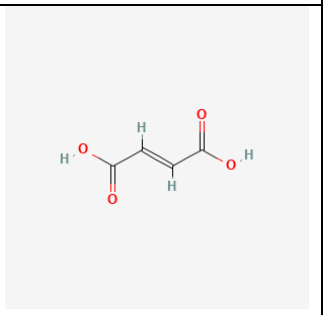
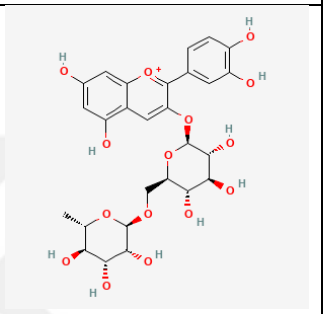
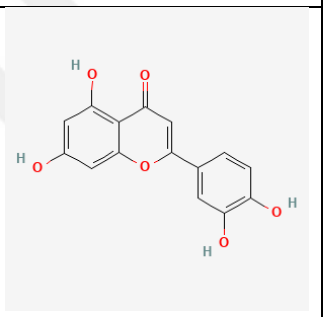
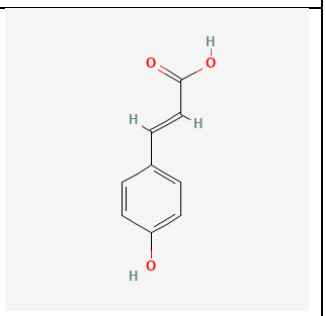
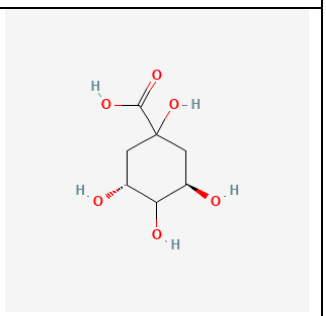
Docking analizinde kullanılan 13 ligandın üç boyutlu yapıları PubChem veri tabanından temin edilmiştir. Ligandlar docking öncesinde preparasyondan geçirilmiş, pH 7.4 koşulu esas alınarak uygun forma getirilmiş ve AutoDock Vina (UCSF Chimera) üzerinden Gasteiger kısmi yükleri atanarak PDBQT formatına dönüştürülmüştür.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan13 ligand ve PubChem CID'leri.

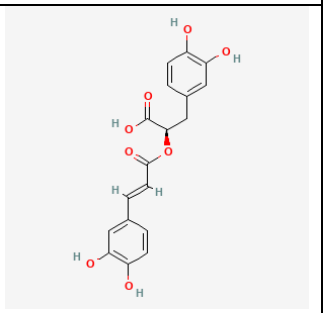
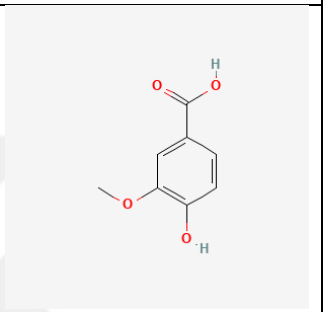
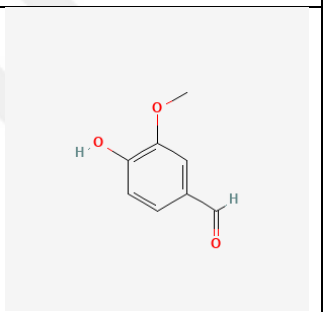
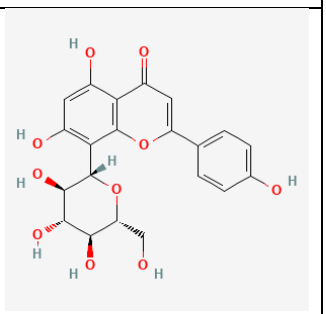
No	Ligand Adı	PubChem CID	2D Yapısı
1	4-Hydroxybenzoic acid	135	
2	Cyanidin-3-glucoside	4481259	
3	Chlorogenic acid	1794427	
4	Ferulic acid	445858	

*Devamı arkada

Çizelge 3.5. Devamı

No	Ligand Adı	PubChem CID	2D Yapısı
5	Fumaric acid	444972	
6	Keracyanin	441674	
7	Luteolin	5280445	
8	p-Coumaric acid	637542	
9	Vanillin	37439	

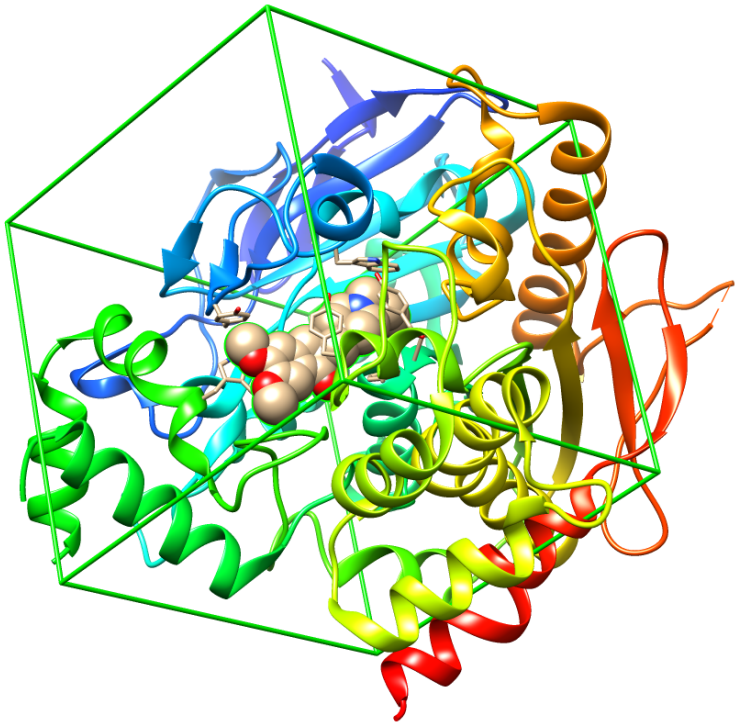
Çizelge 3.5. Devamı

No	Ligand Adı	PubChem CID	2D Yapısı
10	Rosmarinic acid	5281792	
11	Vanillic acid	8468	
12	Quinic acid	1183	
13	Vitexin	5280441	

AChE'nin aktif bölge oluğu, katalitik reaksiyonun gerçekleştiği katalitik aktif bölge (CAS) ve oluğun girişinde konumlanan periferal anyonik bölge (PAS) olmak üzere iki alt bölge bağlamında değerlendirilmiştir. CAS bölgesi, katalitik triadı oluşturan Ser203-Glu334-His447 kalıntılarını ve aktif bölge içindeki temel bağlanma elemanlarını (Trp86) içeren derin oluk kısmı olarak kabul edilmiştir. PAS ise aktif oluğun girişinde yer alan ve ligandların yönlenmesi ve bağlanması üzerinde etkili olabilen başlıca kalıntıların (Tyr72, Asp74, Trp286, Tyr341) bulunduğu bölge olarak ele alınmıştır. Bu

yaklaşım, ligandların CAS'a ve PAS bölgelerine yönelik bağlanma eğilimlerinin karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır.

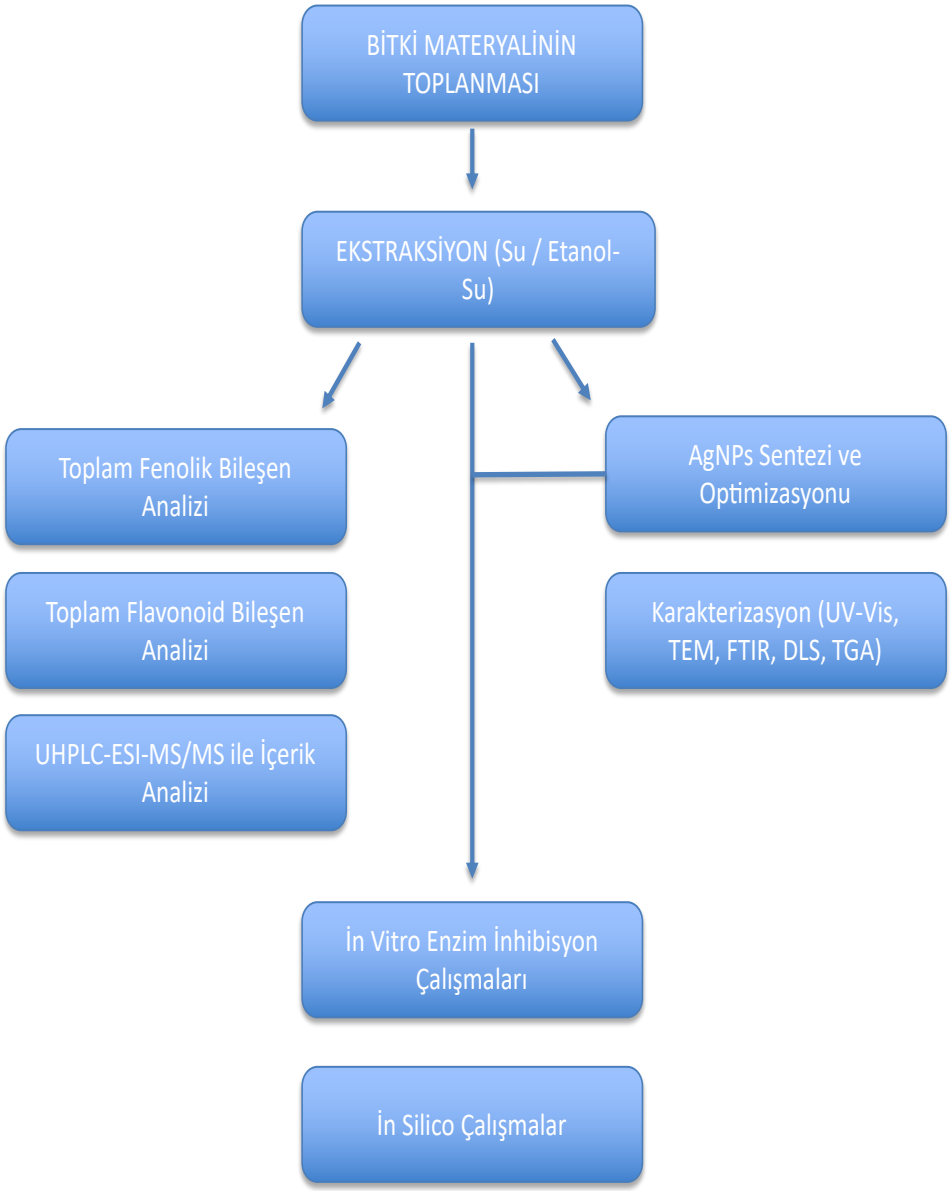
Docking hesaplamaları AutoDock Vina v1.1.7.3 kullanılarak yapılmıştır. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi grid box aktif oluğu (CAS ve PAS bölgeleri) kapsayacak şekilde tanımlanmıştır (center: -14.23, -43.79, 27.57; size: 35 × 35 × 35 Å). Docking parametreleri exhaustiveness = 8, num_modes = 9 ve energy_range = 3 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Her ligand için en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip Mode 1 pozu referans poz olarak seçilmiştir.



Şekil 3.7. Çalışmada 4EY7'nin A zinciri üzerinden seçilen grid box

Docking sonrası elde edilen ligand–AChE komplekslerinin görselleştirilmesi ve etkileşim analizleri BIOVIA Discovery Studio Visualizer (DSV) v25.1.0.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kompleksler 2D ve 3D düzeyde incelenip ligand-protein etkileşimleri konvansiyonel hidrojen bağları, π-π stacking etkileşimleri, π-alkil/π-sigma etkileşimleri ve hidrofobik temaslar başlıkları altında sınıflandırılmıştır. Etkileşime katılan aminoasit kalıntıları ve etkileşim mesafeleri dikkate alınarak ligandların aktif oluk içerisindeki bağlanma profilleri değerlendirilmiştir.

Şekil 3.8'de deneysel çalışma boyunca izlenen akış, şema olarak verilmiştir.



Şekil 3.8. Bütün çalışma boyunca izlenen deneysel akış.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, *Vitex agnus-castus* bitkisinin yapraklarından %60 (v/v) etanol ve çift distile su (ddH_2O) çözücülerinde 3.2.1. bölümünde anlatıldığı gibi ekstraktlar hazırlanmış ve ekstrakt verimlilikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları belirlenmiş, ayrıca fenolik bileşen analizi gerçekleştirilmiştir. Her iki ekstraktın, Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli rol oynayan AChE enzimi üzerindeki etkileri incelenerek inhibitör potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Etanol ve su ekstraktları kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanoparçacıklar sentezlenmiş; pH, reaksiyon süresi, ışık koşulları, ekstrakt konsantrasyonu ve $AgNO_3$ konsantrasyonu gibi bağımsız değişkenlerin sentez üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İki ekstrakttan ayrı ayrı elde edilen AgNP'lerin bir kısmı, 2 °C/dk ve 10 °C/dk ısıtma hızlarında 800 °C'ye kadar kalsine edilmiştir. Sentezlenen tüm AgNP'lerin yapısal ve yüzey özellikleri TEM, Zetasizer (hidrodinamik boyut), zeta potansiyel, FTIR ve DSC/TGA analizleri ile karakterize edilmiştir.

Son olarak hem ekstraktların hem de bu ekstraktlardan sentezlenen (kalsinasyon öncesi ve sonrası) AgNP'lerin AChE inhibisyonu üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu bölümde elde edilen bulgular sunulmuş; literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılarak tartışılmıştır. *Vitex agnus-castus* yaprak özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile AChE inhibisyonu arasındaki ilişki analiz edilmiş; yeşil sentezle elde edilen AgNP'lerin ve farklı ısıtma hızlarında kalsine edilmiş formlarının AChE inhibisyon performansları kıyaslanmıştır. Çalışmanın sonuçlarının, bitkisel temelli terapötik yaklaşımlar ve biyoteknolojik uygulamalar açısından sağlayabileceği katkılar vurgulanmıştır.

4.1. *Vitex agnus-castus* Bitkisinin Ekstraktlarının Fenolik İçerik Analizi

Vitex agnus-castus yaprak ekstraktlarının fenolik ve flavonoid bileşen profili, hedefli analiz yaklaşımıyla UHPLC-MS/MS kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, etanol ekstraktı (EE) ve su ekstraktı (SE) örneklerindeki fenolik asitler, flavonoidler ve ilişkili polifenoller; referans olarak belirlenmiş standart bileşiklerle karşılaştırılarak, alıkonma zamanları (RT) ve MS/MS yanıtı (Response) değerleri dikkate alınarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.1). Fenolik bileşen içerikleri, µg/g ekstrakt cinsinden raporlanmış ve elde edilen veriler bu doğrultuda değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. *Vitex agnus-castus* bitkisinin etanol ve su ekstraktlarına ait UHPLC-MS/MS analizi sonuçları

Fenolik bileşenler	RT	Etanol ekstraktı (µg/g ekstrakt)	Su ekstraktı (µg/g ekstrakt)
Kuinik asit	2,388	4810,85	5447,66
Fumarik asit	3,870	370,29	896,98
Gallik asit	5,548	TE	TE
Pirogallol	6,420	TE	TE
Kerasyanin klorür	10,320	7,26	6,67
Siyanidin-3-O-glukozit	10,510	25,02	25,33
Klorojenik asit	10,787	4943,47	3721,74
Kateşin	10,920	TE	TE
4-Hidroksibenzoik asit	11,247	6361,71	10414,78
Peonidin-3-O-glukozit	11,336	TE	TE
Epikateşin	11,370	TE	TE
Epigallokateşin gallat (EGCG)	11,495	TE	TE
Kafeik asit	11,520	TE	TE
Siringik asit	11,649	TE	TE
Viteksin	11,728	17,20	13,87
Vanilik asit	11,767	TE	16,84
Ellajik asit	11,992	TE	TE
Hesperidin	12,016	TE	TE
Naringin	12,263	TE	TE
p-Kumarik asit	12,391	112,14	280,24

*Devamı arkada

Çizelge 4.1. Devamı

Fenolik bileşenler	RT	Etanol ekstraktı (µg/g ekstrakt)	Su ekstraktı (µg/g ekstrakt)
Rosmarinik asit	12,454	12,72	15,95
Ferulik asit	12,505	TE	69,44
Taksifolin	12,513	TE	TE
Vanilin	12,594	47,97	47,97
Sinapik asit	12,736	TE	TE
Mirisetin	12,875	TE	TE
Resveratrol	13,141	TE	TE
Luteolin	13,443	123,81	72,42
Kuersetin	13,499	TE	TE
Apigenin	14,038	TE	TE
Naringenin	14,096	TE	TE
İzoramnetin	14,223	TE	TE
Krizin	15,605	TE	TE
Kurkumin	15,700	TE	TE
Galangin	15,937	TE	TE

TE: Tespit edilemedi, miktarlandırma sınırının (LOQ) altında kalan bileşenler olarak değerlendirildi.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi 35 tane standart kullanılarak içerik analizi yapılmıştır. Kullanılan standartlar kuinik asit, fumarik asit, gallik asit, pirogallol, kerasyanin klorür, siyanidin-3-O-glukozit, klorojenik asit, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, peonidin-3-O-glukozit, epikateşin, epigallokateşin gallat (EGCG), kafeik asit, siringik asit, viteksin, vanilik asit, ellajik asit, hesperidin, naringin, p-kumarik asit, rosmarinik asit, ferulik asit, taksifolin, vanilin, sinapik asit, mirisetin, resveratrol, luteolin, kuersetin, apigenin, naringenin, izoramnetin, krizin, kurkumin ve galangin'dir.

Çizelge 4.1'deki veriler, her iki ekstraktın fenolik bileşiminde fenolik asitler ve ilişkili bileşiklerin baskın olduğunu göstermektedir. SE için nicel olarak en baskın bileşikler 4-hidroksibenzoik asit (10414,78 µg/g ekstrakt), kuinik asit (5447,66 µg/g

ekstrakt) ve klorojenik asit (3721,74 µg/g ekstrakt) olup, bunları fumarik asit (896,98 µg/g ekstrakt) ve p-kumarik asit (280,24 µg/g ekstrakt) izlemektedir. Ayrıca SE'de ferulik asit (69,44 µg/g), vanilik asit (16,84 µg/g) ve rosmarinik asit (15,95 µg/g) de ölçülebilir düzeyde saptanmıştır.

EE için ise en yüksek miktarlarda bulunan bileşikler 4-hidroksibenzoik asit (6361,71 µg/g ekstrakt), klorojenik asit (4943,47 µg/g ekstrakt) ve kuinik asit (4810,85 µg/g ekstrakt) olup, bunları fumarik asit (370,29 µg/g ekstrakt) ve p-kumarik asit (112,14 µg/g ekstrakt) takip etmektedir. Ayrıca EE'de viteksin (17,20 µg/g) ve rosmarinik asit (12,72 µg/g) de nicel olarak raporlanmıştır. Genel karşılaştırma açısından, 4-hidroksibenzoik asit ve kuinik asit miktarlarının SE'de daha yüksek seyrettiği, buna karşılık klorojenik asidin EE'de daha yüksek düzeyde bulunduğu; p-kumarik asit ve fumarik asit gibi diğer fenolik asitlerin ise SE'de belirgin biçimde daha yüksek değerlere ulaştığı görülmektedir.

Veriler, iki ekstrakt arasında çözücü polaritesine bağlı belirgin bir zenginleşme paterni olduğunu göstermektedir. SE fenolik asit ve organik asit havuzu açısından daha yüksek olup 4-hidroksibenzoik asit (10414,78 µg/g) düzeyi EE'ye göre yaklaşık 1,64 kat fazladır (EE: 6361,71 µg/g); benzer biçimde fumarik asit (896,98-370,29 µg/g; ~2,42 kat) ve p-kumarik asit (280,24-112,14 µg/g; ~2,50 kat) SE'de daha yüksektir. Ferulik asit (69,44 µg/g) ile vanilik asit (16,84 µg/g) yalnızca SE'de nicel olarak görülmüştür.

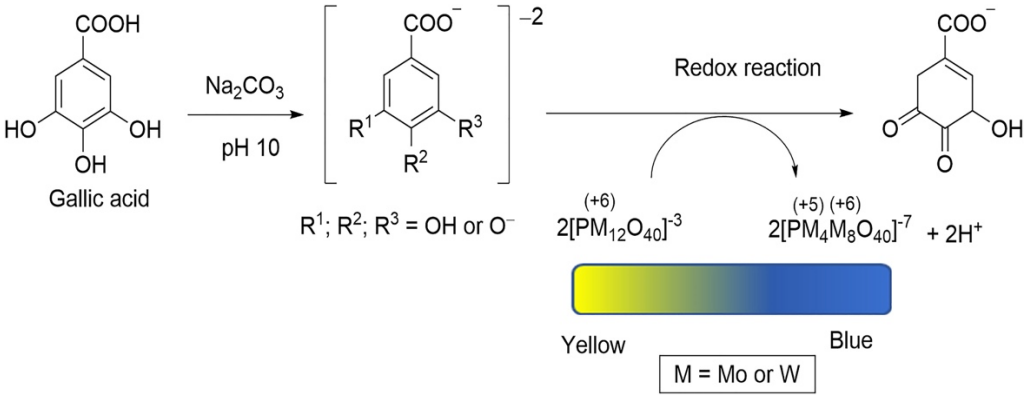
EE klorojenik asitte SE'ye göre yaklaşık 1,33 kat daha yüksek değer vermiştir (4.943,47-3.721,74 µg/g) ve ayrıca vitexin (EE: 17,20 µg/g; SE: 13,87 µg/g) gibi flavonoid glikozitleriyle ilişkili fenoliklerde göreli bir avantaj sergilemiştir.

Bu sonuçlar ekstrakt alırken kullanılan çözücülerin polarite farklarının içerik ve içerdiği ürünlerin nicel miktarı açısından oldukça kritik olduğunu göstermektedir. Suyun hidroksibenzoik asit ve fumarik asit gibi küçük ve yüksek polariteye sahip bileşiklerin ekstraksiyonunda daha etkili olduğunu göstermektedir. Etanolün ise geniş bir polarite aralığında yüksek polariteye sahip fenolik esterler ve flavonoidlerin çözünürlüğünü arttırarak zenginleştirme sağladığı literatürle uyumlu şekilde görülmüştür (Dai & Mumper, 2010; Osorio-Tobón, 2020; Sultana vd., 2009).

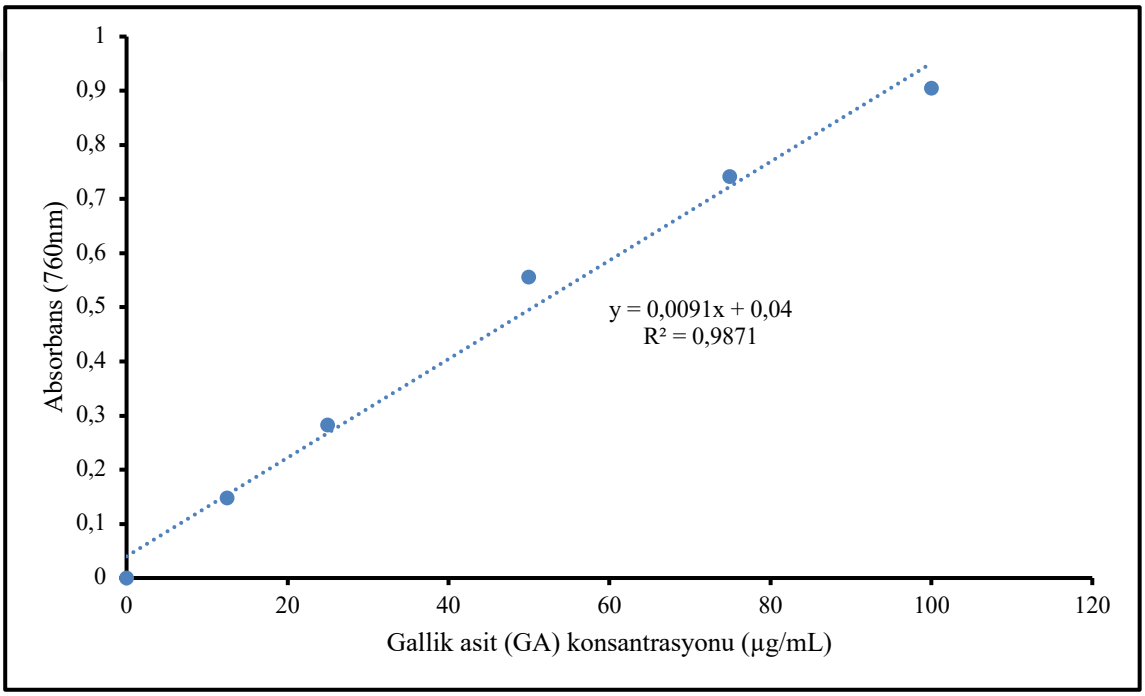
Çözücü seçiminin fenolik profil üzerinde belirleyici olabildiğini ve hidroalkolik sistemlerin bazı fenoliklerin ve flavonoidlerin ekstraksiyonunda avantaj sağlayabildiğini vurgulayan metodolojik literatürle tutarlıdır (Abubakar & Haque, 2020).

4.2. Toplam fenolik ve flavonoid içerik analizi

Toplam fenolik içerik tayini için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak yapılan analizde sarıdan maviye dönen renk değişimi UV-Vis spektrofotometri ile 760 nm'de takip edilerek yapılmıştır. Çalışmada standart bileşik olarak kullanılan gallik asit, şekil 4.1'deki gibi Folin-Ciocalteu reaktifi ile redoks bir tepkime vermesiyle bir renk değişimi gerçekleşmiştir.



Şekil 4.1. FC yönteminde gallik asit ile Folin-Ciocalteu reaktifi arasında gerçekleşen redoks tepkimesi (Dominguez-López vd., 2024).

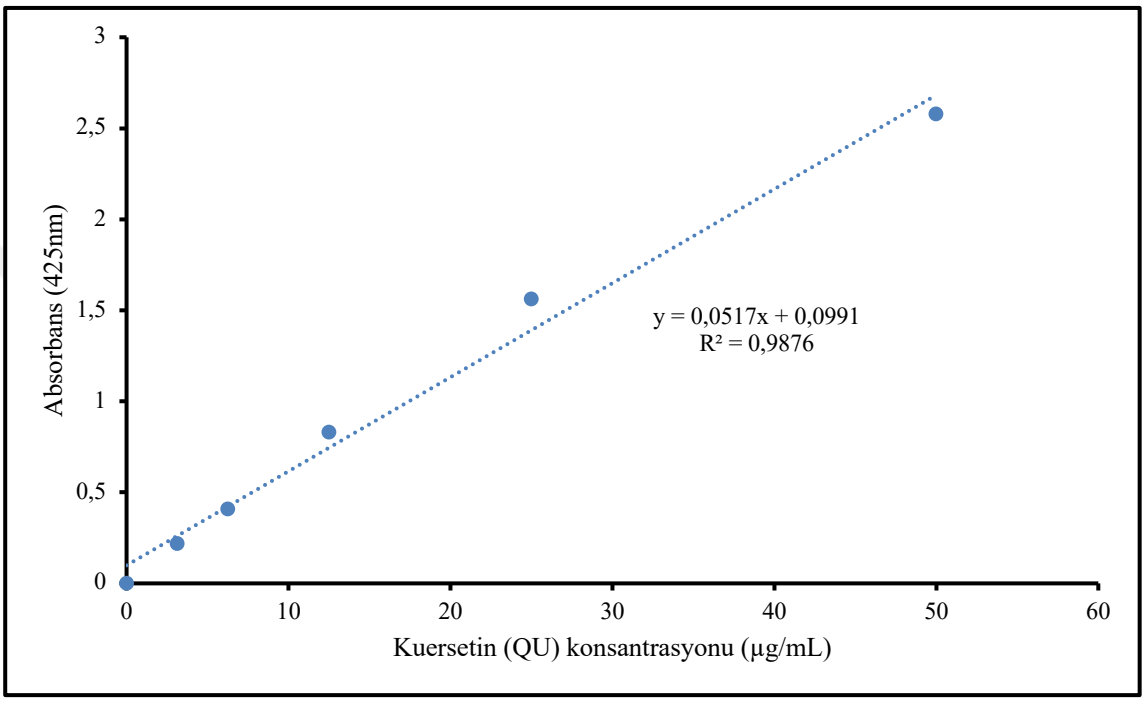


Şekil 4.2. Folin–Ciocalteu (TPC) metodu için gallik asit eşleniği olarak çizilen standart grafiği absorbans sonuçları (760 nm).

Şekil 4.2'de, Folin–Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik içeriğin (TPC) tayininde referans standart olarak kullanılan gallik asidin (GA) farklı konsantrasyonlarından elde edilen 760 nm absorbans değerlerine göre çizilen standart kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Kalibrasyon doğrusu y = 0,0091x + 0,04 eşitliği ile tanımlanmış ve eğrinin belirlenen aralıkta iyi bir doğrusal uyum sergilediği R^2 = 0,9871 değeri ile gösterilmiştir. Elde edilen bu regresyon denklemi kullanılarak numunelerin 760 nm'de ölçülen absorbansları GA eşdeğer konsantrasyonlara dönüştürülmüş; sonuçlar mg GAE/g özüt cinsinden hesaplanarak kaydedilmiştir.

Şekil 4.3'te, $AlCl_3$ kolorimetrik yöntemi ile ekstraktların toplam flavonoid içeriğinin (TFC) tayini için referans bileşik olarak kullanılan kuersetinin (QU) kalibrasyon grafiği görülmektedir. Bu grafik için kuersetinin farklı konsantrasyonlardaki

çözeltilerinin absorbansları 425 nm'de ölçülmektedir. Kalibrasyon doğrusu y = 0,0517x + 0,0991 eşitliği ile tanımlanmış olup, incelenen konsantrasyon aralığında doğrusal ilişkinin yüksek olduğu R^2 = 0,9876 değeri ile doğrulanmıştır. Bu regresyon denklemi kullanılarak numunelerin 425 nm'de ölçülen absorbansları kuersetin eşdeğer konsantrasyonlara dönüştürülmüş ve sonuçlar mg QUE/g ekstrakt cinsinden hesaplanarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.3. $AlCl_3$ metodu için kuarsetin eşleniği olarak çizilen standart grafiği absorbans sonuçları (425 nm).

Çizelge 4.2. *Vitex agnus-castus* bitkisinin toplam fenolik ve flavonoid bileşen değerleri (n=5)

Ekstrakt	Toplam Fenolik İçerik		Toplam Flavonoid İçerik	
	mg GAE / g ekstrakt	% RSD	mg QUE / g ekstrakt	% RSD
Etanol ekstraktı	115,23 ± 1,64	1,42	19,00 ± 0,31	1,63
Su ekstraktı	78,99 ± 1,71	2,17	19,75 ± 0,68	3,46

Çözücü tipinin toplam fenolik içerik (TPC; mg GAE/g özüt) ve toplam flavonoid içerik (TFC; mg QUE/g özüt) üzerindeki etkisi, her grup için n=5 tekrar dikkate alınarak α=0,05 anlamlılık düzeyinde Çizelge 4.2'de değerlendirilmiştir.

Toplam fenolik içerik (TPC) testinde alınan sonuçlar, %60 etanol ekstraktı için 115,23 ± 1,64 mg GAE/g (%RSD=1,42), dH_2O ekstraktı için 78,99 ± 1,71 mg GAE/g (%RSD=2,17) olarak hesaplanmıştır. Gruplar arası fark, varyanslar arası olası eşitsizliği dikkate alan Welch düzeltmeli bağımsız örneklem t-testi (iki yönlü) ile analiz edildiğinde TPC'nin %60 etanol grubunda anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulunmuştur (t=34,21; sd=7,985; p<0,0001).

Ortalama fark (%60 etanol-dH_2O) +36,24 mg GAE/g olup, %95 GA: +33,79 ile +38,68 aralığındadır. Güven aralığının sıfırı içermemesi farkın yönünü ve büyüklüğünü desteklemektedir. Varyans karşılaştırmasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (F testi p=0,9345).

Toplam flavonoid içerik (TFC) testinde alınan sonuçlar, %60 etanol ekstraktı için 19,00 ± 0,31 mg QUE/g (%RSD=1,63), dH_2O ekstraktı için 19,75 ± 0,68 mg QUE/g (%RSD=3,46) olarak hesaplanmıştır. Welch düzeltmeli t-testi sonucuna göre iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (t=2,233; sd=5,585; p=0,0702).

Ortalama fark (dH_2O − %60 etanol) +0,748 mg QUE/g olup %95 GA: −0,086 ile +1,582 aralığındadır; güven aralığının sıfırı kapsaması, çözücü etkisinin TFC için kesin olarak gösterilemediğini işaret etmektedir. Varyanslar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (F testi p=0,1558).

Bu sonuçlar, çözücü seçiminin TPC ve TFC üzerinde aynı yönde ve aynı büyüklükte etki göstermediğini ortaya koymaktadır. TPC açısından %60 etanolün belirgin üstünlüğü (p<0,0001; $\eta^2 \approx 0,99$) fenolik bileşiklerin geniş bir polarite aralığına yayılması ve hidroalkolik sistemlerin bitki matriksinden hem daha geniş fenolik fraksiyonu çözebilmesi hem de kütle transferini artırabilmesi ile uyumludur (Dai & Mumper, 2010).

Ayrıca iki grupta da TPC için %RSD'nin düşük çıkması (≤%2,17), ölçümlerin tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu ve gözlenen farkın analitik saçılmadan çok çözücü kaynaklı gerçek bir etkiyi yansıttığını desteklemektedir.

Literatürle kıyaslandığında, bu çalışmada %60 etanol ekstraktı için elde edilen TPC değeri (115,23 mg GAE/g), *Vitex agnus-castus* yaprak örneklerinde Folin–Ciocalteu yöntemiyle bildirilen yüksek fenolik içeriklerle benzer aralıkta bulunmuştur. Nitekim Gökbulut ve ark (2010) yaprak ekstraktında 123,9±2,281 mg GAE/g ekstrakt raporlamışlardır. Buna karşılık su bazlı hazırlamalarda TPC'nin daha düşük düzeylerde saptanması beklenen bir durum olarak değerlendirilmiştir.

Boujbiha ve ark. *Vitex agnus-castus* meyve dekoksiyonunda TPC'yi 78,53 mg/g ekstrakt olarak bildirmiştir. Bu değerin, dH_2O ekstraktı için belirlenen TPC değeri (78,99 mg GAE/g) ile dikkat çekici biçimde örtüştüğü görülmüştür. Söz konusu paralellik, su ekstraksiyonunda *Vitex agnus-castus* matriksinden çözünebilen fenolik fraksiyonun belirli bir düzeye daha hızlı ulaşıyor olabileceğini ve hidroalkolik sistemlerde ise

matriksten daha fazla ve daha çeşitli fenolik bileşiğin çözünebilir hâle getirilmesiyle toplam fenolik içeriğin yükseltilebildiğini düşündürmüştür.

TFC sonuçlarında ise dH_2O grubunda ortalama değerin daha yüksek olduğu gözlenmiş olmakla birlikte (19,75 vs 19,00 mg QE/g), bu fark istatistiksel anlamlılık düzeyinde doğrulanmamıştır ($p=0,0702$). Bu durumun, flavonoid fraksiyonunun çözücü değişimine fenoliklere kıyasla daha sınırlı ve heterojen yanıt vermesinden veya dH_2O grubunda %RSD'nin daha yüksek bulunması (%3,46) ve güven aralığının sıfırı kapsaması nedeniyle istatistiksel gücün sınırlanmış olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Literatürde *Vitex agnus-castus* üzerine yürütülen çalışmalarda, flavonoid sonuçlarının raporlama temeline (kuru ekstrakt), kullanılan standarda (QE/CE/RE) ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak geniş bir aralıkta değişebildiği bildirilmiştir. Latoui ve ark. *Vitex agnus-castus* yapraklarında toplam flavonoid içeriğini maksimum 19,4 mg kateşin eşdeğeri/g kuru biyokütle düzeyinde raporlamıştır. Bunun yanı sıra metanolik ekstraktında daha düşük TPC (48,05 mg GAE/g) ve daha yüksek TFC (27,45 mg QE) değerleri bildiren çalışmaların da bulunduğu görülmüştür. Bu farklılıkların örnek tipi, hasat zamanı, coğrafi köken ve yöntemsel farklılıklara bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma koşullarında TPC'nin maksimize edilmesi hedeflendiğinde %60 etanolün dH_2O'ya kıyasla daha etkin bir çözücü olduğu gösterilmiştir. Buna karşın, TFC bakımından iki çözücü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

4.3. *Vitex agnus-castus* Ekstraktlarından AgNP Sentezi

Bu tez çalışmasında *Vitex agnus-castus* ekstraktları kullanılarak yeşil sentez yaklaşımıyla AgNP üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentez verimi ve kolloidal oluşum, reaksiyon koşullarının sistematik olarak değiştirilmesiyle değerlendirilmiştir.

Bitkisel ekstraktlar, Ag^+ iyonlarının indirgenmesinde rol alan redoks-aktif bileşenler ve kolloidal kararlılığa katkı sağlayan biyomoleküller içerdiğinden, nanoparçacık oluşumunda hem indirgeyici hem de kaplayıcı işlev görebilmektedir. Bu ikili işlev, bitki aracılı metal nanoparçacık sentezinin temel mekanizması olarak birçok derleme çalışmasında vurgulanmıştır (Chung vd., 2016; Javed vd., 2020).

Sentez sürecinde nanoparçacık oluşumunun hızı ve oluşma miktarı UV-Vis spektroskopisi ile 200-800 nm aralığında okumalar yapılarak belirlenmiştir. Gümüş nanoparçacıklar sulu ortamda tipik olarak görünür bölgede belirgin bir yüzey plazmon rezonans (SPR/LSPR) bandı vermektedir. Bu bandın spektral konumu ve şekli oluşmuş parçacıkların boyutu ve kristal şekli, kırılma indisi ve parçacıklar arası aglomerasyon gibi değişkenlere duyarlıdır (Jain vd., 2006; Kelly vd., 2002; Miller ve Lazarides, 2005).

Bu nedenle, izlenen UV-Vis spektrumları, yalnızca AgNP'lerin oluşup oluşmadığını gösteren bir doğrulama aracı olarak değil, aynı zamanda reaksiyon parmak izi takibi ile koşul optimizasyonunda da kullanılabilmektedir (Haiss vd., 2007; Jain vd., 2006).

Bu çalışmada ekstraktlar EE ve SE olmak üzere iki grup olarak ele alınmıştır. Ancak sentez basamağına geçmeden önce, her iki ekstrakt da suda çözülerek reaksiyon matriksi oluşturulmuştur. Bu yaklaşım, biyolojik testlere uyum (sulu ortam), iyonik kuvvet/pH kontrolü ve UV-Vis izleme kolaylığı açısından avantaj sağlarken, aynı zamanda ortamın dielektrik özellikleri nedeniyle ölçülen plazmonik yanıtın yorumunu da önemli hale getirmektedir (Kelly vd., 2002).

4.3.1. Deneysel tasarım ve UV-Vis bölgede izleme yaklaşımı

Bu bölümdeki deneysel tasarım, *Vitex agnus-castus* ekstraktlarıyla AgNP sentezine etki ettiği bilinen başlıca süreç değişkenlerini aynı çerçevede ele alacak şekilde yapılandırılmıştır.

Çalışmada $AgNO_3$ konsantrasyonu, ekstrakt konsantrasyonu, pH ve ışık koşulu (karanlık/aydınlık) değerlendirilmiştir. Böylece her bir parametrenin tekil etkisinin yanı sıra, özellikle bitkisel indirgeme sistemlerinde kritik olan Ag^+/ekstrakt oranı ve pH-bağımlı iyonizasyon gibi etkileşimlerin UV-Vis ölçümler üzerinden görünür hale getirilmesi amaçlanmıştır.

Belirlenen parametreler hem SE hem EE gruplarında karanlık ve aydınlık koşullarda yürütülmüş ve seçilmiş bir koşul için zamana bağlı (0-24 saat) izlenerek reaksiyon kinetiği hakkında tamamlayıcı bilgiler elde edilmiştir.

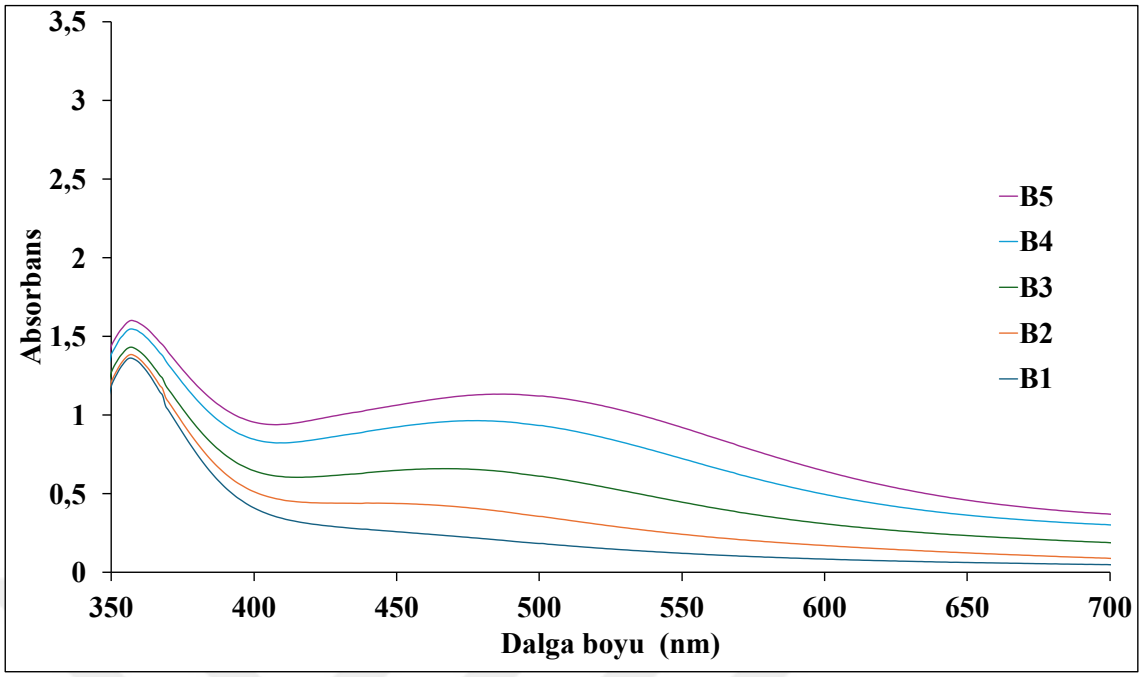
4.3.2. $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı sentez sonuçları

- **Karanlık ortam**

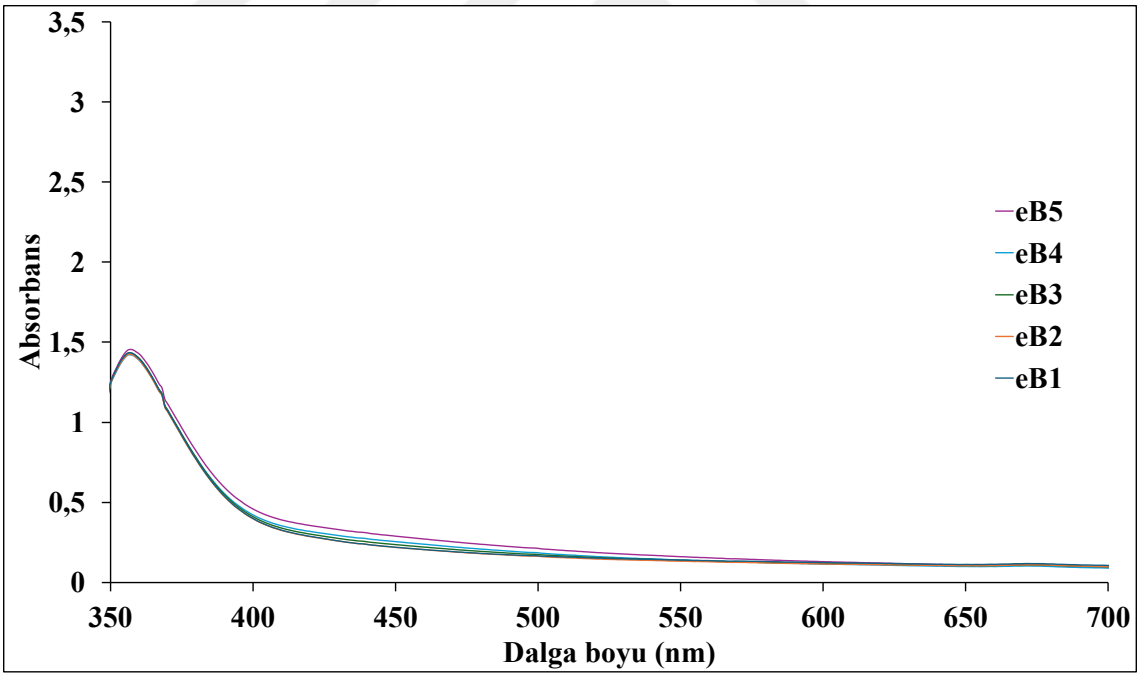
Karanlık koşullarda artan $AgNO_3$ konsantrasyonuyla bazı UV-Vis spektrumlarında görünür bölgede absorbsiyonun yükselmesi, Ag^+ iyonlarının indirgenerek nanoparçacık oluşumuna doğru bir ilerleme olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte bantların zayıf kalması ve belirgin bir yüzey plazmon rezonansı (SPR) tepesinin sınırlı düzeyde gözlenmesi, karanlık ortamda reaksiyon kinetiğinin daha yavaş seyrettiğine işaret etmektedir. Fotokimyasal katkının bulunmadığı bu koşullarda bitkisel ekstraktların indirgeme gücünün daha uzun sürede etkili hale gelebildiği bu sebeple Ag^+/ekstrakt oranı uygun olmadığında SPR profilinin zayıflayabileceği bilinmektedir (Siddiqi vd., 2018).

Şekil 4.4'te, SE ile sentezlenen AgNP'lerin absorpsiyon grafiğine bakıldığında, $AgNO_3$ konsantrasyonundaki artışın absorbansı belirgin biçimde yükselttiği ve geniş bir bant ile maksimum absorbsiyonun yaklaşık 450-500 nm aralığında yer aldığı görülmektedir. Buna karşılık Şekil 4.5'te, EE ile sentezlenen AgNP'lerin absorpsiyon grafiğine bakıldığında, $AgNO_3$ konsantrasyonu arttırılmasına rağmen beklenen ölçüde absorbans artışı elde edilememiştir. Bu durum

Bu durum, karanlık koşullarda yürütülen sentezlerde ekstraktın kimyasal bileşimi, indirgeme kapasitesi ve dolayısıyla reaksiyon ortamındaki etkin Ag^+/ekstrakt dengesinin kritik önem taşıdığını göstermektedir.



Şekil 4.4. Karanlık ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.



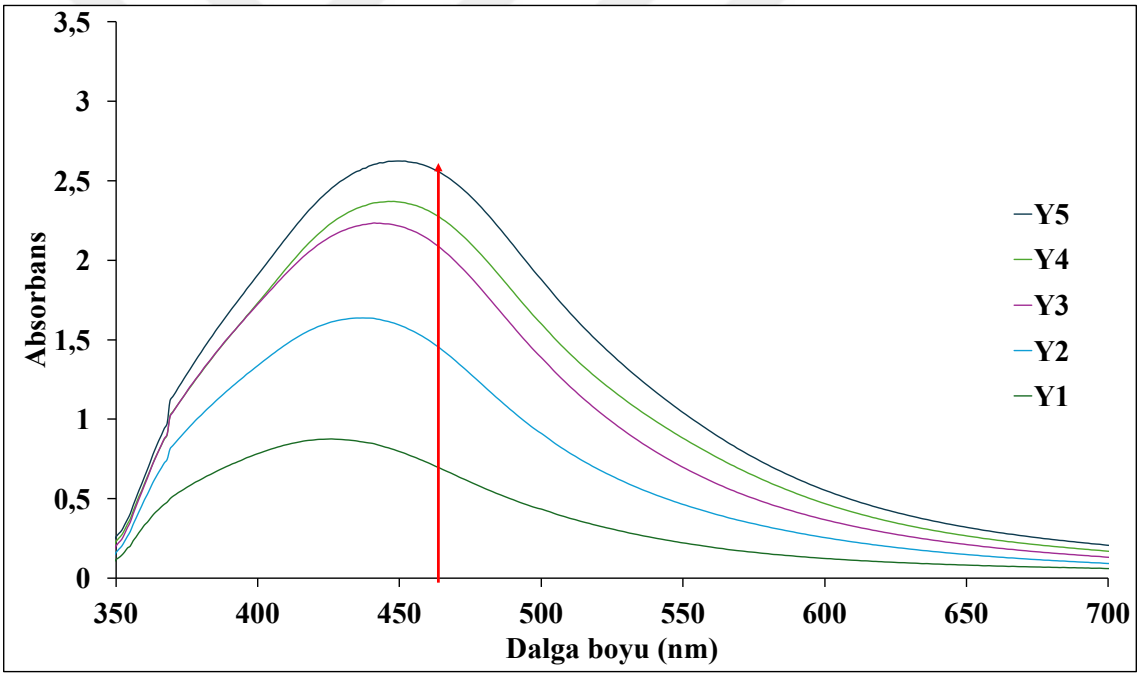
Şekil 4.5. Karanlıkta ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.

- **Aydınlık ortam**

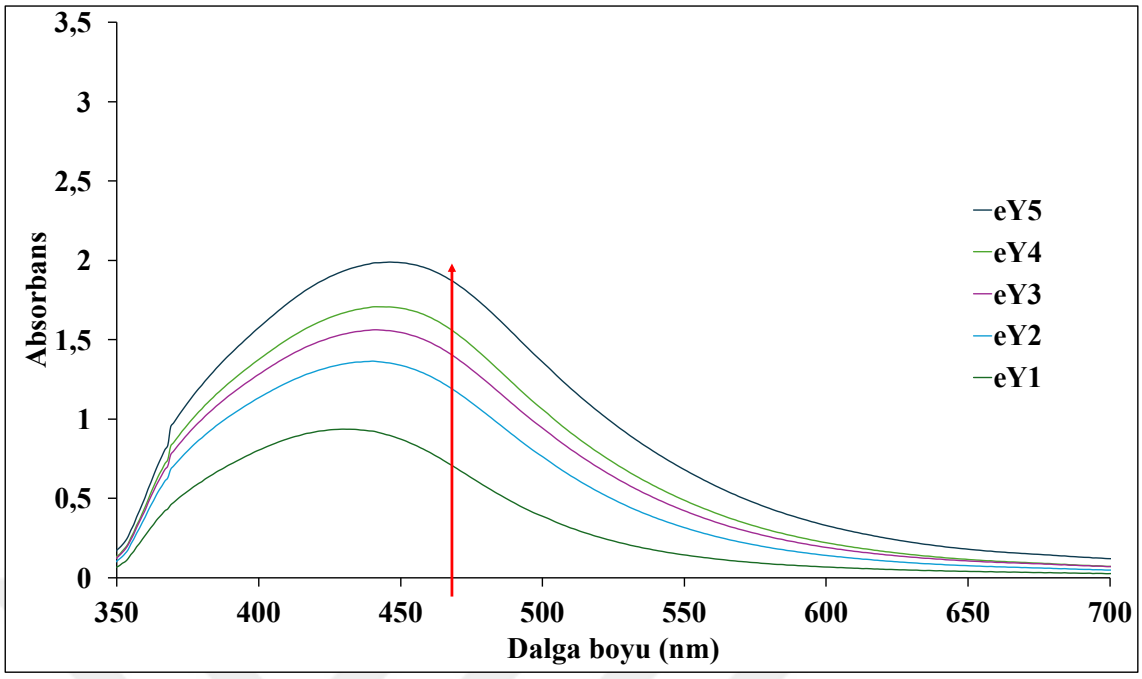
Aydınlık ortamda $AgNO_3$ derişimi yükseldikçe SPR bandının daha belirginleşmesi beklenmektedir. Işığın etkisiyle hızlanan elektron transferi, çekirdeklenmeyi artırabilir.

Işık destekli yeşil sentez çalışmalarında, UV-Vis spektrumlarında daha düşük dalga boylarında ve daha güçlü SPR bandı oluşumu sık raporlanmıştır (Mishra vd., 2020; Ulug vd., 2015). Bununla birlikte çok yüksek $AgNO_3$ düzeylerinde bant genişlemesi veya uzun dalga boyuna kayma görülüyorsa, bunun olası nedeni kaplayıcı ajan yetersizliğinden kaynaklı agregasyon olabilmektedir (Kelly vd., 2002).

SE ile yapılan çalışmada şekil 4.6'da görüldüğü gibi $AgNO_3$ derişimi arttıkça düzenli bir Abs artışı ve oldukça yüksek bir pik noktası alınmıştır. EE ile sentezlenen AgNP'lerin absorpsiyon grafiğine bakıldığında, şekil 4.7'de görüldüğü gibi, $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı düzenli bir artış olmasına rağmen SE'nin kullanıldığı örneklerde olduğu kadar yüksek bir maksimum Abs noktası görülmemiştir. Her iki ekstrakt için de 400-450 nm arası orta keskinlikte bantlar alınmıştır.



Şekil 4.6. Aydınlık ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.



Şekil 4.7. Aydınlık ortamda $AgNO_3$ konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.

4.3.3. Ekstrakt konsantrasyonuna bağlı sentez sonuçları

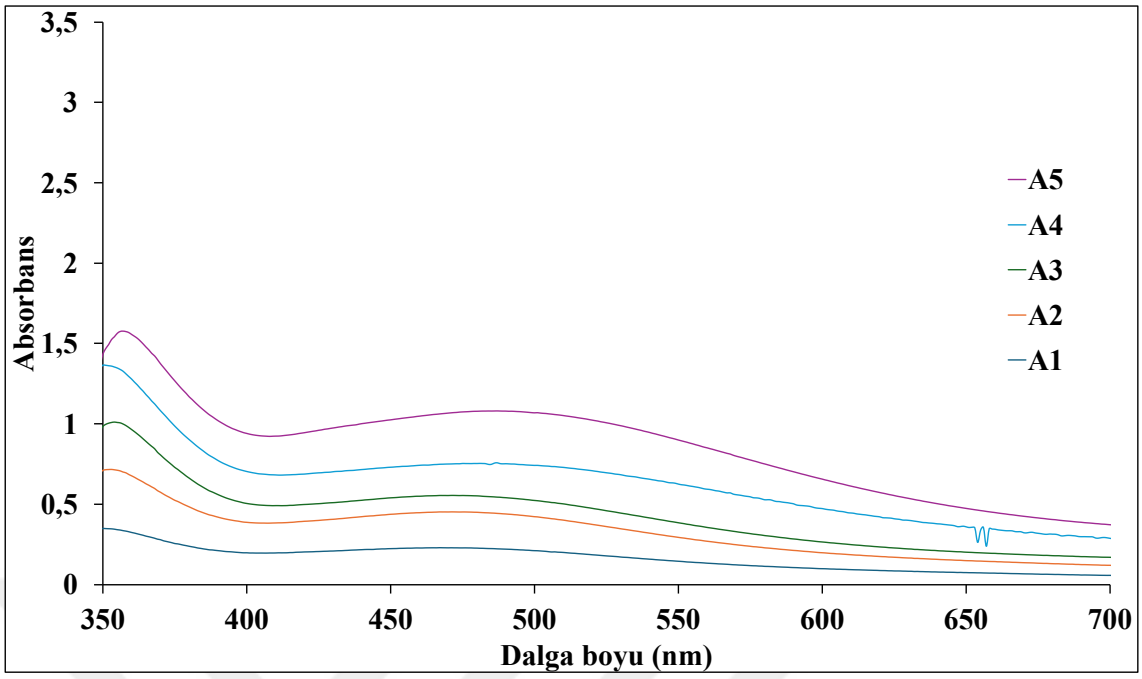
Ekstrakt konsantrasyonu, sistemdeki indirgen ajan olan fitokimyasalların miktarını ve aynı zamanda kaplama kapasitesini belirlemektedir. Uygun aralıkta ekstrakt derişiminin artırılması, çekirdeklenme sayısının artmasına ve daha kararlı kolloidlerin oluşmasına katkı sağlayabilir. Çok yüksek ekstrakt derişimleri, aşırı organik yük nedeniyle spektrumda zayıflama buna bağlı olarak plasmon sönümleme, taban çizgisi yükselmesi ve kompleksleşme davranışları oluşturabilir (Fahim vd., 2024; Rodríguez-Félix vd., 2022).

- **Karanlık ortam**

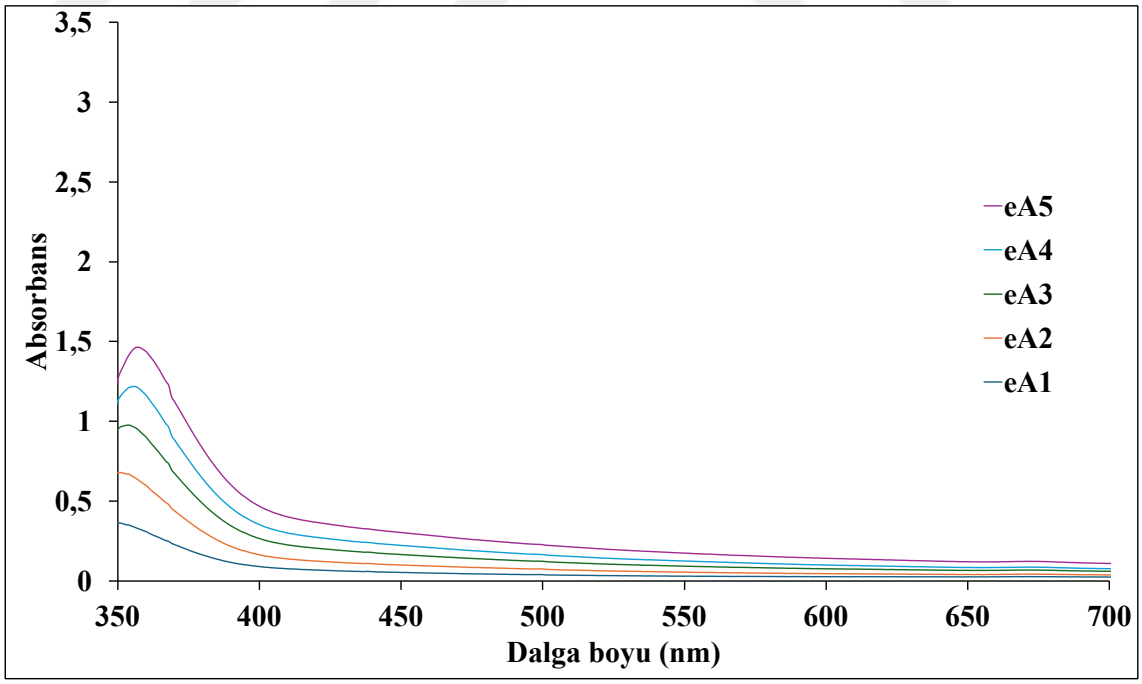
Karanlıkta gerçekleştirilen NP sentezinde ekstrakt konsantrasyonunun artışı, indirgeme kinetiğini artırıyorsa, bu durum SPR bandının zamanla belirginleşmesiyle sonuçlanmalıdır. Buna karşın spektrumlar arasındaki farkın düşük olması, seçilen $AgNO_3$ derişiminin sınırlayıcı etkisi, pH'nin fenoliklerin indirgeme gücünü etkinleştirmemesi ve karanlık koşullarda kinetiğin yavaş kalması gibi nedenlerle açıklanabilir

Ekstrakt konsantrasyonuna bağlı ölçümlerde, Şekil 4.8'de olduğu gibi, SE'nin konsantrasyonuyla birlikte az da olsa bir artış gözlemlenmiştir. 450-500 nm aralığında oldukça yayvan bir pik alınmıştır. Ancak, şekil 4.9'da görüldüğü gibi, EE'nin konsantrasyonunun artırılmasında rağmen hiçbir numunede beklenen bölgede pik oluşumu gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, karanlık ortamda EE ile nanoparçacık sentezi gerçekleşmezken, SE ile gerçekleştiği; ancak hem yeterli hızda AgNP oluşmadığı hem de oluşan AgNP'lerin aglomere olduğu anlaşılmaktadır



Şekil 4.8. Karanlık ortamda SE konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.

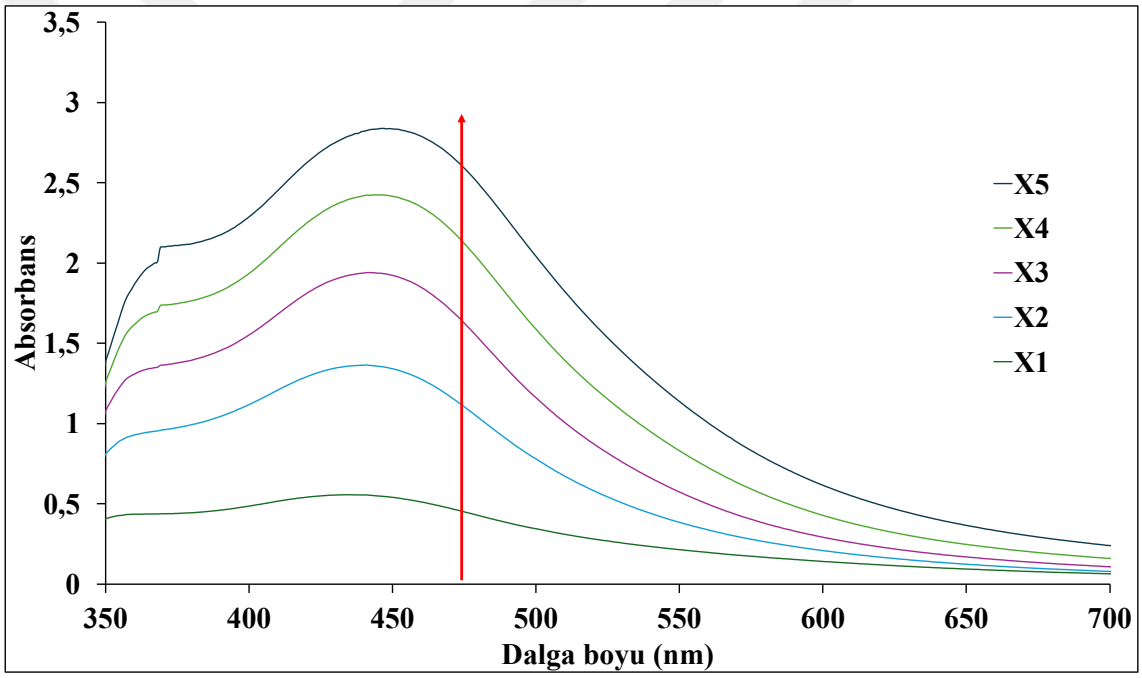


Şekil 4.9. Karanlık ortamda EE konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.

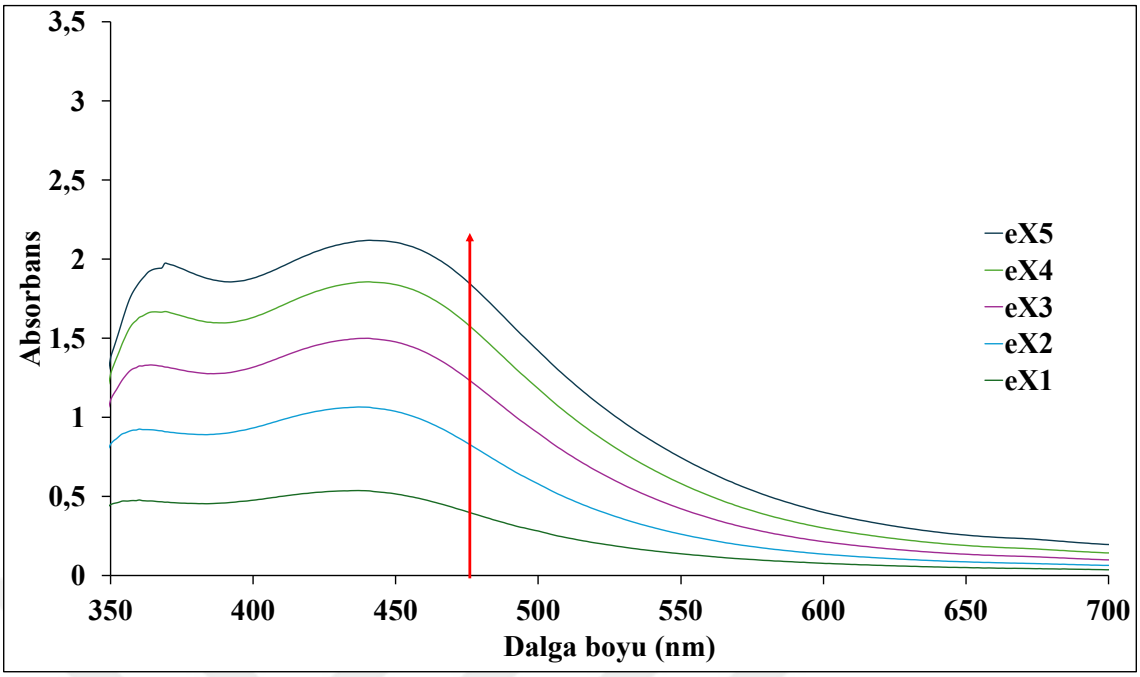
- **Aydınlık ortam**

Aydınlık koşullarda ekstrakt konsantrasyonuna duyarlılık daha net gözlenmekte olup, ışığın bitkisel bileşenlerin indirgeme etkinliğini artırması, ekstrakt derişimindeki artışın SPR şiddetine yansımasını güçlendirebilir. Bu nedenle aydınlık koşullarda optimum ekstrakt derişimi, yüksek SPR şiddeti, dar bant ve düşük saçılma kriteriyle belirlenmelidir (Ulug vd., 2015).

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi her iki örnek de ekstrakt konsantrasyonuna bağlı düzenli artışlar sergilemiştir. SE'nın kullanımı ile 450 nm'de artan konsantrasyonlara bağlı keskinleşen pikler alınırken, EE'nin kullanımı ile biraz daha yayvan pikler elde edilmiştir. Işığın varlığı her iki örnekte de sentezin gerçekleşmesini arttırırken iki ekstraktın içeriklerindeki farklılık AgNP'lerin oluşumunu farklılaştırmıştır.



Şekil 4.10. Aydınlık ortamda SE konsantrasyonuna bağlı SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.



Şekil 4.11. Aydınlık ortamda EE konsantrasyonuna bağlı EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu.

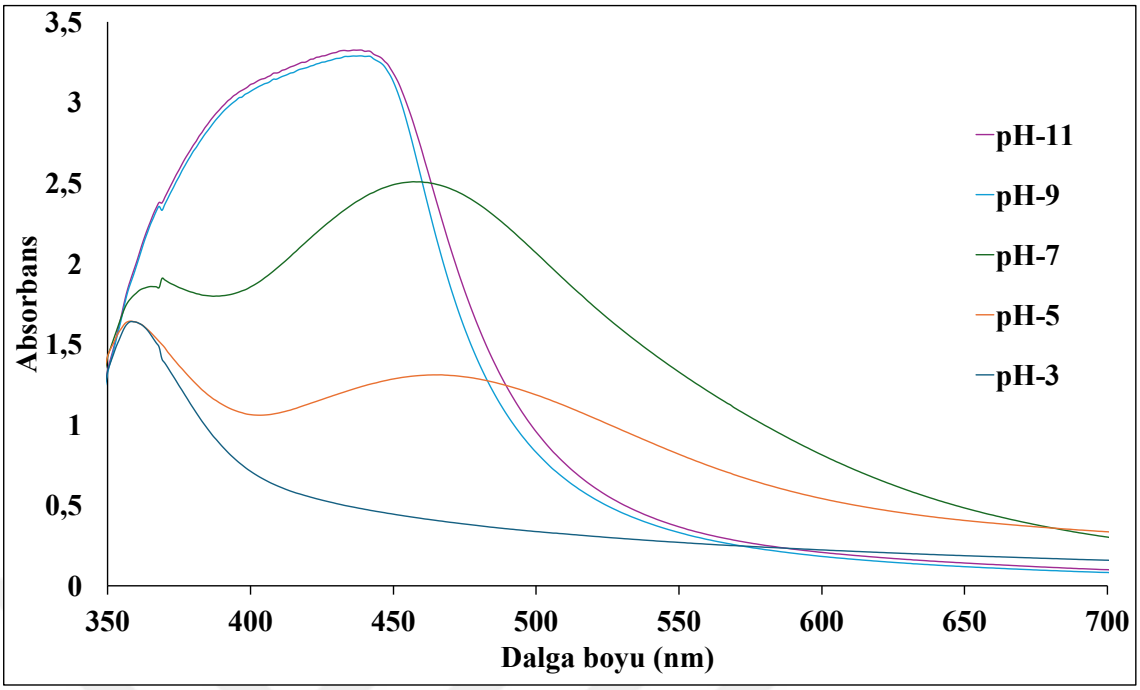
4.3.4. pH'ya bağlı sentez sonuçları

pH, bitkisel ekstrakt bileşenlerinin iyonizasyon durumunu ve dolayısıyla indirgeme gücünü belirleyen en kritik parametrelerden biridir. Fenolik hidroksil gruplarının yüksek pH'da deprotonasyonu, elektron verme kapasitesini artırarak Ag^+ indirgenmesini hızlandırabilir. Bu durum daha belirgin bir SPR bandı oluşumuna yol açabilir. Buna karşılık, asidik pH'da indirgeme kinetiği yavaşlayabilir ve oluşan parçacıklar daha kolay agregasyona uğrayabilir (Sastry vd., 1997).

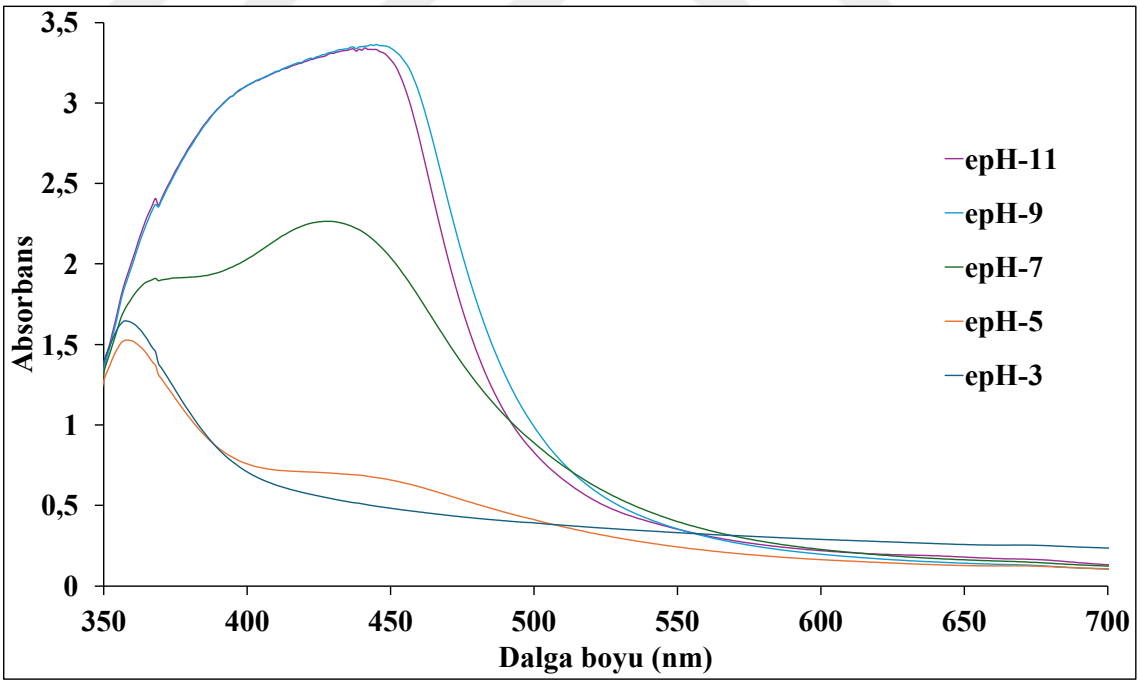
- **Karanlık ortam**

SE ile karanlık ortamda pH yükseldikçe SPR bandının (yaklaşık 400–450 nm) belirginleşmesi, indirgeme hızının artması ve daha fazla AgNP oluşumuna işaret eder. Alkali koşullarda (özellikle pH 9–11) gözlenen yüksek absorbans değerleri, $Ag^+ \rightarrow Ag^\circ$ dönüşümünün daha etkin gerçekleştiğini düşündürür. Bu durum, fenolik -OH gruplarının deprotonasyonu ile elektron verme kapasitesinin artmasıyla uyumludur.

Bant genişliği artması pH 5-7 aralığında polidispersite veya aglomerasyon olduğuna işaret etmektedir. Bandın yüksekliğinin azalması, daha heterojen boyut dağılımı olduğunu ve NP oluşumunun daha zayıf kontrol edildiğini düşündürür. Asidik koşulda (pH 3) ise pik şiddetinin düşmesi ve eğrinin daha sönük hale gelmesi hem indirgeme kinetiğinin yavaşlaması hem de kolloidal kararlılığın azalmasıyla ilişkilidir.

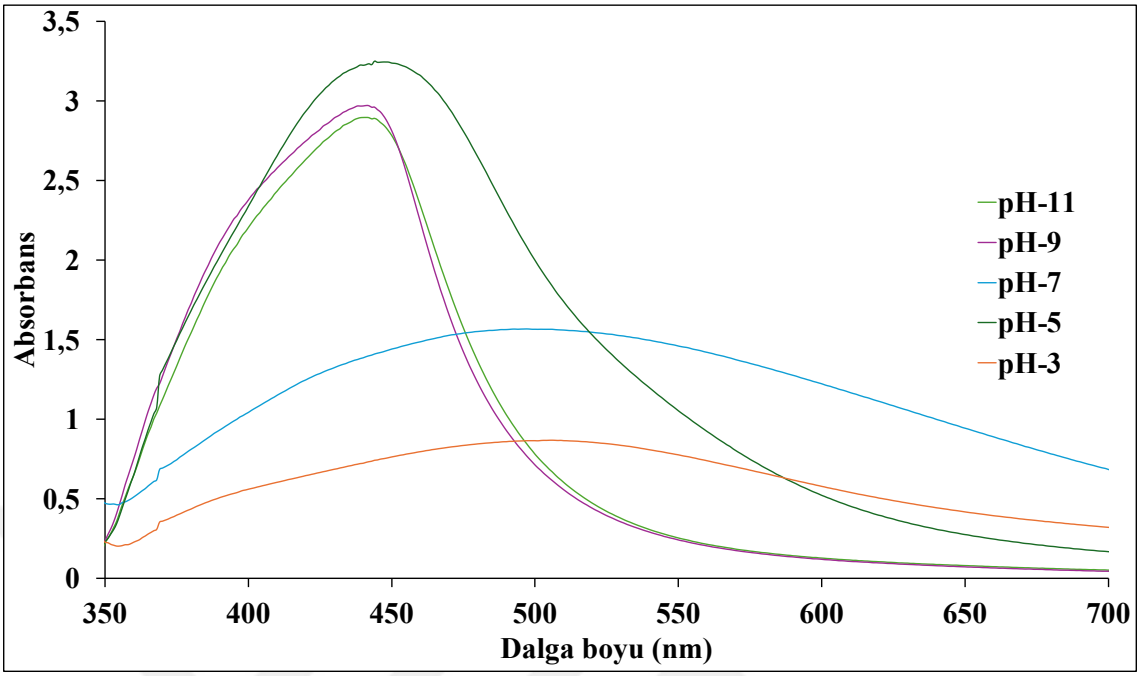


Şekil 4.12. Karanlık ortamda SE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.

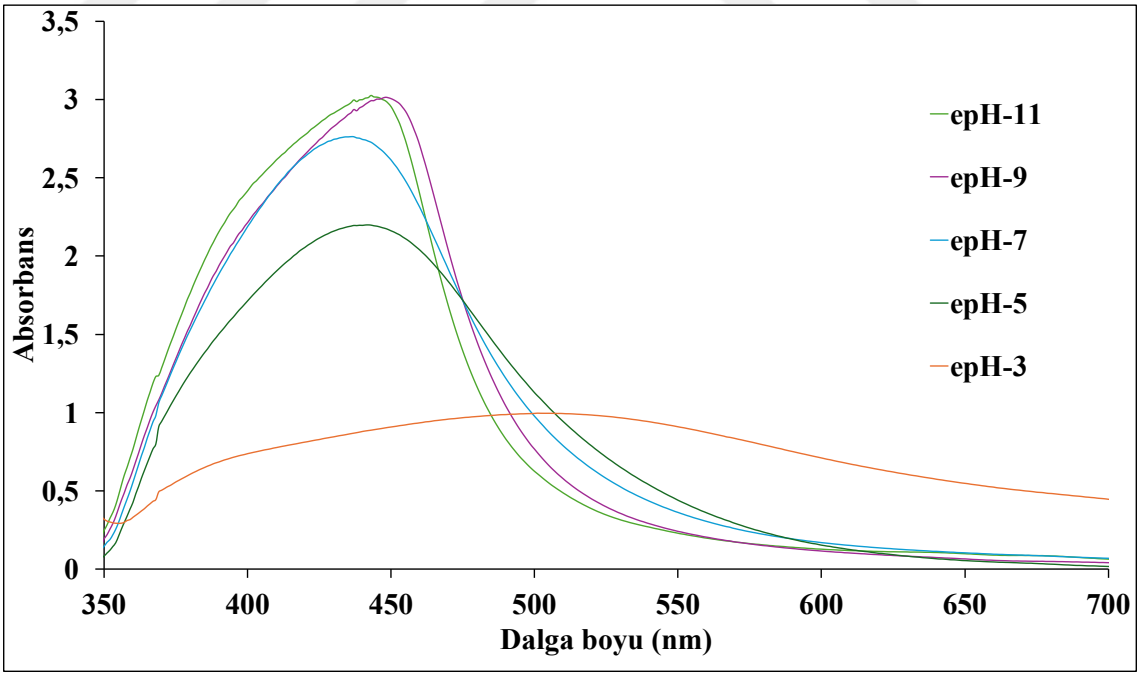


Şekil 4.13. Karanlık ortamda EE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.

- **Aydınlık ortam**



Şekil 4.14. Aydınlık ortamda SE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.



Şekil 4.15. Aydınlık ortamda EE kullanılarak sentezlenen AgNP'ların UV-Vis spektrumu.

Ortamın pH'ı, yeşil sentezde hem indirgeme kinetiğini hem de kaplama mekanizmasını aynı anda etkileyen en kritik parametrelerdendir. Bitkisel ekstraktlarda yer alan fenolik asitler ve flavonoidler gibi bileşiklerin iyonizasyon durumu pH ile değişir. Özellikle alkali koşullarda fenolik -OH gruplarının deprotonasyonu artarak elektron verme kapasitesinin yükselmesi, Ag^+ indirgenmesini hızlandırabilir. Ayrıca yüzey yükünün artması, kolloidal stabiliteyi destekleyerek agregasyonu azaltabilir. Bu pH-bağımlı davranışın AgNP verimi, boyutu ve optik yanıtı değiştirdiği farklı çalışmalarda raporlanmıştır.

Bu çalışmada hem karanlık hem aydınlık ortamdaki sentezlerde pH değişiminin SPR bandını belirgin şekilde etkilediği görülmüştür. Genel eğilim olarak alkali pH değerlerinde (pH 9-11) 400-450 nm aralığında SPR bandının daha yüksek şiddetle ve daha keskin formda ortaya çıkması, daha etkin indirgeme ve daha iyi stabilizasyonla uyumludur. Buna karşılık asidik pH koşullarında (pH 3-5) bant şiddetinin azalması ve bandın genişlemesi, indirgeme hızının düşmesi veya yüzey kaplamasının zayıflaması nedeniyle agregasyon gözlemlenmektedir.

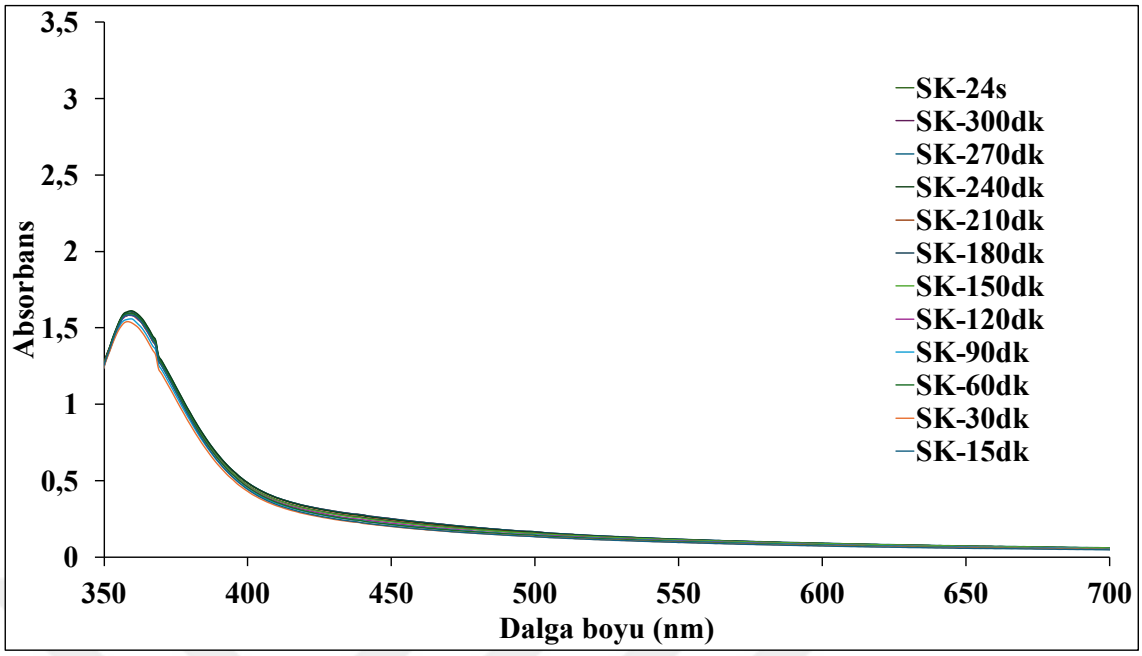
4.3.5. Zaman bağımlı sentez

Zaman bağımlı UV-Vis takibi (15 dk-24 saat), reaksiyonun çekirdeklenme ve büyüme basamaklarını değerlendirmek için yapıldı. Ön çalışmada pH, $AgNO_3$ konsantrasyonu ve ekstrakt konsantrasyonun bağlı sentezin takibi UV-Vis ve DLS ile yapılarak elde edilen bulgulara göre boyut ve verim açısından en kararlı olan grubun zamana bağlı sentezi izlendi. Bu grup (1:1 oranda 5mL 10 mg/mL ekstrakt ile 5mL 10mM $AgNO_3$) kullanılarak yapılan sentezlerin ölçümleri alındı.

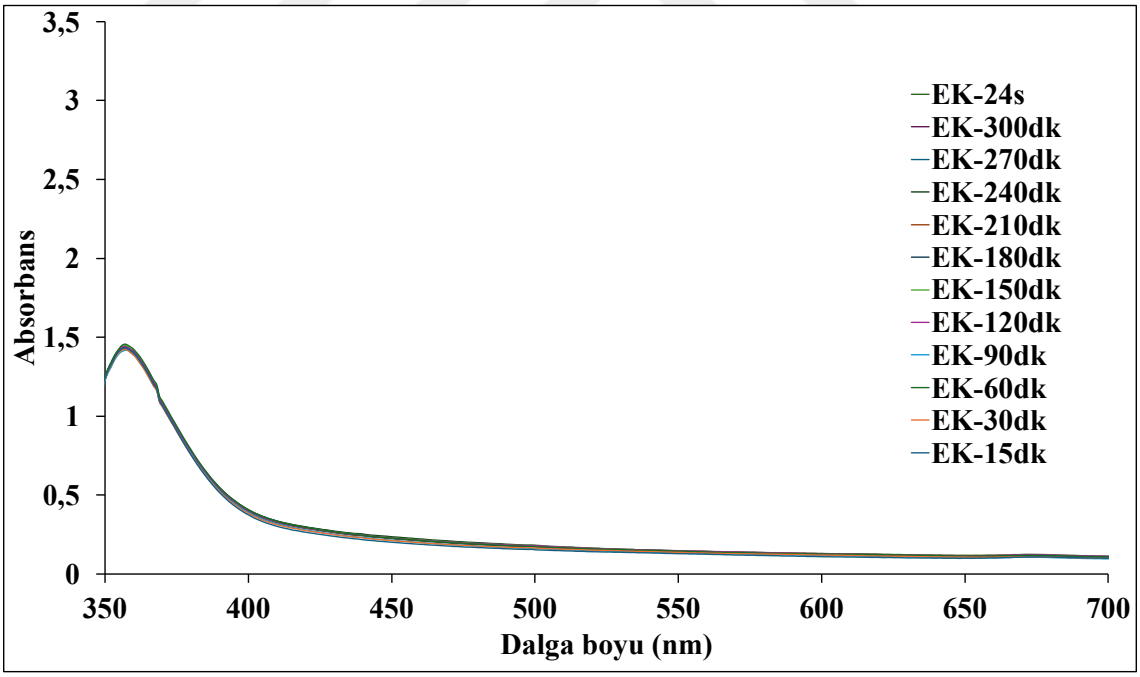
Literatürde tipik olarak, uygun koşullarda SPR bandı erken zamanlarda belirir, belirli bir süre şiddeti artar ve daha sonra plato yaparak reaksiyonun dengeye yaklaştığını gösterir. Bandın zaman içinde genişlemesi veya kırmızıya kayması ise agregasyon süreçlerinin baskınlaştığını göstermektedir (Kelly vd., 2002; Willets & Van Duyne, 2007).

- **Karanlık ortam**

Karanlık koşullarda elde edilen zaman serisi spektrumlarının büyük ölçüde üst üste binmesi ve görünür bölgede belirgin SPR bandının sınırlı gelişim göstermesi, bu koşullarda indirgeme kinetiğinin yavaş olduğunu veya oluşan AgNP derişiminin UV-Vis'te güçlü bir plazmonik yanıt oluşturacak seviyeye ulaşmadığını göstermektedir (Şekil 4.16. ve 4.17). Bitki bazlı sentezlerde, fotokimyasal katkının olmadığı durumlarda reaksiyonun yavaşladığı ve bazı koşullarda zayıf UV-Vis profillerinin gözlendiği rapor edilmiştir (Siddiqi vd., 2018).



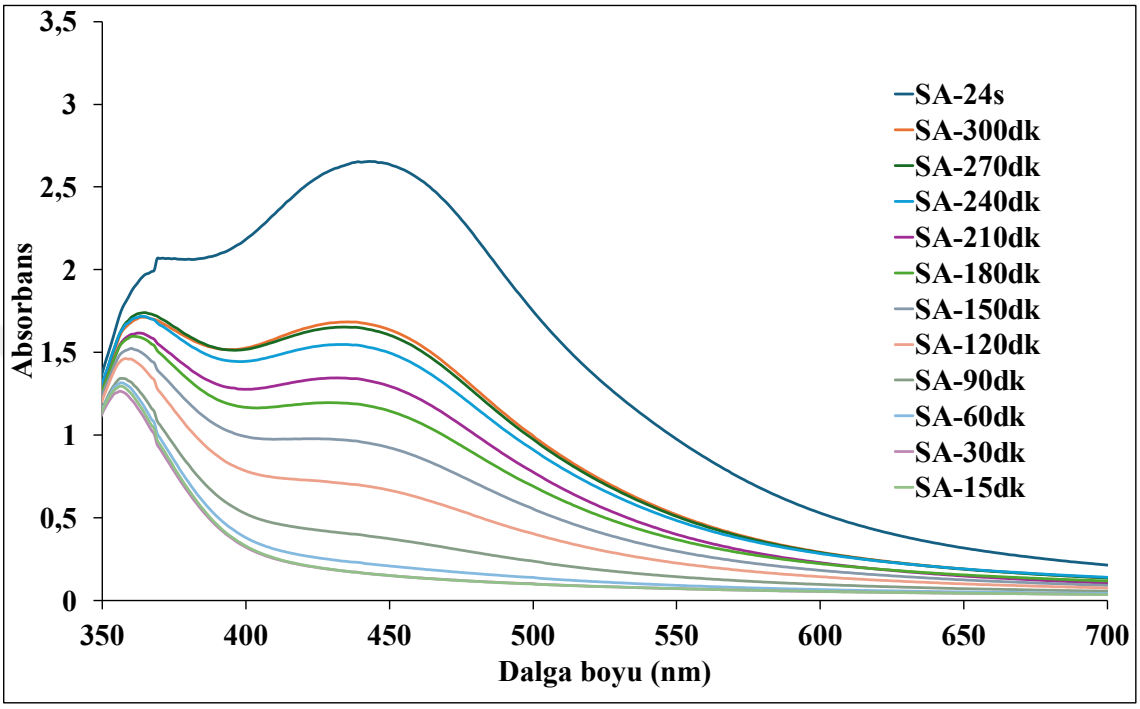
Şekil 4.16. Karanlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (SK: SE karanlık ortam)



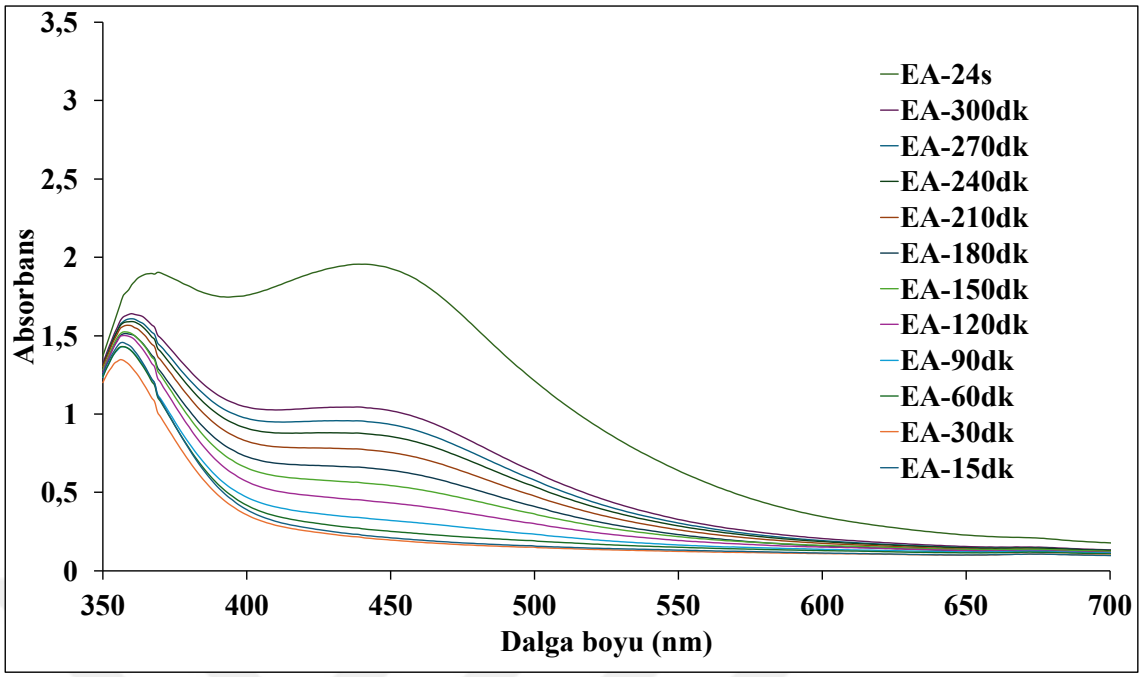
Şekil 4.17. Karanlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (EK: EE karanlık ortam).

- **Aydınlık ortam**

Işık destekli sentezlerde reaksiyon hızının artması beklenir; birçok çalışmada ışık varlığında daha erken SPR oluşumu ve farklı boyut dağılımları bildirilmiştir (Ulug et al., 2015; Mankad et al., 2020). Bu nedenle aydınlık koşullarda zamanla SPR bandının güçlenmesi, stabil bir kolloid oluştuğunu düşündürür. Eğer 24 saate doğru bant genişlemesi veya taban çizgisi artışı görülüyorsa, bu durum uzun bekletme sürelerinde ikincil agregasyon eğilimiyle açıklanabilir.

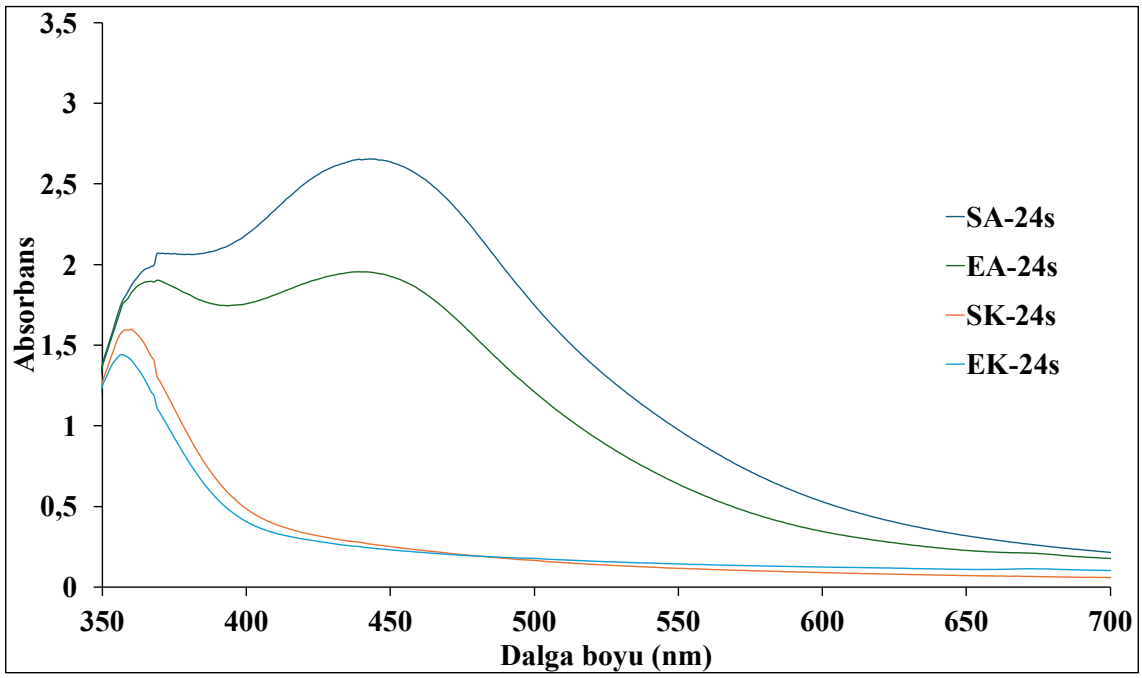


Şekil 4.18. Aydınlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) SE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (SA: SE aydınlık ortam).



Şekil 4.19. Aydınlık ortamda belirlenen zaman aralığında (15dk-24s) EE kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu (EA: EE aydınlık ortam).

Şekil 4.20'de zamana bağlı nanoparçacık sentezinin 24. saatindeki spektrumları bir arada verilmiştir. Bu durum farklı koşulların nihai optik yanıtını karşılaştırarak en uygun koşulun seçilmesini sağlar. Uygun koşul genellikle görünür bölgede belirgin SPR bandı, bandın göreli dar olması (homojenlik), 600-700 nm bölgesinde aşırı saçılma artışı olmaması ile tanımlanır (Kelly vd., 2002).



Şekil 4.20. 24s sonunda yapılan bütün sentezlerin UV-Vis spektrumları.

Sonuç olarak zaman bağımlı izleme, *Vitex agnus-castus* ekstraktlarıyla AgNP sentezinde ışık koşulunun kinetiği belirgin biçimde etkilediğini ve optimum koşul seçiminin yalnızca tek bir parametreye değil, $AgNO_3$-ekstrakt-pH-ışık dengesine dayanması gerektiğini göstermektedir. Bu çıkarım, güncel yeşil sentez derlemelerinde vurgulanan kritik parametrelerin boyut, kararlılık ve verimi birlikte belirlediği yaklaşımıyla uyumludur (Fahim vd., 2024).

Deneyler sonunda pH, $AgNO_3$ konsantrasyonu ve ekstrakt konsantrasyonu değerlendirildiğinde, çalışmada 1:1 oranda 10 mg/mL ekstrakt ile 10mM'lık $AgNO_3$ kullanılarak, aydınlık koşullarda, 24 saat bekletilip ekstraktın kendi pH'sinde sentezlenen AgNP'ler kullanılmıştır.

4.4. Yeşil Sentez ile Elde Edilen AgNP'lerin Enstrümental Analizleri

Bu bölümde, *Vitex agnus-castus* ekstraktları kullanılarak yeşil yöntemle sentezlenen AgNP'lerin fizikokimyasal özellikleri ve yüzey kimyası çoklu enstrümantal tekniklerle bütüncül olarak karakterize edilmiştir. Yeşil sentez yaklaşımında bitkisel bileşenler yalnızca indirgeme ajanı olarak değil, aynı zamanda nanoparçacık yüzeyinde kaplayıcı rolü üstlenerek parçacıkların boyut dağılımını, kolloidal kararlılığını ve biyolojik etkileşimlerini belirleyen kritik bir faktör olarak öne çıkmaktadır.

Bu nedenle sentezlenen AgNP'lerin yapısal morfolojisi, boyutu ve yüzey yükü gibi parametrelerin birlikte değerlendirilmesi hem sentez koşullarının optimize edilmesi hem de sonraki biyolojik uygulamalar açısından önemlidir.

Bu doğrultuda TEM analizi ile nanoparçacıkların morfolojisi ve birincil boyutları doğrudan görüntülenmiş, FTIR spektrumları ile ekstrakt kökenli fonksiyonel grupların AgNP yüzeyine bağlanma karakteri belirlenmiştir. AgNP'lerin sulu ortamda davranışını temsil eden hidrodinamik boyut (DLS) ve zeta potansiyel ölçümleri ile kolloidal kararlılık ve olası agregasyon eğilimleri nicel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca TGA analizleri kullanılarak, yüzeyde tutunan organik kaplama ve çökeltme sürecinde uzaklaştırılamayan serbest bitkisel bileşenlerin termal uzaklaşma profili incelenmiştir. Bu sonuçlar FTIR bulguları ve kolloidal parametrelerle birlikte yorumlanarak capping tabakasının varlığı ve göreli miktarı üzerine çıkarımlar yapılmıştır.

Böylece bu bölümde sunulan enstrümantal veriler, *Vitex agnus-castus* ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin yapısal ve kimyasal özelliklerini ve kararlılık parametrelerini birlikte ortaya koyacak şekilde, birbiriyle ilişkili bir çerçevede tartışılmıştır.

4.4.1. Sentezlenen AgNP'lerin TGA analizleri

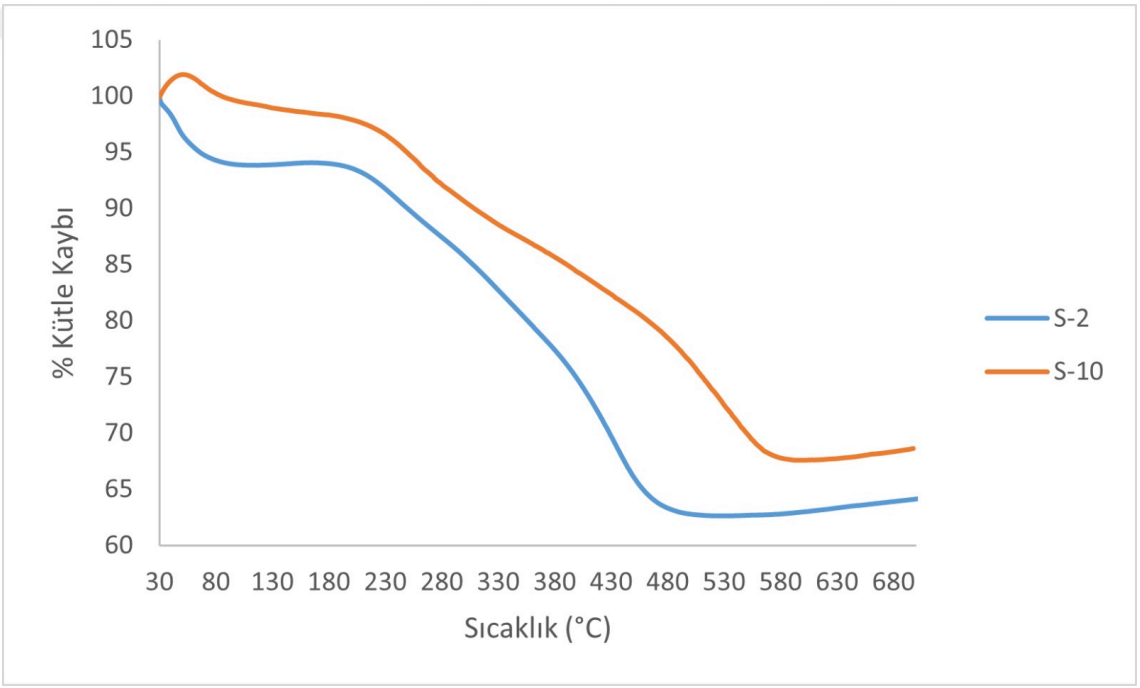
Bu bölümde, *Vitex agnus-castus* ekstraktları kullanılarak yeşil yöntemle sentezlenen AgNP'lerin termal davranışı termogravimetrik analiz (TGA) ile değerlendirilmiştir. Ölçümler oksijen (O_2) atmosferinde gerçekleştirilmiş ve numuneler 30-700 °C sıcaklık aralığında ısıtılmıştır.

TGA uygulamasının temel amacı; AgNP yüzeyinde ekstrakt bileşenleri tarafından oluşturulan organik kaplayıcı tabakanın ve yıkama-çökeltme basamaklarında tamamen

uzaklaştırılamamış serbest bitkisel moleküllerin kontrollü şekilde oksidatif bozunma ile uzaklaştırılması ve buna eşlik eden % kütle değişiminin izlenmesidir.

Bu kapsamda, su ekstraktı ile sentezlenen ve sonraki karakterizasyon ile AChE inhibisyon deneylerinde kullanılacak AgNP'ler S-NP, etanol ekstraktı ile sentezlenen AgNP'ler ise E-NP olarak kodlanmıştır. Isıtma hızına bağlı etkileri karşılaştırmak amacıyla her iki numune grubu 2 °C/dk ve 10 °C/dk hızlarında kalsinasyon koşullarına tabi tutulmuştur.

Buna göre S-2/S-10 ifadeleri S-NP'nin, E-2/E-10 ifadeleri ise E-NP'nin ilgili ısıtma hızındaki TGA-kalsinasyon uygulamasını temsil etmektedir. Şekillerde, sıcaklık artışıyla birlikte numunelerde gözlenen % kütle kaybı, yüzey ve çevre kaynaklı organik fraksiyonun bozunmasına karşılık gelecek şekilde yorumlanmıştır.



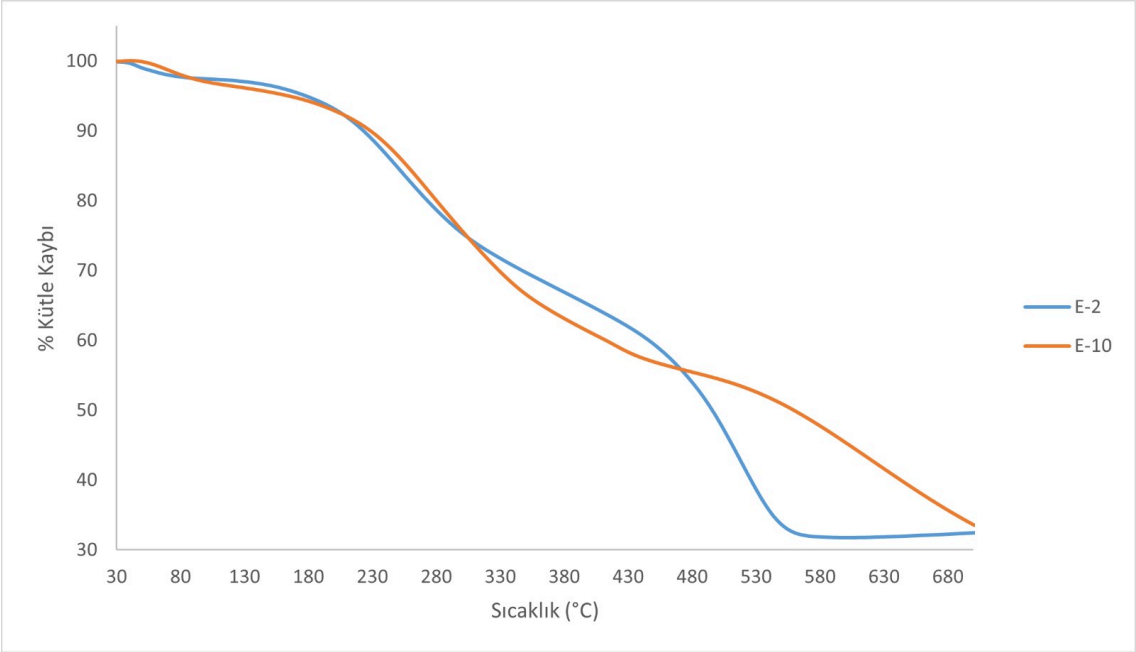
Şekil 4.21. Su ekstraktı kaynaklı AgNP'lerin (S-NP) farklı ısıtma hızlarında gerçekleştirilen kalsinasyon koşullarına bağlı TGA kütle kaybı eğrilerinin karşılaştırılması. S-2: 2 °C/dk; S-10: 10 °C/dk.

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi, S-10 eğrisinde ana bozunma bölgesinin daha geniş bir sıcaklık aralığına yayıldığı ve kütle kaybının görece daha geç sıcaklıklara taşındığı görülmektedir. Bu, TGA'da ısıtma hızı arttıkça TG/DTG olaylarının daha yüksek sıcaklıklara kaymasına neden olan thermal lag olduğunu göstermektedir.

Buna karşılık S-2 koşulunda, numune her bir sıcaklık aralığında daha uzun süre kaldığından termal bozunma süreçleri daha tamamlanmış biçimde ilerlemektedir. Bu durum, ana kütle kaybı basamağının daha belirgin izlenmesine ve daha düşük sıcaklıklarda daha erken ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca, bozunmanın daha

etkin gerçekleşmesi sonucu 680 °C sonunda toplam kütle kaybının daha yüksek olması beklenen ve gözlenen bir sonuçtur.

Hızlı ısıtma koşullarında ısıtılan S-10 numunesinde organik bileşenlerin tam bozunması için geçen sürenin kısalması nedeniyle karbonlu kalıntılar oluşmuştur. Bu durum kalsinasyon işleminden sonra kalan kütlenin olması gerekenden fazla ölçülmesine neden olmaktadır. Buna karşılık yavaş ısıtılan S-2 numunesinin her sıcaklık aralığında daha uzun süre kalmasına olanak vererek organik kaplayıcıların daha etkin biçimde uzaklaştırılmasına ve dolayısıyla kalan kütlenin daha düşük olmasına neden olmaktadır. Isıtma hızına bağlı bu davranış, bozunma olaylarının daha yüksek sıcaklıklara kayması ve süreç veriminin ısı transferi ile kinetik sınırlamalara duyarlı olmasıyla literatürde yaygın olarak ilişkilendirilmektedir.

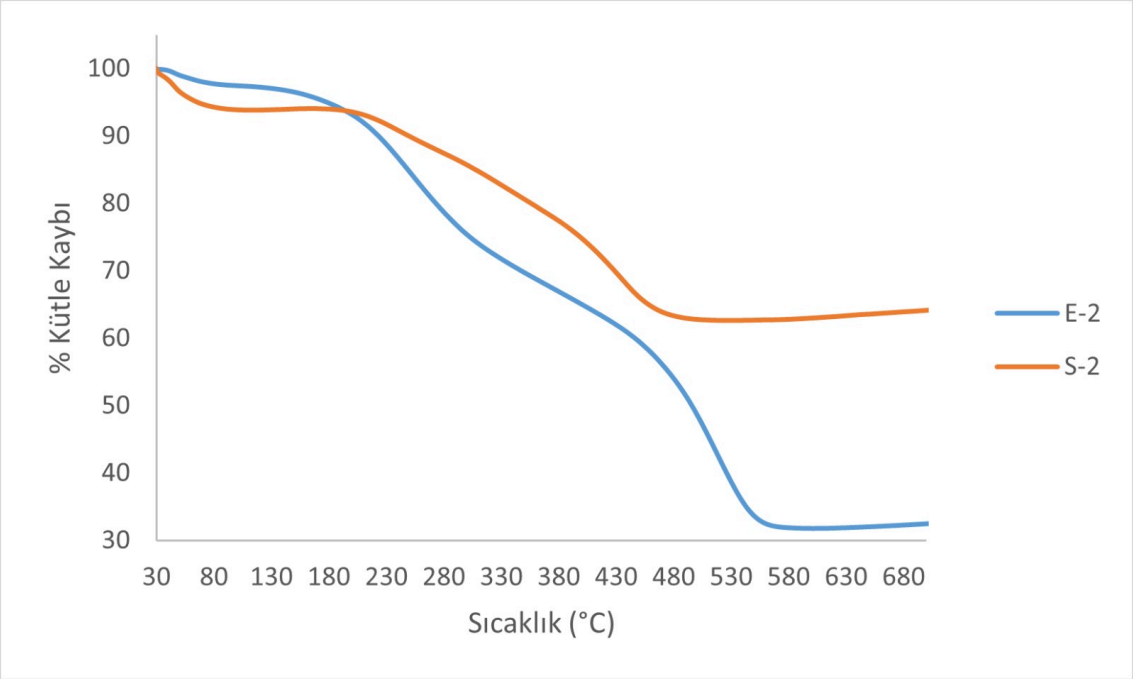


Şekil 4.22. Etanol ekstraktı kaynaklı AgNP'lerin (E-NP) farklı ısıtma hızlarında gerçekleştirilen kalsinasyon koşullarına bağlı TGA kütle kaybı eğrilerinin karşılaştırılması. E-2: 2 °C/dk; E-10: 10 °C/dk.

Şekil 4.22'de görüldüğü gibi, E-2 eğrisinde kütle kaybı basamakları daha erken sıcaklıklarda ve daha keskin görünmektedir. Yavaş ısıtma, her sıcaklık aralığında daha uzun bekleme süresi sağladığı için organik kaplayıcının ayrışması daha verimli şekilde ilerlemektedir. Bu da geçişlerin daha belirgin izlenmesine neden olmaktadır.

E-10 eğrisinde kütle kaybı daha geniş bir sıcaklık aralığına yayılmıştır. Belirli bölgelerde gecikmeler görülmektedir. Bu da yüksek ısıtma hızının thermal lag'ı artırmasından ve ayrışma basamaklarının birbirine daha fazla örtüşmesine neden olmaktadır.

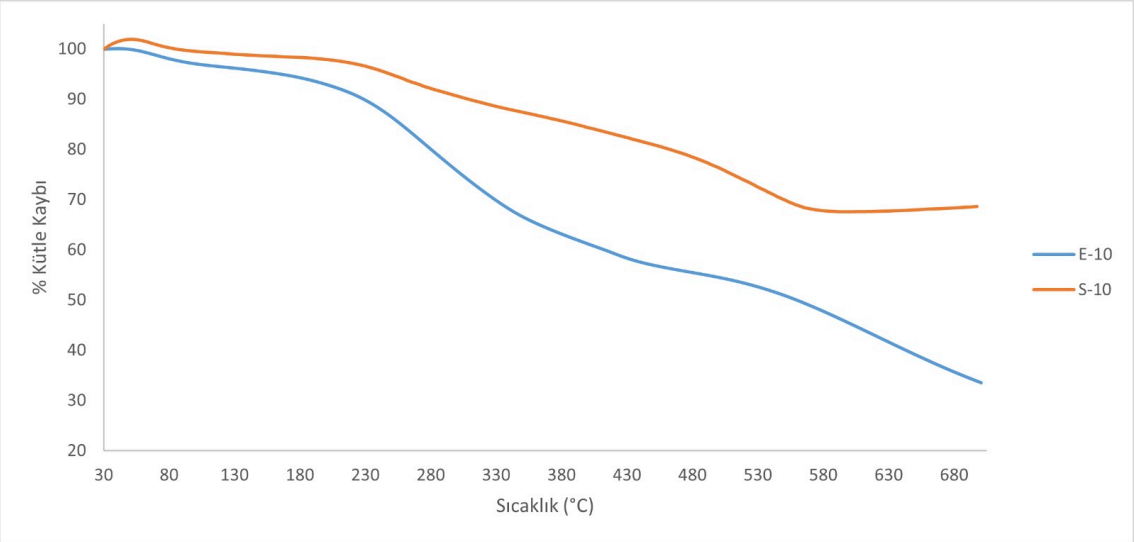
E-10 numunesi sıcaklığın artmasıyla birlikte belirgi bir kütle kaybı göstermiştir. Kalan kütle %33 civarındadır. Bu sonuç 2 °C/dk koşulundaki E-2 ile tutarlı şekildedir. EE kökenli AgNP'lerde yüksek organik içerik bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.23. Etanol ekstraktı kaynaklı AgNP (E-NP) ve su ekstraktı kaynaklı AgNP'nin (S-NP) 2 °C/dk ısıtma hızında elde edilen TGA kütle kaybı eğrileri. E-2: 2 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan E-NP; S-2: 2 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan S-NP.

Şekil 4.22'de görüldüğü gibi, E-10 numunesi sıcaklığın artmasıyla birlikte belirgin bir kütle kaybı göstermiştir. Kalan kütle %33 civarındadır. Bu sonuç 2 °C/dk koşulundaki E-2 numunesi ile tutarlılık göstermektedir. Bu durum, EE kökenli AgNP'lerin SE kökenli AgNP'lere kıyasla daha yüksek oranda organik içeriğe sahip olduklarını göstermektedir.

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi, S-10 numunesinde kütle kaybı daha azdır. Sıcaklık artışıyla birlikte organik gruplar tamamen ayrıldığında %68-69 oranında kütle kalır. S-2 numunesine kıyasla S-10 numunesindeki kalan kütlenin bir miktar daha yüksek görünmesinin sebebi hızlı ısıtmada organik fazın tamamen bozunup uzaklaşmasının ve thermal lag etkileri ile bozunma olaylarının daha yüksek sıcaklıklara ötelenmesiyle açıklanabilmektedir.



Şekil 4.24. Etanol ekstraktı kaynaklı AgNP (E-NP) ve su ekstraktı kaynaklı AgNP'nin (S-NP) 10 °C/dk ısıtma hızında elde edilen TGA kütle kaybı eğrileri. E-10: 10 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan E-NP; S-10: 10 °C/dk koşulunda kalsinasyon uygulanan S-NP.

Her iki ısıtma hızında da EE numuneleri (E-2, E-10) daha düşük nihai kalıntı (≈%32-33), SE numuneleri (S-2, S-10) daha yüksek nihai kalıntı (≈%63-69) vermektedir. Bu, EE kökenli AgNP'lerin organik kaplama yükünün daha fazla olduğunu ve SE kökenli numunelerde ise inorganik fraksiyonun görece daha baskın olduğuna göstermektedir.

10 °C/dk koşulunda özellikle SE numunesinde daha yüksek kalıntı görülmesi, hızlı ısıtmada oksidatif uzaklaşmanın tam tamamlanmaması ve termal gecikme etkilerinden kaynaklanmaktadır.

EE ile sentezlenen AgNP'lerin daha yüksek organik kaplama içeriği, kolloidal stabiliteyi artıran yüzey fonksiyonelleşmesi açısından avantaj sağlayabilir ancak yüksek sıcaklık uygulamalarında daha fazla organik yanmaya ihtiyaç duyacağı için kalsinasyon verimi ve yüzey kimyası üzerinde belirleyici olabilir.

Yeşil sentezde bitki metabolitlerinin hem indirgeme hem de kaplama ajanı gibi davranabildiği bilindiğinden, TGA'daki bu fark, ekstrakt kompozisyonunun nanoparçacık yüzey kimyasına yansımasının dolaylı ama güçlü bir göstergesidir (Iravani, 2011).

4.4.2. Sentezlenen AgNP'lerin DLS ve zeta potansiyeli analizleri

Çalışmanın bu kısmında EE ve SE ile sentezlenen AgNP'lerin hidrodinamik pik boyutları, PDI ve zeta potansiyeli verileri pH değişimlerine göre kıyaslanmıştır. Sürecin devamında, kalsinasyon sonrası elde edilen numunelerin Z-ortalama, PDI ve zeta potansiyeli parametrelerindeki değişimler spesifik olarak ele alınmıştır. Analizler gerçekleştirilirken, DLS verilerinin hidrodinamik çapı yansıttığı ve dolayısıyla ortam koşulları ile organik 'korona' oluşumuna karşı duyarlı olduğu göz önünde bulundurulmuştur. Ek olarak, kolloidal sistemlerin elektrostatik stabilitesinin

belirlenmesinde zeta potansiyeli değerleri temel bir nicel parametre olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.3'te görülmek üzere, SNP numunelerine ait elde edilen "peak size" değerleri pH'a bağlı olarak geniş bir aralıkta değişmektedir. Bu dağılım, su ekstraktı ile sentezde pH'ın hem indirgeme kinetiğini hem de yüzey kaplanmasını belirgin biçimde etkilediğini göstermektedir.

SNP numunelerinin PDI değerlerinin 0,230-0,699 aralığında seyretmesi, örneklerin önemli bir kısmında polidispersite bulunduğuna işaret etmektedir. Özellikle pH 7 (PDI 0,642) ve S-NP (PDI 0,699) koşullarında dağılım heterojenliğinin arttığı görülmüştür. Zeta potansiyel değerleri SNP için -16,8 ile -14,3 mV bandında dar bir aralıkta kalmıştır. Bu durum, pH değişse dahi elektrostatik yüzey yükünün benzer büyüklükte olduğunu, stabilitenin ise büyük ölçüde fitokimyasal kaplama kaynaklı sterik etkiler ve ortamın iyonik gücüyle birlikte şekillendiğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.3. Farklı pH koşullarında sentezlenen S-NP'lerin DLS, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.

pH	Peak size (nm)	PDI	zeta-potansiyel
pH 3	96.35 ± 40.95*	0.352 ± 0.039	-16,8
pH 5	4.737 ± 1.171	0.468 ± 0.010	-16,4
pH 7	69.91 ± 15.74	0.642 ± 0.185	-15,2
pH 9	18.63 ± 1.25	0.230 ± 0.028	-15,3
pH 11	1.447 ± 0.203	0.520 ± 0.035	-15,8
SNP	5.919 ± 0.460	0.699 ± 0.004	-14,3

*±SE: Verilerin ortalamasını ve bu ortalamaya göre standart hatasını vermektedir.

ENP numune grubunda peak size değerleri çizelge 4.4'te verildiği gibi, pH 3'te 169,13 ± 31,20 nm ile yüksek, pH 5'te 42,67 ± 0,36 nm ile orta, pH 7'de 2,856 ± 0,386 nm ile düşük; pH 9'da 18,26 ± 1,63 nm ve pH 11'de 13,36 ± 1,72 nm ile orta-düşük seviyede elde edilmiştir. Ekstraktın kendi pH'ında sentezlenen ENP numunesi için ise 17,96 ± 4,30 nm ölçülmüştür.

ENP numunelerinde PDI değerlerinin 0,330-0,958 aralığında olması, özellikle pH 11'de 0,958 gibi çok yüksek bir PDI ile çok geniş ve heterojen popülasyon oluştuğunu göstermektedir. ENP numunelerinin zeta potansiyeli değerleri pH'a bağlı olarak -14,9 ile -20,2 mV aralığına yayılmış, pH 9 ve pH 11'de daha negatif değerlere (-18,7 ve -20,2 mV) yaklaşmıştır. Bu daha negatif yüzey yükü, elektrostatik itmenin görece artabileceğini düşündürse de aynı örneklerde PDI'nin yükselmesi, pratikte stabilitenin yalnızca zeta potansiyel büyüklüğüyle değil yüzey kaplayıcı kompozisyonu, yeniden düzenlenme ve agregasyon dinamikleriyle birlikte belirlendiğini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Farklı pH koşullarında sentezlenen ENP numunelerinin DLS (pik boyutu), PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.

pH	Peak size (nm)	PDI	zeta-potansiyel
pH 3	169.13 ± 31.20*	0.531 ± 0.014	-15,5
pH 5	42.67 ± 0.36	0,330 ± 0,008	-15,7
pH 7	2.856 ± 0.386	0.562 ± 0.025	-14,9
pH 9	18.26 ± 1.63	0.564 ± 0.070	-18,7
pH 11	13.36 ± 1.72	0.958 ± 0.042	-20,2
ENP	17.96 ± 4.30	0.625 ± 0.028	-16,4

*****±SE: Verilerin ortalamasını ve bu ortalamaya göre standart hatasını vermektedir.

Çizelge 4.5'te sunulan DLS ve zeta potansiyeli verileri, kalsinasyon işleminin ve uygulanan ısıtma hızının AgNP'nin yapısal kararlılığı üzerindeki kritik etkisini ortaya koymaktadır. Başlangıçta nanometre ölçeğinde olan partiküllerin, özellikle 2 °C dk^{-1} gibi düşük kalsinasyon hızlarında (E-2C ve S-2C numuneleri) mikrometre seviyelerine (sırasıyla 2326 nm ve 4101 nm) ulaşması ve PDI değerlerinin 1,0 seviyesine çıkması, sistemde kontrolsüz bir agregasyon ve sinterleşme meydana geldiğini göstermektedir. Bu morfolojik değişim, zeta potansiyeli değerlerindeki dramatik düşüşle (özellikle S-2C numunesinde +1,13 mV) desteklenmekle birlikte yüzeydeki organik koruyucu tabakanın termal bozunması sonucu elektrostatik itme kuvvetlerinin ortadan kalktığı ve kolloidal stabilitenin yitirildiği anlaşılmaktadır. Buna karşın, 10 °C dk^{-1} kalsinasyon hızında gerçekleşen kalsinasyon sırasında partikül büyümesinin daha sınırlı kalması, hızlı termal bozunmanın agregasyon kinetiği üzerinde göreceli bir kontrol sağladığını kanıtlamaktadır.

Çizelge 4.5. Sentezlenmiş AgNP'ler ve TGA ile elde edilen ürünlerin zeta potansiyel ve DLS sonuçları.

Numune	Z-ortalama (nm)	PDI	Tepe noktaları (nm) (sayı dağılımı)	Zeta potansiyeli (mV)	Zeta sapması (mV)
E-NP (Etanol ekstraktı, kalsinasyonsuz)	222,7	0,35	131,7	-16,6	5,44
E-2 (Etanol, 2 °C/dk kalsinasyon)	2326	1	51,58	-25,3	6,58
E-10 (Etanol, 10 °C/dk kalsinasyon)	194	0,39	30,75	-18,7	4,16
S-NP (Su ekstraktı, kalsinasyonsuz)	155,8	0,44	9,533	-13,6	4,19
S-2 (Su, 2 °C/dk kalsinasyon)	4101	1	38,36	1,13	5,58
S-10 (Su, 10 °C/dk kalsinasyon)	1914	1	110,2	-18	4,75

4.4.3. DLS boyut verileri ile UV-Vis parametrelerinin birlikte değerlendirilmesi

Bu çalışmada AgNP oluşumu ve kolloidal özelliklerin optik karşılığı, UV-Vis spektroskopisi üzerinden izlenen SPR bandıdır. SPR bantlarının dalga boyundaki kaymalar (kızıla ya da mora kayma) lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR, localized surface plasmon resonance) bandının özelliklerindeki değişim olarak tanımlanmaktadır. LSPR, metalik nanoparçacıklarda iletken elektronların parçacık yüzeyinde yerelleşmiş kolektif salımına karşılık gelir ve UV-Vis spektrumunda karakteristik bir absorbans bandı (λ_{max}) olarak izlenir. Bu tez kapsamında UV-Vis ölçümleri ile takip edilen tepe bandı, LSPR incelenmiştir. LSPR bandının konumu (λ_{max}) ve şekli, nanoparçacığın çekirdek boyutu, yüzey kaplanması, ortamın kırılma indisi ve agregasyon durumu gibi parametreler üzerinden incelenmiştir. Özellikle bandın FWHM (full width at half maximum; maksimum absorbansın yarı yüksekliğindeki genişlik) değeri, tepenin keskinliği üzerinden optik homojenliğe ilişkin nicel bir gösterge sunmaktadır. FWHM'nin artması genellikle daha geniş boyut ve şekil dağılımı ve agregasyon kaynaklı heterojen popülasyonların varlığıyla ilişkilendirilmektedir. FWHM'nin daralması daha homojen bir nanopartikül popülasyonuna ve daha belirgin bir plazmon yanıtına işaret eder. LSPR bandı için raporlanan λ_{max} ve FWHM değerleri, DLS ile elde edilen boyut dağılımı (peak size) ve polidispersite (PDI) bulguları ile ele alınarak, pH ve ekstrakt

tipinin AgNP oluşum verimi ile kolloidal stabilite üzerindeki etkileri bütüncül biçimde tartışılmıştır.

Çizelge 4.6. pH ve ekstrakt tipine bağlı olarak AgNP'lerin kolloidal (DLS, ζ-potansiyel) ve optik (λ_{max}, A_{max}, FWHM) özellikleri

NP	Koşul	peak size (nm)	PDI	ζ-potansiyel (mV)	λ_{max} (nm)	A_{max} (Abs)	FWHM (nm)
E-NP	pH 3	169,13 ± 31,2	0,531 ± 0,014	−15,5	500	0,997	189,1
	pH 5	42,67 ± 0,36	0,330 ± 0,008	−15,7	441	2,202	124,9
	ekst pH'sı (4.76)	17,96 ± 4,30	0,625 ± 0,028	−16,4	441	2,119	140
	pH 7	2,856 ± 0,39	0,562 ± 0,025	−14,9	434	2,761	105,8
	pH 9	18,26 ± 1,63	0,564 ± 0,070	−18,7	448	3,013	99
	pH 11	13,36 ± 1,72	0,958 ± 0,042	−20,2	443	3,026	96,7
S-NP	pH 3	96,35 ± 40,95	0,352 ± 0,039	−16,8	502	0,865	177,6
	pH 5	4,737 ± 1,17	0,468 ± 0,010	−16,4	444	3,248	129
	ekst pH'sı (4.84)	5,919 ± 0,46	0,699 ± 0,004	−14,3	446	2,838	126,8
	pH 7	69,91 ± 15,74	0,642 ± 0,185	−15,2	492	1,564	192,5
	pH 9	18,63 ± 1,25	0,230 ± 0,028	−15,3	441	2,969	98
	pH 11	1,447 ± 0,20	0,520 ± 0,035	−15,8	439	2,892	98,8

*±SE: Verilerin ortalamasını ve bu ortalamaya göre standart hatasını vermektedir.

Çizelge 4.6'da E-NP ve S-NP numuneleri için DLS ile belirlenen peak size ve PDI değerleri ile UV-Vis spektrumlarından elde edilen λ_{max}, A_{max} ve FWHM parametreleri birlikte ele alındığında pH değişiminin optik yanıtı ve kolloidal özellikleri eş zamanlı olarak etkilediği görülmektedir. Her iki nanoparçacık grubunda da λ_{max} değerinin yaklaşık 500 nm civarına çıktığı koşullar daha düşük A_{max} ve daha geniş FWHM değerleriyle karakterize olmuş ve bu durum DLS tarafında daha büyük boyutların gözlenmesiyle uyum göstermiştir.

E-NP için pH 3 koşulunda λ_{max} 500 nm seviyesine kaymış A_{max} 0,997 olarak izlenmiş ve FWHM 189,1 nm'ye genişlemiştir, aynı koşulda peak size 169,13 nm düzeyinde bulunmuştur. S-NP için pH 3 koşulunda da benzer biçimde λ_{max} 502 nm civarında izlenmiş A_{max} 0,865 olarak ölçülmüş ve FWHM 177,6 nm'ye ulaşmıştır, bu koşulda peak size 96,35 nm olarak belirlenmiştir.

E-NP'de pH 7 koşulu bu eğilimi en belirgin biçimde göstermiş λ_{max} 434 nm'ye inerken A_{max} 2,761 değerine yükselmiş ve FWHM 105,8 nm'ye düşmüştür aynı koşulda çok düşük bir peak size değeri elde edilmiştir. E-NP'de pH 9 ve pH 11 koşullarında da A_{max} yaklaşık 3,0 düzeyinde izlenmiş FWHM 99 ile 96,7 nm aralığında kalmış ve λ_{max} 448 ile 443 nm arasında yer almıştır.

S-NP'de ise pH 9 ve pH 11 koşullarında birbirine çok yakın değerler elde edilmiştir. λ_{max} 441 ile 439 nm aralığında izlenmiş, A_{max} yaklaşık 2,9 düzeyinde ölçülmüş ve FWHM yaklaşık 98 nm'de kalmıştır. Bu durum daha homojen bir optik popülasyona işaret etmektedir.

Ekstraktların doğal pH'sında yürütülen sentezlerde, E-NP için pH 4,76 ve S-NP için pH 4,84 koşullarında λ_{max} değerleri 441 ile 446 nm aralığında kalmış, A_{max} değerleri 2,119 ile 2,838 aralığında izlenmiş ve FWHM 126,8 ile 140 nm düzeylerinde bulunmuştur. Bu bulgular optimuma yakın bir LSPR yanıtı ile DLS'de orta düzeyde heterojenliği düşündürmektedir.

Zeta potansiyel değerleri genel olarak -14,3 ile -20,2 mV aralığında seyretmiş olup E-NP'de pH yükseldikçe zeta potansiyelin daha negatif değerlere ilerlemesi pH 11'de -20,2 mV değerine ulaşması kolloidal stabilite açısından elektrostatik katkının arttığını düşündürmektedir. Bununla birlikte S-NP'de zeta potansiyelin daha dar bir aralıkta kalması ve buna karşın bazı koşullarda FWHM ile boyutun belirgin artış göstermesi stabilitenin yalnızca yüzey yüküne değil ekstrakt kökenli kaplama tabakasının kompozisyonuna ve pH'ya bağlı iyonlaşma dengesine de güçlü biçimde bağlı olduğunu göstermektedir.

Genel olarak UV-Vis spektrumunda LSPR bandının kırmızıya kayması ve band genişlemesi DLS'de artan boyut ve dağılım heterojenliği ile paralel ilerlemiş olup pH optimizasyonunun hem optik yanıtın keskinliği hem de kolloidal kararlılık açısından belirleyici bir kontrol parametresi olduğunu ortaya koymuştur.

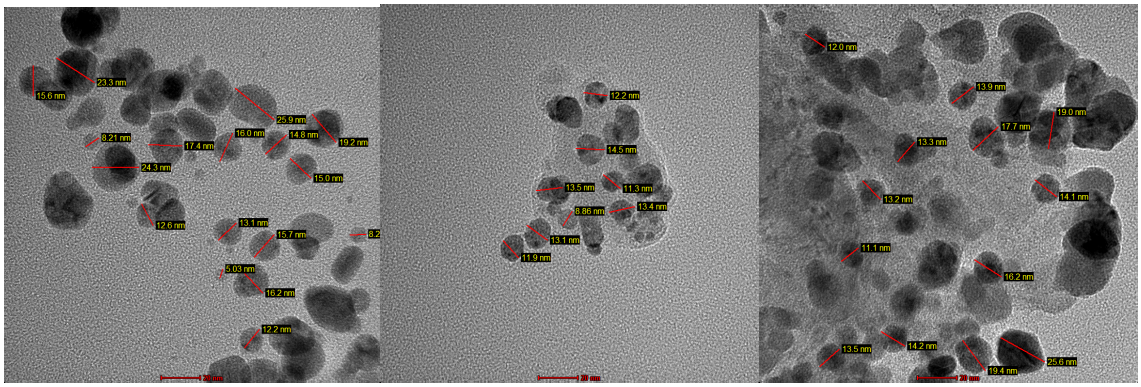
4.4.4. Sentezlenen AgNP'lerin TEM görüntüleri

Önceki aşamada SE ve EE ekstraktları kullanılarak iki farklı AgNP sentezlenmiş ve TGA ile iki farklı ısıtma sıcaklığında kalsine edilmiştir. Sentezlenen parçacıkların TEM görüntüleri alınarak hem boyutları hem de morfolojileri üzerinden değerlendirilmiştir.

Şekil 4.25'de EE ekstraktı ile sentezlenen E-NP'ler ve sırasıyla kalsine edilmiş EE-2C ve EE-10C kodlu nanoparçacıklar görülmektedir. E-NP'ler 8-26 nm aralığında bir dağılım göstermiştir. EE-2C'ler 9-15 nm aralığında bir dağılım sergilerken. EE-10C parçacıkları 11-26 nm aralığında oluşmuşlardır.

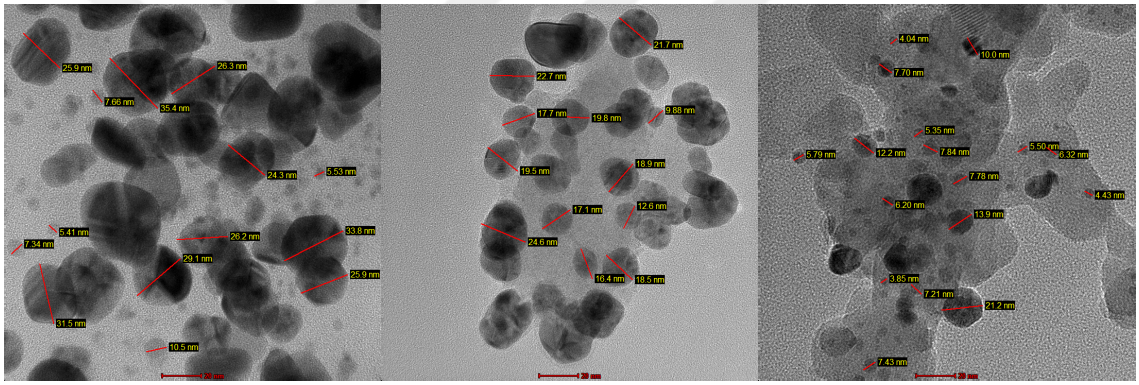
Şekil 4.26.'da ise SE ekstraktı ile sentezlenen S-NP ve sırasıyla kalsine edilmiş SE-2C ve SE-10C kodlu nanoparçacıklar görülmektedir. S-NP'ler 6-32 nm aralığında, SE-2C'ler 10-25 nm aralığında ve SE-10C parçacıkları 4-21 nm aralığında boyutlar göstermektedir.

A **B** **C**



Şekil 4.25. A) EE'den sentezlenen AgNP'lerin (ENP) TEM görüntüsü (8-26nm) **B)** 2°C/dk hızda kalsine edilen E-NP'lerin (EE-2C) TEM görüntüsü (9-15nm) **C)** 10°C/dk hızda kalsine edilen E-NP'lerin (EE-10C) TEM görüntüsü (11-26nm).

D **E** **F**



Şekil 4.26. D) SE'den sentezlenen AgNP'lerin (SNP) TEM görüntüsü (6-32nm). **E)** 2°C/dk hızda kalsine edilen S-NP'lerin (SE-2C) TEM görüntüsü (10-25nm) **F)** 10°C/dk hızda kalsine edilen S-NP'lerin (SE-10C) TEM görüntüsü (4-21nm).

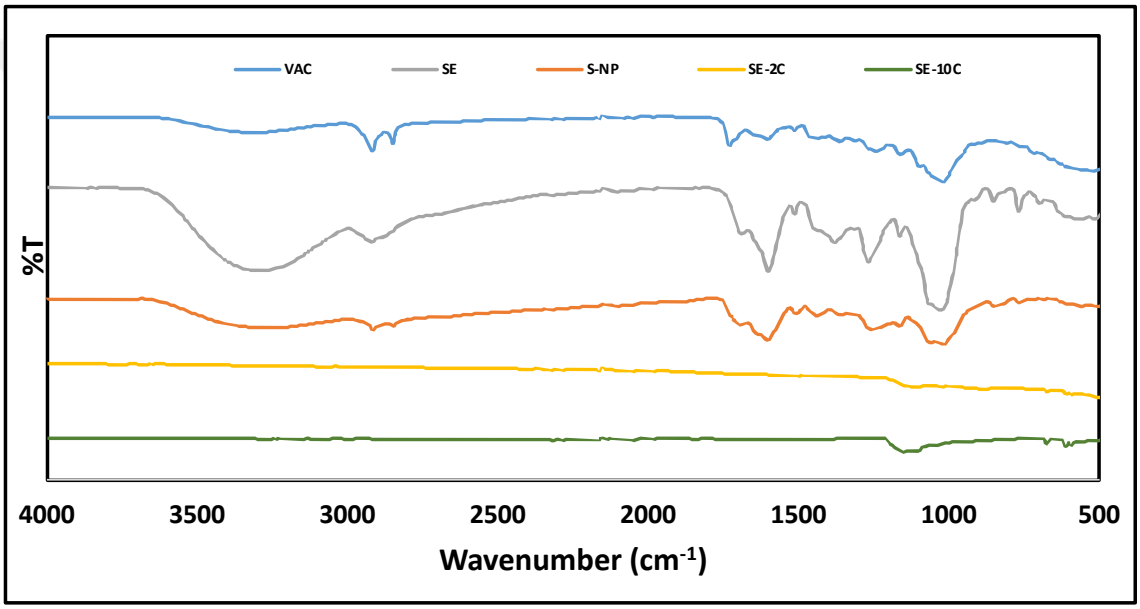
4.4.5. Bitki ekstraktlarının ve sentezlenen AgNP'lerin FTIR analizleri

Etanol ve su ekstraktlarına ait FTIR spektrumlarında 3200-3600 cm^{-1} aralığında gözlenen geniş bant, örneklerde bulunan fenolik bileşikler, polisakkaritler ve diğer hidrojen bağları kurabilen gruplardan kaynaklanan O-H gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir. 2920-2850 cm^{-1} bölgesindeki zayıf/orta şiddette bantlar ise alifatik zincirlere ait C-H ($-CH_2$/$-CH_3$) gerilme titreşimlerini göstermektedir. Ekstraktlarda lipofilik fraksiyonlar ve terpenik yapıların varlığına işaret etmektedir. 1700-1600 cm^{-1} aralığında görülen bantlar ise C=O gerilmesine ait titreşimleri ifade etmekte ve ester grubu, karboksilik asit grubu veya konjuge karbonil grubu varlığını göstermektedir. Ayrıca, aromatik halkalara ait C=C gerilme titreşimleri ile de ilişkilidir. Bu bölge fenolik asitler, flavonoidler ve diğer aromatik bileşenlerin karakterizasyonunda kritik öneme sahiptir (Şekil 4.27).

1500-1400 cm^{-1} civarındaki bantlar, aromatik iskelet titreşimleri ile C-H bükülme titreşimlerine katkı sunabilir. Parmak izi bölgesi olarak tanımlanan 1300-900 cm^{-1} aralığında belirginleşen çoklu bantlar ise özellikle C-O ve C-O-C gerilme titreşimleri ile ilişkilidir ve alkoller, eterler ile glikozidik bağlar ile uyumludur. Ekstrakt matrisinde şekerler, glikozitlerle polifenoliklerin oksijenli fonksiyonel gruplarını destekler.

Su ve etanol ekstraktları arasındaki bant şiddeti ve şekil farklılıkları, çözücü polaritesine bağlı olarak ekstrakte edilen bileşik sınıflarının nispi dağılımındaki değişimle açıklanabilir.

Spektrumlar ekstraktların yeşil sentezde hem indirgeme hem de AgNP yüzeyinde kaplama sağlayan fonksiyonel gruplar açısından zengin olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla sentezlenen AgNP'lerin yüzey kimyasının FTIR ile izlenebilir nitelikte organik gruplar taşıyabileceği öngörülmektedir (Coates, 2000; Stuart, 2005).



Şekil 4.27. *Vitex agnus-castus* bitkisinin yaprağı, su ekstraktı (SE), SE ile sentezlenen SNP ve kalsinasyon uygulanmış örneklerin (SE-2C ve SE-10C) FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

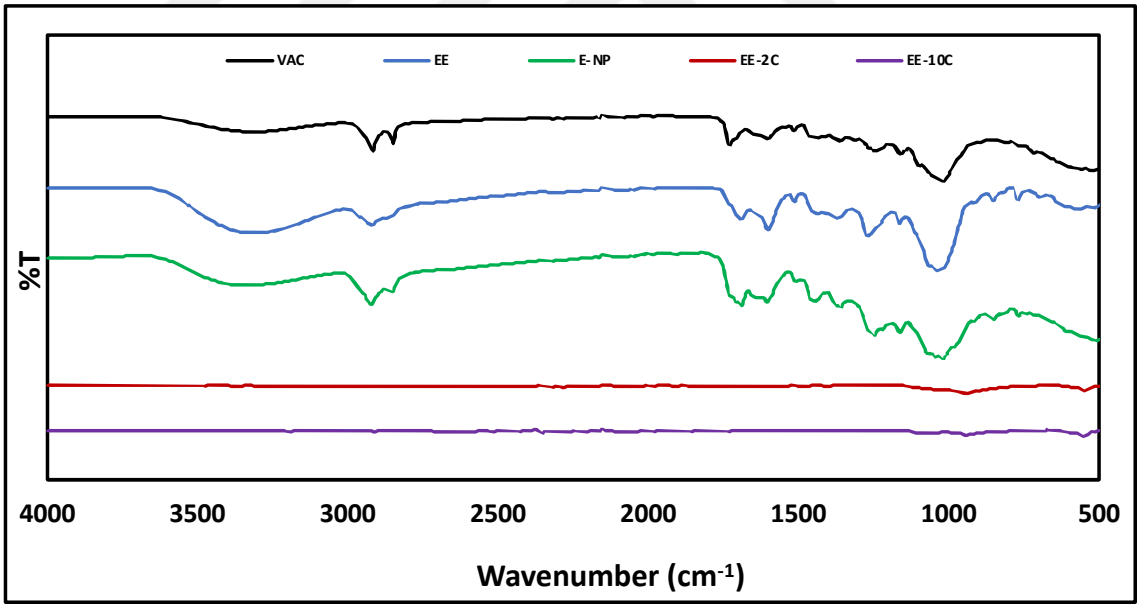
Şekil 4.27'de ham bitki materyali (VAC), SE ekstraktı, kalsine edilmemiş AgNP'ler (S-NP) ve 2 °C/dk ile 10 °C/dk ısıtma hızlarında kalsine edilmiş NP örneklerin FTIR spektrumları sunulmuştur. VAC ve SE örneklerinde 3200-3400 cm^{-1} aralığında gözlenen geniş ve kuvvetli bant, fenolik ve flavonoid yapılarda bulunan hidroksil gruplarına ait O-H gerilme (stretching) titreşimlerine karşılık gelmektedir. Bitkisel ekstraktlarda bu geniş bant, hidrojen bağları nedeniyle tipik olarak yayvan bir profil sergilemektedir. SE örneğinde bu bandın belirginleşmesi, suyun polar doğası nedeniyle hidroksilli bileşiklerin daha etkin ekstrakte edildiğini düşündürmektedir (Coates, 2000; Stuart, 2005).

2920-2850 cm^{-1} aralığında gözlenen bantlar alifatik C-H gerilme titreşimleri ile ilişkilidir ve bitkisel matrikste bulunan lipit, terpenoid ve diğer alifatik zincirli bileşiklerin varlığını göstermektedir. 1600-1635 cm^{-1} bölgesindeki kuvvetli bantlar, aromatik

halkalara ait C=C gerilme titreşimleri ile konjuge karbonil gruplarının C=O gerilmelerinin örtüşmesiyle ortaya çıkmaktadır. 1400-1500 cm^{-1} aralığındaki bantlar, aromatik iskelet titreşimleri ile fenolik yapılarla ilişkilidir. 1200-000 cm^{-1} bölgesinde gözlenen belirgin bantlar ise fenolik asitler ve flavonoidlerdeki C-O ve C-O-C gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir (Coates, 2000).

S-NP spektrumunda özellikle O-H ve C=O bantlarında gözlenen şiddet azalması ve dalga sayısı kaymaları, bu fonksiyonel grupların Ag^{+} iyonlarının indirgenmesi ve nanoparçacık yüzeyine bağlanmasında rol oynadığını göstermektedir. Bitki aracılı AgNP sentezlerinde fenolik hidroksil ve karbonil gruplarının hem indirgeme hem de kaplama ajanı olarak görev yaptığı literatürde yaygın olarak rapor edilmiştir (Iravani, 2011). Bu durum, FTIR verileriyle yüzeyde fitokimyasalların tutunduğunu ve stabil bir tabaka oluştuğunu göstermektedir.

Kalsinasyon sonrası (SE-2C ve SE-10C) spektrumlarında 3200-3400 cm^{-1} ve 1600 cm^{-1} civarındaki organik bantların belirgin şekilde zayıfladığı gözlenmiştir. Organik fonksiyonel gruplardaki bu azalma, yüzeydeki biyokaplı organik fazın termal ayrışmaya uğradığını göstermektedir. Spektrumlar bu farkı veriyor mu sence? Termal işlemin NP'lerin yüzey kimyasını değiştirdiği ve organik kalıntıları azalttığıbeklenen bir durumdur. Bu bulgular, AgNP yüzeyinin kalsinasyonla yüzeydeki fitokimyasalların uzaklaştırmasıyla birlikte sadece metalik AgNP'nin kaldığını göstermiştir (Yashni vd., 2019).



Şekil 4.28. *Vitex agnus castus* bitkisinin yaprağı, %60 etanol ekstraktı (EE), EE ile sentezlenen E-NP ve kalsinasyon uygulanmış örneklerin (EE-2C ve EE-10C) FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.28'de EE tabanlı sistemlerin FTIR spektrumları görülmektedir. Önceki spektrumlara benzer şekilde, EE'ye ait spektrumda 3300 cm^{-1} civarında gözlenen geniş bant, fenolik yapıların O-H gerilme titreşimlerine, 2920–2850 cm^{-1} aralığı ise alifatik C-H gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir (Silverstein et al., 2014). 1700-1600 cm^{-1} aralığında görülen bantlar karbonil gruplarına ait C=O gerilme titreşimleri ile aromatik

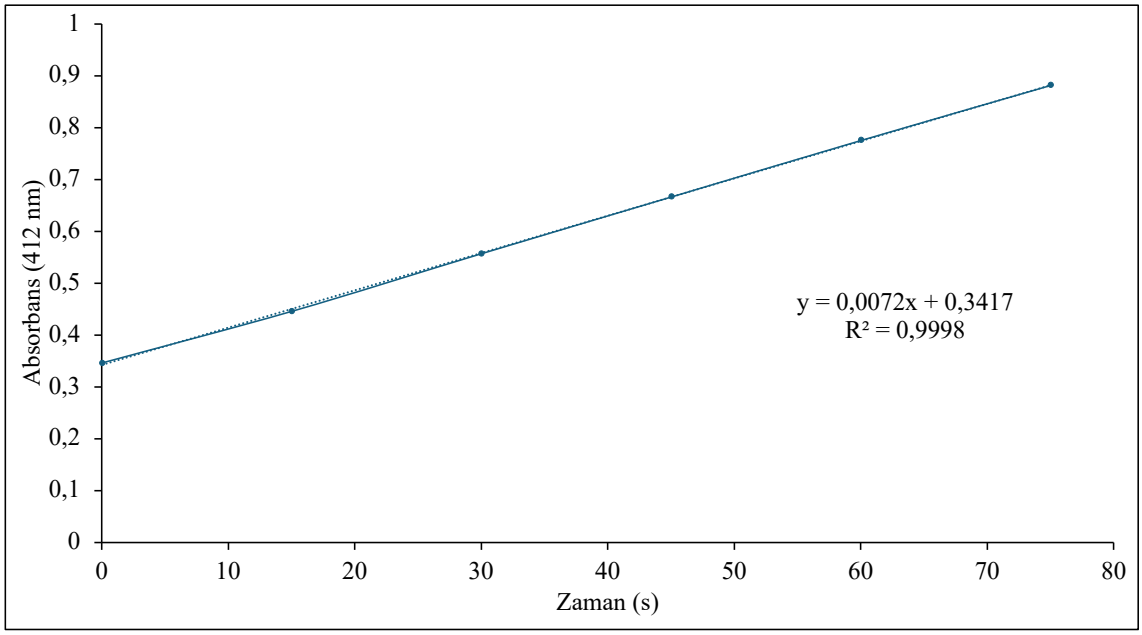
halkalara ait C=C gerilmelerinin örtüşmesini göstermektedir. 1250-1000 cm^{-1} bölgesindeki bantlar ise flavonoid ve fenolik asitlerin karakteristik C-O gerilme titreşimleri ile ilişkilidir.

E-NP'lere ait spektrumda O-H ve C=O bantlarında gözlenen kaymalar, indirgeme sürecinde bu grupların Ag^{+} iyonları ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP'lerde FTIR bant kaymalarının, fonksiyonel grupların metal yüzeyine koordinasyonunu gösteren önemli bir kanıttır. Ayrıca 1000-1100 cm^{-1} bölgesindeki C-O bant profilindeki değişim, yüzey kaplamasının oluştuğunu desteklemektedir.

EE-2C ve EE-10C örneklerinde organik bantların belirgin şekilde zayıflaması, kalsinasyonun yüzeydeki fenolik ve flavonoid kaplamanın tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. 10C örneğinde spektrumun daha düz bir profil göstermesi, organik bileşenlerin daha yüksek oranda uzaklaştırıldığını göstermektedir. Bu durum, kalsinasyonun AgNP yüzey kimyasını değiştirerek yüzey enerjisini ve potansiyel biyolojik etkileşim kapasitesini etkileyebileceğini göstermektedir.

4.5. AChE İnhibisyonu Çalışmaları ve Kinetik Analizi

Bu çalışmada *Vitex agnus-castus* yapraklarından elde edilen SE ve EE ekstraktlarının yanı sıra, bu ekstraktlarla sentezlenen AgNP'lerin AChE inhibitör potansiyelleri 6,25-100 µg/mL derişim aralığında değerlendirilmiştir. AChE'nin aktivitesi, substrat hidrolizine bağlı renk oluşumunun spektrofotometrik olarak izlenmesiyle belirlenmektedir. Her derişim için 5 tekrarlı ölçümlerden elde edilen ortalama % inhibisyon değerleri standart sapma (SD), standart hata (SE) ve %RSD ile raporlanmıştır.



Şekil 4.29. 0-420s aralığında kullanılan AChE enzimine ait standart kalibrasyon grafiği

Şekil 4.29'da zamana karşı AChE enziminin tepkimesinin ilerleyişini ifade eden absorbans değerleri çizilmiştir. 15 saniyede bir ölçüm alınarak ilk 75 saniyelik ölçüm verileri kullanılmıştır.

- Çizilen grafiğinin eğimi denklem 4.1'deki gibi hesaplanır

$$\textbf{Eğim} = \frac{\boldsymbol{\Delta Abs}}{\boldsymbol{\Delta t}} \qquad (\mathbf{4.1})$$

- Bulunana eğimin dk'ya dönüşümünü yapmak için 4.1'deki denklem, 4.2'deki gibi 60 ile çarpılır

$$\frac{\boldsymbol{\Delta Abs}}{\boldsymbol{dk}} = \left(\frac{\boldsymbol{\Delta Abs}}{\boldsymbol{\Delta t}}\right) \times \mathbf{60} \qquad (\mathbf{4.2})$$

- Enzim hızı (nmol/dk) için kullanılan denklem 4.3'te verilmiştir

$$\boldsymbol{v}(\textbf{nmol/dk}) = \left(\frac{\boldsymbol{\Delta Abs}}{\boldsymbol{dk}}\right) \times \boldsymbol{K} \qquad (\mathbf{4.3})$$

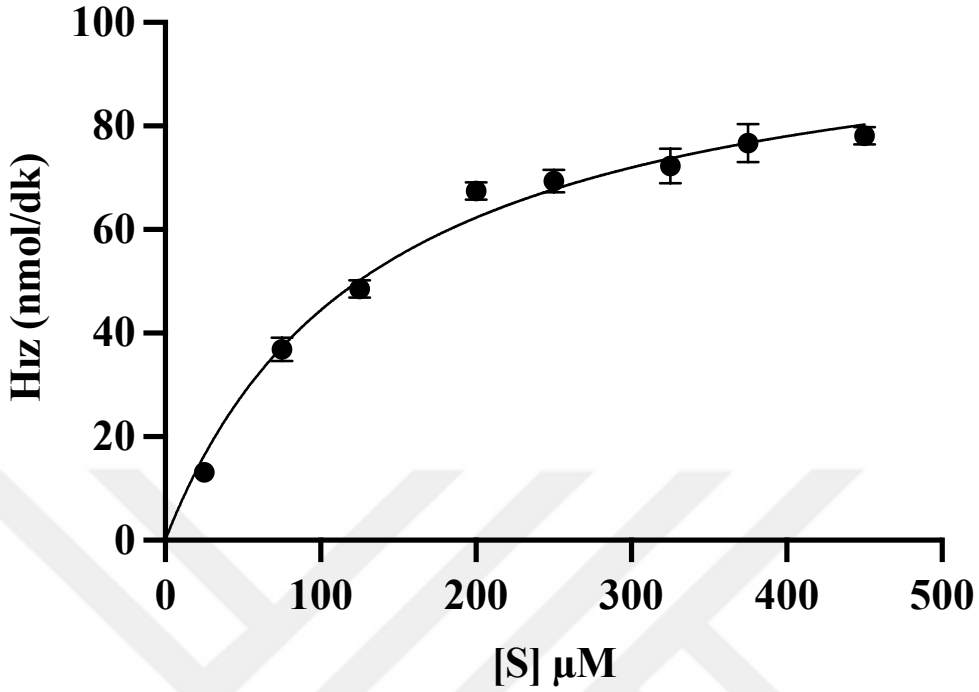
- Denklem 4.4'te verilen eşitlik ise kullanılan toplam hacim (V), molar soğurma katsayısı (ε) ve optik yol uzunluğuna (l) bağlı olarak hesaplanan K dönüşüm katsayısını verir.

$$\boldsymbol{K} = \frac{\boldsymbol{V}_{\textbf{toplam}} \times \mathbf{10^9}}{\boldsymbol{\varepsilon} \times \boldsymbol{l}} \qquad (\mathbf{4.4})$$

- % İnhibisyon değeri hesaplanırken denklem 4.5 kullanılır.

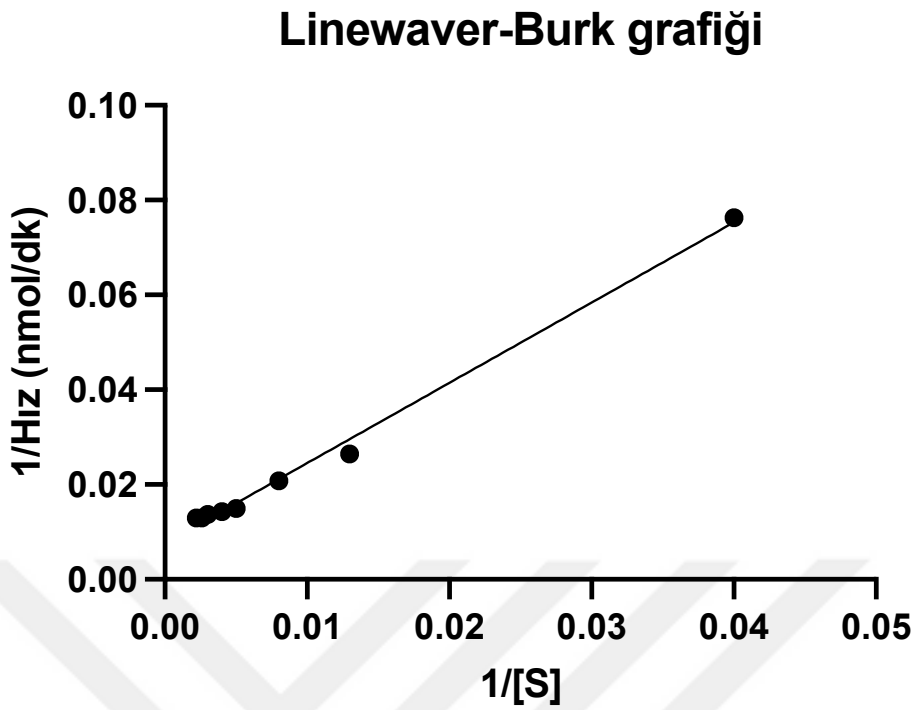
$$\%\textbf{İnhibisyon} = \left[\mathbf{1} - \frac{\boldsymbol{v}_{\textbf{inhibitör}}}{\boldsymbol{v}_{\textbf{0,kontrol}}}\right] \times \mathbf{100} \qquad (\mathbf{4.5})$$

AChE inhibisyon deneyi, Ellman yöntemine dayalı UV-Vis kinetik izleme yaklaşımıyla (412 nm'de absorbans artışı) yürütüldüğünden, her konsantrasyonda önce doğrusal bölgeden eğim (ΔAbs/Δt) alınmış, bu eğim ΔAbs/dk'ya çevrilmiş ve ardından reaksiyon hızı (nmol/dk) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen hız değerleri üzerinden her bir örnek için yüzde inhibisyon 4.5 bağıntısı ile bulunmuştur (Ellman vd., 1961).



Şekil 4.30. AChE enzimi için çizilen Michaelis-Menten grafiği (n:3).

Bu çalışmada AChE enziminin kinetik parametreleri Michaelis-Menten modeli ile hesaplanmış ve reaksiyon hızının substrat derişimine bağlı doygunluk davranışı nicel olarak tanımlanmıştır. Model uyumuna göre maksimum hız V_{max} 103,0 nmol/dk olarak bulunmuş, Michaelis sabiti K_m ise 131,4 µM olarak hesaplanmıştır. Profil olasılık temelli güven aralıkları V_{max} için 96,28 ile 110,9 nmol/dk aralığında, K_m için 107,7 ile 160,7 µM aralığında yer almıştır. $R^2 = 0,9751$ olarak hesaplanmasıyla desteklenmiştir. Elde edilen K_m ve V_{max} değerleri, AChE aktivitesinin çalışma koşullarındaki temel kinetik referansını oluşturarak sonraki inhibisyon değerlendirmeleri için karşılaştırılabilir bir zemin sağlamıştır.



Şekil 4.31. AChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (n:3).

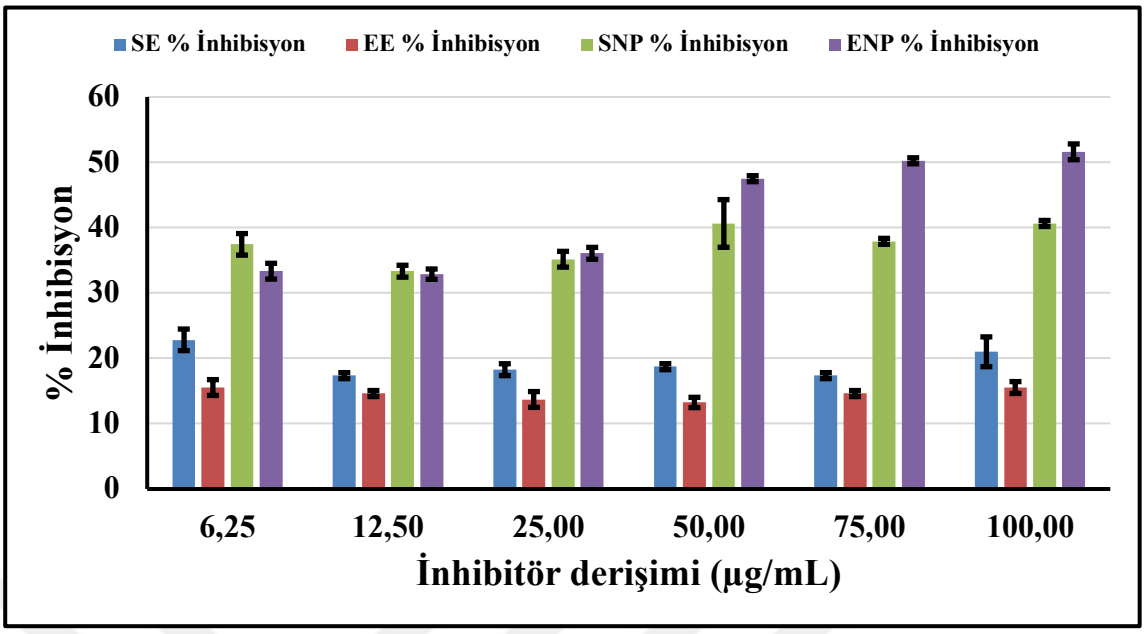
Aynı veri seti Lineweaver-Burk doğrusal dönüşümü ile de incelenmiş ve elde edilen regresyon denklemi y =1,693 x +0,007593 olarak bulunmuştur. Regresyon uyumu oldukça güçlüdür ve R^2 = 0,9947 olarak elde edilmiştir. Eğimin sıfırdan anlamlı derecede farklı olduğu (F=1132 ve P <0,0001) doğrulanmıştır. Lineweaver-Burk yaklaşımında Vmax değeri yaklaşık 131,7 nmol/dk olarak ve Km değeri ise yaklaşık 223,0 µM olarak hesaplanmıştır.

Bu doğrusal dönüşümden elde edilen parametrelerin Michaelis-Menten modelinden hesaplanan K_m ve V_{max} ile birebir örtüşmemesi, Lineweaver-Burk dönüşümünün düşük substrat derişimlerinde ölçüm hatalarını büyütme eğilimi ve doğrusal regresyondaki ağırlıklandırma etkileri ile açıklanabilmektedir. Bu nedenle K_m ve V_{max} yorumunda esas referans olarak doğrudan Michaelis-Menten uyumundan elde edilen parametrelerin kullanılması daha uygun görülmüştür.

Çizelge 4.7'de verilen değerler şekil 4.32'te kıyaslamanın kolay olması için standart hata çubuklarıyla birlikte verilmiştir. Bu çalışmada *Vitex agnus-castus* yapraklarından hazırlanan SE ve EE ekstraktları ile bu ekstraktlarla yeşil yöntemle sentezlenen AgNP'lerin, 6,25-100 µg/mL derişim aralığında AChE enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Beş tekrarlı şekilde gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda enzimin inhibisyon yüzdeleri, ortalama değer ± SD (n=5) olarak, belirlenmiştir. İnhibisyon çalışmasından kullanılan AgNP'ler, kalsine edilmeden kullanılmıştır. Bunun sebebi kalsine işleminden sonra AgNP'lerin yeteri kadar homojen çözülememsidir.

Çizelge 4.7. Ekstrakt ve AgNP'lerin (6,25-100 µg/mL derişim aralığında) AChE enzim üzerinde % inhisyon verileri.

Örnek	Derişim (µg/mL)	% İnhibisyon	SD (±)	SE (±)	% RSD
SE	6,25	22,83	2,85	1,65	12,49
	12,5	17,35	0,79	0,46	4,56
	25	18,26	1,58	0,91	8,66
	50	18,72	0,79	0,46	4,22
	75	17,35	0,79	0,46	4,56
	100	21,00	3,95	2,28	18,83
EE	6,25	15,53	1,58	1,21	10,19
	12,5	14,61	0,79	0,46	5,41
	25	13,70	1,37	1,21	10,00
	50	13,24	2,09	0,79	15,80
	75	14,61	0,79	0,46	5,41
	100	15,53	2,09	0,91	13,48
S-NP	6,25	37,44	2,85	1,65	7,62
	12,5	33,33	1,58	0,91	4,75
	25	35,16	2,09	1,21	5,95
	50	40,64	6,33	3,65	15,57
	75	37,90	0,79	0,46	2,09
	100	40,64	0,79	0,46	1,95
E-NP	6,25	33,33	2,09	1,21	6,28
	12,5	32,88	1,37	0,79	4,17
	25	36,07	1,58	0,91	4,38
	50	47,49	0,79	0,46	1,67
	75	50,23	0,79	0,46	1,57
	100	51,60	2,09	1,21	4,06



Şekil 4.32. Ekstrakt ve AgNP'lerin AChE enzim inhisyonları kıyaslaması (Standart hata: SE ±, n:5).

Ham ekstraktlar düşük ve plato karakterinde bir inhibisyon profili göstermiş; SE ile inhibisyon %17,35-22,83, EE ile inhibisyon %13,24-15 aralığında kalmıştır. Buna karşın nanoparçacık formlarında inhibisyon belirgin biçimde artmıştır. S-NP için değerler %33,33-40,64, E-NP için %32,88-51,60 aralığına yükselmiştir. E-NP grubunda inhibisyonun özellikle inhibitör derişiminin 25 µg/mL'den sonra artış eğilimi göstermesi ve 100 µg/mL'de %51,60 düzeyine ulaşması, AgNP yüzeyinde ekstrakt kökenli fenolik ve flavonoid bileşiklerin etkisiyle fonksiyonel grupların enzime erişilebilirliğini ve çoklu etkileşim olasılığını artırdığına işaret etmektedir.

4.6. Moleküler kenetlenme (Docking) çalışmaları

Asetilkolinesteraz (AChE, PDB: 4EY7, zincir A) üzerinde gerçekleştirilen moleküler docking analizinde, 13 fitokimyasal bileşiğin bağlanma serbest enerji (ΔG) değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın amacı *Vitex agnus-castus* ekstraktlarında tespit edilen fenolik asitler ve flavonoid türevlerinin AChE aktif oluğuna (gorge) bağlanma eğilimlerini in silico olarak ortaya koymak, özellikle CAS ve PAS bölgesine yönelik etkileşim paternlerini belirlemektir. Böylece deneysel AChE inhibisyon bulgularının olası moleküler temeli desteklenmiş ve hangi bileşiklerin enzimin aktif bölgesinde daha kararlı kompleks oluşturabileceği değerlendirilmiştir.

Docking hesaplamaları, UCSF Chimera arayüzü üzerinden AutoDock Vina programı kullanılarak yürütülmüştür. Enzimin yapısı olarak 4EY7'nin A zinciri seçilmiştir. Ligand olarak ise rosmarinic acid, luteolin, chlorogenic acid, cyanidin-3-glucoside, vitexin, keracyanin (cyanidin-3-rutinoside), ferulic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, 4-hydroxybenzoic acid, vanillin, quinic acid ve fumaric acid bileşikleri ile çalışılmıştır. Docking çıktılarında her ligand için en düşük enerjiye sahip poz ("best pose / model 1") esas alınarak ΔG değerleri kaydedilmiş; elde edilen komplekslerin etkileşim analizi iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Chimera üzerinden protein–ligand hidrojen

bağları (intermodel H-bonds) belirlenmiş, BIOVIA Discovery Studio Visualizer (DSV) ile hidrojen bağlarına ek olarak π-π, π-alkil, π-sigma gibi aromatik ve hidrofobik temaslar dahil olmak üzere detaylı etkileşim haritaları çıkarılmıştır. Böylece, Vina'nın enerji temelli sıralamasının yanında bağlanmayı stabilize eden başlıca etkileşim türleri ve hedef aminoasit rezidüleri sistematik biçimde raporlanmıştır.

Çizelge 4.8. Seçilen ligandarın Vina programı ile hesaplanan ΔG (kcal/mol) değerleri.

Sıra	**Ligand**	**ΔG (kcal/mol)**
L1	Rosmarinic acid	-10.5
L2	Luteolin	-10.4
L3	Chlorogenic acid	-10.0
L4	Cyanidin-3	-9.6
L5	Vitexin	-9.5
L6	Keracyanin	-9.2
L7	Ferulic acid	-7.7
L8	*p*-Coumaric acid	-7.5
L9	Vanillic acid	-6.8
L10	4-Hydroxybenzoic acid	-6.5
L11	Vanillin	-6.3
L12	Quinic acid	-6.3
L13	Fumaric acid	-5.0

Elde edilen sonuçlara göre en güçlü bağlanma afinitesi rosmarinik asit (ΔG = -10,5 kcal/mol) ve luteolin (ΔG = -10,4 kcal/mol) tarafından gösterilmiştir. Bu değerler, güçlü hidrojen bağları ve π–π istiflenme etkileşimlerinin eş zamanlı gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bunu sırasıyla klorojenik asit (-10,0 kcal/mol), cyanidin-3 (-9,6 kcal/mol) ve vitexin (-9,5 kcal/mol) izlemiştir.

ΔG değeri -9 kcal/mol'un altında olan bileşiklerin (rosmarinik asit, luteolin, klorojenik asit, cyanidin-3, vitexin ve keracyanin) AChE aktif bölgesinde yüksek stabiliteye sahip kompleksler oluşturduğu söylenebilir. Bu bağlanma enerjileri, literatürde bildirilen birçok doğal AChE inhibitörünün docking skorlarıyla benzer aralıktadır ve özellikle çoklu hidroksil içeren fenolik yapıların katalitik üçlüye ve aromatik cep bölgelerine güçlü şekilde yerleştiğini desteklemektedir.

Orta düzey bağlanma afinitesi gösteren ferulik asit (-7,7 kcal/mol) ve p-kumarinik asit (-7,5 kcal/mol) gibi daha küçük fenolik asitler, daha sınırlı hidrojen bağı kapasitesi ve daha düşük aromatik yüzey alanı nedeniyle nispeten daha zayıf etkileşim göstermiştir. En düşük bağlanma enerjisi ise fumarik asit (-5,0 kcal/mol) için elde edilmiştir. Bu durum molekülün aromatik halka içermemesi ve aktif bölge ile π-π etkileşimi kuramaması ile ilişkilidir.

Genel olarak sonuçlar, hidroksil sayısı ve aromatik halka yoğunluğu arttıkça bağlanma afinitesinin arttığını göstermektedir. Bu eğilim, fenolik yapıların AChE aktif bölgesindeki aromatik amino asit kalıntıları ile π–π istiflenme ve hidrojen bağı etkileşimleri kurabilme kapasitesi ile uyumludur.

Çizelge 4.9. DSV ile görselleştirilen bağlar ve etkileşimler.

Ligand	ΔG (kcal/mol)	Ana etkileşimler	Hedef bölgeler	Mesafe aralığı (Å)
Rosmarinic acid	-10.5	H-bağı: GLU199, ARG287, TYR121; π: HIS438	CAS + PAS + Gorge	2.09-4.67
Luteolin	-10.4	H-bağı: ARG287; π: TRP277, TYR332; π-donor: TYR121	PAS + Gorge	1.97-5.18
Chlorogenic acid	-10.0	H-bağı: GLY118/119, ARG287, SER284, HIS438; π: TRP277; π-alkyl: PHE329	Oksianyon + CAS + PAS + Gorge	1.98-4.75
Cyanidin-3-glucoside	-9.6	H-bağı: TRP83, ASP71, ARG287; (C-H): SER122; π: TRP277, TYR332/328	CAS + PAS + Oksianyon + Gorge	2.06-5.79
Vitexin	-9.5	H-bağı: TYR69, ARG287, SER284; π: TYR332	PAS + Gorge	2.12-3.75
Keracyanin (cyanidin-3-rutinoside)	-9.2	H-bağı: HIS396, ASN521; (C-H): VAL236/TRP520; hidrofobik: LEU524/VAL361	Yüzey/diğer	2.01-5.42
Ferulic acid	-7.7	H-bağı: TYR328; (C-H): SER122; π/π-alkyl: TRP83	PAS + CAS + Oksianyon	2.17-5.35
p-Coumaric acid	-7.5	H-bağı: GLU199, ASP71; π: TRP83	CAS + PAS	2.17-4.40
Vanillic acid	-6.8	H-bağı: TYR121, TYR130; π: TRP83; π-donor: TYR328	PAS + CAS + Oksianyon	2.63-5.35
4-Hydroxybenzoic acid	-6.5	H-bağı: GLU199, TYR328, GLY118; π: TRP83	CAS + PAS + Oksianyon	2.18-4.02
Vanillin	-6.3	(C-H): GLY118; π/π-alkyl: TRP83	CAS + Oksianyon	2.68-5.20
Quinic acid	-6.3	H-bağı: ASP71; (C-H): GLY118; π-donor: PHE329	PAS + Oksianyon + Gorge	2.28-3.12
Fumaric acid	-5.0	H-bağı: SER200, GLU199, TYR130; (C-H): GLY118/123	CAS + PAS + Oksianyon	2.30-2.89

DSV (Discovery Studio Visualizer) etkileşim analizleri, özellikle yüksek afiniteli ligandların AChE'nin aktif oluğu (gorge) boyunca çok noktalı ankraj oluşturduğunu çizelge 4.9'da gösterilmektedir. Örneğin chlorogenic acid, oksianyon boşluğu

çevresindeki Gly118–Gly119 ve oluk içi polar kalıntılar (Arg287, Ser284, His438) ile çoklu hidrojen bağları kurarken, eş zamanlı olarak Trp277 ile π–π etkileşimi ve Phe329 ile π-alkil etkileşimleri sergilemiştir. Benzer şekilde luteolin ve cyanidin-3-glucoside, aromatik çekirdeğin baskın olması nedeniyle π-temelli etkileşimler gösterirken, hidrojen bağlarıyla da pozisyonunu stabilize etmiştir. Bu tip etkileşim çeşitliliği, ΔG değerlerinin daha negatif değerlere kaymasını açıklayan temel yapısal faktörlerdir.

Çizelge 4.10. USCF Chimera ile hesaplanan H-bağları verileri.

Ligand	ΔG (kcal/mol)	H-bağı sayısı (n)	H-bağı yapan rezidüler (bölge)
Rosmarinic acid	-10.5	2	ARG287 (Gorge), GLU199 (CAS/gorge)
Luteolin	-10.4	1	ARG287 (Gorge)
Chlorogenic acid	-10.0	1	HIS438 (CAS/gorge)
Cyanidin-3-glucoside	-9.6	1	TRP83 (CAS/gorge; anyonik)
Vitexin	-9.5	2	TYR69 (PAS), ARG287 (Gorge)
Keracyanin (cyanidin-3-rutinoside)	-9.2	4	GLY237 (diğer), HIS396 (diğer), ASN521×2 (yüzey/diğer)
Ferulic acid	-7.7	0	—
p-Coumaric acid	-7.5	1	GLU199 (CAS/gorge)
Vanillic acid	-6.8	0	—
4-Hydroxybenzoic acid	-6.5	2	TYR328 (PAS), GLU199 (CAS/gorge)
Vanillin	-6.3	0	—
Quinic acid	-6.3	2	TYR121 (PAS), ASP71 (PAS)
Fumaric acid	-5.0	0	—

Chimera'dan elde edilen "Finding intermodel H-bonds" çıktıları temel alınarak hazırlanan çizelge 4.10'da her ligand için Vina bağlanma enerjisi (ΔG) ile aktif oluk içinde tespit edilen hidrojen bağı sayısı ve bu bağların geometrisi (donör–akseptör mesafesi D..A ve donör H-akseptör mesafesi D–H..A, Å) birlikte raporlanmıştır. Bu yaklaşım, bağlanma gücünü yalnızca enerji (ΔG) üzerinden değil, aynı zamanda bağlanma pozunda spesifik yönlü etkileşimlerin (H-bağı) varlığı ve kalitesi üzerinden de değerlendirmeye imkân verir.

Elde edilen bulgular çizelge 4.10'da incelendiğinde en yüksek afiniteli bileşiklerden rosmarinic acid (-10.5 kcal/mol) iki H-bağı ile Glu199 ve Arg287 üzerinden aktif oluk ile etkileşime girmiştir. Özellikle Glu199 ile olan bağın kısa mesafeli olması (D..A≈2.91 Å) daha güçlü bir polar etkileşime işaret etmiştir. Benzer şekilde luteolin (-10.4 kcal/mol) tek bir H-bağı göstermesine karşın bu bağın Arg287 ile nispeten kısa bir geometriye sahip olması (D..A≈2.96 Å) ligandın oluk içinde kararlı bir konum alabildiğini düşündürmektedir. Chlorogenic acid (-10.0 kcal/mol) için His438 üzerinden bir H-bağı gözlenmesi (D..A≈3.26 Å), ligandın aktif oluğun derin kısmındaki polar merkezlerle temas edebildiğini ve yüksek afinitenin bu tür yönlü etkileşimlerle desteklendiğini göstermektedir.

Orta-yüksek afiniteli grupta yer alan vitexin (-9.5 kcal/mol) iki H-bağı ile hem Tyr69 hem de Arg287 üzerinden bağlanmıştır. Bu durum ligandın oluğun girişine yakın

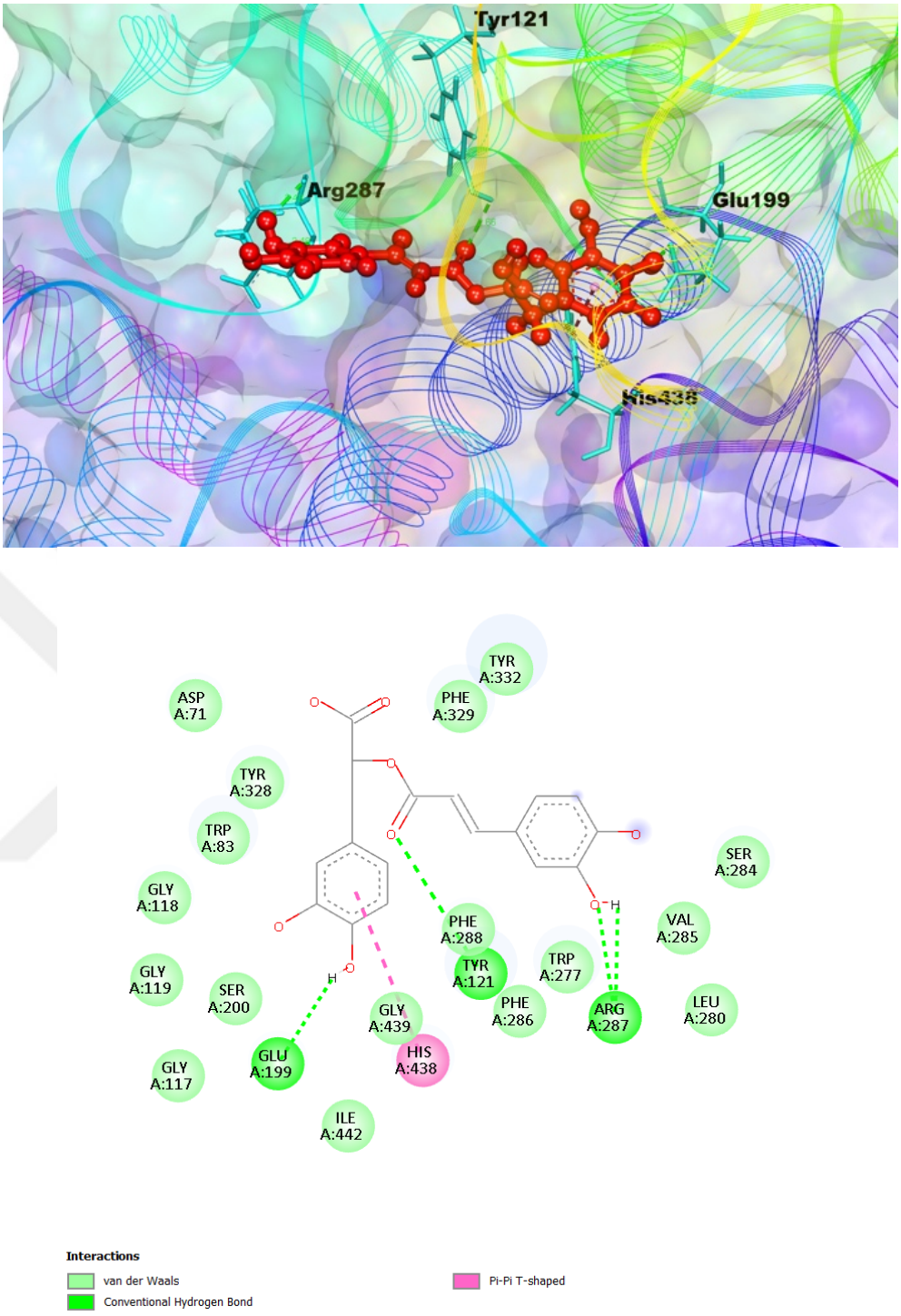
bölgede (Tyr69) ve oluk içi bir polar merkezde (Arg287) eşzamanlı etkileşim kurarak pozunu stabilize ettiğini düşündürmektedir. Cyanidin-3-glucoside (-9.6 kcal/mol) yalnızca Trp83 ile tek H-bağı göstermiştir. Buna rağmen ΔG'nin oldukça negatif olması, bu ligandın bağlanmasının yalnız H-bağı sayısından ziyade genel temas yüzeyi ve diğer etkileşim bileşenleriyle de desteklenebileceğine işaret etmektedir. Keracyanin (-9.2 kcal/mol) için toplam 4 H-bağı raporlanmış (Gly237, His396 ve Asn521 üzerinden); H-bağı sayısının yüksek oluşu polar temasların güçlü olduğunu düşündürse de bu bağların bir kısmının daha yüzeysel bölgelerde konumlanması mümkün olduğundan, tek başına H-bağı sayısı ile ΔG arasında birebir doğrusal bir ilişki görülmemektedir.

Düşük ve orta afiniteli küçük fenoliklerde belirgin bir ayrışma görülmektedir. p-coumaric acid (-7.5 kcal/mol) tek bir H-bağı ile Glu199 üzerinden bağlanırken, 4-hydroxybenzoic acid (-6.5 kcal/mol) iki H-bağı ile Glu199 ve Tyr328 üzerinde bağlanmıştır. Buna karşılık ferulic acid (-7.7 kcal/mol), vanillic acid (-6.8 kcal/mol), vanillin (−6.3 kcal/mol) ve fumaric acid (-5.0 kcal/mol) için Chimera raporunda H-bağı tespit edilmemiştir. Bu durum, bu ligandların bağlanmasının ya daha çok hidrofobik/π-temelli veya zayıf temaslarla gerçekleştiğini ya da seçilen poz geometrisinde H-bağı kriterlerini sağlayamadığını göstermektedir. Ayrıca quinic acid (-6.3 kcal/mol) iki H-bağı ile Asp71 ve Tyr121 üzerinden bağlanmış olsa da ΔG'nin görece zayıf kalması, H-bağlarının varlığının tek başına yüksek afinitiyi garanti etmediğini, ligandın boyutu, şekil uyumu, desolvasyon ve toplam temas yüzeyi gibi parametrelerin de enerjiye belirgin katkı verdiğini düşündürmektedir.

4.6.1. Docking çalışmasında kulanılan ligandların 2D ve 3D görselleştirmeleri

L-1 Rosmarinic Acid (ΔG = -10.5)

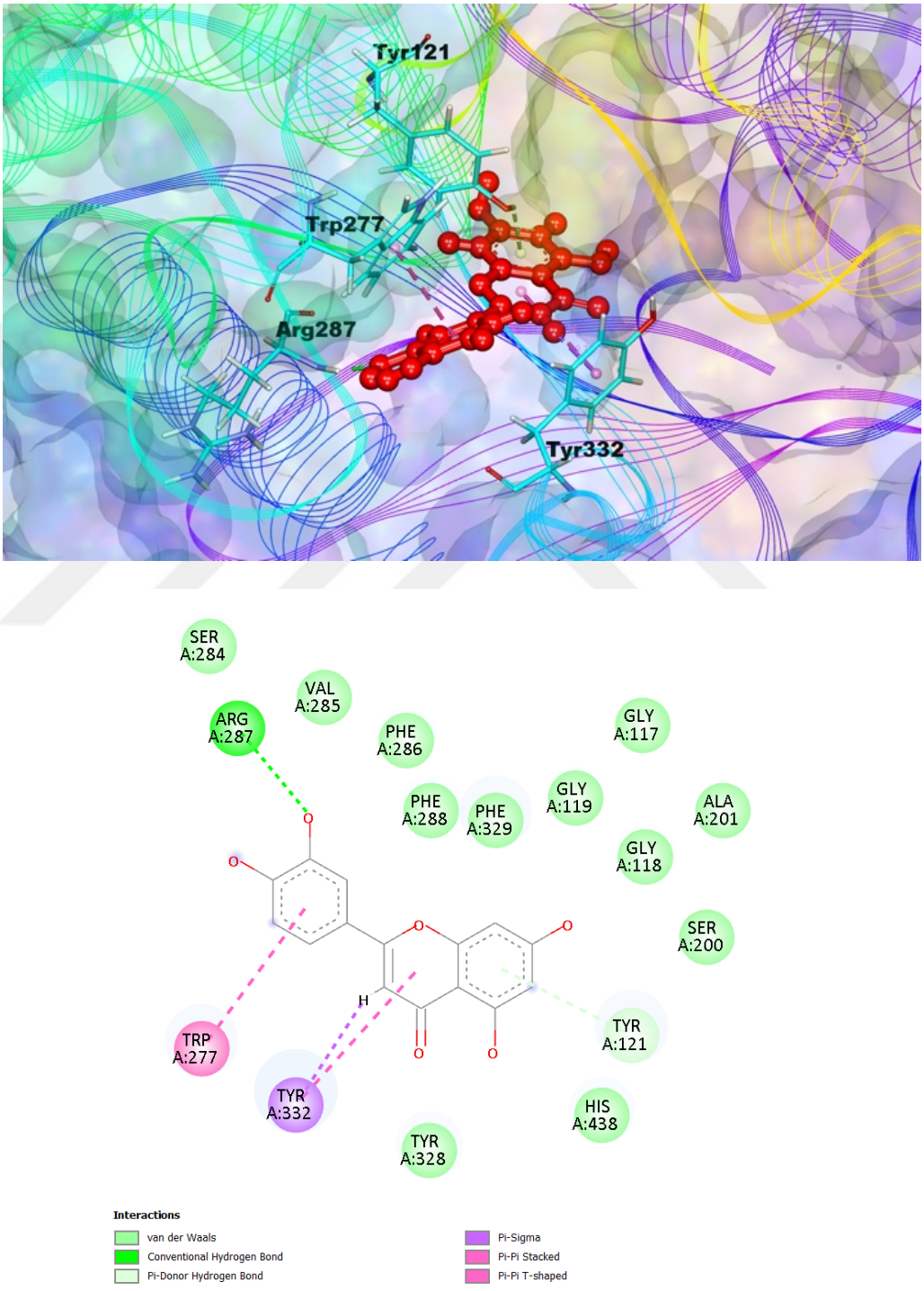
Rosmarinik asit, aktif oluğun derin kısmında Glu199 ve Arg287 üzerinden güçlü polar ankraj oluşturarak yüksek afinite göstermiştir. Tyr121 temasıyla PAS tarafına uzanması, ligandın CAS-PAS ekseninde çok noktalı bağlanma sergilediğini düşündürmektedir. Ayrıca aromatik etkileşimlerin (π-teması) kompleks stabilitesine katkı sağladığı değerlendirilebilir.



Şekil 4.33. Rosmarinik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-2 Luteolin (ΔG = -10.4)

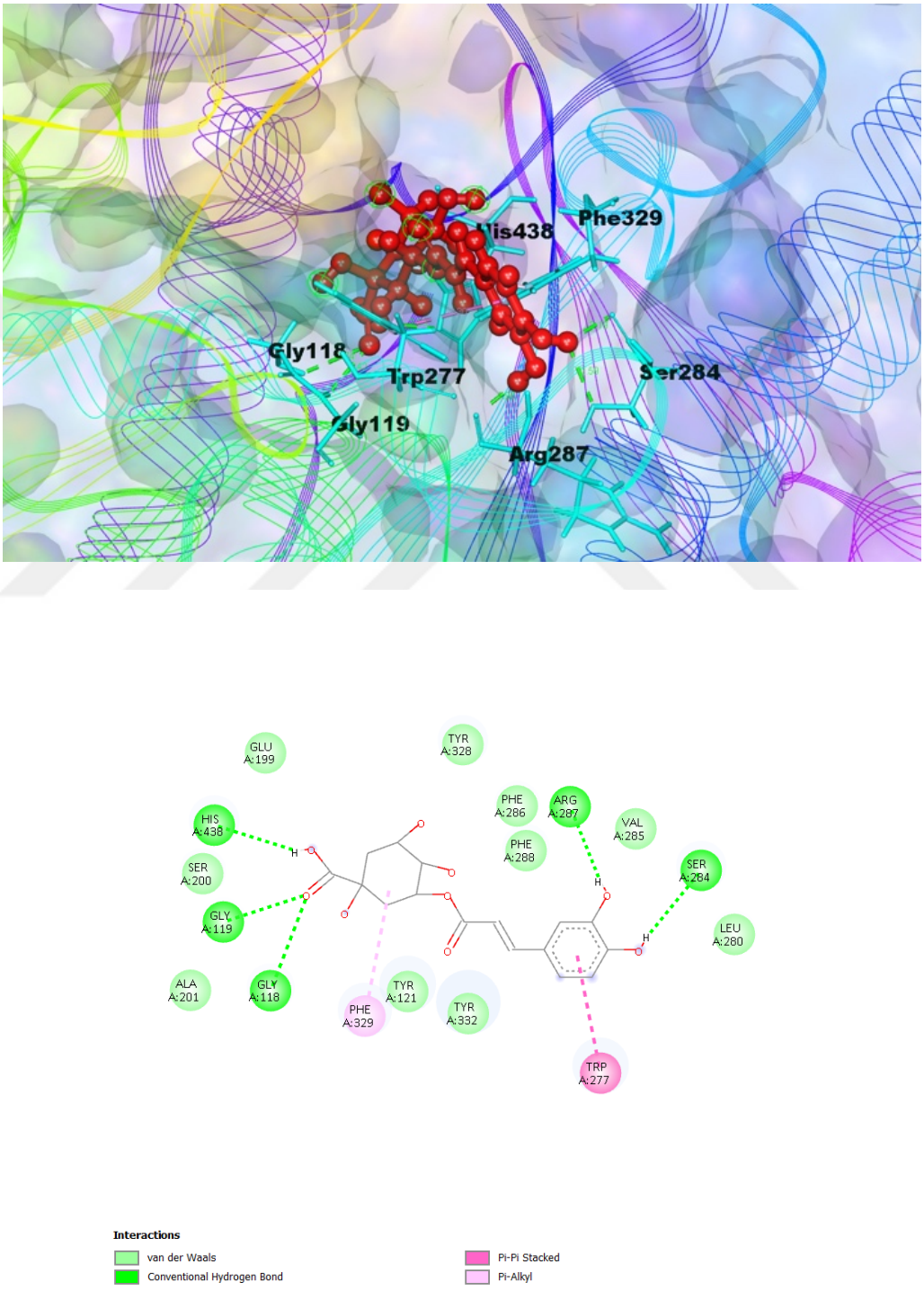
Luteolin, Arg287 üzerinden H-bağı kurarak gorge içinde kararlı bir yerleşim gösterirken, Trp277 ve Tyr332 ile π-etkileşimleri sayesinde aromatik çekirdeğini aktif oluk boyunca stabilize etmektedir. Bu kombinasyon, yüksek ΔG negatifliğini desteklemektedir.



Şekil 4.34. Luteolinin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-3 Klorojenik asit (ΔG = -10.0)

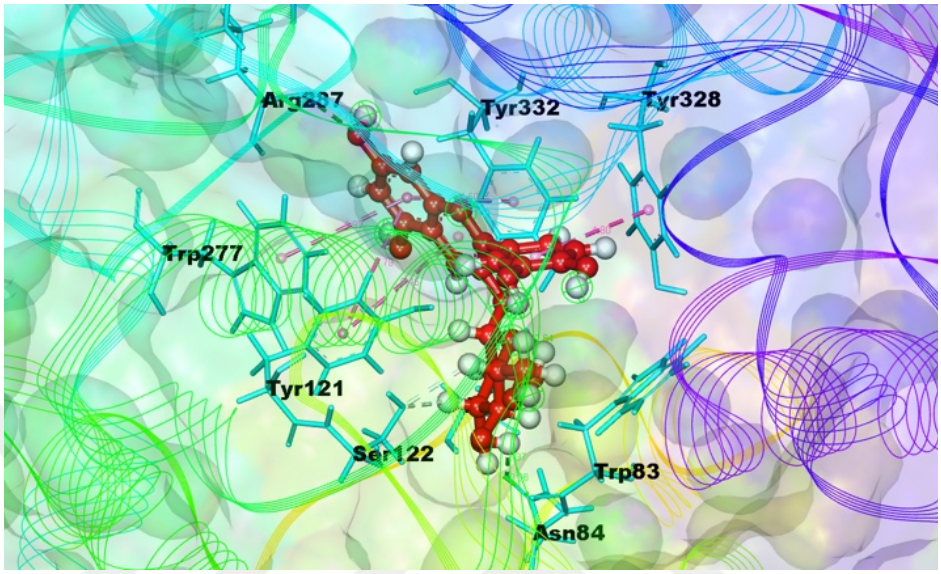
Klorojenik asit, H-bağı kurarak aktif oluğun derin kısmında güçlü stabilizasyon göstermiştir. Trp277 ile aromatik temas ve Phe329 ile hidrofobik/π-alkyl etkileşimi, bağlanmanın yalnızca polar değil aynı zamanda hidrofobik bileşenlerle de desteklendiğini göstermektedir.

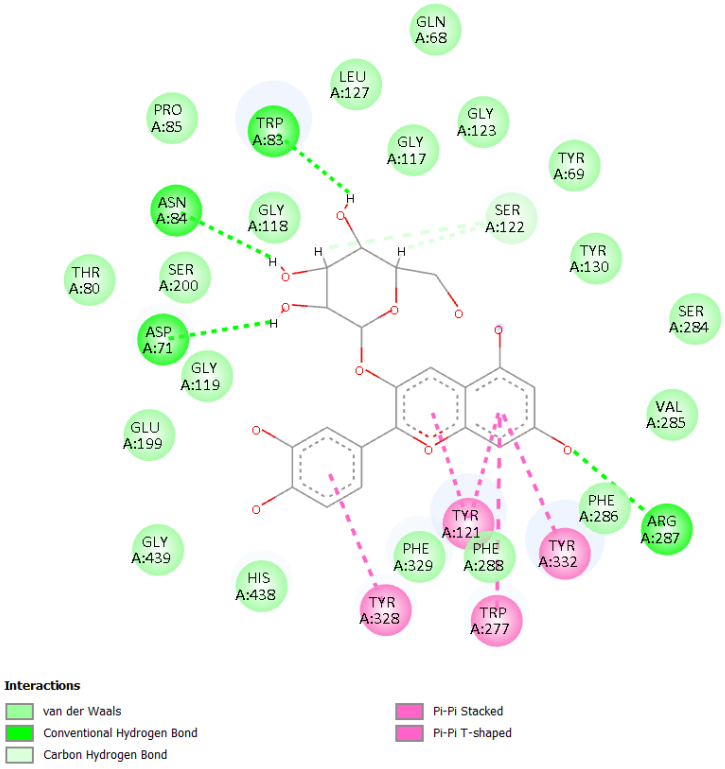


Şekil 4.35. Klorojenik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-4 Siyanidin-3-glukozid (ΔG = -9.6)

Siyanidin-3-glukozid, PAS ve gorge boyunca uzanan yerleşimde Trp83, Asp71 ve Arg287 üzerinden H-bağları kurarak çok noktalı bir polar ağ oluşturmuştur. Ser122 ile C-H bağı ve Trp277/Tyr332/328 gibi aromatik kalıntılar π-etkileşimleri, glikozit yapının hem polar hem aromatik stabilizasyon sağlayabildiğini düşündürmektedir.

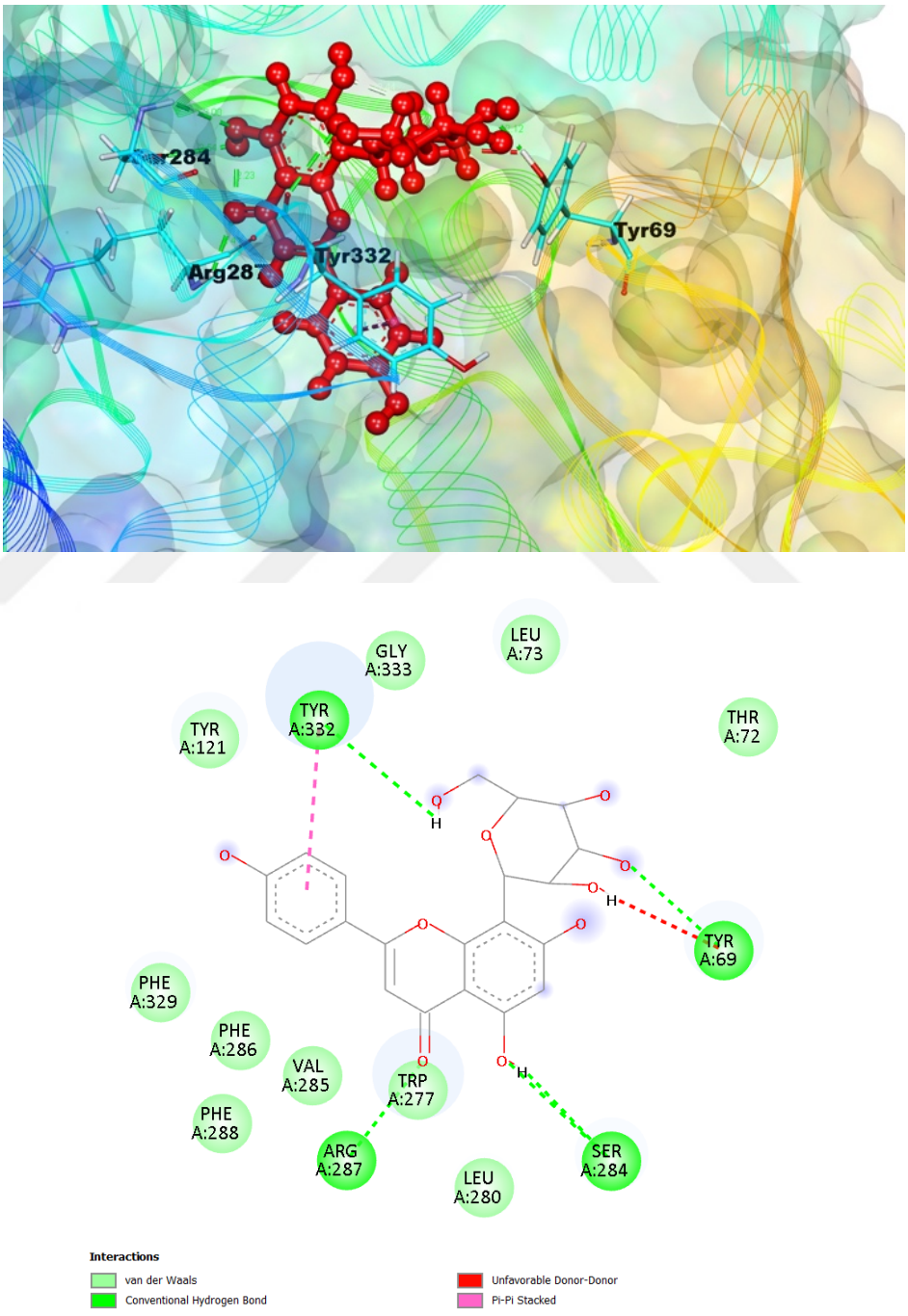




Şekil 4.36. Siyanidin-3-glukozidin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-5 Vitexin (ΔG = -9.5)

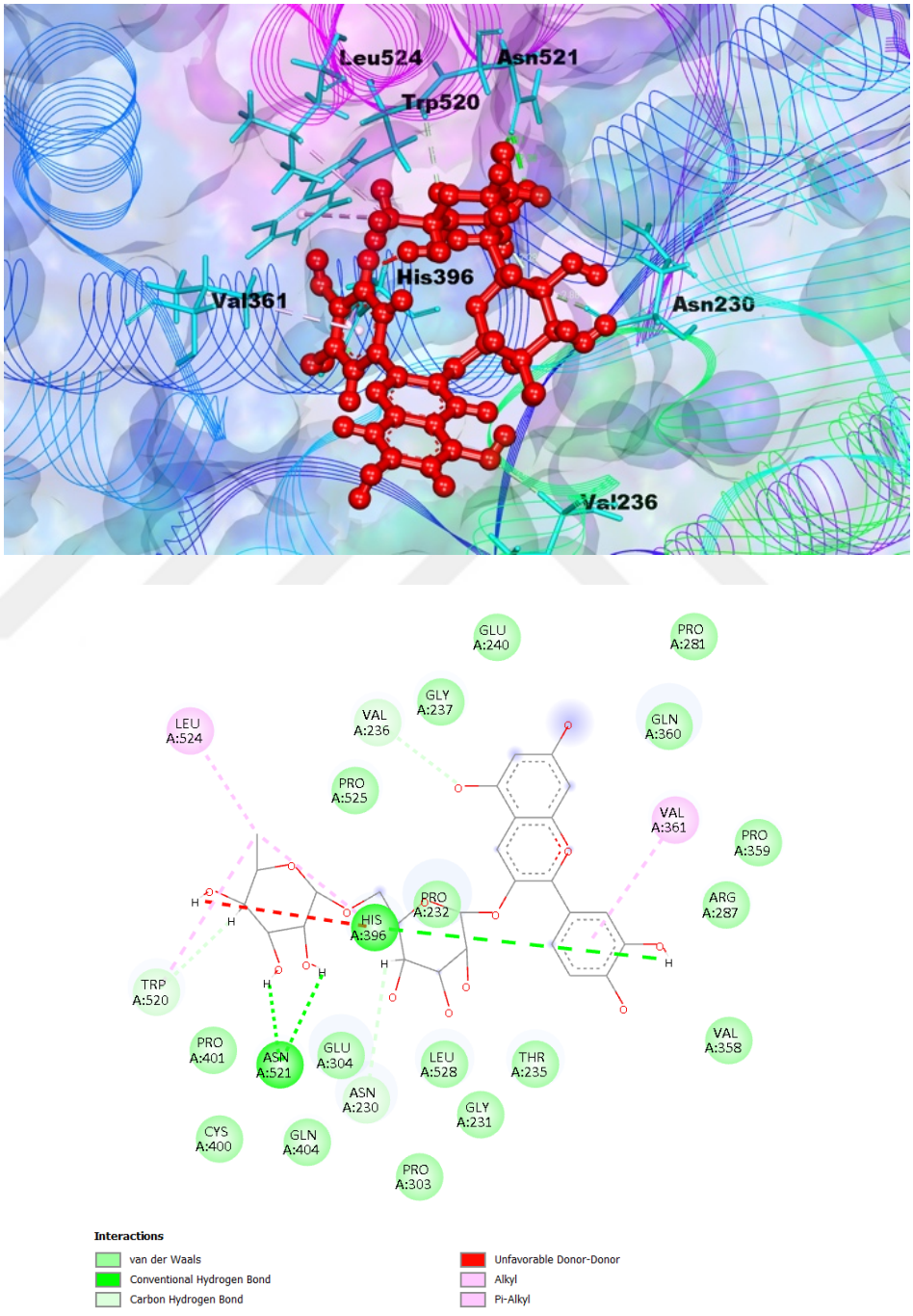
Vitexin, PAS çevresindeki Tyr69 ve gorge içindeki Arg287/Ser284 üzerinden H-bağları kurarak giriş bölgesine yakın iki noktada etkileşim sergilemiştir. Tyr332 ile π-etkileşimi, aromatik çekirdeğin PAS tarafında stabilize olduğuna işaret eder. Bu bağlanma modu, yüksek afiniteyi destekleyen PAS+gorge kombinasyonunu göstermektedir.



Şekil 4.37. Viteksinin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görseli.

L-6 Kerasiyanin (ΔG = -9.2)

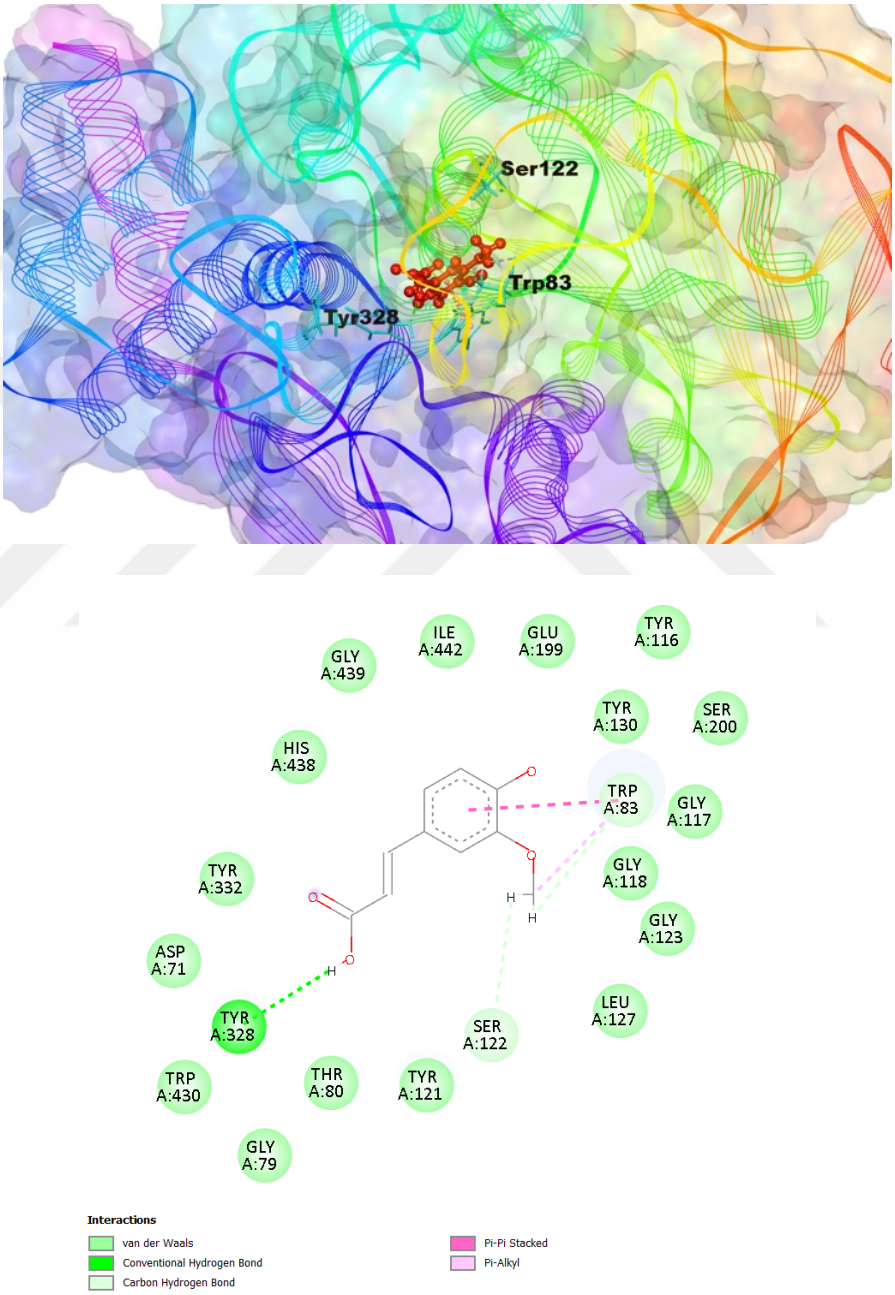
Kerasiyanin'de etkileşimlerin önemli kısmı His396, Asn521, Trp520, Leu524/Val361 gibi 4EY7'nin yüzeyindeki aminoasitlerle etkileşime girmiştir. ΔG'nin yüksek negatiflikte kalmasını desteklese de yerleşimin aktif oluk merkezinden sapma göstermektedir.



Şekil 4.38. Kerasiyaninin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-7 Ferulik asit (ΔG = -7.7)

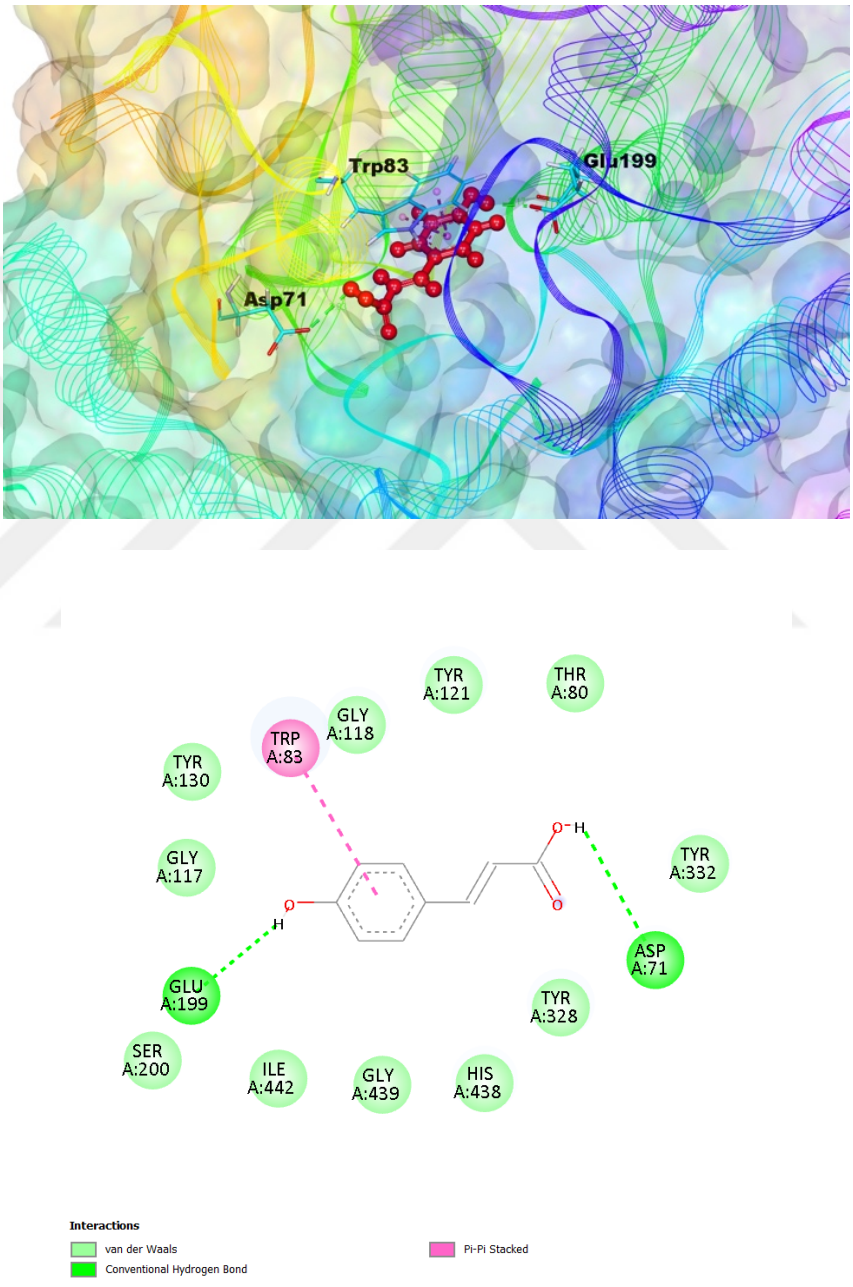
Ferulik asit, Tyr328 üzerinden sınırlı sayıda H-bağı ile bağlanırken, Trp83 ile π/π-alkyl temasları üzerinden aromatik etkileşim göstermektedir. H-bağı sayısının ve temas çeşitliliğinin daha sınırlı olması, afinitenin favori ligandlara göre daha zayıf kalmasını açıklamaktadır. Ligand daha çok aromatik cep etkileşimleri ile stabilize oluyor görünmektedir.



Şekil 4.39. Ferulik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-8 p-Koumaric acid (ΔG = -7.5)

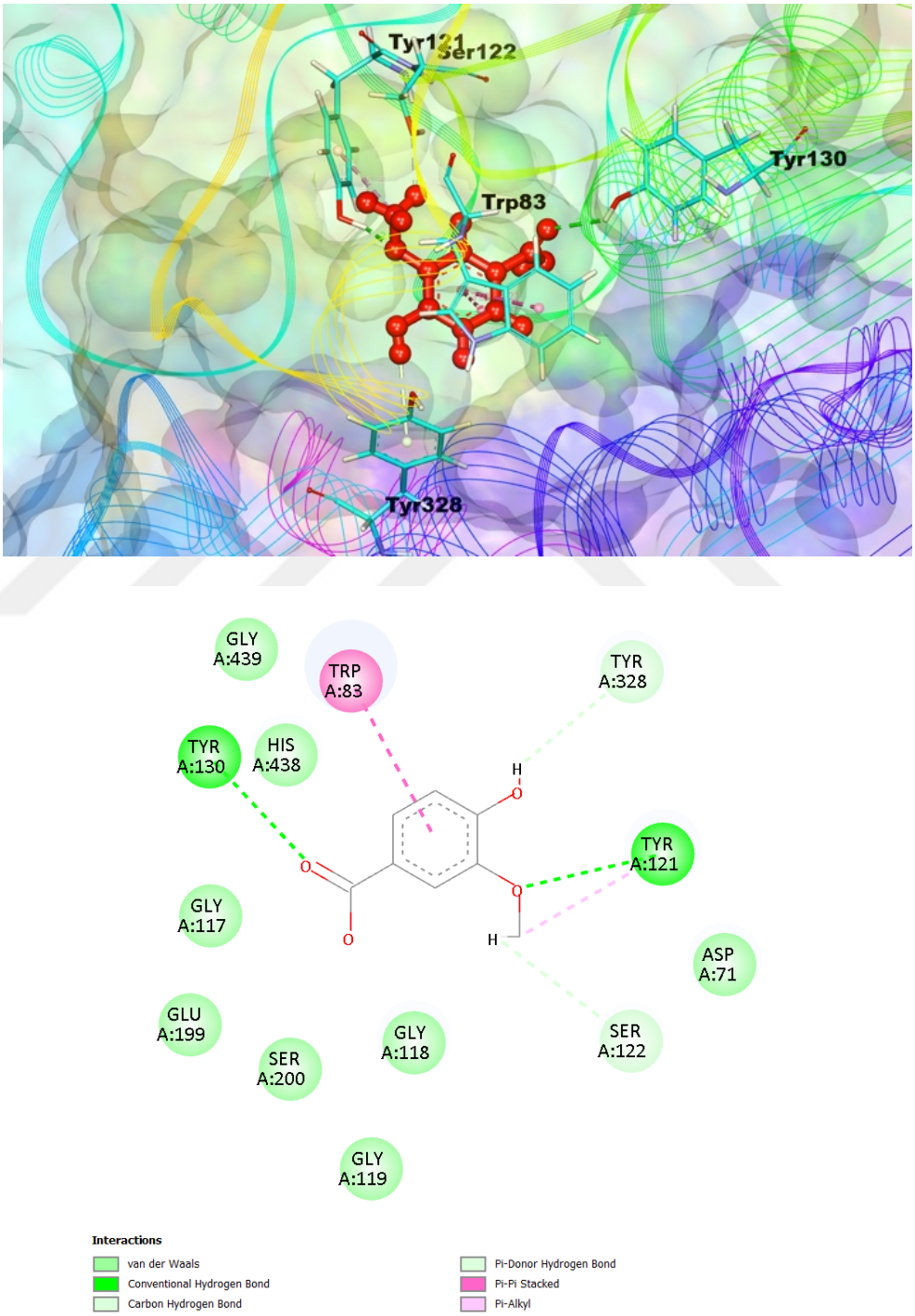
p-Coumarik asit, Glu199 (CAS/gorge) ve Asp71 (PAS) üzerinden iki uçlu polar temas kurarak CAS–PAS doğrultusunda yerleşim gösterebilir. Trp83 ile π-etkileşimi, küçük aromatik çekirdeğin aktif oluk içinde aromatik etkileşim bulduğunu düşündürmektedir. Ancak molekül boyutunun küçük olması toplam temas yüzeyini sınırlayarak afinitenin orta bantta kalmasına yol açmış olabilir.



Şekil 4.40. p-Koumarik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-9 Vanilik asit (ΔG = -6.8)

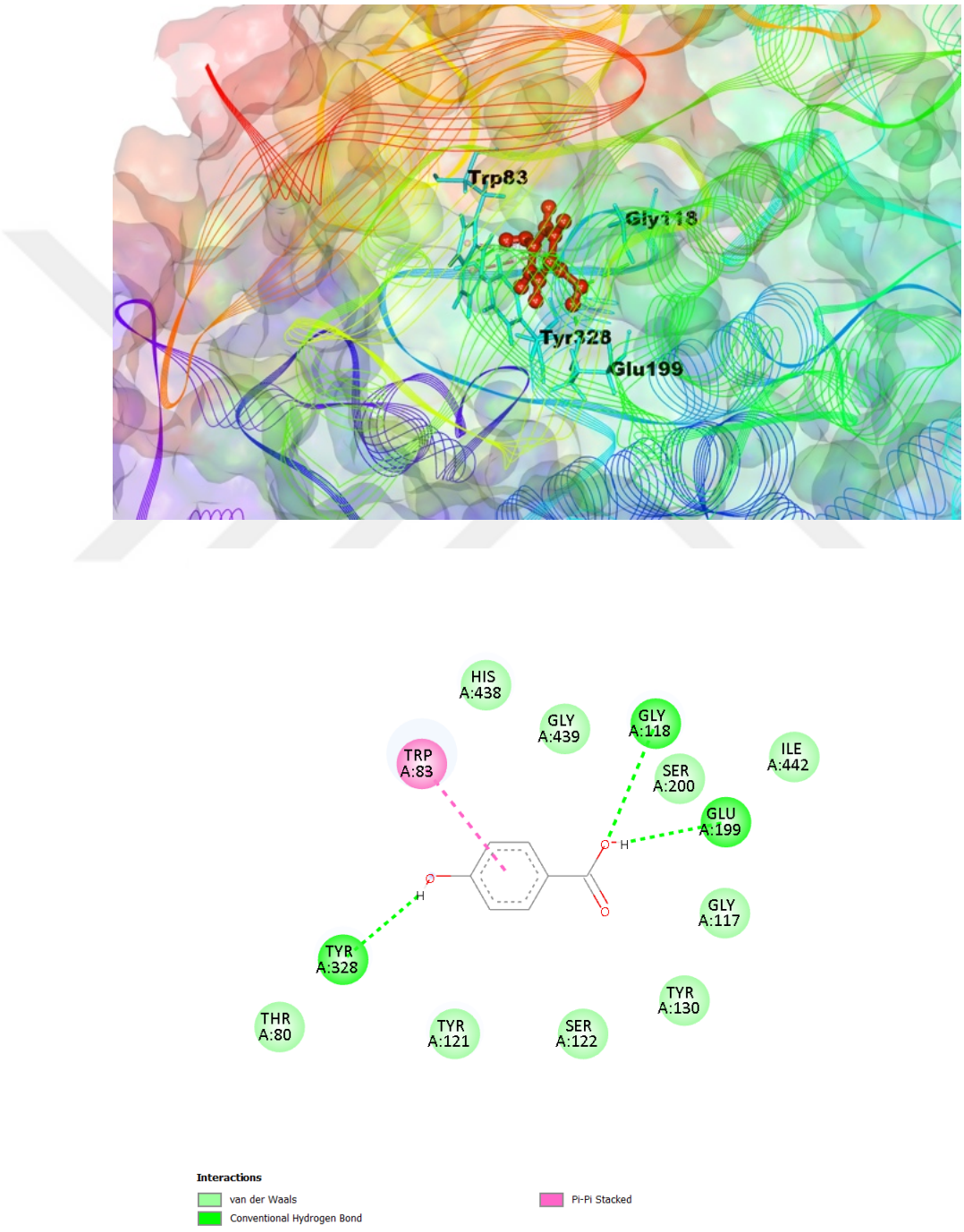
Vanilik asit, Tyr121/Tyr130 gibi PAS rezidüleri ve oksianyon çevresi ile sınırlı polar temaslar kurarken, Trp83 ile aromatik π-etkileşimi sergilemektedir. Tyr328 ile π-donor etkileşimi, PAS çevresinde ek stabilizasyon sağlasa da küçük yapı nedeniyle bağlanma enerjisi daha az negatiftir. Bu sonuç, sınırlı temas çeşitliliği ile uyumludur.



Şekil 4.41. Vanilik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-10 4-Hidroksibenzoik asit (ΔG = -6.5)

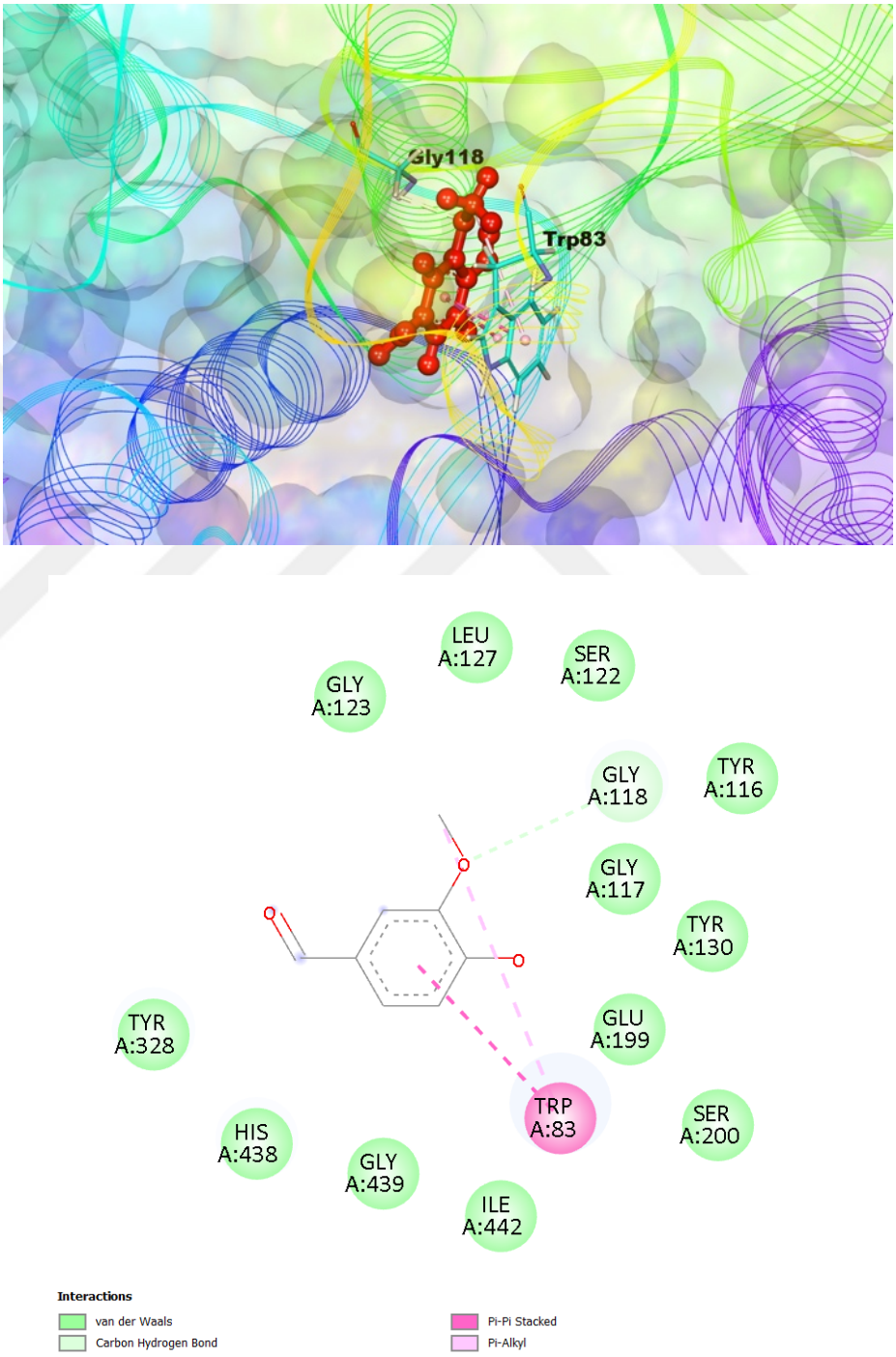
4-Hidroksibenzoik asit, Glu199 ve Gly118 üzerinden polar temas kurarak gorge ve oksianyon çevresine yakın konumlanırken, Tyr328 ile PAS tarafında ek tutunma göstermektedir. Trp83 ile π-etkileşimi aromatik etkileşim sağlasa da ligandın küçük olması toplam stabilizasyonu sınırlar. Bu nedenle afinitenin orta–düşük bantta kalması beklenir.



Şekil 4.42. 4-hidroksibenzoik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-11 Vanillin (ΔG = -6.3)

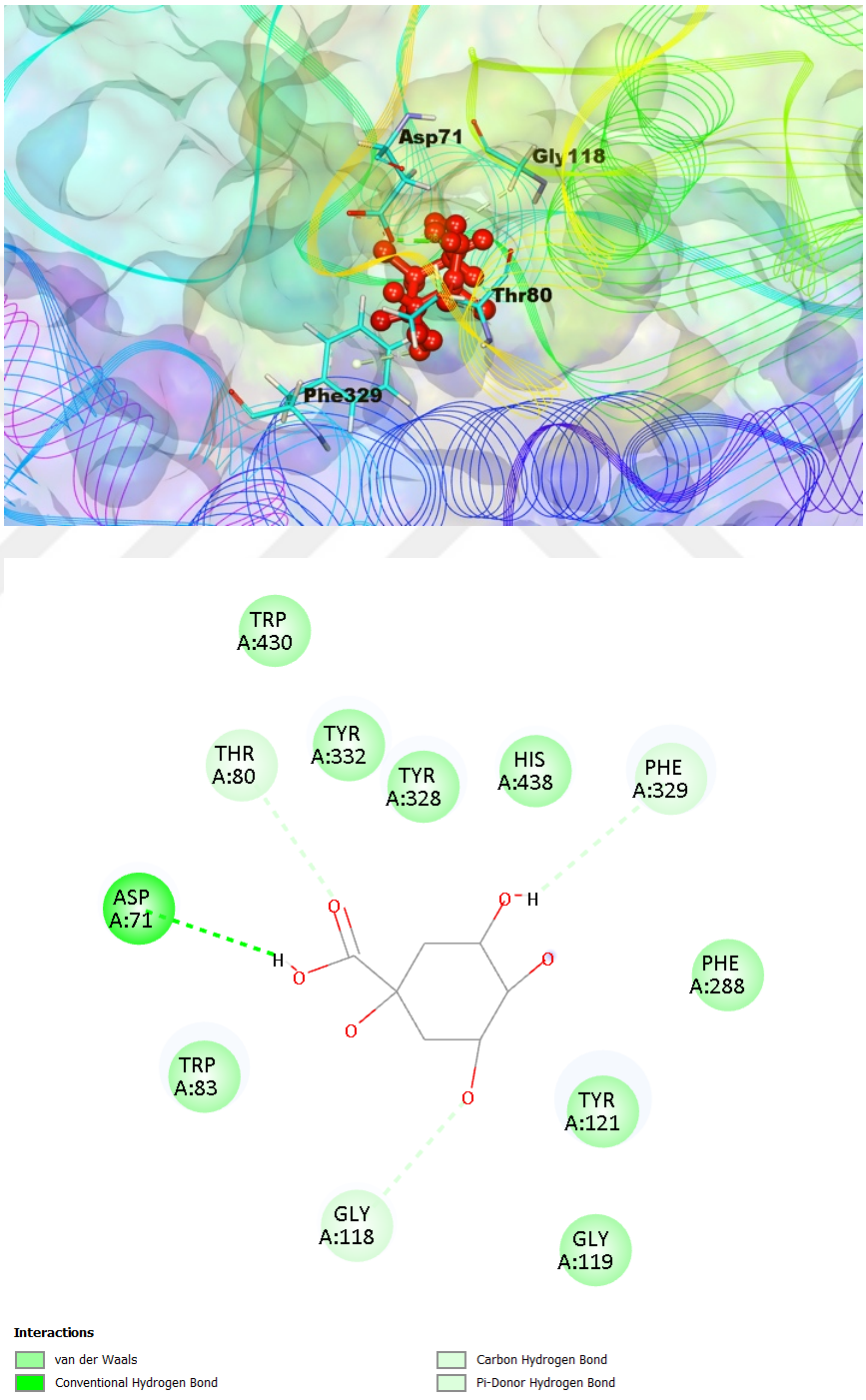
Vanillin'de H-bağı ağı sınırlı olup, bağlanmanın daha çok Trp83 ile π/π-alkyl etkileşimleri üzerinden sürdüğü görülmektedir. Gly118 ile C–H bağı gibi zayıf polar temaslar, oksianyon çevresinde ikincil bir destek sağlayabilir. Küçük ve daha az fonksiyonel grup içeren yapı, ΔG'nin daha az negatif olmasını açıklamaktadır.



Şekil 4.43. Vanillinin 4EY/ ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

L-12 kuinik asit (ΔG = -6.3)

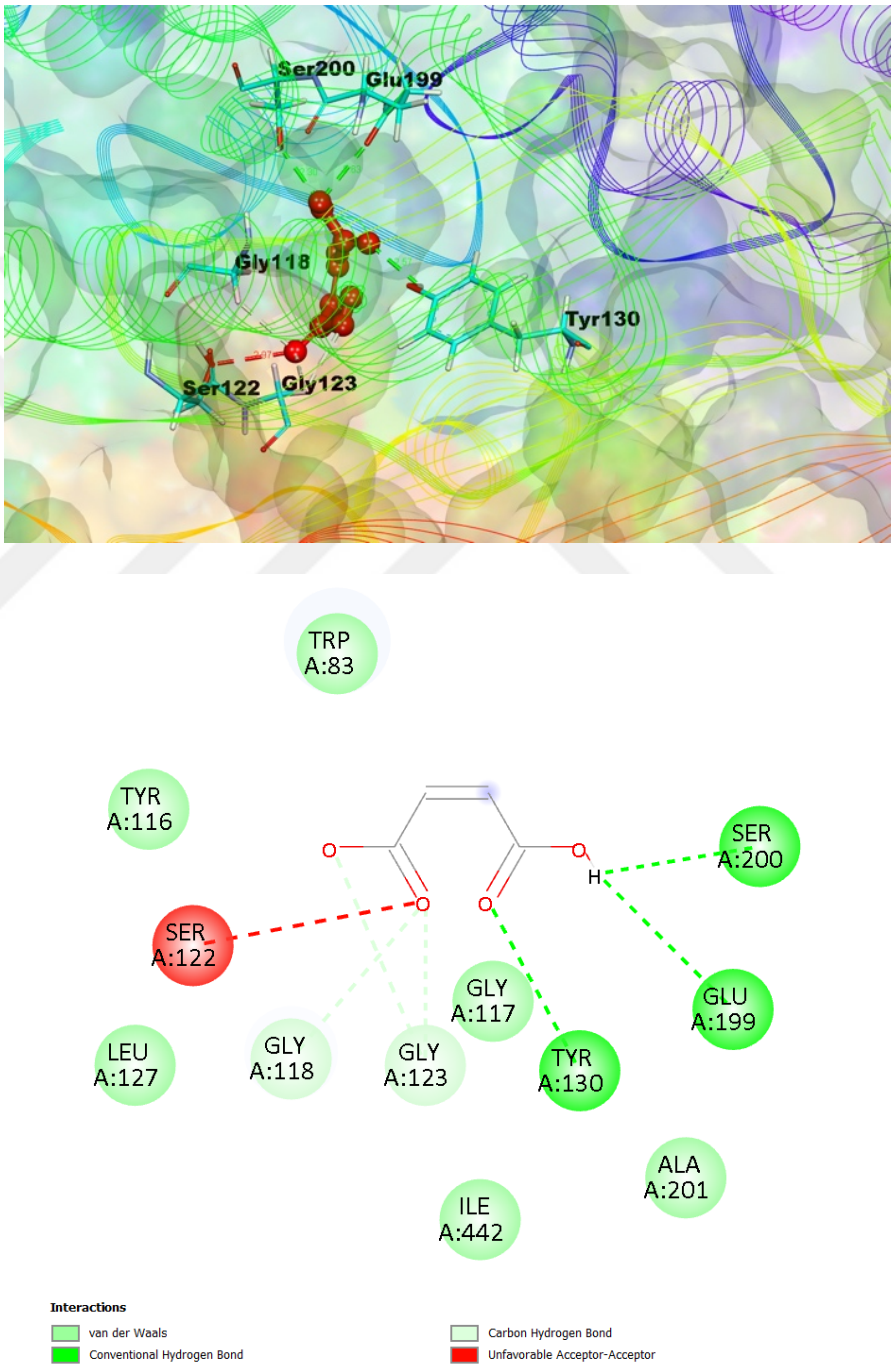
Kuinik asit, Asp71 (PAS) üzerinden H-bağı ve Gly118 üzerinden C–H bağı ile daha çok PAS-oksianyon hattında konumlanma eğilimi göstermektedir. Phe329 ile π-donor temas, gorge bölgesinde ek stabilizasyon sağlayabilir. Ancak aromatik çekirdeğin olmaması toplam hidrofobik/π katkısını sınırlayarak afinitenin orta-düşük bantta kalmasına yol açmış olabilir.



Şekil 4.44. Kuinik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görsellerii.

L-13 Fumarik asit (ΔG = -5.0)

Fumarik asit, Ser200 ve Glu199 gibi gorge/CAS çevresi ile Tyr130 (PAS) üzerinden bazı polar temaslar gösterebilse de küçük ve esnek olmayan yapı nedeniyle aktif olukta sınırlı temas yüzeyi sunar. Oksianyon çevresindeki zayıf temaslar (Gly118/123) bağlanmayı desteklese de aromatik ve hidrofobik etkileşimlerin eksikliği nedeniyle en zayıf ΔG değerine sahiptir.



Şekil 4.45. Fumarik asitin 4EY7 ile 3D ve 2D etkileşim görselleri.

4.6.2 Docking sonuçlarının karşılaştırmalı analizi

Çizelge 4.11. DSV ve USCF Chimera çıktılarının kıyaslaması

Ligand	ΔG	Ortak H-bağları (DSV∩Chimera)	Sadece DSV H-bağları	Sadece Chimera H-bağları	DSV: H-bağı dışı etkileşimler
Rosmarinic acid	-10.5	GLU199 (CAS/gorge) ARG287 (Gorge/diğer)	TYR121 (PAS)	—	Pi-Pi T-shaped: HIS438 4.67
Luteolin	-10.4	ARG287 (Gorge/diğer)	TYR121 (PAS)	—	Pi-Pi Stacked: TRP277 4.56Pi-Pi T-shaped: TYR332 5.18Pi-Sigma: TYR332 2.72
Chlorogenic acid	-10.0	HIS438 (CAS/gorge)	GLY118 (Oksianyon)GLY119 (Oksianyon)SER284 (Gorge/diğer) ARG287 (Gorge/diğer)	—	Pi-Pi Stacked: TRP277 4.30Pi-Alkyl: PHE329 4.75
Cyanidin-3-glucoside	-9.6	TRP83 (CAS/gorge (anyonik))	ASP71 (PAS)ASN84 (Gorge/diğer)SER122 (Oksianyon)ARG287 (Gorge/diğer)	—	Pi-Pi Stacked: TYR332 4.50; TRP277 4.99Pi-Pi T-shaped: TYR328 4.80; TYR121 5.46; TYR121 5.79
Vitexin	-9.5	TYR69 (PAS)ARG287 (Gorge/diğer)	SER284 (Gorge/diğer)TYR332 (PAS)	—	Pi-Pi Stacked: TYR332 3.75
Keracyanin	-9.2	HIS396 (Diğer)ASN521 (Yüzey/diğer)	VAL236 (Diğer)ASN230 (Diğer)TRP520 (Yüzey/diğer)	GLY237 (Diğer)	Pi-Alkyl: HIS396 4.73; TRP520 4.98; VAL361 5.42Alkyl: LEU524 4.71
Ferulic acid	-7.7	—	TYR328 (PAS)SER122 (Oksianyon)TRP83 (CAS/gorge (anyonik))	—	Pi-Pi Stacked: TRP83 3.78; TRP83 4.39Pi-Alkyl: TRP83 5.35
p-Coumaric acid	-7.5	GLU199 (CAS/gorge)	ASP71 (PAS)	—	Pi-Pi Stacked: TRP83 3.76; TRP83 4.40
Vanillic acid	-6.8	—	TYR121 (PAS)TYR130 (PAS)SER122 (Oksianyon)TYR328 (PAS)	—	Pi-Pi Stacked: TRP83 3.93; TRP83 4.22Pi-Alkyl: TYR121 5.35
4-Hydroxybenzoic acid	-6.5	GLU199 (CAS/gorge)TYR328 (PAS)	GLY118 (Oksianyon)	—	Pi-Pi Stacked: TRP83 3.81; TRP83 4.02
Vanillin	-6.3	—	GLY118 (Oksianyon)	—	Pi-Pi Stacked: TRP83 3.74; TRP83 4.46Pi-Alkyl: TRP83 5.20
Quinic acid	-6.3	ASP71 (PAS)	GLY118 (Oksianyon)THR80 (Gorge/diğer) PHE329 (Gorge/diğer)	TYR121 (PAS)	—
Fumaric acid	-5.0	—	SER200 (CAS/gorge)TYR130 (PAS)GLU199 (CAS/gorge) GLY123 (Oksianyon) GLY118 (Oksianyon)	—	—

Chimera "Finding intermodel H-bonds" çıktıları, bağlanmanın özellikle oluk içinde Arg287 ve aktif oluktaki polar kalıntılar üzerinden hidrojen bağı ile desteklendiğini doğrulamaktadır. Rosmarinic acid'de Arg287 ve Glu199 ile ikili H-bağı, luteolin'de Arg287 ile kısa mesafeli H-bağı, vitexin'de Tyr69 ve Arg287 üzerinden iki H-bağı, p-coumaric ve 4-hydroxybenzoic acid'de Glu199 eksenli H-bağı görülmektedir. Bu durum ligandların aktif oluktaki polar merkezlere yönlendiğini göstermektedir.

Bununla birlikte Chimera raporunun yalnızca H-bağlarını listelemesi nedeniyle, DSV'de görülen π-π / π-alkyl gibi hidrofobik-aromatik temasların Chimera çıktısında yer almaması beklenen bir farktır. Dolayısıyla iki yaklaşımın birlikte değerlendirilmesi, bir yandan Vina'nın enerji bazlı sıralamasını (ΔG) verirken, diğer yandan DSV'nin etkileşim çeşitliliğini ortaya koyarak bağlanma mekanizmasını daha bütüncül biçimde desteklemektedir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, *Vitex agnus-castus* bitkisinden elde edilen ekstraktlar kullanılarak yeşil sentez yaklaşımıyla gümüş nanoparçacık (AgNP) üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentez süreci UV-Vis ile AgNP sentezi sistematik biçimde optimize edilmiş ve elde edilen ürünlerin enstrümantal yöntemler ile karakterize edilerek asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu potansiyeli değerlendirilmiştir.

Çalışmanın temel amacı *Vitex agnus-castus* bitkisinin %60 etanol ekstraktı (EE) ve su ekstraktı (SE) ile indirgeme kapasitesini karşılaştırmak, sonra nanoparçacık sentezini etkileyen parametreler olan $AgNO_3$ konsantrasyonu, ekstrakt konsantrasyonu, pH, ışık koşulu ve zamanı dikkate alarak çeşitli AgNP'ler sentezlemek, ardından seçilen örneklerin TGA, FTIR, TEM ve zeta analizleri ile yapısal özelliklerini açıklamaktır. Son olarak elde edilen ekstraktların ve bu ekstraktlardan sentezlenen AgNP'lerin AChE inhibitör potansiyelini nicel olarak tartışmaktır.

Vitex agnus-castus yaprak ekstraktlarının antioksidan ve indirgeme kapasitesini ortaya koymak amacıyla toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik analizleri gerçekleştirilmiş, bu veriler yeşil sentez sürecindeki indirgeme gücü ve kaplama potansiyelinin yorumlanmasında temel bir gösterge olarak ele alınmıştır. TPC sonuçları etanol bazlı ekstraktın daha yüksek total fenolik içerik taşıdığını göstermiş ve %60 etanol ekstraktında toplam fenolik içerik 115,23 mg GAE / g ekstrakt düzeyinde bulunmuştur. TFC sonuçlarında da benzer eğilim gözlenmiş, etanol ekstraktında toplam flavonoid içeriğin su ekstraktına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu dağılım, etanolün daha geniş bir fenolik ve flavonoid fraksiyonu çözebilmesi nedeniyle beklenen bir durumdur ve hem indirgeme kapasitesi hem de enzim inhibisyonuna katkı potansiyeli açısından önem taşımaktadır.

Vitex agnus-castus ekstraktlarının kimyasal profili UHPLC-MS/MS analizi ile bu gözlemleri destekleyen bir çerçeve sunmuştur. Her iki ekstraktın fenolik kompozisyonunda fenolik asit türevlerinin baskın olduğu, ancak çözücüye bağlı belirgin bir zenginleşme paterni bulunduğu görülmüştür. SE'de fenolik asit havuzunun daha yüksek olduğu; özellikle 4-hidroksibenzoik asit (10414,78 µg/g), kuinik asit (5447,66 µg/g), klorojenik asit (3721,74 µg/g) ve fumarik asit (896,98 µg/g) gibi bileşiklerin öne çıktığı belirlenmiştir. EE'de ise klorojenik asit (4943,47 µg/g) ve kuinik asit (4810,85 µg/g) düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca EE'de flavonoid tarafında luteolin (123,81 µg/g) ve vitexin (17,20 µg/g) gibi bileşiklerde SE'ye kıyasla göreli bir zenginleşme olduğu görülmüştür (SE'de luteolin 72,42 µg/g; vitexin 13,87 µg/g).

AgNP oluşumu UV-Vis spektroskopisinde LSPR bandı üzerinden izlenmiş ve bandın konumu, şiddeti ve genişliği sentez verimi ile kolloidal davranışın optik karşılığı olarak değerlendirilmiştir. LSPR bandının yaklaşık 500 nm civarına kaydığı koşullarda band genişlemesinin arttığı ve A_{max} değerlerinin görece düştüğü görülmüş, bu optik tablo DLS'de daha büyük hidrodinamik boyutların ve daha heterojen dağılımların ölçülmesiyle uyumlu bulunmuştur. Buna karşılık daha düşük λ_{max} değerlerinin izlendiği koşullarda LSPR bandının keskinleşmesi ve FWHM'nin daralması, daha homojen bir nanopartikül popülasyonuna işaret etmiştir. Zeta potansiyelin genel olarak -14,3 ile -20,2 mV aralığında seyretmesi belirli bir elektrostatik stabiliteyi desteklerken, bazı koşullarda boyut ve band genişliği artışının öne çıkması stabilitenin yalnızca yüzey yükü ile

açıklanamayacağını, kaplama tabakasının kompozisyonu ve pH'ya bağlı iyonlaşma dengesinin agregasyon eğilimini güçlü biçimde etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle pH optimizasyonu hem optik yanıtın keskinliği hem de kolloidal kararlılık açısından çalışmanın en kritik kontrol parametrelerinden biri olarak öne çıkmıştır.

AChE inhibisyon deneylerinde, EE, SE, S-NP ve E-NP numuneleri 6,25 ile 100 µg/mL aralığında altı farklı derişimde değerlendirilmiş ve doz yanıt eğrileri üzerinden inhibisyon profilleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, ekstraktların AChE üzerinde ölçülebilir bir inhibisyon oluşturduğunu, ancak nanoparçacık formlarına geçildiğinde yanıtın belirgin biçimde güçlenebildiğini göstermiştir. Bu artışın, AgNP'lerin yüksek özgül yüzey alanı ve ekstrakt kaynaklı kaplama tabakasının enzim ile etkileşimi kolaylaştırmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Derişime bağlı değişimlerin numune tipine göre farklılaşması, *Vitex agnus-castus* matriksinin çok bileşenli yapısına ve çözücü seçiminin fenolik bileşen dağılımını değiştirmesine bağlanabilir.

Moleküler docking analizleri AChE enzimi üzerinde 4EY7 yapısı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve *Vitex agnus-castus* kökenli seçilmiş fitokimyasalların aktif bölge oluğuna yerleşimi değerlendirilmiştir. Bağlanma enerjileri ve etkileşim haritaları, özellikle rosmarinik asit, luteolin ve klorojenik asit gibi bileşiklerin AChE aktif bölgesinde stabil kompleksler oluşturabildiğini göstermiştir. Rosmarinik asidin Arg287 ve Glu199 ile, luteolinin Arg287 ile, klorojenik asidin ise His438 ile kurduğu hidrojen bağı etkileşimleri, ekstrakt profilinde yer alan fenoliklerin AChE inhibisyonuna katkı verebilecek moleküler bir zemine sahip olduğunu desteklemiştir. Bu yaklaşım, deneysel inhibisyon bulgularını olası etki mekanizmalarıyla ilişkilendirerek kimyasal bileşenin yapı-etkileşim-biyolojik yanıt hattında daha rasyonel bir yorum çerçevesi sağlamıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması, *Vitex agnus-castus* yaprak ekstraktlarının hedefli UHPLC-MS/MS ile profillenmesi, aynı ekstraktlarla yeşil sentez ile AgNP üretiminin UV-Vis temelli optimizasyonla izlenmesi ve ürünlerin DLS, zeta potansiyel, FTIR, TEM ve TGA gibi tamamlayıcı tekniklerle çok yönlü karakterizasyonunu bir araya getirerek tekrarlanabilir bir yöntemsel çerçeve sunmuştur. AChE inhibisyonunun 6,25 ile 100 µg mL aralığında dört numune tipi üzerinde değerlendirilmesi, nanoparçacık formunun biyolojik yanıtı güçlendirebildiğini göstermiş, docking bulgularının eklenmesiyle kimyasal bileşen ile enzim etkileşimi ve inhibisyon arasındaki ilişki daha bütüncül biçimde tartışılmıştır.

AChE inhibisyon deneylerinde, EE, SE, SNP ve ENP numuneleri 6,25 ile 100 µg mL aralığında altı farklı derişimde değerlendirilmiş ve doz yanıt eğrileri üzerinden inhibisyon profilleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, ekstraktların AChE üzerinde ölçülebilir bir inhibisyon oluşturduğunu, ancak nanopartikül formlarına geçildiğinde yanıtın belirgin biçimde güçlenebildiğini göstermiştir. Bu artışın, AgNP'lerin yüksek özgül yüzey alanı ve ekstrakt kaynaklı kaplama tabakasının enzim ile etkileşimi kolaylaştırmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Derişime bağlı değişimlerin numune tipine göre farklılaşması, *Vitex agnus-castus* matriksinin çok bileşenli yapısına ve çözücü seçiminin fenolik bileşen dağılımını değiştirmesine bağlanabilir.

Moleküler docking analizleri AChE enzimi üzerinde 4EY7 yapısı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve *Vitex agnus-castus* kökenli seçilmiş fitokimyasalların aktif bölge oluğuna yerleşimi değerlendirilmiştir. Bağlanma enerjileri ve etkileşim haritaları,

özellikle rosmarinik asit, luteolin ve klorojenik asit gibi bileşiklerin AChE aktif bölgesinde stabil kompleksler oluşturabildiğini göstermiştir. Rosmarinik asidin ARG287 ve GLU199 ile, luteolinin ARG287 ile, klorojenik asidin ise HIS438 ile kurduğu hidrojen bağı etkileşimleri, ekstrakt profilinde yer alan fenoliklerin AChE inhibisyonuna katkı verebilecek moleküler bir zemine sahip olduğunu desteklemiştir. Bu yaklaşım, deneysel inhibisyon bulgularını olası etki mekanizmalarıyla ilişkilendirerek kimyasal bileşen yapı etkileşim biyolojik yanıt hattında daha rasyonel bir yorum çerçevesi sağlamıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması, *Vitex agnus-castus* yaprak ekstraktlarının hedefli UHPLC-MS/MS ile profillenmesi, aynı ekstraktlarla yeşil sentez AgNP üretiminin UV-Vis temelli optimizasyonla izlenmesi ve ürünlerin DLS, zeta potansiyel, FTIR, TEM ve TGA gibi tamamlayıcı tekniklerle çok yönlü karakterizasyonunu bir araya getirerek tekrarlanabilir bir yöntemsel çerçeve sunmuştur. AChE inhibisyonunun 6,25 ile 100 µg mL aralığında dört numune tipi üzerinde değerlendirilmesi, nanopartikül formunun biyolojik yanıtı güçlendirebildiğini göstermiş, docking bulgularının eklenmesiyle kimyasal bileşen ile enzim etkileşimi ve inhibisyon arasındaki ilişki daha bütüncül biçimde tartışılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Alzheimer's Association. (2024). 2024 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia, 20(5), 3708–3821.

Abdelwahab, G. M., Mira, A., Cheng, Y. B., Abdelaziz, T. A., Lahloub, M. F. I., & Khalil, A. T. (2021). Acetylcholine esterase inhibitory activity of green synthesized nanosilver by naphthopyrones isolated from marine-derived Aspergillus niger. PLoS ONE, 16(9), Article e0257071.

Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 12(1), 1–10.

Adamov, G. V., Rendyuk, T. D., Saybel, O. L., Dargaeva, T. D., Tsitsilin, A. N., & Bokov, D. O. (2022). Vitex agnus-castus: Botanical features and area, chemical composition of fruit, pharmacological properties, and medicinal uses. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 12(3), 34–44.

Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. Neurology, 42(3), 631–639.

Baig, N., Kammakakam, I., & Falath, W. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. Materials Advances, 2(6), 1821–1871.

Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, 217(4558), 408–417.

Bateman, R. J., vd. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. New England Journal of Medicine, 367(9), 795–804.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto Jr., G. J., & Stryer, L. (2015). Biochemistry (8. baskı). W.H. Freeman & Company.

Berrani, A., Marmouzi, I., Bouyahya, A., Kharbach, M., El Hamdani, M., El Jemli, M., Lrhorfi, A., Zouarhi, M., Faouzi, M. E. A., & Benguedour, R. (2021). Phenolic compound analysis and pharmacological screening of Vitex agnus-castus functional parts. BioMed Research International, 2021, Article 6695311.

Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2006(1).

Bloom, G. S. (2014). Amyloid-β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. JAMA Neurology, 71(4), 505–508.

Boujbiha, M. A., vd. (2023). Wild Vitex agnus-castus L.: Phytochemical characterization, acute toxicity, and bioactive properties. Molecules, 28(13), 5096.

Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathologica, 82(4), 239–259.

Bramki, A., vd. (2025). Bioactive potential and chemical composition of Vitex agnus-castus L. leaf extracts collected in Algeria: A combined in vitro and in silico approach. Molecules, 30(3), 749.

Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 0(7), 801–802.

Cantino, P. D., & Sanders, R. W. (1986). Subfamilial classification of Labiatae. Systematic Botany, 11(1), 163–185.

Chase, M. W., vd. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, 181(1), 1–20.

Christoforidi, I., Kollaros, D., Manios, T., & Daliakopoulos, I. N. (2022). Drought- and salt-tolerant plants of the Mediterranean and their diverse applications: The case of Crete. Land, 11(11), 2038.

Chung, I. M., Park, I., Seung-Hyun, K., Thiruvengadam, M., & Rajakumar, G. (2016). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and therapeutic applications. Nanoscale Research Letters, 11(1), 40.

Cichon, N., Grabowska, W., Gorniak, L., Stela, M., Harmata, P., Ceremuga, M., & Bijak, M. (2024). Mechanistic and therapeutic insights into flavonoid-based inhibition of acetylcholinesterase: Implications for neurodegenerative diseases. Nutrients, 17(1), 78.

Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Encyclopedia of Analytical Chemistry içinde. John Wiley & Sons.

Colletier, J. P., vd. (2006). Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. The EMBO Journal, 25(12), 2746–2756.

Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. Current Neuropharmacology, 11(3), 315–335.

Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. Nature Reviews Neurology, 14(7), 399–415.

Copeland, R. A. (2023). Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis (3. baskı). Wiley.

Coyle, J. T., Price, D. L., & DeLong, M. R. (1983). Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. Science, 219(4589), 1184–1190.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313–7352.

Daniele, C., Coon, J. T., Pittler, M. H., & Ernst, E. (2005). Vitex agnus castus: A systematic review of adverse events. Drug Safety, 28(4), 319–332.

DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. Annals of Neurology, 27(5), 457–464.

Dominguez-López, I., Pérez, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2024). Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 64(27), 10048–10054.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7(2), 88–95.

Elmehbad, N. Y., Mohamed, N. A., Abd El-Ghany, N. A., & Abdel-Aziz, M. M. (t.y.). Green synthesis of nano-silver/sodium alginate/carboxymethyl xanthan gum hydrogel and evaluation of its anti-inflammatory and anti-helicobacter pylori activity.

European Medicines Agency. (t.y.). Assessment report on Vitex agnus-castus L., fructus Final.

Fahim, M., vd. (2024). Green synthesis of silver nanoparticles: A comprehensive review of methods, influencing factors, and applications. JCIS Open, 16, Article 100125.

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 66(2), 137–147.

Goate, A., vd. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature, 349(6311), 704–706.

Goedert, M., Eisenberg, D. S., & Crowther, R. A. (2017). Propagation of tau aggregates and neurodegeneration. Annual Review of Neuroscience, 40, 189–210.

Gonçalves, R., vd. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Vitex agnus-castus L. (Lamiaceae). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 89(4), 2825–2832.

Gökbulut, A., Özhan, O., Karacaoğlu, M., & Şarer, E. (2010). Radical scavenging activity and vitexin content of *Vitex agnus-castus* leaves and fruits. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 35*(2), 85–91.

Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. Analytical Chemistry, 79(11), 4215–4221.

Hampel, H., vd. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. Brain, 141(7), 1917–1933.

Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. Science, 297(5580), 353–356.

Heskes, A. M., vd. (2018). Biosynthesis of bioactive diterpenoids in the medicinal plant Vitex agnus-castus. The Plant Journal, 93(5), 943–958.

Honig, L. S., vd. (2024). Updated safety results from phase 3 lecanemab study in early Alzheimer's disease. Alzheimer's Research & Therapy, 16(1), Article 105.

Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C. X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: The story so far. Nature Reviews Neurology, 12(1), 15–27.

Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chemistry, 13(10), 2638–2650.

Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. Research in Pharmaceutical Sciences, 9(6), 385–406.

Jabir, N. R., Khan, F. R., & Tabrez, S. (2018). Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. CNS Neuroscience & Therapeutics, 24(9), 753–762.

Jack, C. R., vd. (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers. The Lancet Neurology, 12(2), 207–216.

Jack, C. R., vd. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. The Lancet Neurology, 9(1), 119–128.

Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2006). Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. Journal of Physical Chemistry B, 110(14), 7238–7248.

Javed, R., vd. (2020). Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: Recent trends and future prospects. Journal of Nanobiotechnology, 18(1), Article 172.

Johnson, G., & Moore, S. (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: Structure, functions and potential role in rational drug design. Current Pharmaceutical Design, 12(2), 217–225.

Kavaz, A., Işık, M., Dikici, E., & Yüksel, M. (2022). Anticholinergic, antioxidant, and antibacterial properties of Vitex agnus-castus L. seed extract: Assessment of its phenolic content by LC/MS/MS. Chemistry & Biodiversity, 19(10).

Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., & Schatz, G. C. (2002). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. Journal of Physical Chemistry B, 107(3), 668–677.

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry, 12(7), 908–931.

Lee, S. H., & Jun, B. H. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. International Journal of Molecular Sciences, 20(4), Article 865.

Lekha, D. C., vd. (2021). Review on silver nanoparticle synthesis method, antibacterial activity, drug delivery vehicles, and toxicity pathways: Recent advances and future aspects. Journal of Nanomaterials, 2021, Article 4401829.

Livingston, G., vd. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. The Lancet, 396(10248), 413–446.

Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies. Cell, 179(2), 312–339.

Lyketsos, C. G., vd. (2011). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 7(5), 532–539.

Meier, B., Berger, D., Hoberg, E., Sticher, O., & Schaffner, W. (2000). Pharmacological activities of Vitex agnus-castus extracts in vitro. Phytomedicine, 7(5), 373–381.

Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. Current Computer-Aided Drug Design, 7(2), 146–157.

Miller, M. M., & Lazarides, A. A. (2005). Sensitivity of metal nanoparticle surface plasmon resonance to the dielectric environment. Journal of Physical Chemistry B, 109(46), 21556–21565.

Mishra, B., Saxena, A., & Tiwari, A. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles from marine diatoms Chaetoceros sp., Skeletonema sp., Thalassiosira sp., and their antibacterial study. Biotechnology Reports, 28, Article e00571.

Morris, G. M., vd. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. Journal of Computational Chemistry, 30(16), 2785–2791.

Morris, G. P., Clark, I. A., & Vissel, B. (2018). Questions concerning the role of amyloid-β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica, 136(5), 663–689.

Munoz-Torrero, D. (2008). Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. Current Medicinal Chemistry, 15(24), 2433–2455.

Musiek, E. S., & Holtzman, D. M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space and "wingmen". Nature Neuroscience, 18(6), 800–806.

Nandi, A., vd. (2022). Global and regional projections of the economic burden of Alzheimer's disease and related dementias from 2019 to 2050: A value of statistical life approach. eClinicalMedicine, 51, Article 101580.

Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Iravani, S., & Varma, R. S. (2020). Trimetallic nanoparticles: Greener synthesis and their applications. Nanomaterials, 10(9), Article 1784.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). Lehninger principles of biochemistry (8. baskı). Macmillan Learning.

Niederberger, M. (2007). Nonaqueous sol–gel routes to metal oxide nanoparticles. Accounts of Chemical Research, 40(9), 793–800.

Niroumand, M. C., Heydarpour, F., & Farzaei, M. H. (2018). Pharmacological and therapeutic effects of Vitex agnus-castus L.: A review. Pharmacognosy Reviews, 12(23), 103–114.

Osorio-Tobón, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. Journal of Food Science and Technology, 57(12), 4299–4315.

Özderin, S. (2021). Determination of phenolic components of Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) from Muğla-Ula region in Turkey. Mustafa Kemal University Journal of Agricultural Sciences, 26(3), 565–571.

Park-Wyllie, L. Y., vd. (2009). Cholinesterase inhibitors and hospitalization for bradycardia: A population-based study. PLOS Medicine, 6(9), Article e1000157.

Perry, E. K., Gibson, P. H., Blessed, G., Perry, R. H., & Tomlinson, B. E. (1977). Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia: Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. Journal of the Neurological Sciences, 34(2), 247–265.

Piccialli, I., vd. (2022). Exploring the therapeutic potential of phytochemicals in Alzheimer's disease: Focus on polyphenols and monoterpenes. Frontiers in Pharmacology, 13, Article 876614.

Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. New England Journal of Medicine, 362(4), 329–344.

Rani, A., & Sharma, A. (2013). The genus Vitex: A review. Pharmacognosy Reviews, 7(14), 188–198.

Ricarte, L. P., vd. (2020). Chemical composition and biological activities of the essential oils from Vitex agnus-castus, Ocimum campechianum and Ocimum carnosum. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 92(1).

Rodríguez-Félix, F., vd. (2022). Trends in sustainable green synthesis of silver nanoparticles using agri-food waste extracts and their applications in health. Journal of Nanomaterials, 2022, Article 8874003.

Sarac, N., Ugur, A., & Sen, B. (2015). In vitro antimutagenic activity of Vitex agnus-castus L. essential oils and ethanolic extracts. Industrial Crops and Products, 63, 100–103.

Sarikurkcu, C., vd. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex agnus castus L. fruits from Turkey. Food and Chemical Toxicology, 47(10), 2479–2483.

Sastry, M., Mayya, K. S., & Bandyopadhyay, K. (1997). pH dependent changes in the optical properties of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 127(1-3), 221–228.

Scarpa, E., vd. (2023). Gold and silver nanoparticles in Alzheimer's and Parkinson's diagnostics and treatments. iBrain, 9(3), 298–316.

Scheltens, P., vd. (2021). Alzheimer's disease. The Lancet, 397(10284), 1577–1590.

Schliebs, R., & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. Behavioural Brain Research, 221(2), 555–563.

Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Molecular Medicine, 8(6), 595–608.

Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., & Poinern, G. E. J. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. Materials, 8(11), 7278–7308.

Sher, N., Ahmed, M., Mushtaq, N., & Khan, R. A. (2023). Ex vivo antiacetylcholinesterase studies on silver nanoparticles synthesized using green approach. Applied Organometallic Chemistry, 37(12), Article e7273.

Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. Journal of Nanobiotechnology, 16(1), Article 14.

Silman, I., & Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: "Classical" and "non-classical" functions and pharmacology. Current Opinion in Pharmacology, 5(3), 293–302.

Singh, J., vd. (2018). 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. Journal of Nanobiotechnology, 16(1), Article 84.

Soltys, L., Olkhovyy, O., Tatarchuk, T., & Naushad, M. (2021). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: Principles of green chemistry and raw materials. Magnetochemistry, 7(11), Article 145.

Stuart, B. H. (2005). Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications. Wiley.

Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules, 14(6), 2167–2180.

Sussman, J. L., vd. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. Science, 253(5022), 872–879.

Tamfu, A. N., Kucukaydin, S., Yeskaliyeva, B., Ozturk, M., & Dinica, R. M. (2021). Non-alkaloid cholinesterase inhibitory compounds from natural sources. Molecules, 26(18), Article 5582.

Tareq, M., Khadrawy, Y. A., Rageh, M. M., & Mohammed, H. S. (2022). Dose-dependent biological toxicity of green synthesized silver nanoparticles in rat's brain. Scientific Reports, 12(1), Article 22642.

Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents, 1(2), 155–170.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry, 31(2), 455–461.

Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discussions of the Faraday Society, 11, 55–75.

Ulug, B., Turkdemir, M. H., Cicek, A., & Mete, A. (2015). Role of irradiation in the green synthesis of silver nanoparticles mediated by fig (Ficus carica) leaf extract. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 135, 153–161.

Van Die, M. D., Burger, H., Teede, H., & Bone, K. (2013). Vitex agnus-castus extracts for female reproductive disorders: A systematic review of clinical trials. Planta Medica, 79(7), 562–575.

Verkaik, S., Kamperman, A. M., van Westrhenen, R., & Schulte, P. F. J. (2017). The treatment of premenstrual syndrome with preparations of Vitex agnus castus: A

systematic review and meta-analysis. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 217(2), 150–166.

Villemagne, V. L., vd. (2018). Imaging tau and amyloid-β proteinopathies in Alzheimer disease and other conditions. Nature Reviews Neurology, 14(4), 225–236.

Voet, D., & Voet, J. G. (2011). Biochemistry (4. baskı). Wiley.

Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). Aβ oligomers - A decade of discovery. Journal of Neurochemistry, 101(5), 1172–1184.

Wang, Y., & Mandelkow, E. (2015). Tau in physiology and pathology. Nature Reviews Neuroscience, 17(1), 22–35.

Weller, J., & Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. F1000Research, 7, Article 1161.

World Health Organization. (2025, March 31). Dementia. World Health Organization.

Willets, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. Annual Review of Physical Chemistry, 58, 267–297.

Wimo, A., vd. (2023). The worldwide costs of dementia in 2019. Alzheimer's & Dementia, 19(7), 2865–2873.

Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., & Seidlová-Wuttke, D. (2003). Chaste tree (Vitex agnus-castus) - Pharmacology and clinical indications. Phytomedicine, 10(4), 348–357.

Yashni, G., Al-Gheethi, A. A., Mohamed, R. M. S. R., & Hashim, M. K. A. (2019). Green synthesis of ZnO nanoparticles by Coriandrum sativum leaf extract: Structural and optical properties. Desalination and Water Treatment, 167, 245–257.

Young, S., Chung, E., & Chen, M. A. (2021). Cardiovascular complications of acetylcholinesterase inhibitors in patients with Alzheimer's disease: A narrative review. Annals of Geriatric Medicine and Research, 25(3), 170–178.

Zeng, H., vd. (2012). Nanomaterials via laser ablation/irradiation in liquid: A review. Advanced Functional Materials, 22(7), 1333–1353.

Zhang, X., Li, Y., & Hu, Y. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles and their preventive effect in deficits in recognition and spatial memory in sporadic Alzheimer's rat model. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 605, Article 125288.

ÖZGEÇMİŞ

Ayberk YEŞİLADA

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2023-2026	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Antalya
Yan Dal 2020-2022	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara
Lisans 2018-2022	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara