



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***HEDYSARUM NİTİDUM* EKSTRELERİNİN
FARMASÖTİK ALANDA
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nuray BALTÜRK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

15/03/2023

Nuray BALTÜRK

İthaf

Doktora tezimi her zaman yanımda olan sevgili anneme ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Botanik Bilgiler	4
2.1.1. Fabaceae Familyası	4
2.1.2. <i>Hedysarum</i> Cinsi	5
2.1.3. <i>Hedysarum nitidum</i>	6
2.1.4. <i>Hedysarum</i> Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar	7
2.1.4.1. <i>Hedysarum</i> Türlerinde Bulunan Bileşenler	7
2.1.5. <i>Hedysarum</i> Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri	8
2.1.6. <i>Hedysarum</i> Cinsinin Diğer Kullanım Alanları	9
2.2. Serbest Radikaller	10
2.2.1. Serbest Radikal Kaynakları	12
2.2.1.1. Endojen Kaynaklar	12
2.2.1.2. Ekzojen Kaynaklar	13
2.2.2. Serbest Radikallerin Yararlı Etkileri	13
2.2.3. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri	13
2.3. Antioksidanlar	15
2.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	16
2.3.1.1. Endojen Antioksidanlar	17

2.3.1.2. Eksojen Antioksidanlar	19
2.3.2. Antioksidan Tayin Sistemleri	20
2.4. Enzimler	21
2.4.1. Enzim İnhibisyonu	22
2.4.1.1. Geri Dönüşümlü (Reversible) Enzim İnhibisyonu	23
2.4.1.2. Geri Dönüşümsüz (İrreversible) Enzim İnhibisyonu	25
2.5. Tirozinaz Enzimi ve İnhibitörleri	25
2.5.1. Tirozinaz İnhibitörleri	26
2.5.2. Tirozinaz İnhibitörlerinin Kullanım Alanları	27
2.6. Asetilkolin Metabolizması	27
2.6.1. Kolinesterazlar	29
2.6.2. AChE Enziminin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi	30
2.6.3. AChE İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığında Kullanılması	31
2.7. α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimleri	32
2.7.1. α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimlerinin Diyabet ile İlişkisi	33
2.8. Sitotoksite ve Değerlendirme Yöntemleri	34
2.8.1. Kanser Tedavisinde Doğal Kaynakların Yeri	35
2.9. Antimikrobiyal Aktivite	36
2.10. Kromatografik Yöntemler	37
2.10.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	38
2.10.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Bitkinin Toplanması, Teşhisi, Kurutulması ve Öğütülmesi	41
3.2. Bitkinin Ekstraksiyonu	41
3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	41
3.3.1. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	42
3.3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	44
3.3.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	44
3.3.4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	44
3.3.4.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini	45
3.3.4.3. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini	46
3.3.4.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini	46

3.3.4.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi Tayini	47
3.3.5. Enzim İnhibisyonu Çalışmaları	48
3.3.5.1. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Tayini	48
3.3.5.2. Antikolinesteraz Aktivite Tayini	49
3.3.5.3. α -Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi	49
3.3.5.4. α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi	50
3.3.6. Sitotoksosite Tayini	50
3.3.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	51
3.3.7.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu	51
3.3.7.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi	52
3.3.8. YPSK ile Bitki Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	52
3.3.9. Uçucu Yağların GC-MS Analiz Yöntemi	54
3.4. İstatiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
4.1. Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları	55
4.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Sonuçları	55
4.1.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Ölçümü Sonuçları	56
4.1.3. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları	57
4.1.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini Sonuçları	58
4.1.5. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları	59
4.2. Enzim İnhibisyonu Tayini Bulguları	61
4.2.1. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları	61
4.2.2. Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları	63
4.2.2.1. Asetilkolinesteraz İnhibitör Aktivite Sonuçları	63
4.2.2.2. Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite Sonuçları	65
4.2.3. α -Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi Sonuçları	67
4.2.4. α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi Sonuçları	69
4.3. Sitotoksosite Tayini Bulguları	71
4.3.1. MTT Yöntemi Sonuçları	71
4.4. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Bulguları	72
4.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Sonuçları	72
4.4.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi Sonuçları	72
4.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Bulguları	73

4.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Bulguları	74
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
6. KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	106



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Türkiye’de yetişen <i>Hedysarum</i> cinsi sistematigi	5
Tablo 2. Reaktif oksijen ve azot türleri	11
Tablo 3. Enzim sınıflandırması	22
Tablo 4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	38
Tablo 5. Kullanılan kimyasal malzeme ve maddeler	42
Tablo 6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	43
Tablo 7. Kullanılan cihazlar ve markaları	44
Tablo 8. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları	51
Tablo 9. Fitokimyasal çalışmalar sürecinde kullanılan kimyasal maddeler	53
Tablo 10. Fitokimyasal çalışmalar sürecinde kullanılan cihazlar ve markaları	53
Tablo 11. YPSK deneysel koşulları	53
Tablo 12. Gradient elüsyon programı	54
Tablo 13. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin antioksidan aktivite çalışma sonuçları	60
Tablo 14. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin ve kojik asitin IC ₅₀ değerleri	62
Tablo 15. Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite tayininde <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin ve galantaminin IC ₅₀ değerleri	64
Tablo 16. Bütirilkolinesteraz inhibitör aktivite tayininde <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin ve galataminin IC ₅₀ değerleri	66
Tablo 17. α -Glukozidaz inhibisyon aktivite tayininde <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin ve akarbozun IC ₅₀ değerleri	68
Tablo 18. α -Amilaz inhibisyon aktivite tayininde <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin ve akarbozun IC ₅₀ değerleri	70
Tablo 19. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin inhibisyon zon çapları	72
Tablo 20. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin MİK ve MBK değerleri	73
Tablo 21. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresinin içerdği fenolik bileşiklerin miktarları	73
Tablo 22. <i>H. nitidum</i> bitkisinin uçucu bileşenleri	75
Tablo 23. <i>H. nitidum</i> bitkisinin uçucu bileşenlerindeki bileşik sınıfları ve miktarları	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Serbest radikaller	15
Şekil 2. Yarışmalı enzim inhibisyonu	23
Şekil 3. Yarışmalı olmayan enzim inhibisyonu	24
Şekil 4. Yarışmasız enzim inhibisyonu	24
Şekil 5. Lineer karışık tip enzim inhibisyonu	25
Şekil 6. Asetilkolin metabolizması	28
Şekil 7. Asetilkolinin hidrolizi	29
Şekil 8. Asetilkolin	30
Şekil 9. YPSK cihazının şematik gösterimi	39
Şekil 10. Gaz kromatografisinin şematik gösterimi	40
Şekil 11. Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan gallik asite ait standart çalışma grafiği	55
Şekil 12. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin toplam fenolik madde miktar tayini sonuçları	55
Şekil 13. Toplam flavonoid madde miktarı tayininde kullanılan kuersetine ait standart çalışma grafiği	56
Şekil 14. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktar tayini sonuçları	56
Şekil 15. FRAP tayini çalışmasında kullanılan trolokse ait standart çalışma grafiği	57
Şekil 16. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin FRAP tayini sonuçları	57
Şekil 17. CUPRAC tayini çalışmasında kullanılan trolokse ait standart çalışma grafiği	58
Şekil 18. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin CUPRAC tayini sonuçları	58
Şekil 19. DPPH radikali giderme aktivitesi tayini çalışmasında kullanılan BHT'a ait standart çalışma grafiği	59
Şekil 20. <i>H. nitidum</i> su ekstresine ait DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları	59
Şekil 21. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresine ait DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları	60
Şekil 22. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin ve BHT standardının IC_{50} değerleri	60
Şekil 23. Kojik asit standardına ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	61
Şekil 24. <i>H. nitidum</i> su ekstresine ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	61
Şekil 25. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresine ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	62
Şekil 26. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması	62

Şekil 27. Galantamin standardına ait asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	63
Şekil 28. <i>H. nitidum</i> su ekstresine ait asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	63
Şekil 29. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresine ait asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	64
Şekil 30. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması	64
Şekil 31. Galantamin standardına ait bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	65
Şekil 32. <i>H. nitidum</i> su ekstresine ait bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	65
Şekil 33. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresine ait bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	66
Şekil 34. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması	66
Şekil 35. Akarboz standardına ait α -glukozidaz enzim inhibisyonu grafiği	67
Şekil 36. <i>H. nitidum</i> su ekstresine ait α -glukozidaz enzim inhibisyonu grafiği	67
Şekil 37. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresine ait α -glukozidaz enzim inhibisyonu grafiği	68
Şekil 38. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin α -glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması	68
Şekil 39. Akarboz standardına ait α -amilaz inhibisyonu grafiği	69
Şekil 40. <i>H. nitidum</i> su ekstresine ait α -amilaz enzim inhibisyonu grafiği	69
Şekil 41. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresine ait α -amilaz enzim inhibisyonu grafiği	70
Şekil 42. <i>H. nitidum</i> ekstrelerinin α -amilaz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması	70
Şekil 43. <i>H. nitidum</i> metanol ekstresinin (a) ve su ekstresinin (b) A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	71
Şekil 44. <i>H. nitidum</i> su ekstresinin A549 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi	71
Şekil 45. <i>H. nitidum</i> 'un YPSK kromatogramı	74
Şekil 46. <i>H. nitidum</i> bitkisinin ana uçucu bileşenlerinin formülleri	76

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Bitkinin Türkiye’deki dağılımı	6
Resim 2. <i>Hedysarum nitidum</i> bitkisinin habitatındaki genel görünümü	6



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

A549	İnsan akciğer karsinomu
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AOA	Antioksidan aktivite
AOK	Antioksidan kapasite
APP	Amiloid öncü proteini
Asetil-CoA	Asetil Koenzim A
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BChE	Bütirilkolinesteraz
BHT	Bütil hidroksi tolüen
CAT	Katalaz enzimi
ChAT	Kolinasetiltransferaz
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
EC	Enzim komisyonu
ET	Elektron transferi
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FDA	Amerikan İlaç Dairesi
FRAP	Demir (III) indirgeme antioksidan kapasitesi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
HAT	Hidrojen atomu transferi
HNM	<i>Hedysarum nitidum</i> metanol ekstresi
HNS	<i>Hedysarum nitidum</i> su ekstresi
IC₅₀	%50'sinin inhibe olduğu gözlenen konsantrasyon
IKI	İyodur/potasyum iyodur
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği

KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MBK	Minimal bakterisidal konsantrasyon
MDA	Molondialdehit
MİK	Minimal inhibisyon konsantrasyon
mM	Milimolar
MPO	Nötrofil miyeloperoksidaz
MS	Multiple skleroz
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PAS	Periferal anyonik alt bölge
PNPG	4-Nitrofenil β -D-glukuronid
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TPTZ	Tripridiltiazin
VACHT	Veziküler asetilkolin taşıyıcı
VD	Vasküler demans
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
XOD	Ksantin oksidaz

Simgeler

FeCl₃	Demir (III) klorür
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HO₂[·]	Hidroperoksil radikali
HOCl	Hipoklorik asit
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
O₂^{·-}	Süperoksit anyonu

$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
ONOO^-	Peroksinitrit
$\cdot\text{OH}$	Hidroksil radikali
p	Para
α	Alfa
β	Beta
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
%	Yüzde



ÖZET

***Hedysarum nitidum* Ekstrelerinin Farmasötik Alanda Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

Bu tez kapsamında *Hedysarum nitidum*'un su ve metanol ekstrelerinin biyolojik aktivitesi incelenerek farmasötik alanda kullanılabilirliği araştırılmıştır. Ekstrelerin antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik ve enzim inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. *H. nitidum*'un fenolik madde ve uçucu yağ bileşenlerinin içeriğinin belirlenmesi amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

H. nitidum'un su ve metanol ekstrelerinde toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, DPPH radikali giderme aktivitesi, FRAP ve CUPRAC değerleri sırasıyla 299.58 ± 2.86 mg gallik asit eşdeğeri/g numune, 481.5 ± 3.74 mg gallik asit eşdeğeri/g numune, 2.11 ± 0.12 mg QE/g numune, 26.62 ± 0.68 mg QE/g numune, 176.8026 ± 2.41 mg/mL, 18.0532 ± 1.4 mg/mL, 455 ± 3.14 μ M trolox eşdeğeri/gram, 1221 ± 5.72 μ M trolox eşdeğeri/g, 551.536 ± 2.84 μ M trolox eşdeğeri/g, 1331.826 ± 2.46 μ M trolox eşdeğeri/g olarak tespit edilmiştir. Su ve metanol ekstrelerinde tirozinaz, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, α -glukozidaz, α -amilaz inhibisyonu için IC_{50} değerleri sırasıyla 65.266 ± 1.45 μ g/mL, 43.118 ± 2.24 μ g/mL, 47.622 ± 1.45 μ g/mL, 67.087 ± 1.14 μ g/mL, 106.104 ± 1.48 μ g/mL, 281.323 ± 2.24 μ g/mL, 82.321 ± 1.14 μ g/mL, 39.537 ± 0.27 μ g/mL, 78.288 ± 2.05 μ g/mL, 55.490 ± 1.07 μ g/mL olarak bulunmuştur. Ekstrelerin A549 hücre hattı üzerinde konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. *H. nitidum*'un metanol ekstresi Gram (+) bakterileri üzerinde spesifik etkinlik göstermiştir. Metanol ekstresi üzerinde yapılan YPSK analiz çalışmasında *p*-hidroksi benzoik asit, kafeik asit ve 2-hidroksi sinnamik asit bulunmuştur. *H. nitidum*'un uçucu yağında ana bileşenler *n*-oktanal (%14.95), hekzahidrofarnesil aseton (%11.09), humulen epoksit-II (%9.81), α -terpineol (%9.12) ve eikosan (%8.96) olarak tespit edilmiştir.

H. nitidum'un iyi bir antioksidan aktiviteye, tirozinaz, asetilkolinesteraz ve α -glukozidaz enzimleri üzerinde güçlü inhibitör etkinliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, bitkinin hiperpigmentasyon, diyabet ve Alzheimer tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antioksidan Aktivite, Enzim İnhibisyon, Endemik, *Hedysarum*

ABSTRACT

Investigation of *Hedysarum nitidum* Extracts in the Pharmaceutical Field

In this thesis, the usability of *Hedysarum nitidum* in the pharmaceutical field was investigated by examining the biological activity of water and methanol extracts. The antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and enzyme inhibitory activities of the extracts were investigated. High performance liquid chromatography (YPSK) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) studies were carried out to determine the content of phenolic substance and essential oil components of *H. nitidum*.

The total phenolic content, total flavonoid content, DPPH radical scavenging activity, FRAP and CUPRAC values in the water and methanol extracts of *H. nitidum* were determined as 299.58 ± 2.86 mg gallic acid equivalent/g sample, 481.5 ± 3.74 mg gallic acid equivalent/g sample, 2.11 ± 0.12 mg QE/g sample, 26.62 ± 0.68 mg QE/g sample, 176.8026 ± 2.41 $\mu\text{g/mL}$, 18.0532 ± 1.4 $\mu\text{g/mL}$, 455 ± 3.14 μM trolox equivalent/gram, 1221 ± 5.72 μM trolox equivalent/g, 551.536 ± 2.84 μM trolox equivalent/g, 1331.826 ± 2.46 μM trolox equivalent/g, respectively. The IC_{50} values for inhibition of tyrosinase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, α -glucosidase, and α -amylase in water and methanol extracts were found to be 65.266 ± 1.45 $\mu\text{g/mL}$, 43.118 ± 2.24 $\mu\text{g/mL}$, 47.622 ± 1.45 $\mu\text{g/mL}$, 67.087 ± 1.14 $\mu\text{g/mL}$, 106.104 ± 1.48 $\mu\text{g/mL}$, 281.323 ± 2.24 $\mu\text{g/mL}$, 82.321 ± 1.14 $\mu\text{g/mL}$, 39.537 ± 0.27 $\mu\text{g/mL}$, 78.288 ± 2.05 $\mu\text{g/mL}$, 55.490 ± 1.07 $\mu\text{g/mL}$, respectively. It was observed that the plant extracts did not have a cytotoxic effect on the A549 cell line due to the increase in their concentrations. Methanol extract of *H. nitidum* showed specific activity on Gram (+) bacteria. *p*-Hydroxy benzoic acid, caffeic acid and 2-hydroxycinnamic acid were found in the YPSK analysis study on the methanol extract. In the essential oil of *H. nitidum*, *n*-octanal (14.95%), hexahydrofarnesyl acetone (11.09%), humulene epoxide-II (9.81%), α -terpineol (9.12%) and eicosan (8.96%) were detected as major compounds.

It has been observed that *H. nitidum* has good antioxidant activity and strong inhibitory activity on tyrosinase, acetylcholinesterase and α -glucosidase enzymes. In the light of this information, it was concluded that it would be useful to investigate the use of the plant as a therapeutic agent in the treatment of hyperpigmentation, diabetes and Alzheimer's.

Keywords: Antioxidant Activity, Enzyme Inhibition, Endemic, *Hedysarum*

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bitkiler doğanın insanlığa sunduğu önemli maddeler olup geçmişten günümüze kadar insanlar tarafından gıda, giyim, barınma, parfüm, baharat gibi birçok temel ihtiyaçların karşılanması amacıyla kullanıldıkları bilinmektedir (1). Bunun yanı sıra tıbbi bitkilerin yüzyıllar boyunca insanlığı rahatsız eden çeşitli hastalıkların tedavisinde de mevcut olan tek kaynak olarak yer aldığı bilinmektedir. Günümüzde hala birçok bitkinin geçmişten gelen bilgiler doğrultusunda hastalıkların teşhis, tedavi ve önlenmesinde geleneksel olarak kullanımı bulunmaktadır (2, 3).

Son yıllarda geleneksel tıp sistemi küresel çapta önem arz eden bir konu haline gelmiştir. Birçok gelişmekte olan ülkede toplumun büyük bir bölümü temel sağlık ihtiyaçlarını karşılamak için geleneksel uygulayıcılara ve şifalı bitkilere büyük ölçüde güvenmektedir. Bitkisel kaynaklı ilaçlar, teknolojinin ilerlemesi, modern tıpın gelişmesi ve yeni kimyasal bileşiklerin keşfi ile eski popülerliğini kaybetmiş olsa da tarihsel ve kültürel nedenlerle farmakolojik tedavi ajanlarının arasında hala büyük bir oranda yerini korumaktadır (4). Doğal kaynaklı ajanlar ile kıyaslandığında sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla ve pahalı olması insanları yeniden tıbbi bitkilerle tedavi arayışına yönlendirmiştir. Bu sebeple geleneksel tedavide kullanılan bitkiler üzerinde yapılacak araştırmaların ihtiyaç duyulan ilaçlara ulaşılmasına ışık tutacağı düşünülmektedir (5, 6).

Sanayileşmenin genişlemesi ile birlikte bireyin maruz kaldığı çevresel etmenler ve yaşam şekli tercihi gibi nedenlerle diyabet, kanser, ateroskleroz gibi birçok kronik rahatsızlıklarda önemli derecelerde artışlar meydana gelmektedir. Meydana gelen bu rahatsızlıkların kaynağını oluşturan serbest radikallerin vücutta meydana getirdiği oksidatif hasarın engellenmesinde antioksidanlar önemli bir rol oynamaktadır. Bu sebeple bitkiler taşıdıkları yüksek orandaki antioksidan bileşikler sebebiyle ilgi kaynağı haline gelmekte ve üzerlerinde antioksidan kapasitenin çalışılması önem kazanmaktadır (7).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre bulaşıcı olmayan hastalıklar her sene 41 milyon kişinin ölümüne sebep olmakta bu da dünya genelindeki ölümlerin %74'üne denk gelmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar, bulaşıcı olmayan hastalıkların sebep olduğu ölümlerin çoğundan veya yılda 17,9 milyon kişiden sorumlu olup bunu kanser, solunum yolu hastalıkları, diyabet ve diyabetin neden olduğu böbrek hastalığı ölümleri takip etmektedir (8).

DSÖ'ye göre, dünya nüfusunun %80'i bitkisel kaynaklı ilaçlara güvenmekte ve birinci basamak sağlık hizmetlerinde kullanılmaktadır. Dünyadaki yaklaşık 422000 çiçekli bitkinin 50000'den fazlası tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır (9). Binlerce yıl boyunca farklı medeniyetleri bünyesinde barındıran ve gerek coğrafi konumu gerek jeomorfolojik yapısı ve çeşitli iklim türlerinin etkisi sayesinde bitkisel flora çeşitliliği bakımından yüksek potansiyele sahip olan ülkemiz, bitkilerden şifa sağlamak amacıyla kullanmak konusunda da zengin bir kültürel geçmişe sahiptir. Türkiye florasında bulunan tür sayısı 11400 kadar olup endemizm açısından bakıldığında bunun üçte birini endemik türlerin oluşturduğu gözlenmektedir (10, 11).

Ülkemizde endemik bitkiler arasında %40'lık bir pay ile ikinci sırada yer alan ve içerdiği cins bakımından zengin bir aile olan Fabaceae familyası halk ilacı olarak kullanılan tıbbi bitkileri barındırması açısından da öneme sahiptir (10). Bu familyanın önemli cinslerinden biri olan *Hedysarum* cinsi Türkiye Florası'nda 21 tür ile temsil edilmekte ve bunların 11'inin endemik olduğu bilinmektedir (12).

Yapılan literatür taramalarında *Hedysarum* türlerinden flavonoidler (13-37), triterpenler ve triterpenoid saponinler (14, 15, 27, 38-41), kumarinler (28, 43, 44), lignanoidler (32, 45), steroller (15, 27, 46), karbonhidratlar (13, 47), yağ asitleri (32, 34) ve benzofuran (28, 49) gibi çeşitli bileşikler izole edilerek *Hedysarum* türlerinin karakteristik kimyasal özellikleri ortaya konulduğuna rastlanmıştır.

Hedysarum cinsinin türleri üzerinde yapılan biyoaktivite çalışmalarında potansiyel antioksidan, anti-aging, antitümör, bağışıklık sistemi düzenleyici ve antidiyabetik etki gösterdikleri saptanmıştır (37, 50-58).

Halk arasında "köse batalak" olarak bilinen ve endemik bir bitki olan *Hedysarum nitidum* için yapılan literatür çalışmalarında biyolojik aktivite ve içerdiği fitokimyasal bileşikler üzerine dair çalışma yapılmadığı tespit edilmiştir. *Hedysarum nitidum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ve su ekstraktları üzerinde biyolojik aktivitelerinin analizi antimikrobiyal, antioksidan, enzim inhibisyonu (tirozinaz, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibisyonları), sitotoksikite testleri ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bitkide yer alan fenolik madde içeriğinin ve uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla YPSK ve GC-MS analiz çalışmaları yapılmıştır.

Hazırladığımız tez çalışması ile *Hedysarum nitidum* bitkisinin biyolojik aktivitesi hakkında kapsamlı bilgiler edinerek eczacılık, kimya ve tıp literatürlerine yeni bir kazanım sağlamayı hedeflemekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Fabaceae Familyası

Fabaceae (Leguminosae) familyası, Orchidaceae ve Asteraceae'den sonra çiçekli bitkiler familyasında yer alan üçüncü büyük angiosperm ailesidir ve 730 cins ve 19300'den fazla tür içerdiği bilinmektedir (59, 60). Ülkemizde 72 cins ve 1228 tür ile temsil edilmekte olup bunların 383'ü endemik olduğu bilinmektedir (61).

Bu familyaya ait türler yıllık ve çok yıllık bitkilerden çalılara, ağaçlara, asmalara ve hatta birkaç sucul bitkiye kadar çeşitlilik göstermektedir. Boyut olarak çöllerin ve arktik veya alpin bölgelerin en küçük bitkilerinden en uzun yağmur ormanı ağaçlarına kadar, dünyanın ılıman ve tropik bölgelerine dağılmış bitki örtüsü türlerinin çoğunun göze çarpan ve baskın bileşenini oluşturmaktadır (62).

Baklagil veya fasulye ailesi olarak bilinen Fabaceae familyası, sağlığa ve geçim kaynaklarına fayda sağlayabilecek protein ve mikro besin kaynakları taşıyan gıda ürünlerine sahip olması bakımından özellikle gelişmekte olan ülkelerde tarımsal ve ekonomik olarak önem teşkil etmektedir (63). Tarımsal öneminin yanı sıra aromalar, zehirler, boyalar dahil olmak üzere çok çeşitli doğal ürünlerin sentezinde ve tıbbi alanda kullanımlarının da olduğu bilinmektedir (64).

Baklagillerin bir diğer önemli özelliği de atmosferdeki azotu bitkinin büyümesi için kullanılan faydalı azotlu bileşiklere dönüştürebilmesidir. Bunu kök nodüllerinde bulunan Rhizobium cinsi bakteriler ile geliştirdikleri ilişki sayesinde yapabilmektedir. Bu simbiyotik ilişki sayesinde meydana gelen azot fiksasyonu ile birlikte cinsin gübre sektöründe kullanımı yaygındır (64).

Familya, Caesalpinioideae, Mimosoideae ve Papilionoideae olmak üzere üç subfamilyaya ayrılmaktadır. Bu alt familyalar birbirinden çiçeklerinden ayırt edilebilirken her üç alt familyada da Fabaceae familyasının en karakteristik özelliği olan legümen tipi meyve bulunmaktadır. Ayrıca Mimosoideae ve Caesalpinioideae genellikle odunsu yapıda olup tropikal ve kurak bölgelerde yetişmektedir. Papilionoideae'nin ise genellikle otsu taksonlardan oluşmakta ve sıcak bölgelerde geniş yayılım göstermektedir (65-67).

2.1.2. *Hedysarum* Cinsi

Fabaceae familyasının alt familyası olan Papilionoideae içinde yer alan *Hedysarum* cinsi, yaklaşık 200 türden oluşmaktadır. Cins genel olarak Orta Asya'da dağılım göstermekle birlikte genetik çeşitlilik ve endemik bakımından İran ve Türkiye merkezi konumda yer almaktadır (68, 12).

Hedysarum cinsi, ılıman ormanlar, kutuplar ve yüksek dağlık bölgeler dahil olmak üzere çeşitli habitatlara uyum sağlayan yıllık veya çok yıllık bitki türünü içermektedir. Cinsin bitkileri, alpin ve arktik çayırlar, taşlı çayırlar, çöller veya deniz kıyıları gibi çeşitli habitatlarda bulunmaktadır (12, 69).

Cinse ait ilk kaynak bilgilerinin 1753 yılında Linnie ile başladığı bilinmektedir (70). *Hedysarum* cinsi üzerine yapılan araştırma ve çalışmalar Bossier'in *Flora Orientalis* adlı eserine kadar devam etmiştir. Bu eser ile birlikte cinse ait birçok yeni tür ortaya çıkarılmıştır. *Flora Orientalis* uzun bir süreç Türkiye'de bulunan bitkiler için önemli bir kaynak görevi görmüştür. Daha sonra editörlüğünü Davis'in yaptığı Türkiye Florası ülkemizde yer alan bitkiler üzerine yapılacak araştırma ve çalışmalara ışık tutmuştur (71).

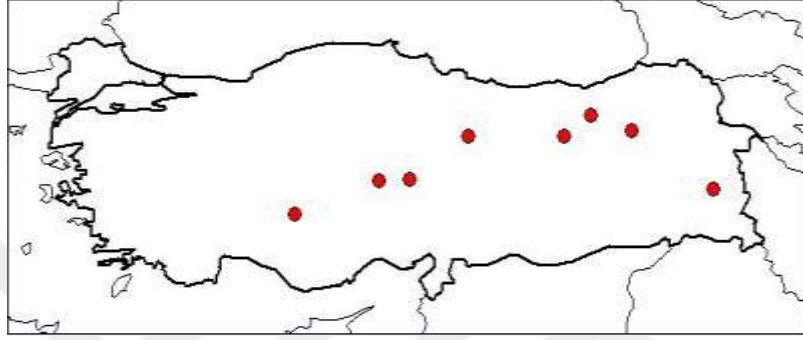
Hedysarum cinsi Türkiye Florası' na göre 21 tür içermekte olup türler 5 seksiyona ayrılmaktadır.

Tablo 1. Türkiye'de yetişen *Hedysarum* cinsi sistematigi (Hedge'den, 72).

Seksiyon	Kapsadıkları Türler	Özellikleri
Seksiyon I: Hedysarum	<i>H. spinosissimum</i>	Gövdeli, stipüller serbest, lomentum dikenli
Seksiyon II: Obscura	<i>H. hedysaroides</i> , <i>H. vanense</i>	Gövdeli, stipüller genellikle birleşik, lomentum setasız, ağsı damarlı
Seksiyon III: Multicaulia	<i>H. formosum</i> , <i>H. varium</i> , <i>H. laxum</i> , <i>H. syriacum</i> , <i>H. pestalozzae</i> , <i>H. nitidum</i> , <i>H. huetii</i>	Gövdeli, stipüller birleşik, lomentum segmentleri spinuloz, yünsü veya keçemsi
Seksiyon IV: Subacaulia	<i>H. cappadocicum</i> , <i>H. elegans</i> , <i>H. sericeum</i> , <i>H. erythroleucum</i>	Gövdesiz, stipüller birleşik, lomentum setasız veya kısa spinuloz
Seksiyon V: Crinifera	<i>H. aucheri</i> , <i>H. pogonocarpum</i> , <i>H. kotschyi</i> , <i>H. rotundifolium</i> , <i>H. pannosum</i> , <i>H. candidissimum</i> , <i>H. pycnostachyum</i> .	Gövdeli, stipüller birleşik, lomentum uzun setalı

2.1.3. *Hedysarum nitidum*

Halk arasında “köse batalak” olarak da bilinen *Hedysarum nitidum* endemik bir bitkidir. Türkiye’de Ağrı, Erzincan, Erzurum, Kayseri, Konya, Nevşehir, Sivas, Van, Bayburt illerinde olmak üzere daha çok Doğu Anadolu bölgesinde yayılış göstermektedir. Kayalık, kireçtaşı ve volkanik yamaçlar ve kumlu alanlarda, yaklaşık 1200-2475 m yükseklikte yetişmektedir. Bitkinin çiçeklenme dönemleri Haziran-Temmuz aylarıdır (73).



Resim 1. Bitkinin Türkiye’deki dağılımı (Tübives’ten, 73)

Bitkinin kaliksleri 5-7 mm boyutunda olup, tamamı ipeksi tüylüdür. Tüp triangular-lanseolat ve akuminat yapıdadır. Korolla kükürt sarısı olup belirgin bir sapı yoktur. Bayrakçık oblong eliptik yapıda olup emarginat tabanı yaklaşık 3-4 mm enindedir. Meyvesi 2-4 segmentli olup yüzeyi buruşuk, setasız ya da seyrek setalıdır. Setalar plumoz yapıdadır (74).



Resim 2. *Hedysarum nitidum* bitkisinin habitatındaki genel görünümü

2.1.4. *Hedysarum* Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Son yıllarda *Hedysarum* cinsi bitkiler üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda, kimyasal yapıları birbirinden farklı birçok bileşenin varlığı saptanmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda bu bileşenlerin arasında flavonoidler, triterpenler ve triterpenoid saponinler, kumarinler, lignanoidler, steroller, karbonhidratlar, yağ asitleri ve benzofuran gibi bileşiklerin bulunduğu gösterilmiştir (13-49).

2.1.4.1. *Hedysarum* Türlerinde Bulunan Bileşenler

Flavonoidler: *Hedysarum* cinsi bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda birçok flavonoidin varlığı saptanmıştır. Bu flavonoid çeşitleri arasında flavonlar, *Hedysarum* cinsindeki en yaygın ve baskın flavonoid grubunu oluşturmaktadır.

Yapılan analiz çalışmalarında *Hedysarum* cinsinden bugüne kadar narcissin, apigenin, 4'-metoksi-7-hidroksiflavon, 5,7-dihidroksi-4'- metoksiflavon, izorhamnetin, 3-O-metilkaempferol, kuersetin 3- α -L-rhamnofuranosid, kuersetin 3- α -L-arabinofuranosid, polistakosit, diosmin, linarin, rhoifolin, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranosid, rutin, neobudofficide, kuersetin-3-O- β -glukopiranosid-7-O- α -rhamnofuranosid, kuersetin kaempferol, ısıkuersitrin, hiperozid ve kuersitrin olmak üzere 21 flavonun izolasyonu gerçekleştirilmiştir (13-23).

İzoflavonlar, flavonlardan sonra *Hedysarum* cinsinde en yaygın bulunan flavonoid grubunu oluşturmakta olup *H. theinum*, *H. polybotrys*, *H. multijugum*, *H. kirghisorum* ve *H. scoparium*'da yüksek konsantrasyonlarda izoflavona rastlanmıştır (13, 15, 23-32).

H. multijugum ve *H. polybotrys* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda bir flavonon bileşiği olan naringin ve naringin türevlerine rastlanmıştır (13, 25). Ayrıca yapılan literatür çalışmalarında *Hedysarum* türlerinden kalkon, flavonol ve ksanton türevi bileşiklerin izole edildiğine de rastlanmıştır. *H. polybotrys*'den isoliquiritigenin (26, 32); *H. gmelinii*'den hedysarumine A, hedysarumine B, paratocarpin E (33); *H. theinum*'den kateşin ve epikateşin (24); *H. kirghisorum*'den epigallokateşin, epikateşin, plumbokateşin (29); *H. theinum*'dan vestitol (24, 34) izole edilen flavonoidlerdir.

Mangiferin ve isomangiferin, *H. flavescens*, *H. alpinum*, *H. denticulatum* ve *H. connatum* türlerinden elde edilen ksanton türevi bileşiklerdir (20, 35, 36).

Hedysarum cinsi üzerinde yapılan çalışmalarda cinsin çoğu türü farklı çeşitlerde flavonoid bileşikler içermesine rağmen, flavonoidlerin türleri ve miktarlarının türler arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (37).

Triterponoidler: *Hedysarum* türü bileşikler üzerinde yapılan izolasyon çalışmalarında lupeol, 12-hidroksilupeol, betulinik asit, ursolik asit ve soyasaponin türevi birçok triterponoid grubu bileşiğe rastlanmış olup birçoğu *H. polybotrys*'de yer aldığı tespit edilmiştir (14, 15, 27, 38-41).

Koumarinler: Yapılan izolasyon çalışmalarında şimdiye kadar 12 adet kumarin bileşiğinin izole edildiğine rastlanmıştır. Aureol, hedysarimkoumestan (A-H), metilhedysarimkoumestan H, 1,3,9-trimetoksikoumestan *H. multijugum*'dan elde edilirken (28, 43), 3,9-dihidroksi koumestan (44) *H. gmelinii*'den izole edilmiştir.

Lignanoidler: *H. polybotrys*'den syringaresinol (32) ve *H. setigerum*'dan isolariciresinyl-9'-O- β -D-glukopiranosid (45) olmak üzere *Hedysarum* türünden sadece 2 lignanoid bileşiğinin varlığı saptanmıştır.

Steroller: *Hedysarum* cinsinde *H. multijugum*'dan stigmasterol ve β -sitosterol (27, 46), *H. scoparium*'den daucosterol, β -sitosterol ve 2 sitosterol türevi (15) izole edilen sterol çeşitleridir.

Karbohidratlar: *H. polybotrys* üzerine yapılan çalışmalarda ramnoz, arabinoz, ksiloz, galaktoz, glukoz ve sukrozun varlığına rastlanmıştır (13, 47).

Yağ asitleri: Yapılan izolasyon çalışmalarında *H. theinum*'da palmitik asit, linoleik asit, oleik asit (34) ve *H. polybotrys*'de de trioleik gliserit, gliserol monopalmitat ve serinik asit (32) gibi yağ asiti türevi bileşiklerin varlığına rastlanmıştır.

Benzofuranlar ve benzen türevleri: *H. multijugum*'dan ebenfuran II, hedysarimbenzofuran A, hedysarimbenzofuran B, andinermal C (28); *H. polybotrys*'den polybotrin, hedysalignan A (48) gibi benzofuran türevi bileşikler izole edilmiştir.

2.1.5. *Hedysarum* Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Hongqi (*Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.) gibi *Hedysarum* cinsinin türleri üzerinde yapılan biyoaktivite çalışmalarında potansiyel antioksidan, anti-aging, antitümör, bağışıklık sistemi düzenleyici ve antidiyabetik etki gösterdikleri saptanmıştır (37).

Çin’de Hongqi olarak bilinen *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.’in kuru kökleri olan Radix hedysari, ünlü bir geleneksel Çin tıbbi ilacıdır (49). *H. polybotrys*’den elde edilen bir polisakarit olan HPS’nin çeşitli fizyokimyasal ve biyolojik özellikler gösterdiği çalışmalar bulunmaktadır.

H. polybotrys’in köklerinden elde edilen HPS-1’in insan hepatoselüler karsinoma HEP-G2 hücrelerinin ve insan mide kanseri MGC-803 hücrelerinin invitro proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe etmesi HPS-1 kanser tedavisinde potansiyele sahip olduğunu düşündürmüştür (50). Ayrıca *H. polybotrys* kökünden elde edilen bir polisakarit HPS-3’ün süperoksit anyonu ve hidroksil radikali üzerinde süpürücü özellik gösterdiği bildirilmiştir (51).

HPS’nin antioksidan, antidiyabetik (52) etkilerine ek olarak *Astragalus membranaceus* polisakkaritine benzer şekilde bağışıklık sistemi üzerinde koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (53-56). Ayrıca siklofosfamid ile indüklenen bağışıklığı baskılanmış farelerde Hedysari Radix’in siklofosfamidin neden olduğu immünosupresif eylemi antagonize ettiğini gösterdiği de bildirilmektedir (57).

Hedysarum cinsine ait olan *Hedysarum vicioider* Turcz. var. *Taipeicum* Hand.-Mazz. Liu, *Hedysarum limprichtii* Hlbr ve *Hedysarum smithianum* geleneksel Çin tıbbında uzun süredir kullanılmakta olan Hedysarum cinsi türleridir. Bu türlerin geleneksel olarak kullanımında vücudun enerjisini arttırma, gastrointestinal nematodların istilasını tedavi edici, bağışıklık sistemini ve periferik sinir sistemini destekleyici etkileri bulunduğu bildirilmektedir (37).

2.1.6. Hedysarum Cinsinin Diğer Kullanım Alanları

Fabaceae ailesinin üyesi olan *Hedysarum* cinsinin türlerinin, yem kalitesi ve atmosferik nitrojeni sabitleyerek toprak verimliliğini artırma yetenekleri sayesinde agronomik açıdan tarım sektöründe önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca bu cinse ait türlerin kurak ve yarı kurak bölgelerde bozulmuş zeminlerin iyileştirilmesinde kullanıldığı da bilinmektedir. Özellikle hayvancılık sektöründe yem ihtiyacının fazla olduğu, toprak erozyonu sorun teşkil ettiği ve organik madde bakımından yoksulluğunun büyük olduğu Cezayir’de kullanımları önem teşkil etmektedir (58).

2.2. Serbest Radikaller

Dış orbitalinde bir/birden fazla ortaklanmamış elektron bulunduran, kararsız ve çok etkin olan atom veya moleküller serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır (75, 76). Diğer moleküller ile kolay bir şekilde elektron alışverişinde bulunan bu moleküllere reaktif oksijen partikülleri ya da oksidan moleküller de denilmektedir. Bu moleküller, sahip oldukları eşlenmemiş elektrondan dolayı çevresindeki maddelerle kolayca reaksiyona girebilme eğilimindedirler. Elektronlarını eşlenik bulunduran molekül ya da atomlar ise kararlı yapıda olup serbest radikaller göre diğer moleküller ile reaksiyonlara girme eğilimleri daha zayıftır ve nonradikaller olarak adlandırılmaktadır (77).

Aerobik metabolizma sonucu meydana gelen serbest radikaller, apoptoz, gen ekspresyonu ve hücre proliferasyonu gibi bir dizi düzenleyici süreçte yer almaktadır. Serbest radikaller, fazla üretildiğinde, membran lipidlerini, hücre proteinlerini, karbonhidratları, DNA'yı ve enzimleri oksitleyerek hücrenin temel yapısının bozulmasına sebep olmaktadır (78).

Biyolojik sistemin antioksidan kapasitesi ile serbest radikal oluşumu arasındaki dengesizlik durumunda oksidatif stres gelişmektedir. Oksidatif stres organizmada sitotoksik bileşiklerin oluşmasına ve normal hücre fonksiyonu ile karakterize edilen oksidan- antioksidan dengesinin değişmesine sebep olmaktadır. Oksidan dengenin değişmesi sonucu gelişen oksidatif hasar kanser, yaşlanma süreci, ateroskleroz, bağışıklık sistemi rahatsızlıkları, hipertansiyon, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve nörolojik rahatsızlıklar gibi birçok hastalığın temelini oluşturmaktadır (78-80).

Serbest radikaller, süperoksit, hidroksil, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahip olup moleküler oksijenin metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile oluşmaktadır (81). Serbest radikaller, oksijen ve azot kaynaklı olmak üzere reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri olarak sınıflandırılmaktadır (77).

Tablo 2. Reaktif oksijen ve azot türleri (Karabulut'tan, 77)

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)			
Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROOH^{\cdot}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	O_2
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipidperoksil	$LOO^{\cdot}$		
Reaktif Azot Türleri (RNS)			
Radikaller		Nonradikaller	
Azot oksit	$NO^{\cdot}$	Nitröz asit	HNO_2
Azot dioksit	$NO_2^{\cdot}$	Nitroksil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Diazol tetroksid	N_2O_4
		Diazol trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitrik asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Alkil peroksinitrit	$ROONO$

Oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan süperoksit radikali, serbest radikal olmasına karşın yüksek dereceli bir radikal değildir. Mitokondri iç zarına yerleşmiş olan elektron transport sisteminde enerji dönüşümü sırasında açığa çıkan elektron kaçakları oksijenin süper oksit radikaline dönüşmesine neden olmaktadır (77).

Reaktif oksijen türleri arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), biyolojik membranlar arasında yayılabilen, nispeten kararlı, radikal olmayan bir oksidandır. Moleküler oksijenin 2 elektron alarak indirgenmesiyle veya süperoksit anyon radikalinin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyonu ile üretilmektedir (82).

H_2O_2 , mitokondriyal süperoksit üretiminin arttığı veya antioksidan sistemlerin tükendiği koşullarda birikerek mitokondriyal oksidatif stres durumuna yol açmaktadır. Aynı zamanda H_2O_2 'un, mitokondriyal Fe^{+2} ile reaksiyona girerek yüksek oranda reaktif hidroksil radikalinin ($HO^{\cdot}$) olduğu Fenton reaksiyonunda aktif rol oynadığı da bilinmektedir (83, 84).

Serbest radikaller azot kaynaklı da olabilmektedir. RNS, nitrosilasyon reaksiyonlarını kolaylaştırmak için hareket edebilen radikal azot bazlı moleküllerdir. Nitrik oksidin kendisi çoğu biyolojik molekülle reaktif değildir fakat ikincil reaktif azot türlerine dönüştürüldüğünde toksik hale gelmektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS), argininin sitriline katalitik dönüşümünde NO[•] radikal türünün sentezini katalize etmektedir. Nitrik oksitin bilinen en hızlı biyolojik reaksiyonu, radikal olmayan bir ürün olan peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturmak için süperoksit radikali ile kombinasyonudur (79).

2.2.1. Serbest Radikal Kaynakları

Organizmadaki serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilmektedir.

2.2.1.1. Endojen Kaynaklar

Hücrel olayların birçoğunda serbest radikal oluşumu mevcut olup oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermektedir. Endojen kaynaklı serbest radikaller fiziksel egzersiz, yaşlılık, stres, kronik hastalıklar (kanser, inflamasyon, ateroskleroz vb), enfeksiyon, antioksidanların alınamadığı durumlar (malabsorbsiyon, iştahsızlık, kolestaz vb.) sonucu organizma ve doku yüzeyinde meydana gelmekle birlikte normal metabolik olaylar sırasında da hücrel düzeyde açığa çıktığı bilinmektedir (85).

Hücre içi serbest radikal oluşumunda;

- Normal aerobik mitokondriyal solunum esnasında yan ürün olarak H₂O₂, O₂⁻ ve OH[•] radikalleri oluşumu,
- Ksantin oksidaz (XOD) ve nötrofil miyeloperoksidaz (MPO) gibi enzimlerin aktivitesi sonucu reaktif oksijen türleri açığa çıkması,
- Makrofajlar ve nötrofiller gibi bağışıklık sistemi hücreleri tarafından süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit üretimi,
- Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ile birlikte makrofaj ve nötrofillerin aktivasyonu sonucu hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri oluşması,
- Yağ asitlerinin yıkımı sonucu peroksizomlarda hidrojen peroksit oluşması,
- Karaciğerde detoksifikasyon ve eliminasyon gibi metabolik olaylar sonucu oksidatif yan ürünlerin oluşması örnek verilebilir (77, 86).

2.2.1.2. Ekzojen Kaynaklar

- Çevresel faktörler
 - Sigara ve egzoz dumanı
 - Orman yangınları, volkanik faaliyetler
 - Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi kirletici maddeler
 - Hava kirletici kimyasallar (ozon, karbonmonoksit, formaldehit, benzen vb.)
 - Temizlik ürünleri
 - Parfümler ve böcek ilaçları
 - Radyasyon
- Diyetel faktörler
 - Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması,
 - Alkol ve sigara kullanımı
 - Fazla kalorili diyet
- İlaçlar
 - Antineoplastik ilaçlar
 - İlaç toksikasyonları
 - Glutasyon tüketen ilaçlar (85, 86)

2.2.2. Serbest Radikallerin Yararlı Etkileri

Serbest radikallerin sebep olduğu zararlı etkilerinin yanı sıra organizmada düşük yoğunlukta bulundukları zaman yararlı etkileri de mevcuttur. Serbest radikallerin yararlı etkilerinin arasında makrofajlar tarafından sitotoksik hücrelerin öldürülmesi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, fagositoz yoluyla enfeksiyonlara karşı savunma etkileri yanı sıra büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu, tirozin amino asidinin fosfatlanmasının aktivasyonu, intrasellüler depolardan kalsiyumun salınımı gibi birtakım hücre sinyallerinin aktivasyonu da yer almaktadır (77).

2.2.3. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

Hücresel olaylar sonucu antioksidan kapasiteyi aşan serbest radikaller dengeli hale gelebilmek için yakın çevresindeki bileşiklerle etkileşerek dengeli hale gelmeye çalışmaktadır. Fakat bu etkileşimle birlikte hücre yapılarında bozukluklara ve hasarlara

neden olmaktadır. Enzimler, proteinler, nükleik asitler, DNA, yağ asitleri gibi makromoleküller açığa çıkan oksijen radikallerinden etkilenen bileşenlerin başında yer almaktadır (78, 87).

Lipitler: Hücre içinde meydana gelen serbest radikaller özellikle membran yapısında yer alan fosfolipit, gliserit gibi doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon süreci üretilen radikallerin, membran yapısını, işlevini ve reseptörleri değiştirdiği 3 fazlı bir kimyasal reaksiyon zincirinden oluşmaktadır. Membran yapısında yer alan yağ asitleri zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlayan reaksiyon hücre duvarı lipid yapısının bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bozulan membran yapısı ile birlikte organellerin parçalanması, lizozomal enzimlerin salıverilmesi ve otoliz gerçekleşmektedir (86, 88, 89).

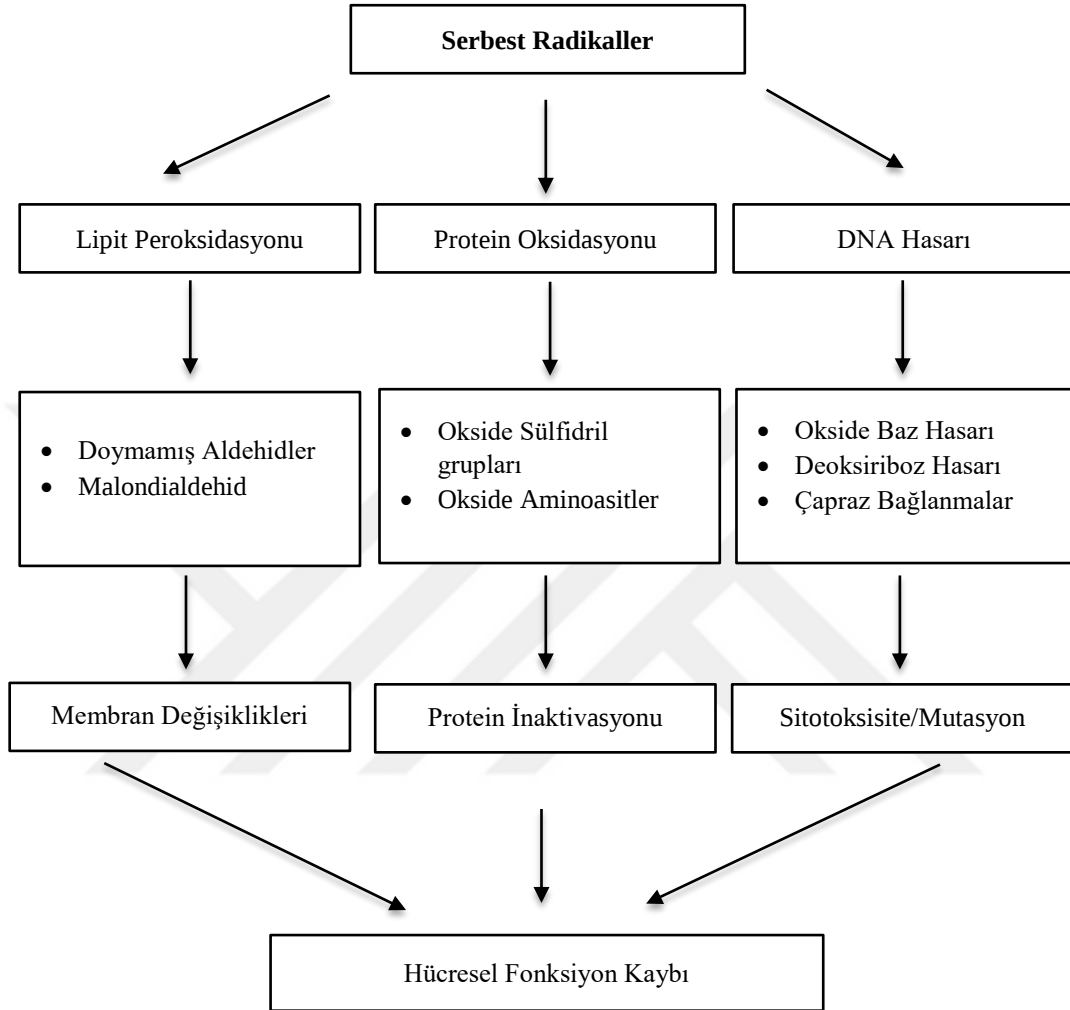
Üç veya daha fazla sayıda çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin oksijenle yükseltgenmesi sonucu meydana gelen üç karbonlu bir dialdehid olan malondialdehit (MDA) meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden biri olan MDA'nın hücre yüzeyi bileşenlerinde deformasyon, hücre membranlarındaki iyon transportunun ve enzim aktivitesinin değişmesi gibi birtakım hasarlara yol açtığı bilinmektedir (76).

Proteinler: Serbest radikaller, yapısal proteinlerin işlevini ve enzim aktivitesini engelleyerek protein yapısında hasara neden olmaktadır. Proteinin yapısındaki aminoasit içeriği ve yerleşimi proteinlerin oksitadif saldırıya duyarlılığını belirlemektedir. Doymamış bağ içeren ve yapısında sülfür taşıyan moleküller yüksek reaktivite sergilemeleri nedeniyle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitler içeren proteinler serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girmektedir.

Oksitlenmiş proteinlerin çoğu inaktif yapıda yer almaktadır. Bu oksidasyona uğramış proteinlerin zararlı etkileri ortamdaki uzaklaştırılarak kaldırılmakla birlikte yaşla kademeli bir şekilde ortamda biriktiği ve hücre hasara neden olduğu da bilinmektedir (90-92).

DNA: Serbest radikal saldırısına karşı oldukça hassas olan başka bir molekül türü de DNA'dır. Bir oksijen radikalının DNA ile reaksiyonu sonucu baz hasarı veya DNA zincir kırılmaları meydana gelmektedir. Oluşan bu hasar DNA'nın tamir mekanizmaları ile onarılmazsa mutasyonlar ve apoptozis gelişmektedir. Serbest radikallerin DNA'ya

doğrudan etkisi mevcut olduğu gibi lipid peroksidasyon sonucu oluşan yıkım ürünleri ile DNA'nın etkileşimi sonucu indirekt etkileri mevcuttur (93).



Şekil 1. Serbest radikaller (Akalin'dan, 93)

2.3. Antioksidanlar

Serbest reaktiflerin organizmada oluşturduğu yararlı ve zararlı etkilerin arasındaki dengenin sağlanması önemlidir. Oksijen yaşamın sürekliliği için kritik öneme sahip bir element olup enerji üretimi için kullanıldığında reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumuna sebep olmaktadır. Bu reaktif türlerinin aerobik organizmalarda meydana getirdiği hasarları azaltan çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (94, 95).

Serbest reaktiflerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği oksidatif hasarları önleyen, serbest radikalleri yakalayan ve stabilize eden bileşiklere “antioksidanlar” adı

verilmektedir. Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek oksidasyon ve peroksidasyonun ilerlemesini önlemektedir. Bu bileşenler insan vücudunda oksidatif süreçleri ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltmak için hayati bir rol oynamaktadır (96).

Antioksidanların reaktif ürünlere karşı oksidatif savunma mekanizması üç şekilde gerçekleşmektedir (85):

- Oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu
- Radikal oluşum reaksiyonlarının sonlandırılması
- Radikal oluşumunu sınırlandırılması

2.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidan savunma sistemleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırılmakta olup endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak iki grup altında toplanmaktadır. Endojen kaynaklı antioksidanlar da enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidan savunma sistemleri belirli spesifik kofaktör ve reaktif substrat türlerine sahipken nonenzimatik antioksidanlar için herhangi bir substrata spesifik eğilim bulunmamaktadır. Dolayısıyla nonenzimatik sistemler hem ROS'un hem de RNS'nin olumsuz etkilerini ortadan kaldıracabilecekleri için diğerlerinden farklı bir etkiye sahiptir (97, 98).

Antioksidanlar savunma hatlarına göre sınıflandırılmaktadır. İlk savunma hattında koruyucu antioksidan, ikinci savunma hattında radikal süpürücü antioksidan ve son olarak üçüncü savunma hattı olarak da re-pair ve de-novo enzimler olarak etki gösterdikleri bilinmektedir.

- **İlk savunma hattında** SOD, CAT, GPx, glutatyon redüktaz gibi enzimler ve selenyum (Se), manganez (Mn) gibi çeşitli mineral türleri aracılığıyla oksidatif strese yol açan serbest radikallerin üretimi engellenmektedir.
- **İkinci savunma hattında** serbest radikalleri daha az zararlı hale getirmenin yanı sıra oksidatif reaksiyonun neden olduğu zararları daha da azaltarak hasarlı bileşiklerin üretimi engellenmektedir. E ve C vitaminleri, flavonoidler ve ürik asitler ikinci savunma hattında yer alan serbest radikal temizleyicileridir.

- **Üçüncü savunma hattında** peroksil lipid radikalinde zincir reaksiyonunun yayılmasını engellemenin yanı sıra, hasarlı DNA'ları, proteinleri, peroksitleri ve oksitlenmiş lipidler onarılmaktadır (98).

2.3.1.1. Endojen Antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar

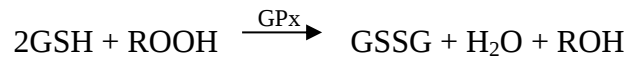
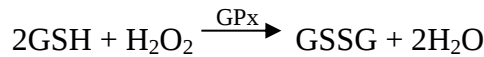
Süperoksit Dismutaz (SOD): Enzimatik bir antioksidan olan Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalının hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalize eder. Bu etkisiyle birlikte hücrede bulunan süperoksit radikal seviyesini kontrol altında tutarak hücrel hasarın meydana gelmesini önlemektedir.



Antioksidan savunma sistemin ilk hattını oluşturan SOD enziminin aktif bölgesinde taşıdığı geçiş metali iyonuna ve bulundukları yere göre Mn-SOD, Cu/Zn SOD ve EC-SOD (ekstrasellüler süperoksit dismutaz) olmak üzere üç izoenzimi bulunmaktadır (99, 100, 101).

Katalaz (CAT): Katalaz bilinen en etkili enzimlerden biridir. Tetramerik yapıdan oluşmakta olup yapısında hem grubu yer almaktadır. Molekül başına 4 ferriprotoporfirin grubu içermektedir. Genellikle peroksizomlarda bulunan katalaz hidrojen peroksidin H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü katalizlemektedir (100).

Glutatyon Peroksidaz (GPx): Glutatyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanarak hidrojen peroksitlerin ve organik hidroperoksitlerin suya veya alkollere indirgenmesini katalize etmektedir. Böylece hidrojen peroksidin hücrel düzeyde meydana getirdiği oksidatif hasarı engellemektedir.

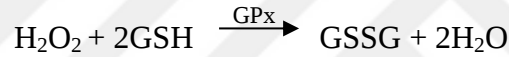


Glutatyon peroksidaz, her birinin selenyum atomu taşıdığı 4 protein alt biriminden oluşmaktadır. Glutatyon peroksidazın enzimin aktif bölgesinde selenyum taşımaya bağlı

olarak selenyuma bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GPx) ve selenyuma bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz olmak üzere 2 farklı formu bulunmaktadır.

- a. Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz: Hidrojen peroksit ve organik hiperoksitler üzerinde etki gösterir.
- b. Selenyuma bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz (GST): Organik hidroperoksitler üzerinde etki gösterir (96, 102).

Glutatyon Redüktaz: Glutatyon redüktaz, oksitlenmiş glutatyonu indirgenmiş forma geri dönüştüren temel bir enzimdir. Hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin indirgenme reaksiyonunda glutatyon da okside glutatyon formuna yükseltgenmektedir. Organizmada sınırlı sayıda glutatyon olması sebebiyle bu okside glutatyonun tekrar eski formuna dönüşmesi gerekmektedir. Glutatyon redüktaz NADPH varlığında okside glutatyonu tekrardan redükte glutatyonla dönüştürmektedir (103, 110).



Nonenzimatik Antioksidanlar

Glutatyon: Glutatyon, sitozol, kloroplastlar, endoplazmik retikulum, vakuoller ve mitokondri gibi hücre kompartımanlarında bulunan ve glutamikasit-sistein-glisinden oluşmuş bir tripeptittir. Genellikle indirgenmiş olarak GSH formunda bulunmaktadır. Singlet oksijen, süperoksit radikalleri ve hidroksil radikalleri, ROS ile enzimatik olmayan bir şekilde reaksiyona girerek serbest radikallerin detoksifikasyonunda görev almaktadır. Böylece oksidatif hasara ve serbest radikallere karşı etkinlik göstermektedir. ROS'a karşı savunmada temel bir yardımcı substrat ve indirgeyici olmasının yanı sıra, glioksalaz sistemi, ribonükleotitlerin deoksiribonükleotitlere indirgenmesi, tiyol yoluyla protein ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi, disülfid değişim reaksiyonları gibi diğer hücresel reaksiyonlarda da rol oynamaktadır (103, 105).

Ürik Asit: Ürik asit, çeşitli reaktif oksijen türlerini temizleme yeteneğine sahip bir antioksidandır. Serbest radikallerin birikimini önlemede, mitokondriyal fonksiyonu stabilize etmede ve hücre zarlarının geçirgenliğini düzenleyerek kalsiyum iyonu dengesinin sağlanmasında rol oynamaktadır. Ayrıca demir veya bakır iyonları ile kararlı

kompleksler oluşturarak Fenton reaksiyonu veya Haber-Weiss reaksiyonu gibi reaksiyonlarda görev almaktadır (106).

Bilirubin: Bilirubin hepatik fonksiyonların belirtecidir. Etkili bir antioksidan olan bilirubin singlet oksijeni ve hipokloritlerin detoksifikasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca linolenik asidin peroksidasyonunu önlenmesinde de görev almaktadır (106).

Melatonin: Melatonin, oksidatif bileşikler ve reaktif oksijen türlerine karşı süpürücü ve hücrel makromoleküllere yönelik oksidatif hasarı azaltma eylemleri olan etkili bir antioksidandır. Doğrudan bir serbest radikal süpürücü etkisi yanı sıra glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz dahil olmak üzere antioksidan enzimlerini uyarılmasında, glutatyon sentezinin regüle edilmesinde ve serbest radikal süpürücülerle sinerji oluşturulmasında dolaylı yollardan antioksidan faaliyet göstermektedir. Melatoninin dolaylı antioksidan işlevleri, bu molekülü serbest radikal hasarını sınırlamada anahtar bir endojen faktör yapmaktadır (107).

Albumin: Albumin, 585 aminoasit içeren yüksek çözünürlü bir proteindir. Güçlü bir oksidan olan hipokloröz asit, nötrofil ve monosit gibi aktif fagositlerde bulunan myeloperoksidaz enzimi tarafından üretilmektedir. Oluşan HOCl albümin tarafından süpürülmektedir (108).

2.3.1.2. Eksojen Antioksidanlar

C vitamini (Askorbik Asit): Güçlü bir antioksidan olan askorbik asit, bitki hücre tiplerinin çoğunda, organellerinde ve apoplastta yer almaktadır. Askorbik asit çoğunlukla indirgenmiş formda bulunmakta ve askorbat havuzunun %90'ını oluşturmaktadır. Süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijeni doğrudan temizleme ve askorbat peroksidaz reaksiyonu yoluyla H_2O_2 'nin suya indirgenmesinde faaliyet göstererek oksidatif hasara karşı etkin bir koruma sağlamaktadır (109). Ayrıca tokoferoksil radikallerinden tokoferolün oluşmasına katkı sağlamaktadır. Bütün bunların yanı sıra askorbik asit Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşümünde yer alması oksidan bir etkisinin olduğunun göstergesi olarak yer almaktadır (96).

E vitamini: Vitamin E, dört tokoferol ve tokotrienol türevlerinden oluşan 8 stereoisomeri bulunan bir bileşiktir. Bütün formların antioksidan aktiviteleri vardır fakat içlerinden en etkili antioksidan aktivite gösteren formu α -tokoferoldür. E Vitamini, peroksil radikallerini temizlemekte ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA'lar)

oksidasyonunu sonlandırmaktadır. Ayrıca zincir kırıcı bir antioksidan olarak etki göstererek lipid otooksidasyonu sırasında zincir yayılma adımını engellemektedir (110).

Karoten: Karotenoidler, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan pigmentleridir. Karotenoid bileşiklerin antioksidan etkisi yapısında bulunan konjuge çift bağ ile ilişkilendirilmektedir. Bu antioksidan özellikleri sayesinde serbest radikal bileşiklerin oluşumunu engellemekte ve reaktif oksijen ürünlerin baskılanması yoluyla dokuları fotooksidatif ve oksidatif hasara karşı korumaktadırlar (111).

Flavonoidler: Flavonoidler, genellikle bitkilerde bulunan difenilpropan halka yapısı içeren polifenolik bileşiklerdir. Flavonlar, flavonoller, izoflavonlar, flavononlar ve kalkanlar gibi gruplara ayrılabilir. Flavonoidlerin, lipid peroksid, süperoksit ve hidroksil gibi serbest radikalleri süpürme, singlet oksijen söndürücü, lipid peroksidasyonunu inhibe etme, siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerini inhibe etme gibi farklı etki mekanizmalarıyla serbest radikaller üzerinde antioksidan özellik göstermektedirler (112).

2.3.2. Antioksidan Tayin Sistemleri

Antioksidan kapasite tayinini analiz etmek için günümüze kadar birçok yöntem geliştirilmiştir (113). Genel olarak bu yöntemlerde antioksidan aktivite (AOA) ölçümleri reaksiyon kinetiği ile ilişkilendirilerek tayin edilirken, antioksidan kapasite (AOK) ölçümleri ise reaksiyon termodinamiği ile ilişkilendirilmiştir. Bu yöntemler ayrıca in vivo ve in vitro; direk ve indirekt; enzimatik ve enzimatik olmayan olarak da sınıflandırılmaktadır. Toplam antioksidan kapasiteyi tayin etmede en yaygın kabul edilen yöntem sistematığı, hidrojen atomu transferine (HAT) dayalı ve elektron transferine (ET) dayalı analiz yöntemleridir (114).

HAT'a dayalı yöntemlerin temeli azo bileşiklerin yıkımı ile açığa çıkan peroksid radikallerinin substrat ve antioksidanın rekabetine dayanmaktadır. Bu tayin yöntemlerinde çoğunlukla yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenmektedir. HAT'a dayalı yöntemler çözücü ve pH'dan bağımsız olarak ve kısa bir süre içinde gerçekleşmektedir (115, 116). Bu yöntemler;

- a. Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP)
- b. Krosin beyazlatma yöntemi
- c. Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) yöntemi olarak sıralanmaktadır.

Elektron transferine dayalı yöntemler antioksidan bileşiğin oksidantı indirgeme kapasitesini renk değişimi ile ölçen analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerde oksidan madde antioksidandan elektron alarak renk değişimine neden olmaktadır. Renk değişiminin seviyesi örnekte yer alan antioksidan bileşiğin derişimi ile bağlantılıdır. Çözücü ve pH derecesine ET'e dayalı yöntemler, çözücü ve ortamın pH'ından etkilenmekte olup HAT'a dayalı yöntemlere göre daha uzun bir sürede gerçekleşmektedir (116, 117).

Oksidan + e⁻ (antioksidan) → indirgenmiş oksidan + yükseltgenmiş antioksidan

ET dayalı analiz yöntemleri;

- a. Toplam fenolik madde miktarı tayini
- b. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali giderme aktivitesi tayini
- c. Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC) yöntemi
- d. Cu (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi
- e. Ferrik indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) Tayini olarak sıralanmaktadır.

2.4. Enzimler

Organizmada meydana gelen biyokimyasal reaksiyonların hızlanmasını sağlayan protein yapısındaki biyolojik katalizörlere **enzim** adı verilmektedir (118). Bu biyokatalizörler, katıldıkları kimyasal reaksiyonları büyük ölçüde hızlandırarak, katalizlenmemiş reaksiyonlara göre 10²⁵ katı kadar hız artışı sağlamaktadır (119).

Enzimler, metabolizma, katabolizma, hücrel sinyal iletimi, hücre döngüsü ve gelişimi dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal olaylara aracılık etme ve düzenlemede canlı organizmalar için hayati öneme sahiptir. Bununla birlikte birçok insan hastalıklarının temelini enzim ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. İnsanlarda çeşitli rahatsızlıklar, enzimlerin işlev bozukluğunun yanı sıra enzimlerin aşırı ekspresyonu veya hiperaktivasyonundan kaynaklanmaktadır (120).

Enzimlerin katalizledikleri reaksiyonda spesifik olarak etki ettikleri maddeye “**substrat**”, bu tepkime sonucunda oluşan maddeye de “**ürün**” adı verilmektedir (121). Bugüne kadar enzim sınıflandırması için birçok yöntem mevcut olup enzimlerin çalışılmasını kolaylaştırma ve standardize etmek amacıyla Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından enzimlerin sınıflandırmasından sorumlu Enzim Komisyonu (EC) adlı bir komisyon kurulmuştur. EC, enzimleri 6 sınıfa ayırmakta olup enzimin ana sınıfını, alt

sınıfını, alt alt sınıfını ve substrat sınıfını tanımlayan dört bölümden oluşmaktadır (122, 123).

Tablo 3. Enzim sınıflandırması (Tao'dan, 122)

Grup	Katalizlenen Reaksiyon	Örnek Enzimler
Oksidoredüktazlar	Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalize etme; H ve O atomu veya elektron transferi	Oksidaz, Dehidrojenaz
Transferazlar	Bir bileşikten diğerine bir fonksiyonel grubun aktarımı. Grup açıl-, fosfat, amino- veya metil- olabilir.	Transaminaz, Kinaz
Hidrolazlar	Hidroliz yoluyla bir substrattan iki ürünün oluşması	Lipaz, Amilaz, Peptidaz
Liyazlar	Hidrolitik olmayan bir yolla substratlara grupların eklenmesi veya alınması C-C, C-N, C-O veya C-S bağları kopabilir.	Adenilat siklaz
İzomerazlar	Molekül içi değişiklikler	Izomeraz, Mutaz
Ligazlar	ATP'nin defosforilasyonu ile eş zamanlı yeni C-O, C-S, C-N veya C-C bağ yapılarının oluşumu	Sentetaz

2.4.1. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin katalizlediği bazı reaksiyonlarda reaksiyona giren buna karşın tepkime sonucu yeni bir ürün formuna dönüşmeyen bileşikler yer almaktadır. Bu ürünler, substrat gibi hareket etmeyip katıldıkları reaksiyonun hızında değişikliğe sebep olan moderatörlerdir. Genellikle etki mekanizması reaksiyonun hızını azaltma veya reaksiyonun gerçekleşmesini engelleme şeklindedir. Bu çeşit maddelere “**inhibitör**”, meydana gelen olaya da “**inhibisyon**” adı verilmektedir (124).

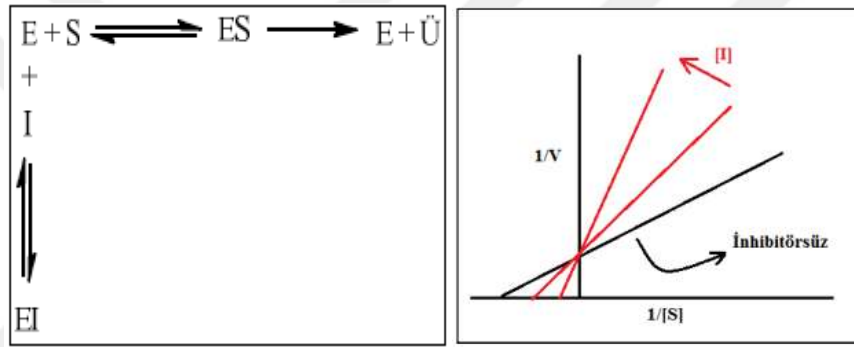
İnhibisyonu ölçmek için, inhibitör varlığında ve yokluğunda enzim aktivitesi farkının inhibitör yokluğunda enzim aktivitesine oranı olarak tanımlanan “inhibisyon derecesi” terimi kullanılmaktadır. Ayrıca I50, %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu ve Ki, enzimin inhibitöre olan afinitesini ölçen inhibisyon sabiti olarak tanımlanmaktadır (125).

Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü (reversible) inhibisyon ve geri dönüşümsüz (irreversible) inhibisyon şeklinde iki grup altında sınıflandırılmaktadır.

2.4.1.1. Geri Dönüşümlü (Reversible) Enzim İnhibisyonu

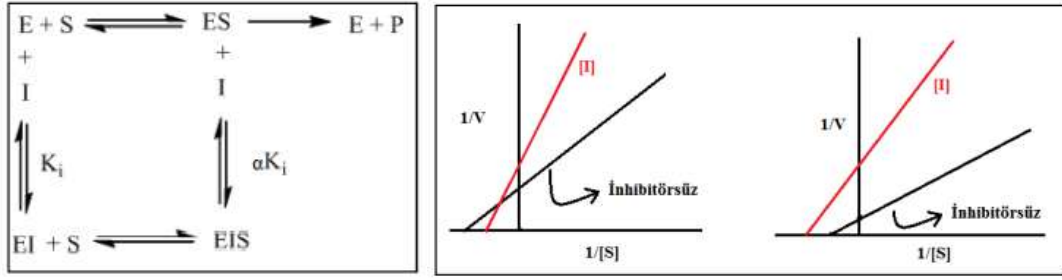
Geri dönüşümlü inhibisyonda kolayca tersine çevrilebilen enzim yüzeyinin çeşitli kısımları ile kovalent olmayan etkileşimler mevcuttur.

1. **Yarışmalı Enzim (Kompetatif) İnhibisyonu:** Bu inhibisyon tipinde inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substrat ile rekabet halindedir. Substrat ve inhibitör arasındaki yapısal benzerlik bulunması ikisinin enzimin aktif bölgesine eş zamanlı bağlanmasını engel olmaktadır. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör ile enzimin bağlanması reversibldir ve substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla inhibisyon derecesi azalmaktadır (124, 126).



Şekil 2. Yarışmalı enzim inhibisyonu (Aynacı'dan, 124)

2. **Yarışmalı Olmayan (Nonkompetatif) Enzim İnhibisyonu:** Bu inhibisyon tipinde, inhibitör ve substrat arasında yapısal benzerlik olmadığı için enzimin aktif bölgesi için bir rekabet bulunmamaktadır. Hem inhibitör hem de substrat enzime farklı bölgelerde bağımsız olarak bağlanmaktadır. Dolayısıyla inhibisyon derecesi, substrat konsantrasyonundaki değişiklikten etkilenmemektedir (124, 126).



Şekil 5. Linear karışık tip enzim inhibisyonu (Aynacı'dan, 126)

2.4.1.2. Geri Dönüşümsüz (İrreversible) Enzim İnhibisyonu

Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonunda tam protein yıkımı sırasında bile sıklıkla devam eden, enzim yüzeyindeki farklı fonksiyonel gruplarla güçlü kovalent bağlar oluşturan etkileşimler bulunmaktadır. Böylece enzim kalıcı olarak inaktif hale gelmektedir (127).

2.5. Tirozinaz Enzimi ve İnhibitörleri

Tirozinaz (EC 1.14.18.1), monofenollerin ilgili katekollere o-hidroksilasyonunu (kresolaz aktivitesi) ve buna müteakip o-kinonlara oksidasyonunu (katekolaz aktivitesi) katalize eden bakır içeren bir monooksijenazdır. Tirozinaz, monooksijenaz ve oksidaz aktiviteleri sergileyerek iki oksidasyon mekanizmasında yer alması ve deoksi-, oksi-, met- ve deact-tirozinaz olmak üzere dört ayrı okside formuna sahip olmasıyla karakterize bir enzimdir. Fenolazlar, fenol oksidazlar, katekol oksidazlar olarak da adlandırılan tirozinaz enziminin en yaygın kullanılan genel tanımı polifenol oksidazdır. Tirozinaz terimi, substrat olan tirozine atıfta bulunmaktadır (128, 129).

Tirozinazın memelilerde pigmentasyona katkıda bulunan melanin biyosentezinde de kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. İnsan deri, saç ve göz pigmentasyonunda başlıca sorumlu ana pigment olan melaninler, melanogenez yoluyla üretilmektedir. Melanin sentezi, tirozinin melanogenezin ilk adımı olan L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonunu katalize etmesi ile başlamaktadır (130, 131). Daha sonra kendiliğinden devam eden siklizasyon, dekarboksilasyon ve oksidatif polimerizasyon gibi spontan reaksiyonlar sonucu melanin sentezlenmektedir. Bunun yanı sıra tirozinazın, pigmentasyon, sklerotizasyon, birincil bağışıklık tepkisi ve konak savunması gibi birçok temel biyolojik işlevden de sorumlu olduğu bilinmektedir (132).

2.5.1. Tirozinaz İnhibitörleri

Melanogenez ve esmerleşme sürecinde tirozinazın kritik rolü nedeniyle, bu zamana kadar yapılan çalışmalarda hem doğal hem de sentetik kaynaklardan elde edilen bir dizi tirozinaz inhibitörü tanımlanmaktadır (133). Bununla birlikte “tirozinaz inhibitörü” tanımı bazı araştırmacılar tarafından herhangi bir doğrudan inhibitör/enzim etkileşiminden bağımsız olarak melanin oluşumuna bir miktar müdahalede bulunan melanogenez inhibitörlerine atıfta bulunmak için kullanılmaktadır (128). Tirozin inhibitörleri kimyasal yapılarına ve inhibitör mekanizmalarına göre çeşitlilik göstermekte olup birçok türevleri mevcuttur.

Tirozinaz inhibitörlerinin en büyük grubu olan polifeneoller yapısında birden fazla fenolik grubun bulunduğu bileşiklerdir. Flavonoidler, fenoller ve piran halkalarından oluşan ve bitkilerin yapraklarında, tohumlarında, kabuğunda ve çiçeklerinde bulunan polifenol türevlerinden biridir. Altı ana gruba ayrılmaktadırlar: flavonoller, flavonlar, flavonoller, flavononlar, izoflavonlar ve antosiyanidinler. Bitkilerde bu bileşiklerin UV radyasyonuna, patojenlere ve otoburlara karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Ayrıca meyvelerin, şarapların ve bazı sebzelerin karakteristik kırmızı ve mavi renklerinden de sorumludurlar. Doğal tirozinaz inhibitörlerinin en büyük kısmını flavonoidler oluşturmaktadır (134).

Flavonoidlerin tirozinaz inhibitörleri ile uyumlu bir yapı içinde yer almakta olup yapılan çalışmalarda bazı flavonoidlerin oldukça güçlü inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur (134).

Yapılan literatür çalışmalarında kaempferol, kuersetin ve morin gibi bazı flavonoidlerin tirozinaza karşı inhibitör aktivite sergilediği görülmektedir. Bunun yanı sıra kateşin ve ramnetinin enzim substratı gibi hareket ederek tirozinaz aktivitesini baskıladığı da bilinmektedir (135).

Kojik asit farklı mantar türlerinden elde edilen bir tirozinaz inhibitörüdür. Kojik asidin tirozinaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisi, enzimin aktif bölgesindeki bakır ile şelat oluşturabilmesinden kaynaklanmaktadır. Kojik asit, monofenolaz aktivitesi üzerinde yarışmalı bir inhibitör etki ve difenolaz aktivitesi üzerinde karışık bir inhibitör aktivite sergilemektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda türevlerinin birçoğu, güçlü bir tirozinaz inhibitör aktivite gösterdiği de gözlenmektedir. Ayrıca DOPA, norepinefrin ve dopamin

tirozinaz enzimi tarafından oksitlendiğinde, kojik asitin pigmentli bileşiklerin oluşum hızını etkili bir şekilde engellediği bilinmektedir (135-137).

Birçok sayıda bitkiden izole edilen benzaldehit ve benzoat türevi bileşikler olan benzoik asit, benzaldehit, anisik asit, anisaldehyt, sinamik asit, p-kumarik asit, metoksisinamik asit ve vanilik asit bileşiklerinin de antitirozinaz aktivite gösterdiği bilinmektedir. Benzaldehit inhibitörlerinin tirozinaz inhibitör mekanizması, enzimde birincil amino grubu ile bir Schiff bazı oluşturma yeteneklerinden gelmektedir. Benzoat inhibitörleri ise inhibitör aktivite sergilerken enzimin aktif bölgesindeki bakır şelatlama yeteneğini kullanmaktadır. Birçok bitki türünden elde edilen gallik asit, tirozinaz inhibe edici aktivite göstermekte olup askorbik aside benzer bir redoks döngüsü yoluyla dopakinonu tekrar L-DOPA'ya indirgenmesinde rol oynamaktadır (135).

2.5.2. Tirozinaz İnhibitörlerinin Kullanım Alanları

Tirozinaz enziminin yapısal ve işlevsel motifi nedeniyle gıda, sağlık, kozmetik gibi birçok alanda yaygın olarak kullanımı bulunmaktadır.

Tirozinaz inhibisyonun en yoğun çalışılan alanı hiperpigmentasyonun tedavisidir. Bir cilt problemi olan hiperpigmentasyonun tedavisinde, derideki melanin seviyesinin düşürülmesi hedef alınmaktadır. Tirozinaz inhibitörü olarak aktivite sergileyen kojik asit, kozmetik cilt beyazlatma maddesi olarak ve enzimatik esmerleşmeyi önlemek için bir gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (138, 139).

Enzimatik esmerleşme, besin değerleri ve güvenilirliği üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu için çoğu taze meyve ve sebzede önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu sebeple enzimatik esmerleşmenin önlenmesi, gıdaların kalitesini ve güvenliğini artırmak gıda endüstrisinde amaçlanan birincil hedefler arasındadır. Bitki ve mantar tirozinaz inhibitörleri, meyve, sebze veya mantarların işlenmesi ve depolanması sırasında meydana gelen istenmeyen esmerleşmeyi önleyebilmektedir. Bu nedenle tıbbi tedavi ve gıda endüstrisinde ekonomik açıdan büyük bir öneme sahiptirler (140, 141).

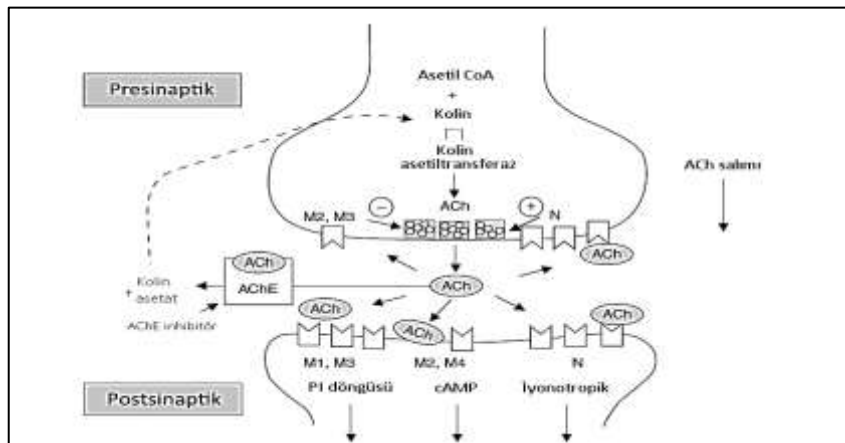
2.6. Asetilkolin Metabolizması

Merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan kolinerjik sistem, vücutta çeşitli karmaşık işlevleri yerine getiren bir ağı temsil etmektedir. Beynin başlıca omurilik, arka beyin, medial habenula, mezopontin bölge, bazal ön beyin, striatum, koku alma tüberkülünde bulunmaktadır. Asetilkolin (ACh), kolinasetiltransferaz (ChAT),

kolinesterazlar (asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE)) ve kolinerjik reseptörler kolinerjik sistemin ana bileşenlerini oluşturmaktadır.

Ach, tanımlanan ilk nörotransmitterdir. Periferik ve merkezi sinir sistemlerinde bulunan tüm kolinerjik nöronların kullandığı bir nörotransmitter olan asetilkolinin, nöromodülatör olarak da hareket eden çok işlevli bir molekül olduğu da bilinmektedir. ACh üreten kolinerjik nöronlar beyinde, özellikle beyin sapı, bazal ön beyin ve stratumda bulunmaktadır (142-144).

Ach, kolinerjik nöronların sitoplazmasında ChAT enzimi tarafından kolin ve asetilkoenzim A'nın (asetil-CoA) birleştirilmesi ile sentezlenmektedir (143). Kolinin çoğunluğu başta lesitin olmak üzere lipidlerin parçalanması ve Ach'in hidrolizi ile oluşurken, asetil-CoA mitokondrilerde gerçekleşen hücresel solunumun bir yan ürünü olarak açığa çıkmaktadır. Sentezlenen ACh nörotransmitter veziküler asetilkolin taşıyıcı (VACHT) tarafından sitozolden sinaptik veziküllere taşınarak depolanmaktadır. Nörona sinir iletimi geldiğinde ACh sinaptik boşluğa salınarak postsinaptik reseptörlere bağlanmakta ve sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılmaktadır. Postsinaptik reseptörden ayrılan ve reseptörlere bağlanmayıp ortamda bulunan ACh molekülleri ortadan kaldırılmak üzere AChE tarafından yıkılarak hidrolize uğramaktadır. Hidroliz sonucu açığa çıkan kolin tekrardan ACh sentezinde kullanılmak üzere nörona gönderilmektedir (144, 145).



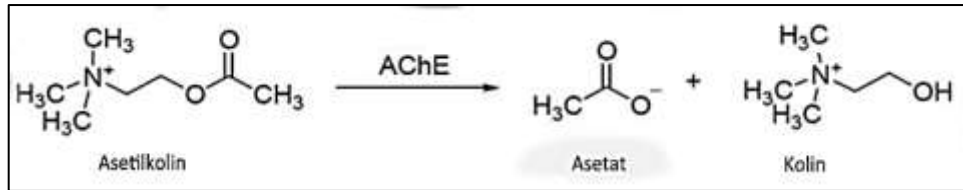
Şekil 6. Asetilkolin metabolizması (Wilkinson'dan, 146)

Ach'in bir organizma içindeki aktivitelerindeki farklılık, bu nörotransmitterin çeşitli hücre ve dokuların yüzeyindeki bağlandıkları reseptörlere ve bunlara bağlanma şekline göre açıklanabilmektedir (147).

2.6.1. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar kolin esterlerini hidrolize eden hidrolaz sınıfına ait bir enzim ailesidir. Omurgalılarda asetilkolinesteraz (AChE; E.C 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BChE; E.C 3.1.1.8) olmak üzere iki tip kolinesteraz bulunmaktadır. Bu iki tip kolinesteraz genetik, yapı ve kinetik bakımdan birbirinden farklılık göstermektedir. Kolinesterazların substratları için özgülüğü, kolin esterlerinin hidrolizi sırasında kolin kalıntısını bağlayan bir 'anyonik bölgenin' varlığından gelmektedir (148, 149, 150).

AChE, kolinerjik ve nöromüsküler sinapslarda Ach'i hidrolize eden sinir sisteminin en etkili enzimlerinden biridir. Burada ACh'in hızlı bir şekilde kolin ve asetata yıkımını sağlayarak kolinerjik sinir iletiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. AChE kolinerjik iletimdeki klasik rollerinin yanı sıra, hücre proliferasyonu, farklılaşması, stres ve amiloid oluşumu gibi birçok farklı reaksiyonda da yer aldığı bilinmektedir. Vücutta sinir dokusunda, kaslarda, plazma ve kan hücrelerinde bulunmaktadır (148, 151).

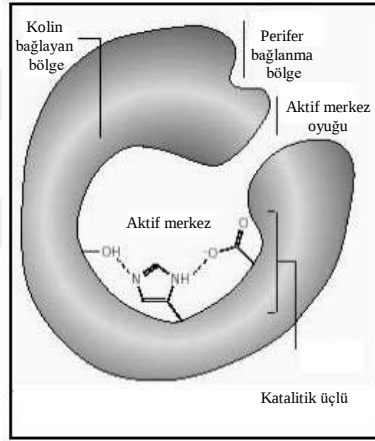


Şekil 7. Asetilkolinin hidrolizi (Koçancı'dan, 144)

AChE ile karşılaştırıldığında, BChE'nin biyolojik rolü hala belirsizliğini korumaktadır. Plazmatik kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak da bilinen bütirilkolinesteraz, asetilkolinesteraz aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı veya engellendiği koşullar altında Ach'i metabolize eden bir yedek sistem olarak hareket edebilmektedir. BChE karaciğer, bağırsak, kalp, böbrek ve akciğerde en yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (146, 150).

Aktif bölgenin ve katalitik mekanizma açısından diğer enzimlere göre farklılık gösteren asetilkolinesteraz kuaterner yapıda karmaşık bir moleküler polimorfizm

göstermektedir. Enzimin aktif bölgesi, katalitik üçlüye (Ser-His-Glu) sahip esterik alt bölge (aktif bölge) ve Ach'in pozitif dörtlü kutbunu barındıran perifer al anyonik alt bölge (PAS) olmak üzere iki alt bölgeden oluşmaktadır. Esterik alt bölge, Ser 200, His-440 ve Glu-327 üçlüsünden oluşmakta olup enzimin katalitik aktivitesinden sorumludur. Aktif bölge çukurunun ağız kısmında bulunan perifer al anyonik bölge Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 ve Tyr 334 aminoasit kalıntılarını içermektedir. Bu bölge birçok farklı liganda bağlanma yeteneğine sahip olmakla birlikte katalitik aktivitenin düzenlenmesinde görev almaktadır. Ayrıca enzimin pek çok inhibitör ile etkışimine aracılık etmesi nedeniyle birçok ilaç ve toksinin etki mekanizmasının belirlenmesinde hedef kaynak olarak alındığı bilinmektedir (150-152).



Şekil 8. Asetilkolin (Tripathi'den, 151)

2.6.2. AChE Enziminin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi

Yaşlı insanlarda bunamanın önde gelen formu olan Alzheimer hastalığı, merkezi sinir sisteminin (MSS) çeşitli kısımlarında meydana gelen nöron ve sinaps kayıpları sonucu gelişen bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın genel klinik tablosu; bilişsel işlevlerde azalma, bozulmuş muhakeme, dil bozuklukları, uyku-uyanıklık döngüsü, nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar, öz bakım yetersizlikleri gibi semptomlarla karakterizedir (153, 154).

Yüzyılı aşkın bir süre önce tanımlanan Alzheimer hastalığı, demansın en yaygın nedeni olmakla birlikte tüm demans vakalarının %60-80'ine tekabül etmektedir. Dünya genelinde yaklaşık 50 milyon insan bu hastalıktan muzdariptir ve bu rakamın her 5 yılda

bir ikiye katlanarak 2050 yılına kadar tahmini 115 milyon olması beklenmektedir. Bunun yanı sıra, Alzheimer hastalığının nedeninin ve tedavisinin henüz tam olarak aydınlatılamamış ve geliştirilememiş olması hala toplumlar için bir sorun teşkil etmektedir. Alzheimer hastalığında görülen semptomlarının oluşumu temel olarak kolinerjik sinapslardaki yapısal değişiklikler, ACh reseptörlerinin spesifik alt tiplerinin kaybı, ACh üreten nöronların ölümü ve sonuç olarak kolinerjik sinir iletiminin bozulmasına dayanmaktadır. Kolinerjik sistemde meydana gelen bu değişimlere dayanarak 'kolinerjik hipotez' öne sürülmektedir (149, 155).

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada Alzheimer hastalığının nedenlerinin altında yatan bir dizi farklı patojenik mekanizma tanımlanmaktadır. Hastalığın temeline bakıldığında hücrelerde ACh hidrolize edici enzim olan AChE seviyesinin yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda ölüm sonrası Alzheimer hastalarında ChAT ve AChE gibi kolinerjik belirteçlerin kaybının gözlemlerinden ve geç evre Alzheimer hastalığında demansın derecesi ile kolinerjik anormallikler arasındaki korelasyondan kaynakladığı gözlenmiştir (156).

Amiloid öncü proteinin (APP) aşırı eksprese edilmiş bölünmesine bağlı olarak beta amiloid peptitlerden oluşan hücre dışı plakların birikimi ve bazal ön beyni içeren kolinerjik nöronlara ciddi şekilde zarar veren fosforile tau proteinlerinden oluşan hücre içi nörofibriler yumakların birikimi hastalığın fizyopatolojisi içerisinde yer almaktadır. Bu süreçte meydana gelen kolinerjik nöronların kaybı, Alzheimer hastalığında bilişsel bozukluklara yol açan ACh nörotransmitterinin sinaptik kullanılabilirliğini azaltmaktadır (152).

2.6.3. AChE İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığında Kullanılması

Alzheimer hastalığının patogenezindeki temel olaylar tam olarak anlaşılmamış olsa da nörodejenerasyonun altında yatan biyoloji üzerine atılan birkaç farklı teori, araştırmaları, hastalığın ilerlemesini ve klinik tezahürlerini modifiye etmek, durdurmak veya geciktirmek için yapılan müdahalelere yönlendirmiştir. Yapılan inceleme ve çalışmalar ACh seviyelerinin Alzheimer hastalığının bulguları ile ilişkili olduğu gözler önüne sermektedir. Bunun sonucu olarak da hastalığı tedavi etmeye yönelik son çalışmalar, kolinerjik reseptör agonistleri veya en yaygın olarak AChE inhibitörleri (AChEI'ler) kullanılarak kolinerjik fonksiyonun güçlendirilmesine odaklanmıştır. Kolinesteraz inhibitörleri ACh seviyesini artırıcı etkileri sayesinde hastalığın bilişsel semptomları ve

yaşam kalitesi üzerinde iyileştirici etkiye sahiptirler. Bu ilaçların yaklaşık 1 ila 3 yıl süreyle olumlu etkileri vardır ve hastalığın ilerlemesini durduramamaktadır. Alzheimer tedavisi için çeşitli kimyasal yapıya ve etki mekanizmasına sahip birkaç AChEI kullanılmaktadır. Bu bileşikler kolinesteraz formları için benzersiz özgünlük modellerine sahiptir (146, 148, 157, 158).

Günümüzde hastalığın tedavisinde kullanılan ve Amerikan İlaç Dairesi (FDA) onaylı AChEI'leri Rivastigmin, Donepezil, Takrinin ve Galantamin'dir. Takrinin ve donepezil inhibitörleri sentetik kaynaklıdır. Rivastigmin *Physostigma venenosum*'dan ve galantamin de *Lycoris radiata*'dan elde edilen edilmektedir (144, 159).

2.7. α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimleri

α -Amilaz (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolazlar; EC 3.2.1.1) nişasta, amiloz, amilopektin, glikojen gibi şeker polimerlerinin α -D-(1,4)-glukan bağlarının hidrolizini katalize eden önemli bir sindirim enzimidir. Birçok farklı organizmada yaygın olarak bulunan bu enzimin parotis bezinden salınan tükürük α -amilazı ve pankreastan salınan pankreas α -amilazı olmak üzere 2 izoenzimi bulunmaktadır. Parotis bezinden salınan tükürük α -amilazı nişastayı dekstrin ve maltoza hidrolize ederken pankreas α -amilazı ise nişastayı glukoza kadar parçalamaktadır. Diyetten alınan nişastanın sindirimi ilk olarak ağızda tükürük α -amilazı ile başlamaktadır. Midede düşük pH nedeniyle sindirim durdurulmakta daha sonra yiyecek bolusu mideden ince bağırsağa geçtiğinde pankreatik α -amilaz tarafından sindirim sonlandırılmaktadır (160, 161).

Glukozidazlar, oligosakkaritler veya glikokonjugatlardaki glukozidik bağların hidrolitik bölünmesini katalize eden ve mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bir enzim sınıfıdır. Bazı glukozidaz çeşitleri, şeker molekülündeki hidroksil gruplarının sayısına, konumuna veya konfigürasyonuna bağlı olarak glukozidik bağların bölünmesi için spesifik özellik taşımaktadır. Bu enzim sınıfı içinde yer alan α -glukozidaz, anomerik merkezdeki α -bağları yoluyla bölünme bölgesine bağlanan terminal glukozu içeren glukozidik bağların bölünmesini katalize etmektedir. İnce bağırsak epitelyumunda fırçamsı kenar hücrelerde bulunan α -glukozidazlar karbohidratların sindirim son basamağında görev almaktadırlar (162-164).

2.7.1. α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimlerinin Diyabet ile İlişkisi

Diyabet, yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize bir hastalık olup karbohidrat ve lipid metabolizmasının homeostazının bir pankreas hormonu olan insülin tarafından uygunsuz şekilde düzenlendiği bir durum olarak tanımlanmaktadır. Diyabet ömür boyu süren bir hastalıktır ve dünya popülasyonunda obezite ve yaşlanmanın artmasıyla birlikte diyabetli hasta sayısının hızla arttığı bilinmektedir. Diyabetin en yaygın şekli insüline bağımlı olmayan (Tip 2) diyabettir. Bu hastalığın tedavisi, hastalığa özgü çeşitli faktörler ve yüksek postprandiyal hiperglisemi nedeniyle karmaşıktır. Postprandiyal hiperglisemi, kompleks karbohidratların maltoz ve glukoz gibi basit şekerlere parçalanmasına yardımcı olan bir enzim sınıfı olan amilaz ve glukozidazların etkisiyle yükselmektedir. Postprandiyal plazma glukoz seviyelerini kontrol etmenin en iyi yolu, diyet kısıtlaması ve egzersiz programı ile birlikte ilaç kullanmaktır. Bununla birlikte, diyabet için erken tedavide tokluk hipergliseminin kontrolü kritik öneme sahiptir. Postprandiyal hiperglisemiyi azaltmak için bir terapötik yaklaşım, sindirim sisteminde karbohidratı hidrolize uğratan enzimlerin (α -amilaz ve α -glukozidaz) inhibisyonu yoluyla glukoz emilimini yavaşlatmaktır. Her iki enzim inhibitörünün de glukoz emilim seviyesini azaltma ve sindirim sisteminde glukoz emilimini bozarak karbohidrat sindirim süresini uzatma gibi tokluk kan şekeri üzerinde etkileri bulunmaktadır (165, 166).

α -Glukozidaz inhibitörleri bağırsakta psödo karbohidratlar gibi davranarak α -glukozidaz enzimini yarışmalı ve geri dönüşümlü bir şekilde inhibe etmektedir. Bu enzimler, zayıf emilebilir oligosakkaritler ve polisakkaritlerin bağırsakta kolayca emilen monosakkaritlere dönüşümünü kolaylaştırarak postprandiyal hipergliseminin kontrolünde önemli rol oynamaktadır (166).

Günümüzde postprandiyal hiperglisemiyi azaltmak için kullanılan α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitör ilaçlar grubunda akarboz, miglitol ve voglibose yer almaktadır. Her iki enzimin de oral inhibitörü olan akarboz birinci ve ikinci glukoz molekülü arasında azot bulunduran yapıya sahip bir psödotetrasakkarittir. Bu yapısal özellik, akarboza α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerine bağlanmak için yüksek bir afinite sağlamaktadır. Etki mekanizmasının doymamış siklohekzan halkasına ve glukozidik bağların enzimatik bölünmesi için geçiş durumunu taklit eden glukozidik azot bağlantısına bağlı olduğu bilinmektedir. Akarboz *Actinoplanes* suşları ve *Streptomyces glaucescens*'den üretilmektedir (161, 167, 168).

2.8. Sitotoksosite ve Değerlendirme Yöntemleri

Bazı kimyasal ve biyolojik maddelerin canlı hücreler üzerinde farklı mekanizmalar ile meydana getirdiği toksik etki sitotoksosite olarak tanımlanmaktadır. Sitotoksik etki ile hücrenin yapısında ve fonksiyonlarında hasar meydana gelerek hücreler apoptoza ve nekroza sürüklenmektedir. Sitotoksitenin, karsinogenez ve inflamasyon dahil olmak üzere bir dizi patolojik süreçte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca sitotoksosite serbest radikaller, tahriş edici maddeler ve genotoksinler dahil olmak üzere diğer ajanların aktivitesini de modüle etmektedir (169, 170).

Kimyasallar, ilaçlar ya da kontamine çevresel numuneler tarafından ortaya çıkan toksik etkilerin değerlendirilmesi ve hücre canlılığının tespiti toksikoloji, tıp, ilaç sanayi, ekotoksikoloji gibi birçok alanda önem arz etmektedir (171). Bir maddenin hücresel sistemlerde yarattığı sitotoksik etkilerin ve potansiyelinin saptanması amacıyla sitotoksosite testleri geliştirilmiştir. Sitotoksosite testlerinin değerlendirilmesinde, hücre canlılığı ve proliferasyonu, metabolik aktivite, artan membran geçirgenliği, nükleik asit ve protein sentezi gibi birçok farklı parametre yer almaktadır (172).

Test edilen bileşiğin hücre üzerine maruziyet sonrasındaki toksisitenin değerlendirilmesinde; canlılık değerlendirme testleri, metabolik aktivite değerlendirme testleri ve hücre proliferasyonu değerlendirme testleri kullanılmaktadır (173).

Canlılık değerlendirme testlerinde toksik etkiye maruziyet sonucu hücre canlılığının oranı, artan membran geçirgenliği ile ilişkilendirilerek belirlenmektedir. Bu yöntemde hücre kültürü ortamına eklenen Tripan mavisi, Eozin, Kongo kırmızısı ve Eritrosin B gibi boyalar ile canlı hücrelerin eklenen boyaları dışarıda bırakması, ölü hücrelerin ise bozulan membran bütünlüğü sebebiyle boyaları dışarıda bırakmayarak içeri alması esas alınmaktadır. Basit, ucuz ve boyalı hücrelerin mikroskop altında daha hızlı sayılabilmesi sebebiyle en çok tercih edileni Tripan mavisidir (170).

Metabolik aktivite değerlendirme testleri ile daha çok uzun dönemde meydana gelen toksisite değerlendirilmektedir. Prolifere olan hücrelerde tetrazolyum tuzunun mitokondriyal süreçlerde dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenerek renkli formazan kristalleri oluşması ve meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hücre canlılığı tespit edilmektedir. Hücrelerin mitokondrial aktivitesinin baz alınarak metabolik aktivitenin değerlendirildiği testler içinde MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-

2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür), alamar mavisi ve LDH testleri yer almaktadır (173, 174).

Hücre proliferasyonu değerlendirme testleri materyalden salıverilen çeşitli bileşenlerin hücre kültürü içindeki hücre proliferasyonuna etkisinin saptanmasında kullanılan testlerdir. Hücre proliferasyonunun değerlendirildiği bir yöntem olan ³H-timidin testinde, proliferasyon sırasında uygulanan ve hücre içine alınan radyoaktif ³H-timidinin radyoaktivitesi ölçülmektedir. Radyoaktivite ölçümü ile yeni DNA sentezi yapan hücreler belirlenerek materyalin proliferasyon üzerine etkisi ölçülmektedir (175).

2.8.1. Kanser Tedavisinde Doğal Kaynakların Yeri

Çağın hastalığı olarak adlandırılan kanser, insidansının her geçen sene artması ve mortalite ve morbiditesinin yüksek olması nedeniyle dünya çapında en önemli sağlık problemlerinden biri olarak yer almaktadır. Kanser insidansı ve ölümlerinin büyük bir oranı, yüksek seviyede vücut kitle indeksi, sağlıksız beslenme, alkol ve sigara kullanımı, radyasyona maruz kalma, kronik enfeksiyonlar ve kalıtım gibi farklı çevresel ve genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır (176).

Bu sebeple günümüzde birçok araştırmacı kanserin patofizyolojisi üzerinde çalışarak kanser tedavisinde en etkili tedavi yöntemini aramaktadır. Cerrahi, kemoterapi ve radyasyon kanseri tedavi etmek için bilinen en yaygın tedavi yöntemleridir. Bununla birlikte, bu tedavilere sıklıkla yorgunluk, mide bulantısı ve ağrı gibi yan etkiler ve komplikasyonlar da eşlik etmektedir (177, 178). Son birkaç yıldır, bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin yüksek antikanser etki ve düşük toksisite göstermeleri, hücre üremesini ve anjiyogenezi azaltmaları ve bunun yanı sıra kolayca temin edilebilmeleri birçok araştırmacıyı kemoterapinin yerine antikanser aktiviteye sahip doğal bileşikleri keşfetmeye yönlendirmiştir.

Kansere karşı potansiyel ajan olarak kabul edilen fitokimyasalların, diğer antikanser ilaçlar ile birlikte hareket ederek çoklu ilaca dirençli kanser tedavisinde etkili oldukları bilinmektedir. Bu antikanser ajan ve destekleyici tedavinin bitkilerde bulunan kurkumin, resveratrol, vinorelbin ve bir diterpenoid olan 17-hidroksijolkinolid B gibi bileşiklerden ileri geldiği yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Kamptotesin kurkumin, dosetaksel, irinotekan, lurtotekan, paklitaksel, topotekan ve vinkristin doğal kaynaklardan elde edilen ve kanser tedavisinde etkili olan bileşiklerdir (179).

2.9. Antimikrobiyal Aktivite

Günümüzde mikrobiyal enfeksiyonlar ve antibiyotik ilaçlara karşı direnç gelişimi toplum sağlığını en büyük tehdit edici faktörlerden biri olmaktadır. Mikrobiyal enfeksiyonlar, dünya çapında toplam ölümlerin yaklaşık yaklaşık %17'sinden sorumlu olması sebebiyle büyük sorun teşkil etmektedir. Direnç mekanizmasının gelişmesi, mevcut antibakteriyel ilaçların daha az etkili olmasına ve bu süreçte giderek de etkisiz hale gelmesine neden olmaktadır (180).

Geleneksel tıbbın bilinen başarısı ve doğal kaynaklar üzerine yapılan araştırmalar, ilaca direnç gelişmiş enfeksiyonları ortadan kaldırmak ve antibiyotiğin organizmada meydana getirdiği zararı azaltmak için yeni bileşiklerin bulunmasına öncü olmuştur. Dünyanın farklı bölgelerinde bulunan bitki türleri üzerinde yapılan birçok farklı araştırmalar sonucu bitki ekstraktının ve uçucu yağlarının antimikrobiyal etkisinin bitkiden bitkiye farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu farklılık, bitkinin yetiştiği iklim ve toprak bileşimi, yaş, ekstrakte edilen ürünün kalitesi, miktarı ve bileşimi üzerindeki etkisi, çözücü tipi, farklı bakteri suşları gibi birçok faktöre göre değişkenlik gösterebilmektedir (181-183).

Uçucu yağlar, çiçekler, tomurcuklar, tohumlar, yapraklar, ağaç, meyveler, kökler, dallar ve ağaç kabuğu gibi bitki materyallerinden izole edilen uçucu bileşiklerdir. Uçucu yağların antibakteriyel aktiviteleri uzun zamandır bilinmekte olup bu özelliklerinin yapısındaki fenolik bileşiklerinden kaynaklandığı bilinmektedir (184).

Bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerinden sekonder metabolitlerin sorumlu olduğu görülmektedir. Antimikrobiyal özelliklere sahip başlıca fitokimyasal grupları fenolikler ve polifenoller (flavonoidler, kinonlar, tanenler, kumarinler), terpenoidler, alkaloidler, lektinler ve polipeptitlerdir. Bu bileşiklerin antimikrobiyal yeteneklerinin altında yatan birçok farklı mekanizma bulunmaktadır. Yapılan literatür çalışmalarında karvakrol, timol ve öjenol, sinnamaldehit gibi uçucu yağların mikrobiyal hücre membran yapısını ve hücresel metabolizmayı antimikrobiyal etkiyi gösterdikleri bulunmaktadır. Trans-sinnamaldehit, karvakrol, timol, geraniol biyofilm oluşumu üzerinde; salisilik asit ve türevlerinin bakteriyel kapsül üretimi üzerinde; dihidroi sosteviol, taninin de mikrobiyal toksin üretimi üzerinde etki göstererek antimikrobiyal aktivite sergilemektedir. Bitki metabolitlerinin direnç değiştirici ajanlar (RMA) olarak da hareket ettiği bilinmekte olup

bakteriyel dirençle savaşmanın en olası yollarından biri olarak kabul edilmektedir. Nerolidol ve bisabolol RMA etkili bileşiklerdir (185, 186).

Disk difüzyon, agar dilüsyon ve tüp dilüsyon gibi metotlar antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir (187).

2.10. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımın bileşenlerinin sabit ve hareketli olmak üzere iki fazlı bir ortamda yapı, boyut, yük ve diğer özelliklerinden faydalanarak ayrılmasını sağlayan kalitatif bir analiz yöntemidir. Bu analiz yöntemi, bir karışımın bileşenlerini ayırması yanı sıra bileşenlerinin tanımlanmasını ve saflaştırılmasını da sağlayan önemli bir fiziksel tekniktir (188). Kromatografinin temelinde 3 etkili faktör yer almaktadır.

- **Sabit faz:** Ayrılması istenen bileşenlerin etkileşime girdikleri veya alıkonulma işleminin gerçekleştiği fazdır. Kromatografik işlem için seçilecek olan sabit faz ayrışması istenen bileşenlerin doğasına ve kromatografinin tipine göre değişkenlik göstermektedir. Genellikle düz bir yüzey ya da bir kolon içerisine tutturulmuş şekilde bulunmaktadır.
- **Hareketli faz:** Analizi yapılmak istenen karışımı sabit faz boyunca taşıyan bir çözücüdür. Hareketli faz olarak kullanılan maddeler, numunedeki bileşenlerin doğasına ve sabit fazın tipine göre değişmektedir.
- **Hareketli faz, sabit faz ve analiz edilen maddeler arasındaki etkileşimin türü:** “Çözünürlük” ve “adsorpsiyon” kromatografinin temelini oluşturan kavramlardır (189, 190).

Kromatografik yöntemler faz tiplerine, ayrılma mekanizmalarına ve uygulama biçimine göre sınıflandırılmaktadır.

Tablo 4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması (Eser'den, 191)

Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografiler	• Adsorpsiyon kromatografisi • Partisyon kromatografisi • İyon değiştirme kromatografisi • Jel Filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
Uygulama Biçimine Göre Kromatografiler	• Düzlemsel kromatografi – Kâğıt kromatografisi – İnce tabaka kromatografisi (TLC) • Kolon kromatografisi – Gaz kromatografisi (GC) – Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK)
Faz Tiplerine Göre Kromatografiler	• Sıvı kromatografisi • Sıvı-Katı kromatografisi • Sıvı-Sıvı kromatografisi • Gaz kromatografisi

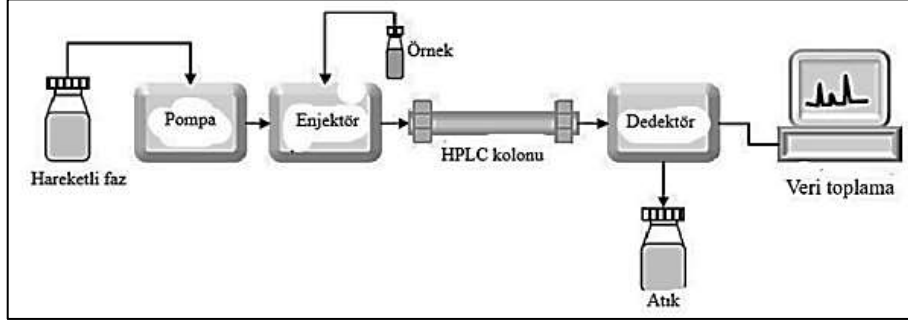
2.10.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

YPSK, bir çözücü içinde çözünmüş bir numunenin katı bir malzeme ile hazırlanmış kolon içerisinden yüksek basınç ile birlikte ilerletilerek ayrıştırılması esasına dayanan analiz yöntemidir. Analiz edilecek olan numune bileşenlerinin kolana enjeksiyonundan detektöre ulaşmasına kadar geçen süre alıkonma süresi olarak adlandırılmaktadır. YPSK'da analitin sabit farz tarafından alıkonma süresi ve kolondan geçiş hızı bileşiğin tanımlanmasındaki esas faktörler olup numune, çözücü ve sabit fazın özelliklerine göre değişkenlik göstermektedir. Buna göre numune karışımının kolondan geçiş sırasında sabit faz ile güçlü etkileşim gösteren analitler diğerlerine göre daha uzun alıkonma süresi sergileyip daha yavaş çıkarken, kolon malzemesi ile daha az etkileşim özelliğine sahip analitler kısa bir alıkonma süresi gösterip hızlı bir şekilde ayrılmaktadır. Kolonda gerçekleşen ayrışma işleminden sonra kolondan ayrılan analitler detektörden geçmektedir. Daha sonra detektör vasıtasıyla analitlere ilişkin üretilen sinyal analiz verileri bilgisayar programına aktarılmaktadır (190, 192).

Bir YPSK sistemi;

- Numunenin enjektör, kolon ve detektörden belirli bir sabit hızda geçişini sağlayan pompa sistemi,
- Sıvı numunenin hareketli faza enjekte edilmesinde kullanılan enjektör sistemi,
- Analitlerin ayrılma işleminin gerçekleştiği yer olan kolon,

- Kolondan çıkan analitin miktarına ilişkin sinyal üreten dedektör,
- Dedektörden alınan sinyallerin kaydedildiği veri sistemi bileşenlerinden oluşmaktadır (193, 194).



Şekil 9. YPSK cihazının şematik gösterimi (Giri'den, 193)

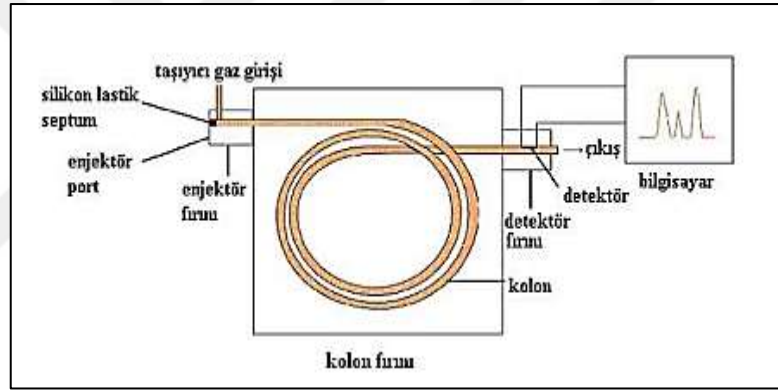
YPSK yönteminin normal faz ve ters faz kromatografisi olmak üzere iki çalışma şekli bulunmaktadır. Normal fazda polar bir sabit faz ve apolar bir hareketli faz bulunmaktadır. Ters fazda adından anlaşılacağı üzere tam tersi bir durum söz konusu olup günümüz YPSK çalışmalarında daha çok tercih edilmektedir. Normal faz kromatografisinde polaritesi yüksek olan solventler polar molekülleri diğer bileşenlere göre sabit fazdan hızlıca uzaklaştırmaktadır. Ters faz kromatografisinde ise hidrofobik solventler apolar molekülleri benzer yapıya sahip olduğu için sabit fazdan daha kolay bir şekilde uzaklaştırmaktadır (190, 194).

2.10.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Gaz kromatografisi, gaz ve uçucu karışımları ayırmak için kullanılan en etkili kromatografik tekniktir. Analitik kimyada yaygın olarak kullanılan bu yöntemde analiz edilecek gaz veya buhar numunesi, bir taşıyıcı gaz ile kromatograftan geçirilmektedir. Taşıyıcı gaz, numunenin doğasına ve kullanılacak dedektör çeşidine göre değişkenlik göstermekte olup genellikle helyum, hidrojen ve azottur. Sabit faz ise inert katı bir yüzey üzerinde yer alan tepkimeye girmeyen sıvı bir tabakadan oluşmaktadır. Gaz veya buhar karışımı kolon boyunca taşıyıcı gaz ile sabit bir akımda taşınırken burada çözünürlük, adsorbsiyon ve kimyasal bağ gibi faktörler sebebiyle farklı kuvvetlerde sabit faza tutunarak birbirinden ayrılmaktadır. Sabit faz tarafından alıkonma sürelerine bağlı olarak kolondan farklı zamanlarda çıkışı gerçekleşen komponentlerin çıkışı grafiksel veya elektronik olarak kaydedilebilen bir dedektör vasıtasıyla ölçülmektedir (195-197).

Bu yöntem ile uçucu halde bulunmayan katı ve sıvı karışımların da analizi mümkündür. Ayrımı yapılacak olan numunenin öncelikle gaz veya uçucu gaz haline getirilmesi gerekmektedir. Bunun için bileşenlerin trimetilsilil açıl veya ester gibi türevleri hazırlanarak kaynama noktasının düşürülmektedir. Ayrıca alev iyonizasyon detektörü ve elektron yakalama detektörü sayesinde çok düşük konsantasyonda bile bulunan bileşenler gaz kromatografisi ile kantitatif analiz edilebilmektedir. Bir karışımdaki bileşenlerin bu yöntem ile analiz edilebilmesi için, termal kararlılığının yüksek, buharlaşabilir ve gaz fazı halinde kararlı olması, hareketli faz (taşıyıcı gaz) ile ve analizi yapılacak olan diğer bileşenler ile herhangi bir reaksiyona girmemesi gerekmektedir (190).

Gaz kromatografisi, taşıyıcı gaz kaynağı, enjeksiyon portu, kolon, dedektör, kayıt edici ve yazıcı bileşenlerinden oluşmaktadır (198).



Şekil 10. Gaz kromatografisinin şematik gösterimi (Öksüz'den, 198)

GC-MS'in uçucu yağlar, hidrokarbonlar gibi birçok bileşenden oluşan karışımların ayrıştırılmasında kullanılmasının yanı sıra kirlilik çalışmaları, adli tıp çalışmaları ve genel izleme çalışmalarında kullanılması gibi çok yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır. Polar olmayan bileşenlerin, uçucu yağ, yağ asitleri, lipidler ve alkaloidlerin GC-MS çalışmaları ile analizlerinin yapılması sonucu bu yöntemi tıbbi bitkilerinin analizinde daha popüler hale getirmiştir (197).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bitkinin Toplanması, Teşhisi, Kurutulması ve Öğütülmesi

H. nitidum Erzincan ili Pöske Dağı'ndan 2100 m yükseklikten 2019 yılının temmuz ayında toplanmıştır. Bitkinin teşhisi Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitkinin herbaryum örneği Erzincan Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda saklanmakta olup herbaryum numarası 6661'dir.

Bitkinin toprak üstü kısımları serin ve gölge bir alanda kurutulduktan sonra tez çalışmalarında kullanılmak üzere öğütücü değirmen yardımıyla iyice toz haline getirilmiştir.

3.2. Bitkinin Ekstraksiyonu

Çalışma kapsamında iki ayrı solvent (su ve metanol) kullanılmıştır. Bu çözücüler ile elde edilen karışımların ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstratlar biyolojik aktiviteleri çalışmalarında kullanılmıştır. Bitkinin değirmende toz haline getirilmiş olan toprak üstü kısımlarından 500'er g alınarak 1000 mL çözücü (metanol/saf su) ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda bir gece boyunca ekstraksiyona bırakılmış ve ardından süzölmüştür. Maserasyon işlemi 3 kez tekrarlanmış olup elde edilen süzöntüler birleştirilmiştir (199, 200). Metanol ekstresi için elde etmek için evaporatör yardımıyla 30 °C'de evaporatör yardımıyla kuruluğa kadar uçurulmuş ve 31,12 g ham ekstre elde edilmiştir. Su ekstresi elde etmek için de liyofilizatörde kurutma işlemi yapılmış olup 11,09 g kuru ekstre elde edilmiştir.

3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bitkiden elde edilen su ve metanol ekstratlarından, antioksidan testler kapsamında Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini, Toplam Flavonoid Madde Miktarı Ölçümü, Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Ölçümü, Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini ve DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini; enzim inhibisyonu kapsamında tirozinaz, bütirikolinesteraz, asetilkolinesteraz, α -glukozidaz ve α -amilaz inhibitör aktivite tayinleri; antimikrobiyal aktivite testleri kapsamında agar kuyucuk difüzyon ve minimal inhibisyon testleri; sitotoksikite çalışmaları kapsamında MTT testi ve fitokimyasal çalışma kapsamında YPSK ve GC-MS analiz çalışmaları bir arada çalışılmıştır.

3.3.1. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasal malzeme ve maddeler Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan kimyasal malzeme ve maddeler

Kimyasal Adı	Marka	Kimyasal Adı	Marka
AlCl ₃	Merck	IKI	Merck
Akarboz	Acros Organics	Kojik asit	Sigma-Aldrich
Asetilkolin iyodür	Sigma-Aldrich	Na ₂ CO ₃	Tekim
Asetilkolinesteraz	Sigma-Aldrich	Metanol	Sigma-Aldrich
Bütirilkolin iyodür	Sigma-Aldrich	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Bütirilkolinesteraz	Sigma-Aldrich	NaHPO ₄	Sigma-Aldrich
BHT	Kimetsan	Nişasta	Sigma-Aldrich
DTNB	Sigma-Aldrich	PNPG	Sigma-Aldrich
DPPH reaktifi	Sigma-Aldrich	TPTZ	Fluka
FeCl ₃	Tekim	Tirozinaz	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	Troloks	Sigma-Aldrich
Gallik asit	Merck	α -amilaz	Sigma-Aldrich
Glutasyon	Sigma-Aldrich	α -glukozidaz	Sigma-Aldrich
HCl	Tekim		

3.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözeltiler	Hazırlanışı
Gallik Asit (0.5 mg/mL)	1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan 1 mL stok çözeltisinden hareketle metanol ile seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi sonucu 0.5-0.25-0.125-0.0625-0.03125 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır.
0.2 N Folin-Ciocalteu	Hazır olarak satın alınmış Folin-Ciocalteu reaktifinden (2 N) 1:10 oranında seyreltme yapılarak (saf su ile) hazırlanmıştır.
Na ₂ CO ₃ (%7.5'luk)	7.5 g Na ₂ CO ₃ 90 mL su içerisinde çözülerek daha sonradan 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Kuersetin (10 mg/mL)	10 mg/mL olarak hazırlanan stok çözeltisinden hareketle 5-2.5-1.25-0.625 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.
AlCl ₃ (%0.2'lik)	1 g AlCl ₃ 50 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
HCl (100 mM)	25 mL saf su üzerine 205 µL HCl'den (%37'lik) ilave edilmiştir. Daha sonra saf suyla birlikte 100 mL'ye tamamlanmıştır.
TPTZ (10 mM)	TPTZ (46.8 mg) 6 mL 100 mM'lik HCl'de çözülmüştür. Daha sonra 9 mL metanol eklenerek çözelti hazırlanmıştır.
FeCl ₃ (20 mM)	FeCl ₃ (48.6 mg) 6 mL saf su içinde çözülmüştür. Daha sonra çözelti üzerine 9 mL metanol eklenmiştir.
Asetat Tamponu (pH 3.6-300 mM)	2.325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edilerek hazırlanan karışımın hacmi saf suyla 750 mL'ye tamamlanmıştır.
FRAP Reaktifi	Kullanılmadan önce taze hazırlanmıştır. Asetat tamponu (300 mM pH 3.6), TPTZ (10 mM) ve FeCl ₃ (20 mM) sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılmıştır.
Troloks (1000 µM)	2.5 mg tartılan troloks standardı 10 mL etanol içinde çözülen hazırlanan stok çözeltisinden 1000-500-250-125-62.5 µM konsantrasyonlarında olacak şekilde etanolük çözeltileri hazırlanmıştır.
CuCl ₂ .2H ₂ O (10 mM)	92.4 mg CuCl ₂ .2H ₂ O bir miktar su içerisinde çözülmüş ardından hacmi 50 mL'ye tamamlanmıştır. (NaOH ile pH 7 olacak şekilde ayarlanmıştır.).
NH ₄ CH ₃ COO- (1M)	3.8 g CH ₃ COONH ₄ bir miktar saf su ile çözülmüş ve hacmi 50 mL'ye tamamlanmıştır. (pH:7'ye NaOH ile ayarlandı).
Nc Çözeltisi (7.5 mM)	78 mg Neokuproin 50 mLmetanol ile çözülerek hazırlanmıştır.
DPPH• Reaktifi (100 mM)	3.94 mg DPPH• 90 mL metanol içinde çözülmüş ardından çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.
BHT (10 mg/mL)	0.1 mg tartılan BHT standardı 10 mL metanol içinde çözülmüş ardından stok BHT çözeltisinden 10-5-2.5-1.25-0.625 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri metanolle 1:1 oranında seyreltme yapılarak hazırlanmıştır.
L- DOPA çözeltisi (2.5 mM)	10 mL fosfat tamponu çözeltisinde (pH 6.8) 0.004925 g L-DOPA çözülerek hazırlanmıştır.
Kojik asit standardı (500 µg/mL)	2.5 mg kojik asit tartılmıştır. Ardından 5 mL fosfat tamponu çözeltisi içinde çözülerek tampon çözelti ile seyreltme işlemleri yapılarak farklı konsantrasyonda (500-100-50-25 µg/mL) çözeltileri hazırlanmıştır.
Asetiltiyokolin iyodür (15 mM)	32.8 mg asetiltiyokolin iyodür tartılmış ve 8 mL distile suda çözülmüştür. Daha sonra 8 mL fosfat tamponu ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
Bütiriltiyokolin iyodür (15 mM)	8 mL distile su içinde 4 mg asetiltiyokolin iyodür çözülmüştür. Daha sonra üzerine 8 mL fosfat tamponu eklenmiştir.
Asetilkolinesteraz	0.2 mg tartılan asetilkolinesteraz enzimi 3 mL fosfat tamponunda (pH 8) çözülerek hazırlanmıştır.
Bütirilkolinesteraz	0.2 mg tartılan bütirilkolinesteraz enzimi 1.8 mL fosfat tamponunda (pH 8) çözülerek hazırlanmıştır.
DTNB çözeltisi (10 mM)	4 mL fosfat tamponunda (pH 7) 7.5 g NaHCO ₃ ve 16 g DTNB çözülmüş ardından üzerine 4 mL fosfat tamponu (pH 8) ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
Fosfat Tamponu (pH 8)	8.75 g tartılan sodyum fosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O) 950 mL distile suda çözülmüştür ardından 1N NaOH çözeltisi ile birlikte pH derecesi 8'e ayarlanmıştır. Daha sonra tampon hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Marka
Rotary evaporatör	Heidolph Hei-VAP Precision
Hassas terazi	OHAUS Pioneer
İnkübatör	Memmert
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph MR
Öğütücü Değirmen	Spice Herb Grinder
pH metre	Hanna Instruments
Spektrofotometre cihazı	BMG Labtech Spectrostar Nano
Ultrasonik Su Banyosu	Isolab
Vorteks	Heidolph Reax Top Vortex Mixer
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf

3.3.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Türlerin antioksidan kapasiteleri Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini, Toplam Flavonoid Madde Miktarı Ölçümü, Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Ölçümü, DPPH Radikalı Giderme Aktivitesi Tayini ve Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini ile test edilmiştir.

3.3.4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Bu yöntemin esası alkali ortamdaki elektronların fenolik bileşiklerden ve diğer indirgeyici türlerden molibdene transferi sonucu 750-765 nm’de maksimum absorpsiyon gösteren mavi renkli kompleksin oluşmasına dayanmaktadır (201). Çalışmada ilk olarak standart olarak kullanılan gallik asitin farklı konstantrasyonlardaki (500, 250, 125, 62.5 ve 31.25 µg/ mL) çözeltileri hazırlanmıştır. Test çözeltisi olarak 10 mg/ mL olarak hazırlanmış metanol ve su ekstraktları kullanılmış ve 3 paralel olarak çalışılmıştır. Deneyde kör olarak da her numune çözeltisinin kendi çözücüsü kullanılmıştır. Deneyde sırasıyla;

- Numune çözeltisinden 50 µL alınarak test çözeltilerine ve numune körü tüplerine, gallik asit çözeltilerinden de 50 µL alınarak standart körüne ve standart tüplerine pipetleme işlemi yapılmıştır.

- Reaktif körüne de numune ve standardın çözücülerinden 50 µL pipetlenmiştir.
- Tüm tüplere 2.5 mL distile su eklenmiştir.
- 20 sn aralıklarla test çözeltilerine, reaktif körü tüpleri üzerine 250 mL FCR eklenerek vortekslenmiştir.
- 20 sn aralıklarla standart ve numune körü tüplerine 250 µL distile su eklenerek vortekslenmiştir.
- Oda sıcaklığında 3 dk bekledikten sonra tüm tüplere 750 µL %20'lik Na₂CO₃ eklenerek vorteksleme işlemi tekrarlanmıştır.
- Bütün tüpler oda ısısında 2 saat bekletilerek spektrofotometre ile 765 nm'de absorbansları ölçülmüştür.

Gallik asit çözeltisinin farklı konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri baz alınarak standart çalışma grafiği çizilmiştir. Bitki ekstralarının toplan fenolik madde miktarı standart çalışma grafiğine göre gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonuçları mg GAE/g ekstre ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

3.3.4.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

H. nitidum ekstralarının toplam flavonoid madde miktarı tayini Arvout-Grand ve ark.'larının yöntemi esas alınarak yapılmıştır (202). Çalışmanın standardı kuersetin olarak belirlenmiş olup 0.625-1.25-2.5-5.0-10 mg/mL olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Numune çözeltisi olarak 10 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmış metanol ve su ekstraları kullanılmıştır. Deneyde sırasıyla;

- Numune çözeltisinden 1 mL alınarak test çözeltilerine ve numune körü tüplerine, kuersetin çözeltilerinden de 1 mL alınarak standart körüne ve standart tüplerine pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Reaktif körüne de numune ve standardın çözücülerinden 1 mL pipetlenmiştir.
- Daha sonra standart, numune tüplerine ve reaktif körüne 1 mL AlCl₃ ilave edilmiştir.
- Standart ve numune körlerine de 1 mL saf su ilave edilmiştir.
- Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk beklenmiştir. İnkübasyon sürecinin ardından absorbanslar değerleri spektrofotometre ile 430 nm'de tespit edilmiştir.

- Okunan absorbans değerlerine göre standart çalışma grafiği çizilmiş olup ekstraların toplam flavonoid madde miktarları kuersetin standardı eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonuçları mg QE/g cinsinden $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur.

3.3.4.3. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Ferrik indirgeyici antioksidan güç tayininde, antioksidan madde varlığında Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazin) kompleksinin indirgenmesiyle mavi renkli bir bileşik olan ve 595 nm’de maksimum absorbans veren Fe(II)-tripiridil triazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksinin oluşmasına esas alınmıştır (203). Çalışmada öncelikle 10 mg/mL konsantrasyonunda bitki ekstresi numuneleri ve standart olarak kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda (62.5, 125, 250, 500, 1000 μ M) Troloks çözeltileri hazırlanmıştır. FRAP reaktifi taze hazırlanmış olup çalışma süresi boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilerek stabilitesi korunmuştur. Deneyde sırasıyla;

- Numune çözeltisinden 50 μ L alınarak test çözeltilerine ve numune körü tüplerine, troloks çözeltilerinden de 50 μ L alınarak standart körüne ve standart tüplerine pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Reaktif körüne de numune ve standardın çözücülerinden 50 μ L pipetlenmiştir.
- Test çözeltilerine ve reaktif körü tüplerine 20 sn aralıklarla 1.5 mL FRAP reaktifi pipetlenmiştir.
- Numune ve standartların çözücülerinden 1.5 mL alınarak numune ve standart körü tüplerine 20 sn aralıklarla pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Oda sıcaklığında 20 dk bekledikten sonra spektrofotometrede 595 nm’de absorbansları ölçülmüştür.

Elde edilen çalışma grafiğine göre FRAP değerleri Troloks ile karşılaştırılarak g numune başına μ M olarak hesaplanmıştır.

3.3.4.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

CUPRAC metodunun esası, bir yükseltgen olan Cu(II)-Nc’nin, antioksidan madde varlığında 450 nm’de maksimum absorbans veren [bakır(I)- neokuproin (Cu(I)-Nc)] kompleksini oluşmasına dayanmaktadır (116). Çalışmada 10 mg/mL konsantrasyonunda bitki ekstresi numuneleri ve standart olarak kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda (62.5, 125, 250, 500, 1000 μ M) Troloks çözeltileri hazırlanmıştır.

- Numune çözeltisinden 500 μL alınarak test çözeltilerine ve numune körü tüplerine, troloks çözeltilerinden de 500 μL alınarak standart körüne ve standart tüplerine pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Reaktif körüne de numune ve standardın çözücülerinden 500 μL pipetlenmiştir.
- Daha sonra tüm tüplere 1000 μL $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}^-$ ve 1000 μL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pipetlenmiştir.
- Test çözeltilerine ve reaktif körü tüplerine 20 sn aralıklarla 1000 μL Nc reaktifi pipetlenmiştir.
- Numune ve standartların çözücülerinden 1000 μL alınarak numune körü tüplerine 20 sn aralıklarla pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekledikten sonra spektrofotometrede 450nm'de absorbansları ölçülmüştür.

Elde edilen çalışma grafiğine göre CUPRAC değerleri Troloks ile karşılaştırılarak g numune başına μM olarak hesaplanmıştır.

3.3.4.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

DPPH radikal çözeltisi, hidrojen atomu verebilen bir antioksidan molekül ile karıştırıldığında, radikalın indirgenmiş formuna ve çözeltinin karakteristik özelliği olan menekşe renginin kaybına yol açmakta ve çözelti renginde meydana gelen renk kaybı yüksek süpürme kapasitesini ifade etmektedir (113).

Çalışmada DPPH radikalının metanol ile hazırlanmış 100 μM 'lık ticari formu kullanmıştır. Çalışmanın standartı olarak BHT kullanılmış olup metanol ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (0.000625-0.00125-0.0025-0.005-0.01 mg/mL) çözeltileri hazırlanmıştır.

Deneye başlamadan önce numunelerin analiz uygun konsantrasyonlarını saptamak amacıyla ön deneme çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan numune ve DPPH çözeltilerinden eşit oranda alınarak 40 dk beklenerek renk değişimi süreci gözlenmiştir. Radikalın karakteristik rengi olan mor menekşe renginin kalıcı olarak kaldığı konsantrasyon bulunana kadar seyreltme yapılarak uygun numune konsantrasyonu bulmaya çalışılmıştır. Deneyde sırasıyla;

- Numune çözeltisinden 750 µL alınarak test çözeltilerine ve numune körü tüplerine, BHT çözeltilerinden de 750 µL alınarak standart körüne ve standart tüplerine pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Reaktif körüne de numune ve standardın çözücülerinden 750 µL pipetlenmiştir.
- Test çözeltileri ve reaktif körü tüplerine 750 µL DPPH çözeltisi pipetlenerek vortekslenmiştir.
- Numune körüne DPPH çözücüsü olarak 750 µL metanol pipetlenerek vortekslenmiştir.
- Vorteksleme işleminden sonra tüm tüpler oda sıcaklığında ilk pipetleme işleminden itibaren 55 dk bekletilmiş ve spektrofotometrede 517 nm’de aborsbansları ölçülmüştür.
- Konsantrasyonlarına karşı bulunan absorbans değerlerine göre standart çalışma grafiği çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.3.5. Enzim İnhibisyonu Çalışmaları

3.3.5.1. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Tayini

Bitki ekstralarının tirozinaz inhibisyon kapasitesi, 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin’in (L-DOPA) substrat olarak kullanıldığı bir metot yardımıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (204). Çalışmada metanol ve su ekstralarından 10 mg/mL olacak şekilde ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra fosfat tamponu (pH 6.8) ile birlikte seyreltme yapılarak farklı (25, 50, 100, 500 µg/mL) konsantrasyonlarda test çözeltileri hazırlanmıştır. Standart için bir tirozinaz inhibitörü olan kojik asitin de 25, 50, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır.

96 kuyucuklu mikroparka içinde örnek çözeltisi (40 µL), tirozinaz çözeltisi (40 µL) ve fosfat tamponu (80 µL, pH 6.8) karıştırılarak 25 °C’de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra L-DOPA çözeltisi (40 µL) ilave edilerek tekrardan 25 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kör çözeltisinde enzim bulunmamaktadır. İnkübasyon sürecinden sonra örnek ve kör çözeltilerin absorbansları 492 nm’de okunmuştur. Deney 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Tirozinaz inhibitör aktivitesi sonuçları kojik asite eşdeğer olarak hesaplanarak verilmiştir.

3.3.5.2. Antikolinesteraz Aktivite Tayini

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu tayini, 96 kuyucuklu mikrolakalarda Ellman metodu ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (205). Bu yöntemin esası, asetilkolinin asetilkolinesteraz enzimi tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra tiyokolinin 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu oluşturmaya dayanan kolorimetrik bir yöntemdir.

Çalışmada enzim olarak asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri, enzim substratı olarak asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin iyodür kullanılmıştır. Aktivitenin belirlenmesinde sarı renkli DTNB kullanılmıştır. Çalışmanın standartı olarak galantamin kullanılmış olup standart ve test bileşiklerinin 25-200 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır.

96 kuyucuklu mikrolaka içine 130 µL fosfat tamponu (pH 6.8), test çözeltisi (10 mL) ve enzim çözeltisi (20 µL) ilave edilerek 10 dk boyunca 25°C de inkübe edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklara önce DTNB reaktifi (20 µL) hemen ardından enzimin substratı (20 µL) eklenerek 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Benzer işlemler enzim çözeltisi olmadan kör çözeltisi için tekrarlanmıştır. Test ve kör çözeltilerin absorbanı 412 nm'de okunmuştur. Asetil ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyon sonuçları galantamine eşdeğeri olarak verilmiştir.

3.3.5.3. α-Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi

Çalışmada α-glukozidaz inhibitor aktivite tayini için Palanisamy ve ark.'nın yöntemi kullanılmıştır (206). Standart olarak akarboz kullanılmıştır. Standart ve test bileşiklerinin 6.25-12.5, 25 50, 100 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrolaka icinde 50 µL örnek çözeltisi, 50 µL glutatyon, 50 µL α-glukozidaz çözeltisi, 50 µL fosfat tamponu (pH 6.8) ve 50 µL PNPG (4-Nitrofenil β-D-glukuronid) çözeltisi karıştırılarak 37°C'de ve 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Kör çözeltisinde enzim bulunmamaktadır. Daha sonra 50 µL 0.2 M sodyum karbonat eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Örnek ve kör çözeltilerin absorbanları 400 nm'de okunmuştur. Çalışmada α-glukozidaz inhibitor aktivitesi sonuçları akarboz eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.3.5.4. α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi

Çalışmada α -amilaz inhibitor aktivite tayini için Caraway-Somogyi iyodur/potasyum iyodur (IKI) yöntemi kullanılmıştır (207). Standart olarak akarboz kullanılmıştır. Standart ve test bileşiklerinin 6.25-12.5, 25 50, 100 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. 25 μ L örnek çözeltileri ile fosfat tamponunda (pH 6.9) hazırlanmış α -amilaz çözeltisi 96 kuyucuklu mikrolakaya içinde karıştırılarak 10 dakika boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 50 μ L %0.05’ lik nişasta çözeltisi inkübe edilmiş örneklerle eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 37 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin ardından tüm tüplere 25 μ L HCl (1 M) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Benzer işlem α -amilaz enzim çözeltisi olmadan kör çözeltisi için tekrarlanmıştır. Daha sonra iyodin-potasyum iyodid çözeltisi (100 μ L) eklenerek örnek ve kör çözeltilerin absorbensları 630 nm’de okunmuştur. α -Amilaz inhibitör aktivitesi sonuçları akarboz eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

3.3.6. Sitotoksikite Tayini

H. nitidum su ve metanol ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (208). Çalışma kapsamında, insan akciğer kanser (A549) hattı kullanılmıştır. Su ve metanol ekstraktlarından kendi çözücülerini kullanarak 75 mg/mL’lik ana stok çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra ana stok çözeltilerden yine kendi çözücülerini kullanarak ayrı ayrı 6 farklı konsantrasyonda (0.25, 0.75, 2.5, 7.5, 25, 75 mg/mL) dilüsyon serisi hazırlanmıştır. Her bir dilüsyon örneğinden besiyerlerindeki çözücü son konsantrasyonu %0.4 (su veya metanol) olmak koşuluyla 1, 3, 10, 30, 100 ve 300 μ g/mL ekstre içeren maruziyet besiyerleri hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu için yalnız %0.4 oranında su veya metanol içeren besiyeri kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu için 0.6 μ M sodyum lauril sülfat (SLS) kullanılmıştır.

Hücrelerin pasajlanmasının ardından 96 kuyucuklu mikrolakaya her kuyucukta 5×10^3 hücre/100 μ L olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin mikrolakaya yüzeyine yapışmalarını sağlamak için mikrolakalar 24 saat inkübasyona (37°C ve %5 CO₂) bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki besiyerleri vakum yardımıyla çekilerek atılmıştır. Hemen sonrasında farklı konsantrasyonda (0-300 μ g/mL) ekstre içeren maruziyet besiyerleri her kuyucukta 100 μ L olacak şekilde eklenmiştir. Hücrelerin 24 saatlik inkübasyonun (37°C ve %5 CO₂) ardından besiyerleri tekrardan vakum yardımıyla çekilerek atılmıştır. Ardından her kuyucuğa 0.5 mg/mL MTT içeren besiyerinden 100 μ L konularak 2 saat

boyunca inkübe (37°C ve %5 CO₂) edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki MTT içeren besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerde MTT'nin indirgenmesi sonucu oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için kuyucuklara 150'şer µL dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Mikroplakalar orbital çalkalayıcıda 10 dk bekletilmiş ve ardından absorbans değerleri spektrofotometre ile 570/690 nm' de ölçülmüştür.

3.3.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Çalışma kapsamında bitki ekstralarının kullanılan test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri, Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ve Minimal İnhibisyon Yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. (Tablo 8).

Tablo 8. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları

Gram negatif non fermentatif bakteri	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Gram negatif enterik bakteriler	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911
Gram pozitif koklar	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus mutans</i> RSKK07038, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
Gram pozitif sporlu basiller	<i>Bacillus cereus</i> 702 ROMA, <i>Scardovia wigsiae</i> DSM 22547
Gram almayan asido resistant bakteri	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607
Maya mantarları	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RSKK 251

3.3.7.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

H. nitidum ekstralarında antimikrobiyal aktivitenin saptanmasında öncelikli olarak agar kuyucuk difüzyon metodu çalışılmıştır (209). Çalışma kapsamında test edilecek kültür bakterileri 1 gecelik inkübasyona bırakılarak hazır hale getirilmiştir. Hazır hale getirilen bakterilerinden sıvı besiyeri içerisinde yaklaşık 10⁶ kob/mL (koloni oluşturan birim) dilüe çözeltileri hazırlanarak katı besiyerlerine yaygın ekimleri yapılmıştır. Daha sonra cam boru yardımı ile birlikte besiyeri üzerinde inhibisyon zon ölçümünün yapılacağı aralarında 2 cm aralık olacak şekilde 5 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Bitki ekstralarından çözücülerini uzaklaştırıldıktan sonra DMSO ile 10.000 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan test çözeltilerinden 50 µL alınarak her bir kuyucuğa eklenmiştir. Daha sonra bakteri içeren petriler 24 saat, maya içeren bakteriler 48 saat ve

Mycobacterium smegmatis kültürü içeren petriler ise 72 saat olacak şekilde 36 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde antimikrobiyal etki çapı (inhibisyon zonu) cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Çalışmanın standart kontrol ilacı olarak Streptomisin ve Ampisilin bakteriler için kullanılırken Flukonazol mayalar için kullanılmıştır. DMSO standart çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır.

3.3.7.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi

Agar kuyucuk metodu çalışılarak *H. nitidum* ekstrelerinden elde edilen etkinliğin kantitatif analizi için sıvı besiyerlerinde mikrodilüsyon sıvı yöntemi uygulanmıştır (210). MİK yöntemi, “National Committee for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS) standartlarının belirlediği kriterler baz alınarak çalışılmıştır (211).

Bakteri ve maya kültürleri aerobik koşullarda 3–5 gün boyunca 35°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Test kapsamında ELISA pleytleri ile çalışılmıştır. Bitki ekstrelerinden 0.1 mL alınarak sıvı besiyerleri ile bir seri sulandırmaları yapılmıştır. Daha sonra inoküle edilmiş olan mikroorganizmalar bir gecelik kültürlerinden sonra McFarland 0.5 bulanıklılığında (1×10^8 kob/mL) olacak şekilde süspanse edilmiştir. Hazırlanan süspansiyonlardan 1:10 oranında sulandırılmıştır. Son test konsantrasyonu 5×10^4 kob/kuyucuk olacak şekilde her kuyucuğa 0.005 mL mikroorganizma eklenerek aerobik koşullarda etüvde 16-72 saat süre boyunca 35°C’de bekleme bırakılmıştır. Çalışmanın standart kontrol ilacı olarak Streptomisin ve Ampisilin bakteriler için kullanılırken Flukonazol mayalar için kullanılmıştır. DMSO standart çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır. Kuyucuklarda bulunan mikroorganizmanın üremesinin tamamen engellendiği ve gözle görülebilen en düşük antimikrobik madde konsantrasyon cinsinden (MİK) olarak ifade edilmiştir. Minimal bakterisit konsantrasyonu (MBK) tayin etmek amacıyla agar plaklara üreme görülmeyen kuyucuklardaki dilüsyon eklenerek 16-24 saat süre boyunca 35°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı kuyucuktaki madde konsantrasyonu MBK olarak ifade edilecektir.

3.3.8. YPSK ile Bitki Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Fitokimyasal çalışmalar sırasında kullanılan kimyasal madde, cihazlar ve Tablo 9 ve 10’da belirtilmiştir.

Tablo 9. Fitokimyasal çalışmalar sürecinde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Marka/Model
Metanol	Sigma-Aldrich
Formik asit	Sigma-Aldrich

Tablo 10. Fitokimyasal çalışmalar sürecinde kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Marka/Model
Hassas Terazı	OHAUS Pioneer
Ultrasonik Banyo	Sonica, 3300MH
Membran filtre	Sartorius Stedim, Selüloz asetat, 0.45 µm
YPSK Cihazı	Shimadzu Corporation, LC 20 AT

H. nitidum'un metanol ekstresinin içerdığı fenolik bileşiklerin YPSK-DAD yöntemi ile analinisi gerçekleştirmek amacıyla daha önce Yıldırım ve ark. tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (212) (Tablo 11, 12). Evaporatör yardımıyla kuru hale getirilen ekstrelerden alınan numune çözelti konsantrasyonu 10 mg/ mL olacak şekilde YPSK saflıkta metanolde çözülmüştür. Daha sona sonra 0.45 µm membran filtreden geçirilerek örnek çözeltisi hazırlanmıştır. Fenolik bileşiklerin analizi 280 nm dalga boyunda DAD dedektörü yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 11. YPSK deneysel koşulları

Kolon sıcaklığı	25 °C
Akış hızı	1 mL/dk
Dedektör	DiodeArrayDetector (DAD)
Dedektör dalga boyu	280 nm
Kolon	Zorbax Eclipse XDB-C ₈
Hareketli faz	(A) %0.1 formik asit (B) metanol
Yöntem	Gradient elüsyon

Tablo 12. Gradient elüsyon programı

Zaman (dk)	Solvent A % (%0.1 Formik asit)	Solvent B % (Metanol)
0	75	25
14	20	80
16	20	80
16.5	75	25
25	75	25

3.3.9. Uçucu Yağların GC-MS Analiz Yöntemi

H. nitidum'dan uçucu yağ eldesi Mikrodalga Clevenger yöntemi ile %0.019 verimle gerçekleştirilmiştir. Bitkiden elde edilen uçucu yağ kahverengi viallere konularak n-hekzan çözücüsü içinde ve -10 °C'de saklanmıştır.

Bitkiden elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi, Shimadzu QP 2010 Plus cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz çalışmasında taşıyıcı gaz olarak helyum (% 99.999, 1 mL/ dakika) kullanılmıştır. n-Hekzan (YPSK kalitesinde) içinde çözünmüş uçucu yağın GC-MS cihazına enjeksiyonu, split modda ve 250 °C'de gerçekleştirilerek başlangıçta 60 °C'de 2 dakika tutulmuştur. Daha sonra da 3 °C/dakika ısıtma rampasıyla 240 °C'ye yükseltilerek 60 dakika süreyle koşturulmuştur (198).

3.4. İstatiksel Analiz

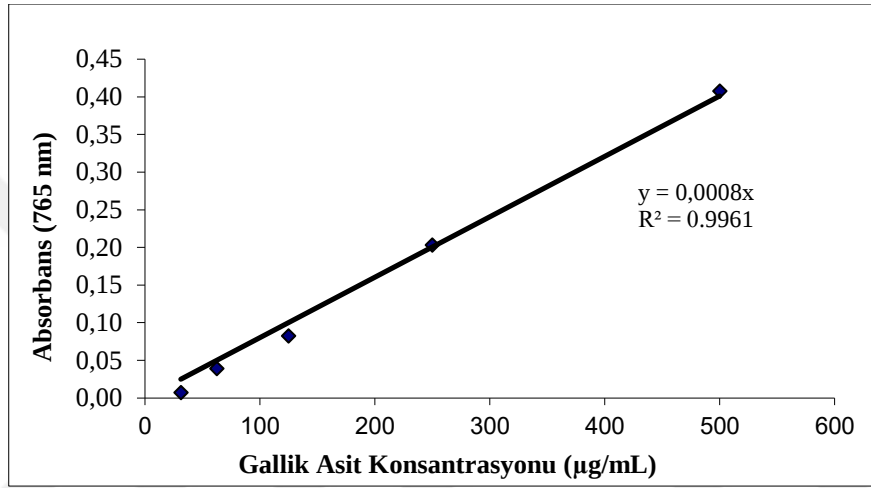
Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması±standart sapma alınarak hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen verilerin değerlendirmesi Graphpad Prism 5 programı ile yapılmıştır. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Örneklerin her birinden elde edilen sonuçların birbirleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi T-testi ile yapılmıştır (p<0.05).

4. BULGULAR

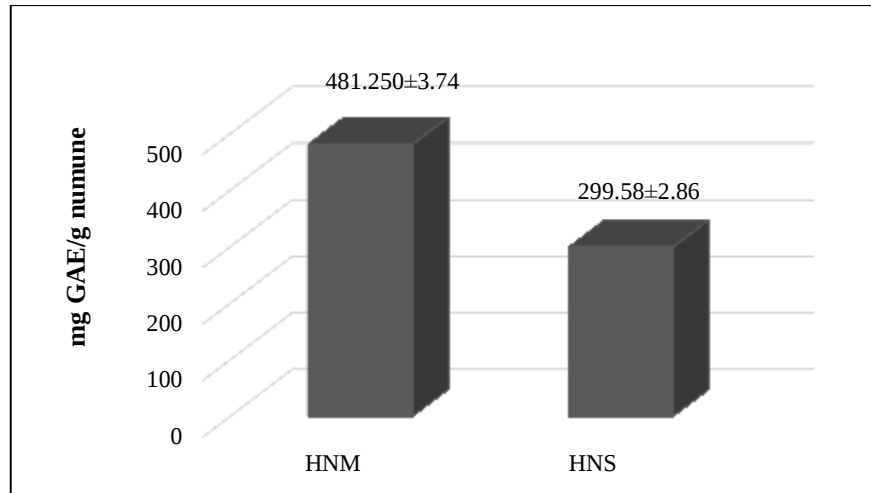
4.1. Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları

4.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Sonuçları

Bu çalışmada, toplam fenolik madde miktarı tayini için yöntemin standartı olan gallik asit için hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 11’de, bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı değerleri mg GAE/g numune olarak Şekil 12’de gösterilmiştir.



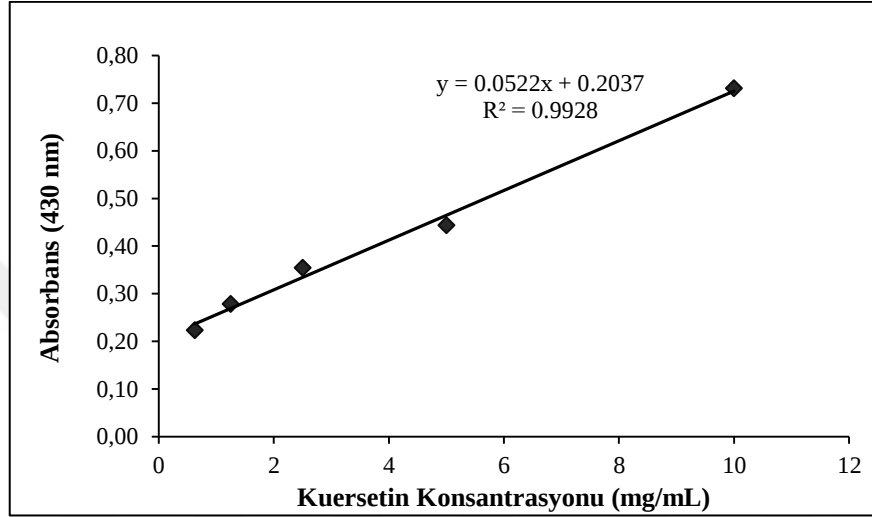
Şekil 11. Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan gallik asite ait standart çalışma grafiği



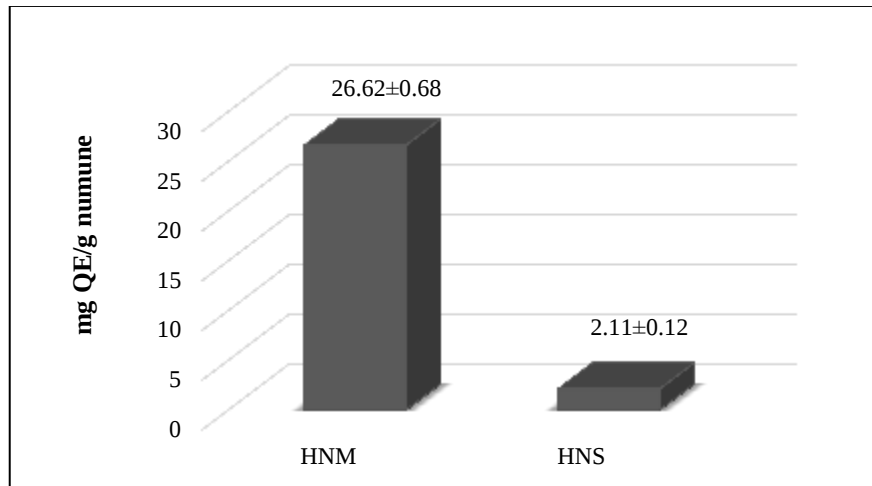
Şekil 12. *H. nitidum* ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı tayini sonuçları

4.1.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Ölçümü Sonuçları

Bu çalışmada, toplam flavonoid madde miktarı tayini için yöntemin standartı olan kuersetin için hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 13'te, bitkiden elde edilen su ve metanol ekstratlarının içerdiği toplam flavonoid madde miktarı değerleri mg QE/g numune olarak Şekil 14'te gösterilmiştir.



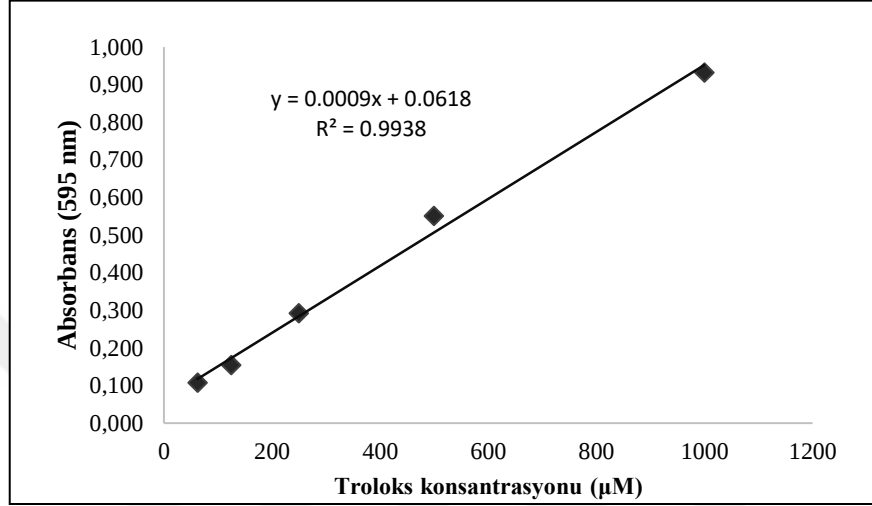
Şekil 13. Toplam flavonoid madde miktarı tayininde kullanılan kuersetine ait standart çalışma grafiği



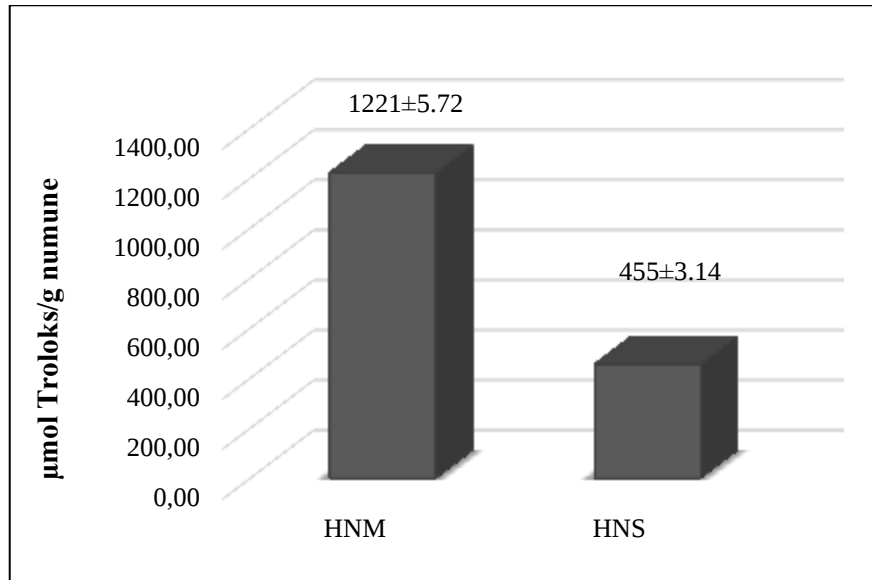
Şekil 14. *H. nitidum* ekstratlarının toplam flavonoid madde miktarı tayini sonuçları

4.1.3. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları

Çalışmada kullanılan troloks standartına için hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 15'te verilmiştir. *H. nitidum* ekstrelerinin FRAP değerleri μmol Troloks/g numune şeklinde Şekil 16'da gösterilmiştir.



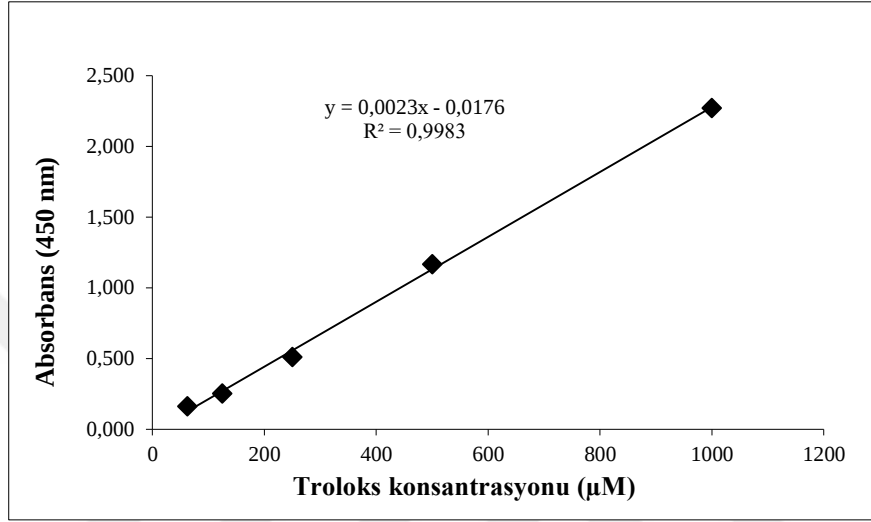
Şekil 15. FRAP tayini çalışmasında kullanılan troloksa ait standart çalışma grafiği



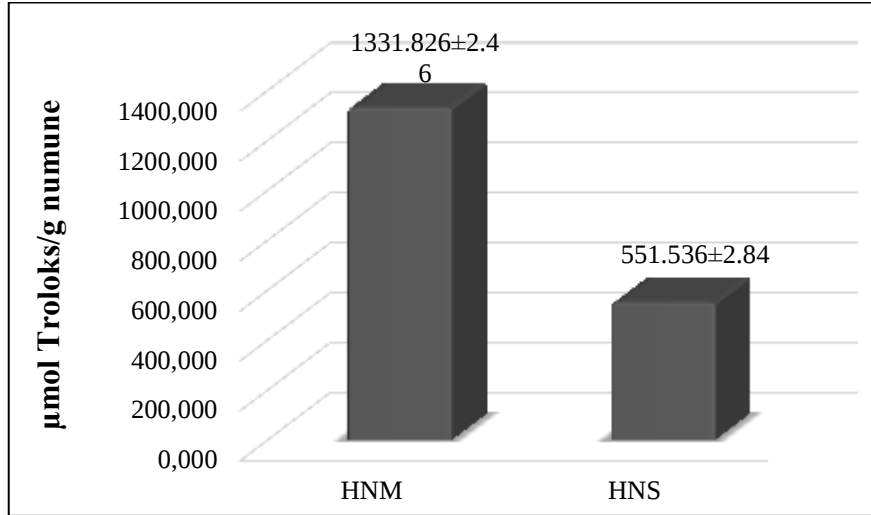
Şekil 16. *H. nitidum* ekstrelerinin FRAP tayini sonuçları

4.1.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini Sonuçları

Çalışmada kullanılan troloks standartına için hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 17’de verilmiştir. *H. nitidum* ekstrelerinin CUPRAC değerleri μmol Troloks/g numune şeklinde Şekil 18’de gösterilmiştir.



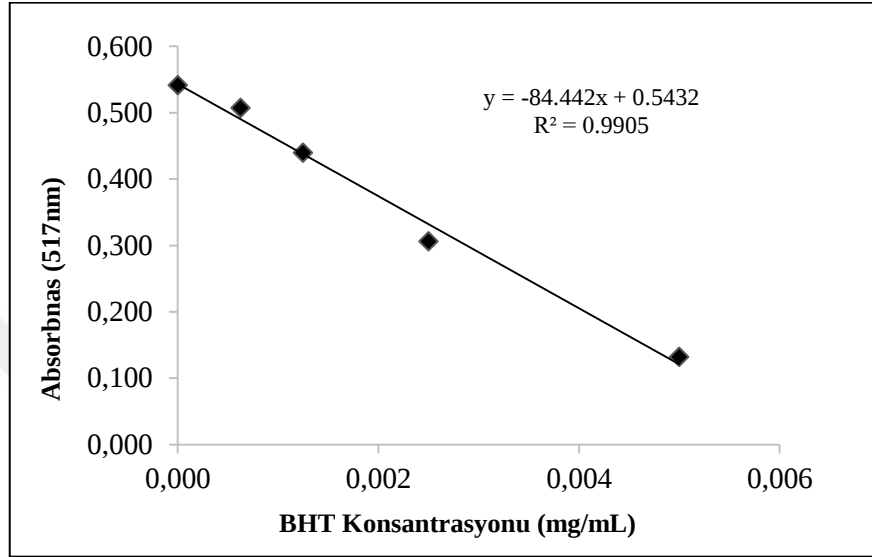
Şekil 17. CUPRAC tayini çalışmasında kullanılan troloksa ait standart çalışma grafiği



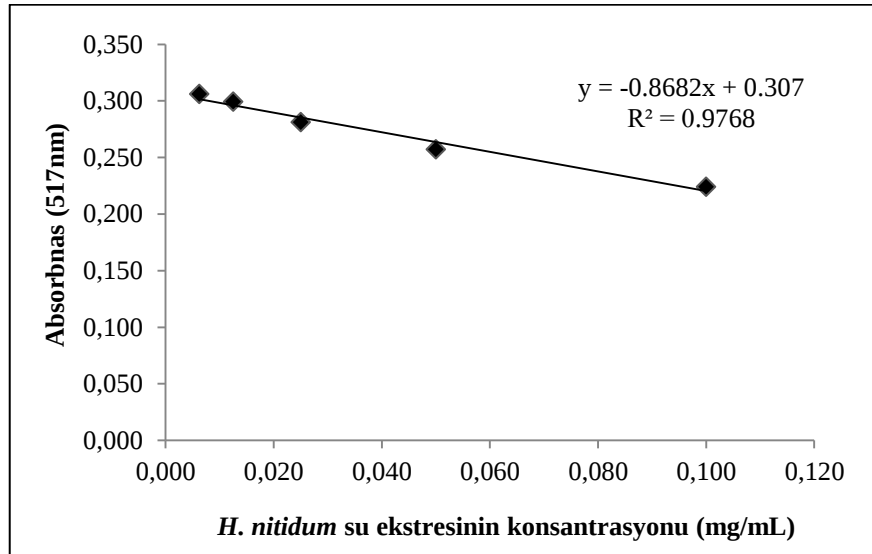
Şekil 18. *H. nitidum* ekstrelerinin CUPRAC tayini sonuçları

4.1.5. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları

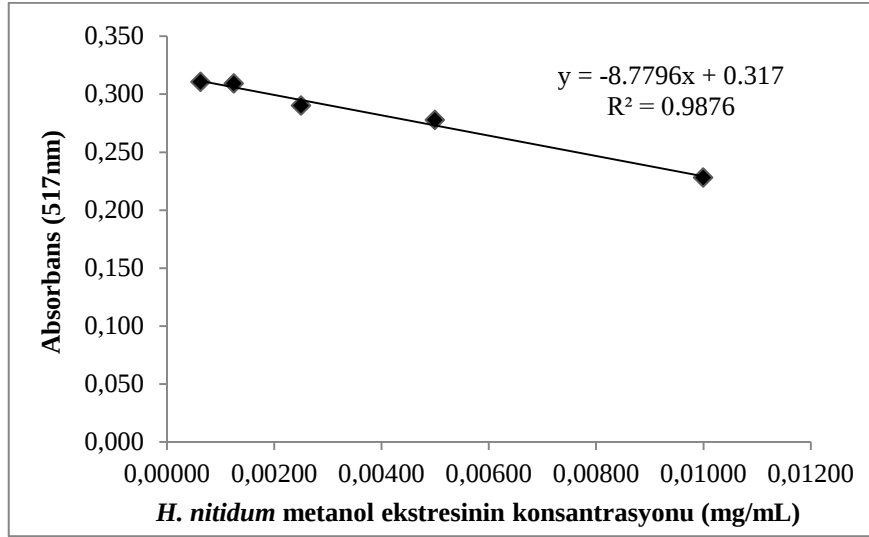
Çalışma kapsamında, standart madde olarak kullanılan BHT için hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 19’de verilmiştir. *H. nitidum* ekstrelerinin absorbans konsantrasyon grafikleri Şekil 20-22’de verilmiştir.



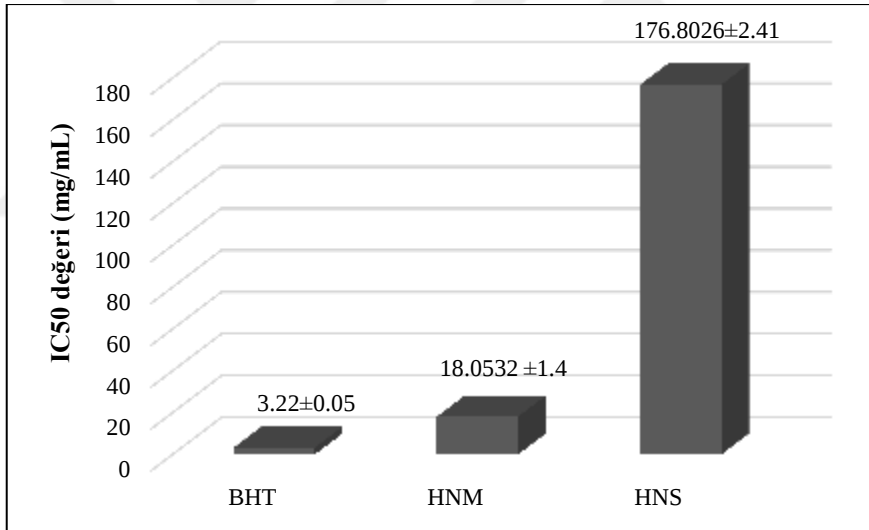
Şekil 19. DPPH radikali giderme aktivitesi tayini çalışmasında kullanılan BHT’a ait standart çalışma grafiği



Şekil 20. *H. nitidum* su ekstresine ait DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları



Şekil 21. *H. nitidum* metanol ekstresine ait DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları



Şekil 22. *H. nitidum* ekstrelerinin ve BHT standardının IC₅₀ değerleri

Tablo 13. *H. nitidum* ekstrelerinin antioksidan aktivite çalışma sonuçları

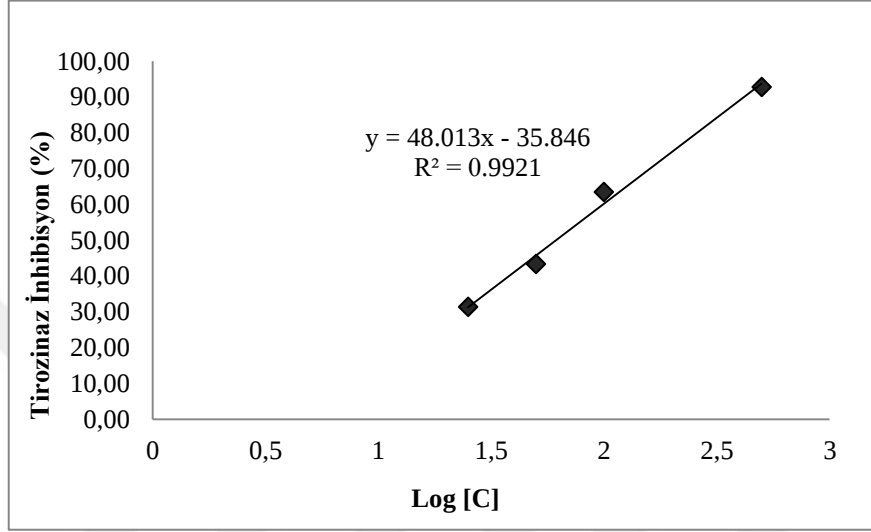
Numuneler	TPC ^a	TFC ^b	FRAP ^c	^d CUPRAC	DPPH ^e
HNM	481.5±3.74	26.62±0.68	1221±5.72	1331.826±2.46	18.0532 ±1.4
HNS	299.58±2.86	2.11±0.12	455±3.14	551.536±2.84	176.8026±2.41
BHT					3.22±0.05

^aTPC değeri total fenolik içeriğini (mg gallik asit eşdeğeri/gram), ^bTFC değeri toplam flavanoid içeriğini (mg kuersetin eşdeğeri/gram), ^cFRAP değeri demir indirgeyici antioksidan gücünü (µM trolox eşdeğeri/gram), ^dCUPRAC değeri bakır indirgeyici antioksidan gücünü (µM trolox eşdeğeri/gram), ^eDPPH değeri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesini (mg/mL), BHT değeri bütillenmiş hidroksi tolueni ifade eder.

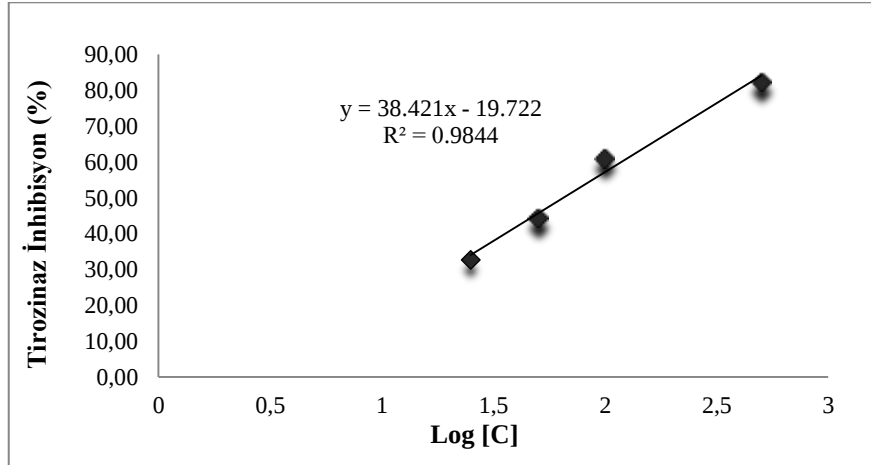
4.2. Enzim İnhibisyonu Tayini Bulguları

4.2.1. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları

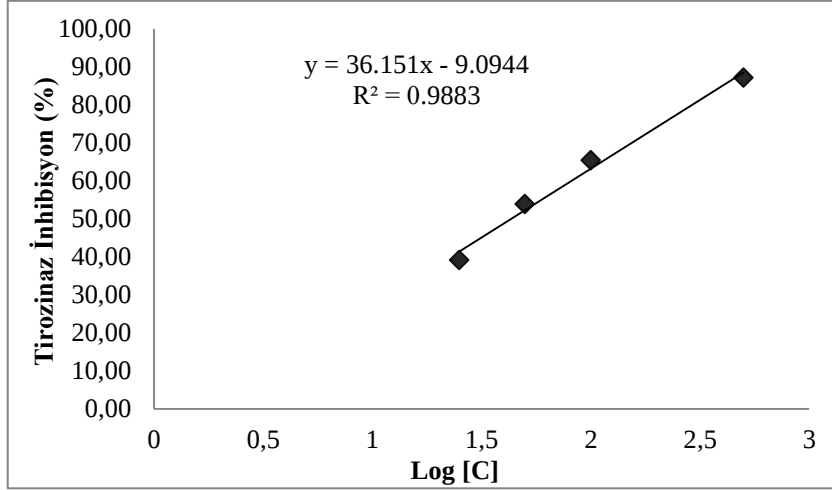
H. nitidum ekstrelerinin ve kojik asit standardının tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği ve sonuçları Şekil 23-26'da, IC₅₀ değerleri Tablo 14'te verilmiştir.



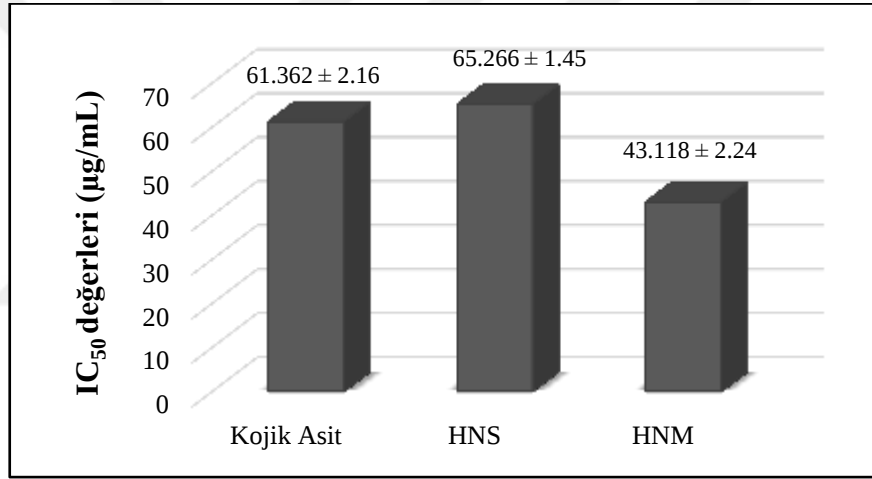
Şekil 23. Kojik asit standardına ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 24. *H. nitidum* su ekstreğine ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 25. *H. nitidum* metanol ekstresine ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 26. *H. nitidum* ekstrelerinin tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması

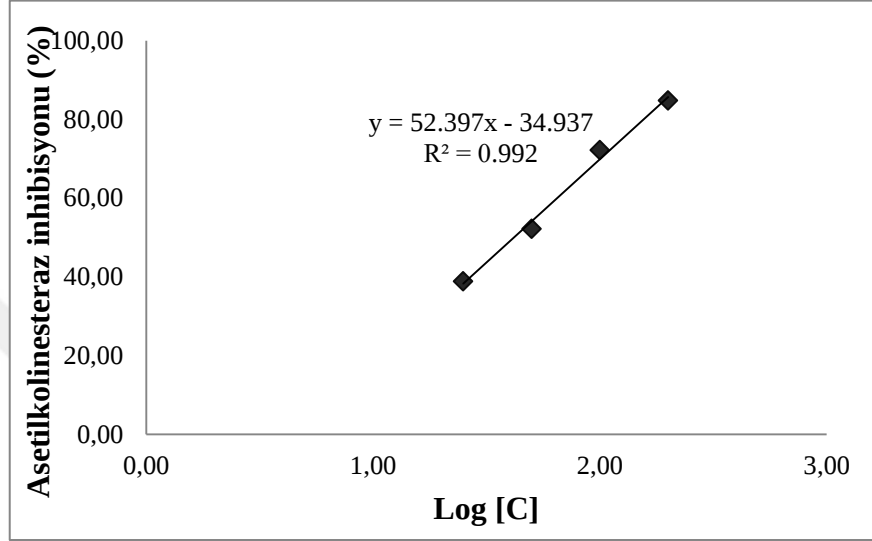
Tablo 14. *H. nitidum* ekstrelerinin ve kojik asitin IC₅₀ değerleri

Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi	
Test Bileşikleri	IC ₅₀ (µg/mL)
Kojik Asit	61.362 ± 2.16
<i>H. nitidum</i> Su Ekstresi	65.266 ± 1.45
<i>H. nitidum</i> Metanol Ekstresi	43.118 ± 2.24

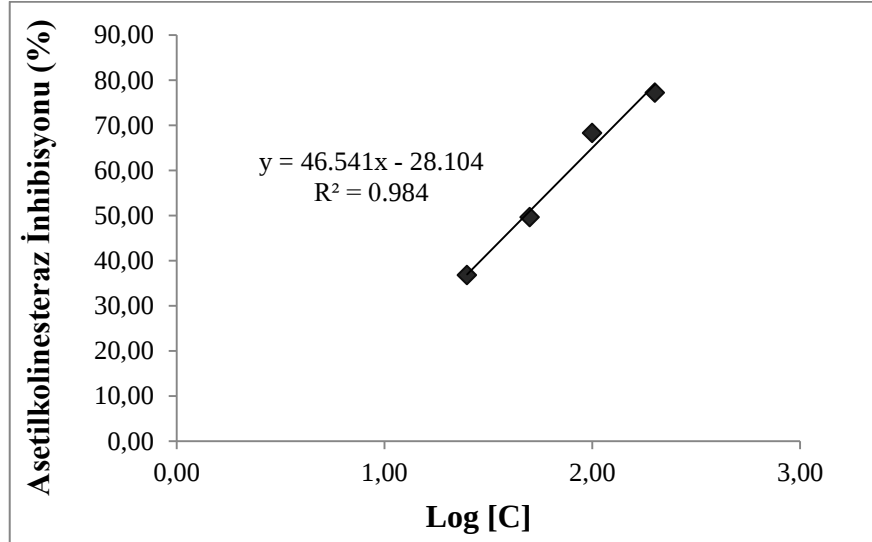
4.2.2. Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları

4.2.2.1. Asetilkolinesteraz İnhibitör Aktivite Sonuçları

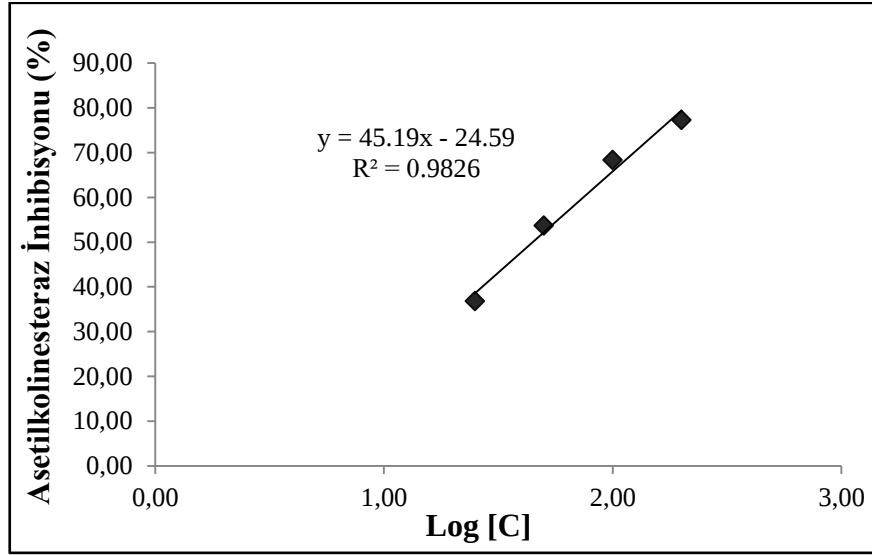
H. nitidum ekstrelerinin ve galantamin standardının asetilkolinesteraz inhibisyon grafikleri ve sonuçları Şekil 27-30'da, IC₅₀ değerleri Tablo 15'te verilmiştir.



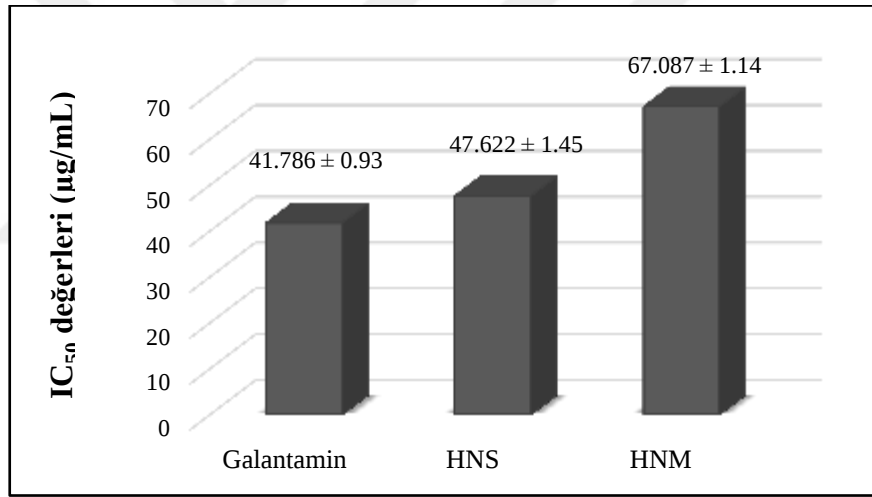
Şekil 27. Galantamin standardına ait asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 28. *H. nitidum* su ekstresine ait asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 29. *H. nitidum* metanol ekstresine ait asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



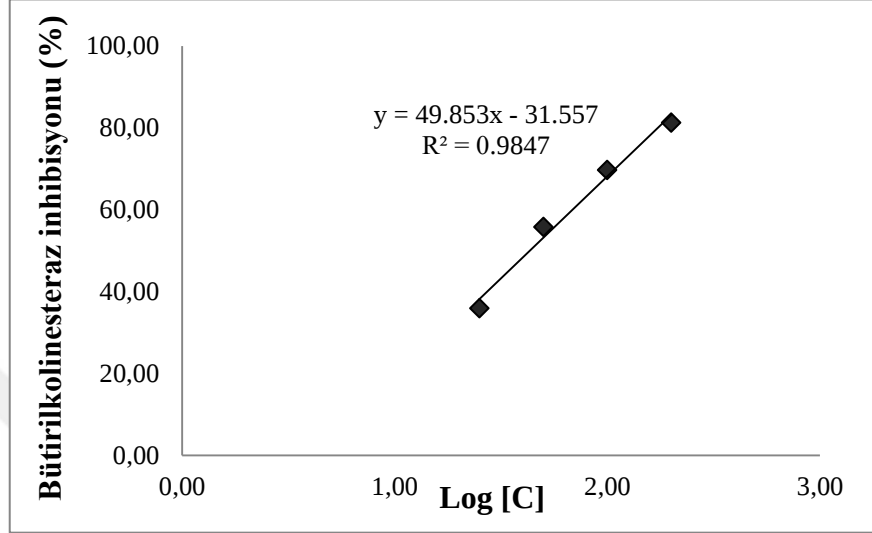
Şekil 30. *H. nitidum* ekstrlerinin asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo 15. Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite tayininde *H. nitidum* ekstrlerinin ve galantaminin IC₅₀ değerleri

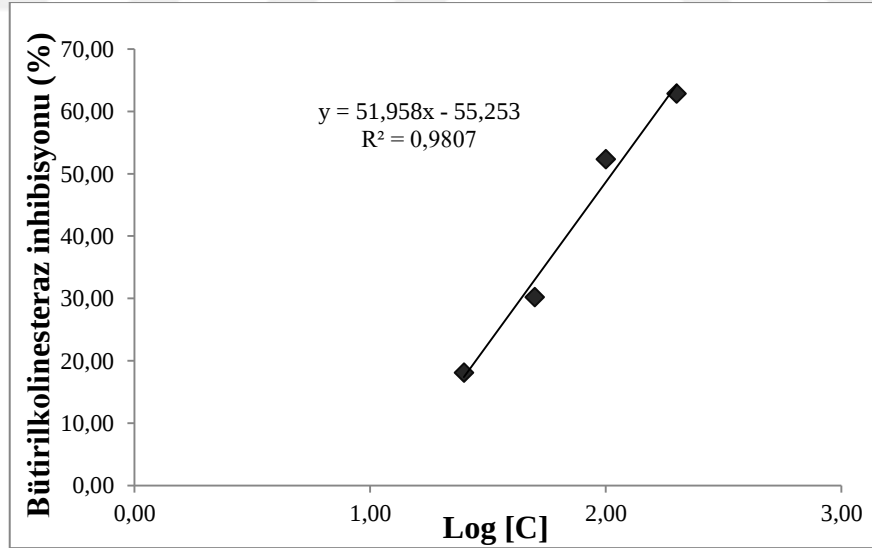
Asetilkolinesteraz Aktivitesi	
Test Bileşikler	IC ₅₀ (µg/mL)
Galantamin	41.786 ± 0.93
<i>H. nitidum</i> Su Ekstresi	47.622 ± 1.45
<i>H. nitidum</i> Metanol Ekstresi	67.087 ± 1.14

4.2.2.2. Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite Sonuçları

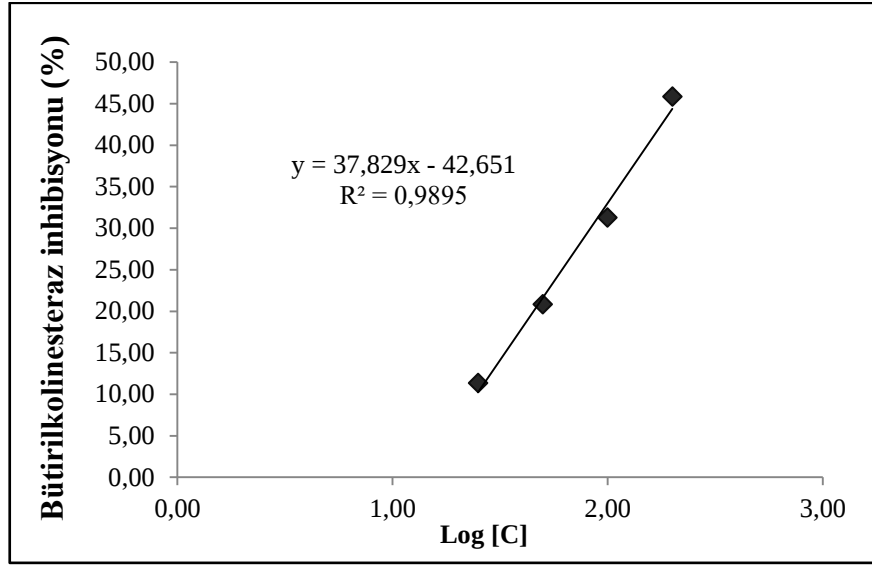
H. nitidum ekstrelerinin ve galantamin standardının bütirilkolinesteraz inhibisyon grafikleri ve sonuçları Şekil 31-34'te, IC₅₀ değerleri Tablo 16'da verilmiştir.



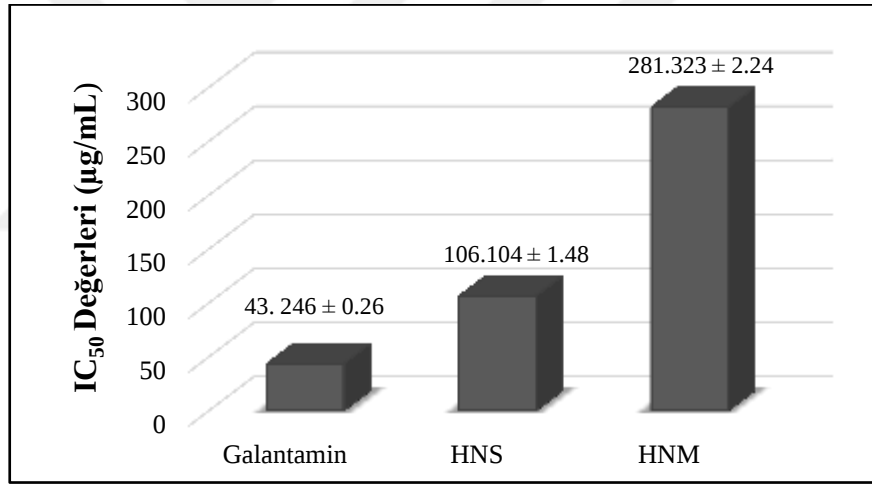
Şekil 31. Galantamin standardına ait bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 32. *H. nitidum* su ekstreğine ait bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 33. *H. nitidum* metanol ekstresine ait bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



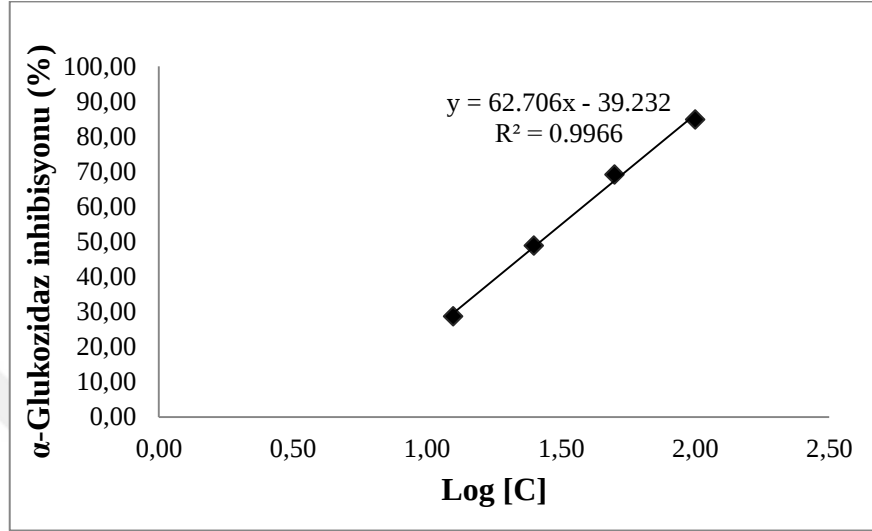
Şekil 34. *H. nitidum* ekstrelerinin bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo 16. Bütirilkolinesteraz inhibitör aktivite tayininde *H. nitidum* ekstrelerinin ve galataminin IC₅₀ değerleri

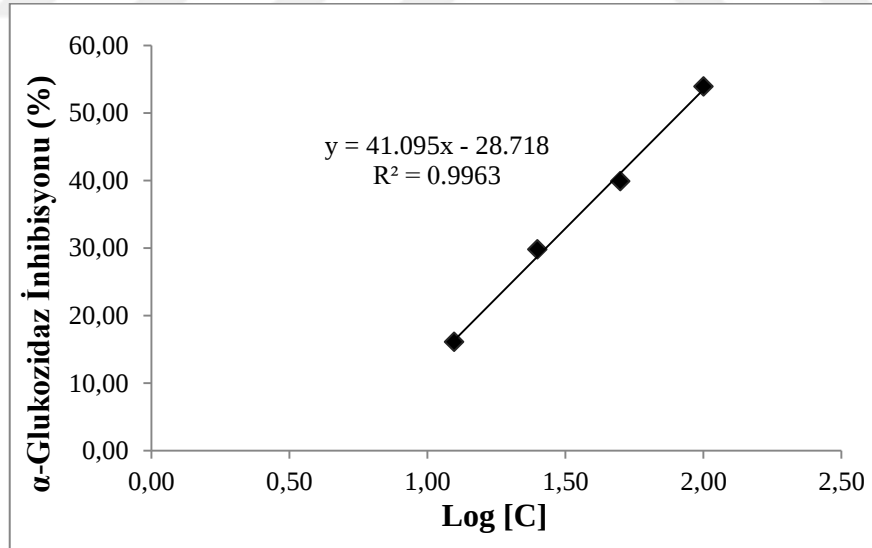
Bütirilkolinesteraz Aktivitesi	
Test Bileşikleri	IC ₅₀ (µg/mL)
Galantamin	43.246 ± 0.26
<i>H. nitidum</i> Su Ekstresi	106.104 ± 1.48
<i>H. nitidum</i> Metanol Ekstresi	281.323 ± 2.24

4.2.3. α -Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi Sonuçları

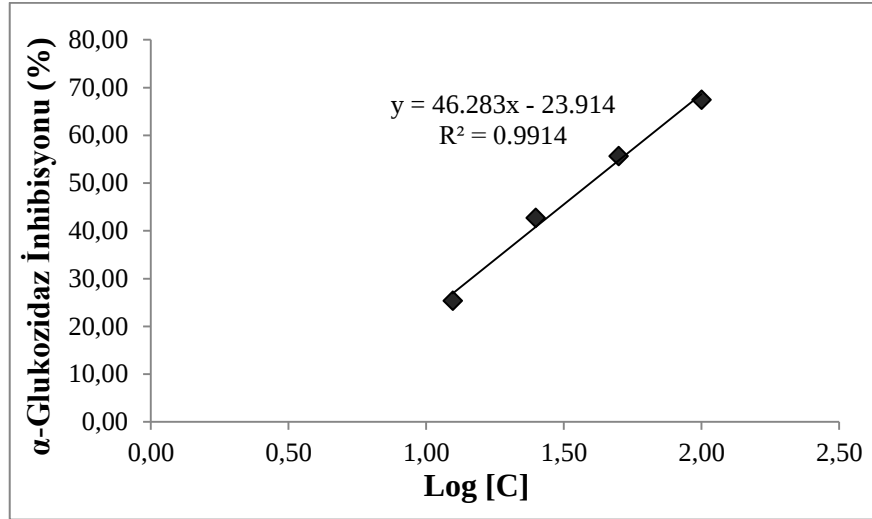
H. nitidum ekstrelerinin ve akarboz standardının α -glukozidaz inhibisyon grafik ve sonuçları Şekil 35-38’de, IC_{50} değerleri Tablo 17’de verilmiştir.



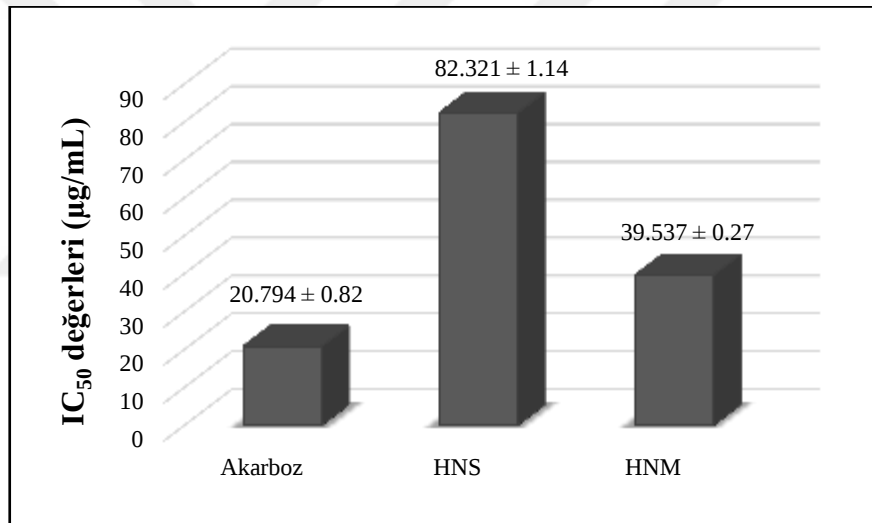
Şekil 35. Akarboz standardına ait α -glukozidaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 36. *H. nitidum* su ekstreğine ait α -glukozidaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 37. *H. nitidum* metanol ekstresine ait α-glukozidaz enzim inhibisyonu grafiği



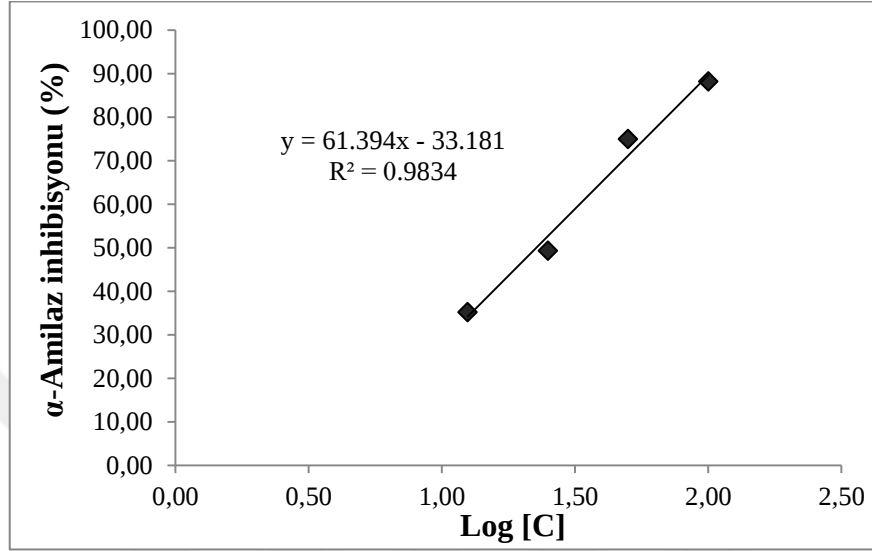
Şekil 38. *H. nitidum* ekstrlerinin α-glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo 17. α-Glukozidaz inhibisyon aktivite tayininde *H. nitidum* ekstrlerinin ve akarbozun IC₅₀ değerleri

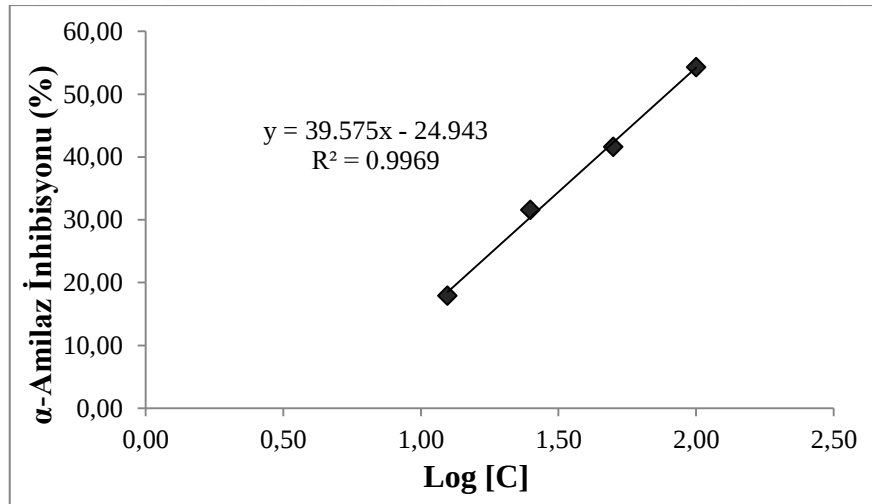
α-Glukozidaz Enzim İnhibisyonu	
Test Bileşikleri	IC ₅₀ (µg/mL)
Akarboz	20.794 ± 0.82
<i>H. nitidum</i> Su Ekstresi	82.321 ± 1.14
<i>H. nitidum</i> Metanol Ekstresi	39.537 ± 0.27

4.2.4. α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi Sonuçları

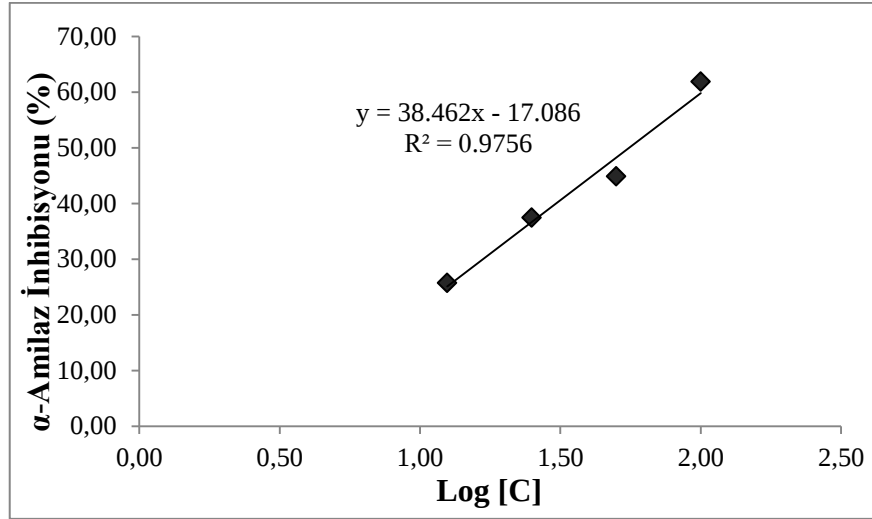
H. nitidum ekstrelerinin ve akarboz standardının α -amilaz inhibisyon grafikleri ve sonuçları Şekil 39-42’de, IC₅₀ değerleri Tablo 18’de verilmiştir.



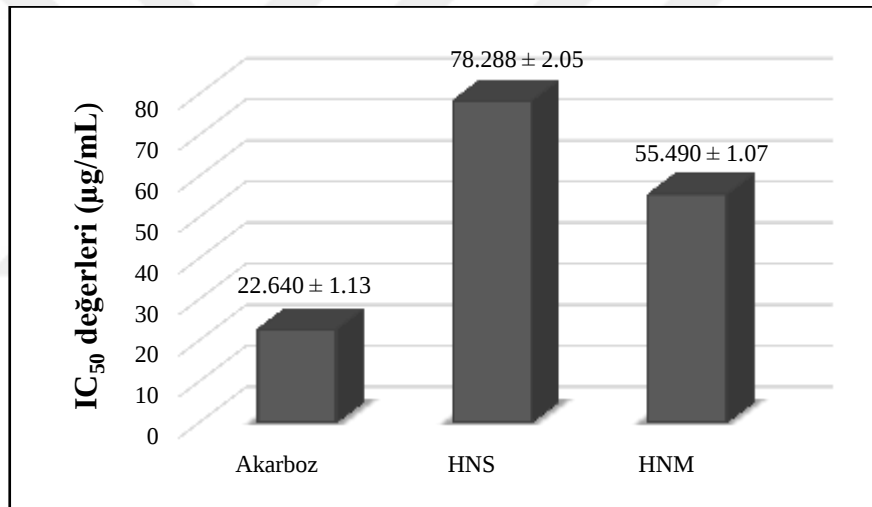
Şekil 39. Akarboz standardına ait α -amilaz inhibisyonu grafiği



Şekil 40. *H. nitidum* su ekstresine ait α -amilaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 41. *H. nitidum* metanol ekstresine ait α-amilaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 42. *H. nitidum* ekstrelerinin α-amilaz enzim inhibisyonu sonuçlarının karşılaştırılması

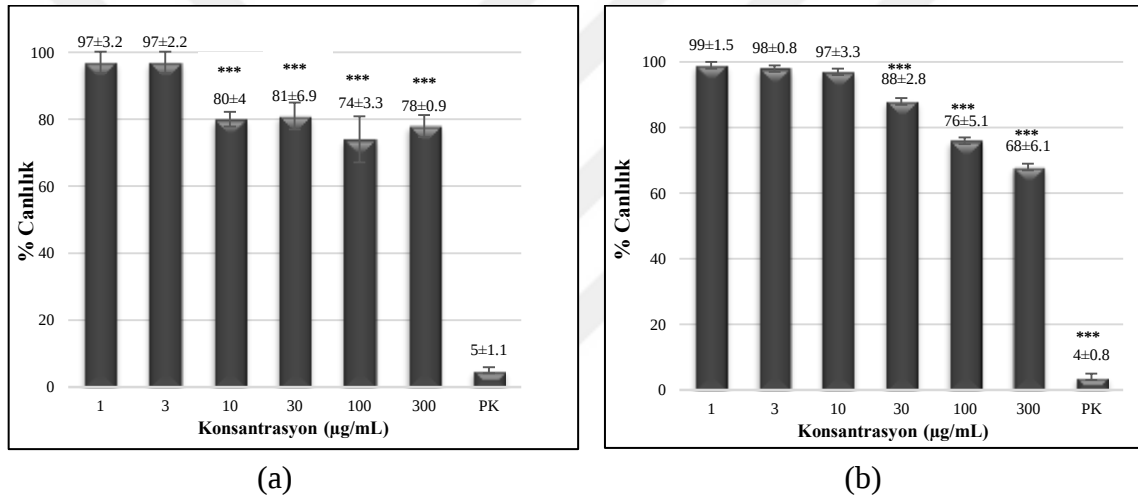
Tablo 18. α-Amilaz inhibisyon aktivite tayininde *H. nitidum* ekstrelerinin ve akarbozun IC₅₀ değerleri

α-Amilaz Enzim İnhibisyonu	
Test Bileşikleri	IC ₅₀ (µg/mL)
Akarboz	22.640 ± 1.13
<i>H. nitidum</i> Su Ekstresi	78.288 ± 2.05
<i>H. nitidum</i> Metanol Ekstresi	55.490 ± 1.07

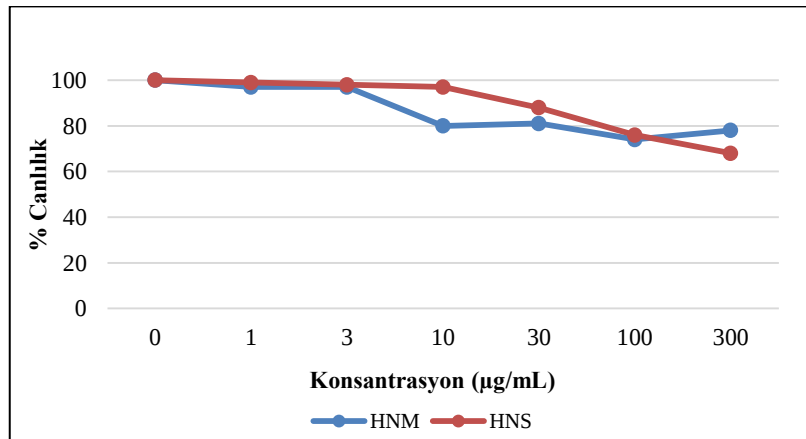
4.3. Sitotoksikite Tayini Bulguları

4.3.1. MTT Yöntemi Sonuçları

H. nitidum ekstrelerinin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile incelenmiş olup sonuçlar Şekil 43 ve 44'te verilmiştir. *H. nitidum* su ve metanol ekstreleri ile 24 saatlik maruziyet gerçekleştirilmiştir. *H. nitidum* metanol ekstresinin 10, 30, 100 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında; su ekstresinin 30, 100 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığında anlamlı azalma bulunmuştur ($p<0.001$). Su ekstresinin 300 µg/mL konsantrasyonunda hücre canlılık oranı 68 ± 6.1 bulunurken metanol ekstresinde 78 ± 0.9 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 43. *H. nitidum* metanol ekstresinin (a) ve su ekstresinin (b) A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi (Negatif kontrole göre anlamlı fark bulundu; *** $p<0,001$).



Şekil 44. *H. nitidum* su ekstresinin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

4.4. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Bulguları

H. nitidum ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri, 9 bakteri ve 2 maya üzerinde çalışılarak tayin edilmiştir.

4.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Sonuçları

H. nitidum ekstrelerinin agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile oluşturduğu inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçülerek mm şeklinde ifade edilmiştir. Çalışmanın standart kontrol ilacı olarak Streptomisin ve Ampisilin bakteriler için kullanılırken Flukonazol mayalar için kullanılmıştır. Sonuçlar standartlar ile karşılaştırmalı olarak Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 19. *H. nitidum* ekstrelerinin inhibisyon zon çapları

Mikroorganizma ve Zon Çapları (mm)												
Örnek	Miktar (µg/mL)	Gram (-)			Gram (+)				Gram almayan	Maya Mantarı		
		Ec	Yp	Pa	Ef	Sa	Sm	Sw	Bc	Ms	Ca	Sc
Su ekstresi	1000	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-
Metanol ekstresi	5000	-	-	-	-	10	8	13	15	22	-	-
Amp.	10	10	10	18	35	10	NT	NT	15			
Strep.	10									35		
Flu.	5										25	25

Ec: *Escherichia coli*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sm: *Streptococcus mutans*, Sw: *Scardovia wiggsiae*, Bc: *Bacillus cereus* 702 Roma, Ms: *Mycobacterium smegmatis*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Amp.: Ampisilin, Strep.: Streptomisin, Flu.: Flukonazol

4.4.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi Sonuçları

H. nitidum ekstrelerinin minimal inhibisyon yöntemi sonuçları, kuyucuklarda bulunan mikroorganizmanın üremesinin tamamen engellendiği, gözle görülebilen en düşük antimikrobik madde konsantrasyon cinsinden (MIK) ve kuyucuklarda üremenin olmadığı madde konsantrasyonu cinsinden (MBK) olarak ifade edilmiştir. Çalışmanın standart kontrol ilacı olarak Streptomisin ve Ampisilin bakteriler için kullanılırken Flukonazol mayalar için kullanılmıştır. Sonuçlar standartlar ile karşılaştırmalı olarak Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20. *H. nitidum* ekstrelerinin MİK ve MBK değerleri

MİK ve MBK Değerleri (µg/mL)													
Örnek	Miktar (µg/mL)	Test	Gram (-)					Gram (+)					Maya Mantarı
			Ec	Yp	Pa	Ef	Sa	Sm	Sw	Bc	Ms	Ca	Sc
Su ekstresi	1000	MIK	-	-	-	-	-	-	125	-	-	-	-
		MBK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol ekstresi	5000	MIK	-	-	-	-	62.5	62.5	3.91	31.25	15.625	-	-
		MBK	-	-	-	-	240	240	62	240	62	-	-
Amp.	10	MIK	10	18	128	10	35	NT	NT	15			
		MBK											
Strep.	10	MIK									4		
		MBK											
Flu.	5	MIK										8	8
		MBK											

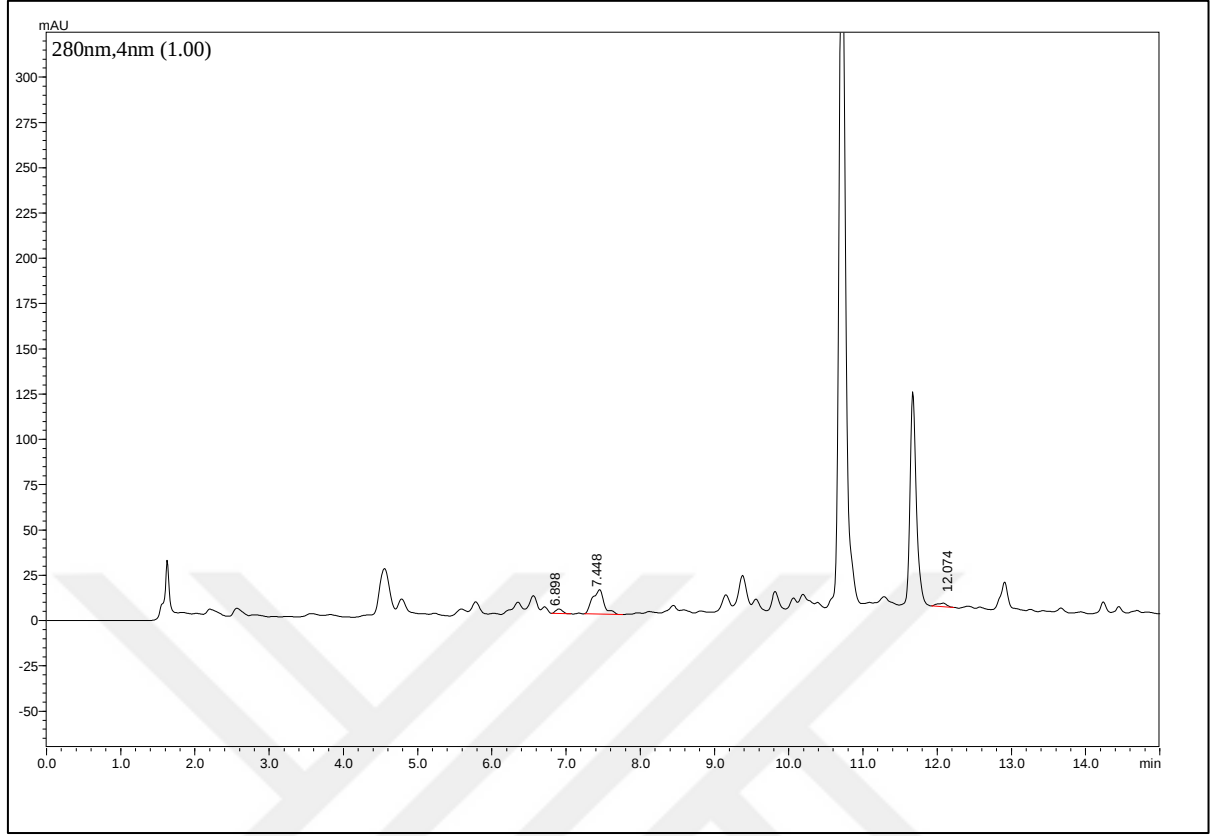
Ec: *Escherichia coli*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sm: *Streptococcus mutans*, Sw: *Scardovia wiggisiae*, Bc: *Bacillus cereus* 702 Roma, Ms: *Mycobacterium smegmatis*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Amp.: Ampisilin, Strep.: Streptomisin, Flu.: Flukonazol

4.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Bulguları

H. nitidum'un metanol ekstresinin içerdiği fenolik bileşiklerin analizi YPSK-DAD yöntemi ile 5 farklı fenolik bileşiğin alıkonma zamanları üzerinden taranmış olup içerdiği fenolik bileşiklerin miktarları mg/g olarak Tablo 21'de ve ilgili kromatogram Şekil 45'te verilmiştir.

Tablo 21. *H. nitidum* metanol ekstresinin içerdiği fenolik bileşiklerin miktarları

Bitki Adı	<i>p</i> -Hidroksi Benzoik Asit	Kafeik Asit	Siringik Asit	<i>p</i> -Kumarik Asit	2-Hidroksisinnamik Asit
<i>H. nitidum</i>	2.4±0.01	12.1±0.12	-	-	0.6±0.002



Şekil 45. *H. nitidum*'un YPSK kromatogramı

4.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Bulguları

H. nitidum bitkisinden elde edilen uçucu yağın GC-MS analiz sonuçları Tablo 22 ve 23'te, uçucu bileşenlerinin formülleri Şekil 46'da verilmiştir.

Tablo 22. *H. nitidum* bitkisinin uçucu bileşenleri

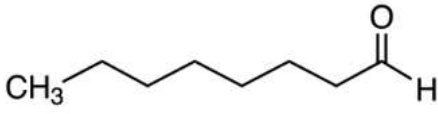
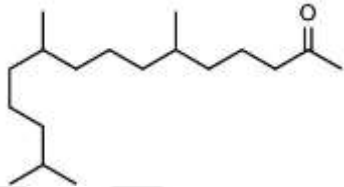
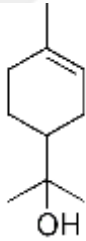
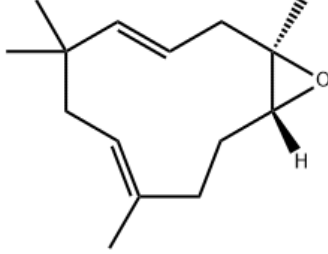
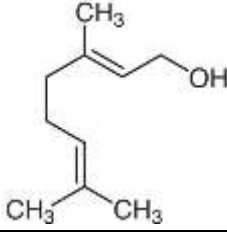
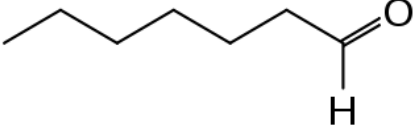
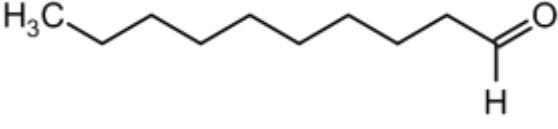
	BİLEŞİK SINIFI	BİLEŞİK	RT	RI	RI*	(%)^a
1	Aldehit	Heptanal	16.197	906	899	6.50
2	Monoterpen	Terpinolen	20.647	1085	1089	1.12
3	Aldehit	<i>n</i> -Oktanal	21.231	1008	1002	14.95
4	Monoterpenoid	Terpinen-4-ol	25.217	1171	1177	0.94
5	Monoterpenoid	α -Terpineol	25.847	1192	1189	9.12
6	Aldehit	Dekanal	26.336	1204	1202	5.34
7	Monoterpenoid	Nerol	27.534	1230	1230	1.86
8	Monoterpenoid	Gereniol	28.757	1255	1253	7.78
9	Aldehit	2 <i>E</i> -Decenal	29.131	1263	1260	1.18
10	Alkol	Dec-2-en-1-ol	29.912	1277	1271	0.69
11	Aldehit	<i>n</i> -Undekanal	31.314	1308	1307	0.64
12	Monoterpen	Damascenon	35.284	1392	1388	0.59
13	Seskiterpen	β -Bourbonen	35.578	1395	1388	0.61
14	Aldehit	<i>n</i> -Dodekanal	36.081	1410	1409	0.84
15	Seskiterpen	γ -Elemen	37.229	1436	1437	1.43
16	Monoterpen	Geranil aseton	38.117	1455	1455	2.09
17	Alkol	Dodekanol (lauril alkol)	38.953	1474	1471	0.45
18	Seskiterpenoid	(<i>E</i>)- β - Ionen	39.883	1490	1487	0.64
19	Seskiterpen	β -Selinen	40.227	1497	1490	0.25
20	Aldehit	Tridekanal	40.616	1512	1510	0.86
21	Seskiterpenoid	Zonaren	41.531	1536	1530	1.95
22	Seskiterpenoid	<i>E</i> - Nerolidal	43.000	1568	1563	0.94
23	Seskiterpenoid	Karyophyllen oksid	43.127	1576	1582	0.96
24	Seskiterpenoid	Humulene Epoksid-II	44.499	1604	1608	9.81
25	Aldehit	Tetradekanal	44.905	1614	1613	1.17
26	Seskiterpenoid	α -Cadinol	46.710	1659	1663	1.61
27	Seskiterpenoid	İntermedeol	47.227	1672	1667	1.44
28	Hidrokarbon	<i>n</i> -Heptadecane	48.335	1700	1700	0.37
29	Seskiterpen	Fiton (Hekzahidrofarneşil aseton)	53.915	1842	1838	11.09
30	Alkol	Hekzadekanol	54.948	1881	1876	2.63
31	Terpenoid	Isofitol	57.561	1950	1949	0.57
32	Hidrokarbon	Eikosan	59.820	2008	2000	8.96
33	Diterpenoid	(<i>E,E</i>)-Geranil Linalool	60.538	2031	2026	0.53
Toplam						99.91

(%)^a: Bileşiğin alanı, RI*: Referans değeri, RT: Alıkonma zamanı.

Tablo 23. *H. nitidum* bitkisinin uçucu bileşenlerindeki bileşik sınıfları ve miktarları

	% ^a	Adet
Aldehit	31.48	8
Hidrokarbon	9.33	2
Monoterpen	3.8	3
Monoterpenoid	19.7	4
Seskiterpen	2.29	3
Seskiterpenoid	17.35	7
Terpenoid	0.57	1
Diterpenoid	0.53	1
Diğer	11.09	1
Toplam	99.91	33

(%)a: Bileşiğin alanı

	
n-Oktanal	Fiton (Hekzahidrofarnesil aseton)
	
α -Terpineol	Humulen Epoksid-II
	
Eikosan	Geraniol
	
Heptanal	Dekanal

Şekil 46. *H. nitidum* bitkisinin ana uçucu bileşenlerinin formülleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sekonder metabolit ve yağ asitleri bakımından zengin bir içeriğe sahip olan *Hedysarum* cinsi Fabaceae familyasında yer almaktadır (37). Cins genel olarak Orta Asya'da dağılım göstermekle birlikte genetik çeşitlilik ve endemik bakımdan İran ve Türkiye merkezi konumdadır (68). *Hedysarum* cinsi ülkemizde 21 takson ile temsil edilmekte ve bunların 11'inin endemik olduğu bilinmektedir (12). Tez çalışmasında yer alan ve halk arasında “köse batalak” olarak da bilinen *Hedysarum nitidum* endemik bir bitkidir. *H. nitidum* için yapılan literatür çalışmalarında bitkiye ait herhangi bir biyolojik aktivite, sitotoksikite veya fitokimyasal çalışmalarına rastlanmamıştır.

H. nitidum bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ve su ekstreleri üzerinde biyolojik aktivitelerinin analizi antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu, antimikrobiyal ve sitotoksikite testleri ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bitkide yer alan fenolik madde içeriğinin ve uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla YPSK ve GC-MS ile çalışılmıştır.

Antioksidan kapasite tayin çalışma sonucu elde edilen verilerin bilimsel çalışma kapsamında yapılacak olan diğer çalışmalara yol gösterdiği düşünülmektedir (213). Bu sebeple çalışmanın ilk kısmında antioksidan kapasite tayini çalışmalarına öncelik verilmiştir.

Çalışma kapsamında *H. nitidum* bitkisinin su ve metanol ekstrelerinden hareketle antioksidan kapasite tayini; Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini, Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini, Ferrik İndirgeyici FRAP Ölçümü, CUPRAC Tayini ve DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini yöntemleri ile tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında Burlando ve ark. *H. coronarium*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinde fenolik ve flavonoid madde içeriğini 62 ± 1 mg GAE/g ve 13 ± 8 g QE/g numune olarak bulmuştur (214). Altay ve ark. yaptıkları çalışmada *H. candidissimum*'un hekzan, etil asetat, metanol ve su ekstrelerinde toplam fenolik madde miktarını 5.42 ± 0.715 , 36.11 ± 1.15 , 80.88 ± 1.82 ve 46.85 ± 0.95 mg GAE/g numune bulurken flavanoid madde miktarını 0.48 ± 0.025 , 13.8 ± 1.42 , 11.88 ± 2.35 ve 35.42 ± 0.84 mg QE/g numune olarak bulmuştur (215). Bir başka çalışmada Uyar ve ark. *H. aucheri*'den elde edilen hekzan, metanol, bütanol, su ve diklorometan ekstreleri üzerinde gerçekleştirilen toplam fenolik ve flavonoid miktar tayininde flavonoid madde içeriği sırasıyla 20.8 ± 0.6 , 42.6 ± 1.4 , 66.3 ± 1.3 , 9.4 ± 1.1 ve 22.7 ± 2.5 mg QU/g DW bulunurken fenolik madde içeriği 51.7 ± 1.6 , 56.9 ± 1.3 , 56.9 ± 1.3 , 15.7 ± 0.4 ve 25.4 ± 0.8 mg GAE/g DW

olarak bulunmuştur (216). Bektaş ve ark.'nın yaptığı çalışmada *H. cappadocicum*'un su ekstresinde toplam fenolik madde miktarı 50.96 ± 1.01 mg GAE/g numune olarak bulunmuştur (217). Çalışmamızda *H. nitidum*'a ait su ve metanol ekstrelerinde fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucu toplam fenolik madde miktarları su ekstresinde 299.58 ± 2.86 mg gallik asit eşdeğeri/g numune olarak tespit edilirken metanol ekstresinde de 481.5 ± 3.74 mg gallik asit eşdeğeri/g numune olarak bulunmuştur. Bitki ekstrelerine ait toplam flavonoid miktar tayini kuersetin standart çalışma grafiği ile belirlenmiş olup su ve metanol ekstrelerinde sırasıyla 2.11 ± 0.12 , 26.62 ± 0.68 mg kuersetin eşdeğeri/g olarak bulunmuştur. Ekstrelerin içerdiği miktarlar açısından değerlendirdiğimizde en yüksek fenolik ve flavonoid bileşiğin metanol ekstresinde olduğu görülmüştür.

Bitkilerde antioksidan kapasite tayininin belirlenmesinde kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Bu yöntemler birbirleri ile kıyaslandığında her birinin kendi içinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (7). Çalışma kapsamında bitkiye ait su ve metanol ekstrelerinde antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla DPPH, CUPRAC ve FRAP yöntemleri birlikte çalışılmıştır. Çalışmamızda en yüksek fenolik ve flavonoid madde miktarlarının metanol ekstresinde olduğu görülmüştür.

Literatür taramalarında Loizzo ve ark. tarafından yapılan çalışmada *H. coronarium* etanol ekstresinde DPPH radikali süpürücü aktivitesinin IC_{50} değeri 1.6 ± 0.8 μ g/mL ve FRAP değeri 19.1 ± 1.9 μ M Fe(II)/g olarak bulunmuştur (218). Uyar ve ark. *H. aucheri* üzerinde yaptığı araştırmada farklı ekstraktların antioksidan kapasitelerini CUPRAC tayini ile kendi aralarında değerlendirmiş bütanol ekstresinin 400 μ g/mL konsantrasyonda 0.823 ± 0.08 ile en yüksek absorbansı göstererek diklorometan, hekzan, metanol ve su ekstrelerinden daha yüksek bir Cu^{+2} iyonlarını indirgeme gücünün olduğunu raporlamıştır (216). Zengin ve ark. *H. varium*'un radikal süpürücü aktivitesini DPPH yöntemi ile değerlendirerek etil asetat, metanol, su ekstrelerinde IC_{50} değerlerini 6270, 300 ve 350 μ g/mL, FRAP değerlerini 1980, 440, 430 μ g/mL ve CUPRAC değerlerini de 3.01 ± 0.279 , 0.69 ± 0.031 , 0.80 ± 0.008 mg/ml olarak bulmuştur (10). Altay ve ark.'nın yaptıkları araştırmada *H. candidissimum*'un DPPH radikali giderme aktivitesi IC_{50} değerleri etil asetat, metanol ve su ekstrelerinde 82.23 ± 1.75 , 17.61 ± 0.75 , 72.71 ± 1.44 μ g/mL olarak saptanmıştır (215). Bektaş ve ark. *H. cappadocicum*'un su ekstresinde DPPH IC_{50} ve FRAP değerlerini 108.32 μ g/mL ve 429.21 μ M FeSO₄.7H₂O/g numune olarak bulmuştur (217).

Çalışma kapsamında DPPH radikalini giderme aktivitesi tayininde standart olarak BHT kullanılmıştır. Bu tayin yöntemine göre okunan absorbans değerinin yüksekliği ile serbest radikal süpürme aktivitesi arasında ters ilişki bulunmaktadır (219). Çalışma sonucunda IC₅₀ değerleri su ekstresinde 176.8026±2.41 mg/mL, metanol ekstresinde 18.0532±1.4 mg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen IC₅₀ değerlerine göre değerlendirme yapıldığında metanol ekstresinin su ekstresine göre yüksek ve standarta yakın bir radikal süpürücü aktivite sergilediği görülmüştür. Çalışmamızda ekstrelerin FRAP ve CUPRAC değerleri trolox eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. *H. nitidum* bitkisinin su ekstresinin FRAP ve CUPRAC değerleri 455±3.14 ve 551.536±2.84 µM trolox eşdeğeri/g olarak bulunurken metanol ekstresinin FRAP ve CUPRAC değerleri 1221±5.72 ve 1331.826±2.46 µM trolox eşdeğeri/g olarak bulunmuştur.

Fenolik madde miktar tayini yönteminde fenolik olmayan bileşiklerin de indirgenmesi sebebiyle yöntemin miktar tayininden daha çok indirgeyici kapasitenin ölçülmesi amacıyla kullanımı bulunmaktadır (113). Fakat bir bileşiğin antioksidan kapasitesi hakkında yorumda bulunulmasına yöntem tek başına yeterli gelmemektedir. Bu nedenle fenolik madde içeriği bulgularının DPPH, FRAP gibi diğer antioksidan kapasite yöntemleri sonuçlarının birlikte tartışılarak yorumda bulunulması gerekmektedir. Çalışmamızda fenolik madde içeriği bulguları DPPH, CUPRAC VE FRAP antioksidan kapasite yöntemleri sonuçları ile birlikte tartışılarak değerlendirilmiştir. Ekstrelerde bulunan fenolik ve flavonoid miktarları ile elde edilen antioksidan aktivite sonuçları arasında doğrudan bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Fenolik madde içeriği yüksek bulunan metanol ekstresinin yüksek bir radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Literatürde *Hedysarum* cinsine ilişkin enzim inhibitör aktivitesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda bazı *Hedysarum* türlerinin α-glukozidaz ve asetilkolinesteraz enzimleri üzerinde iyi derecede inhibitör aktivite etki sergilediği ve Alzheimer, diyabet gibi kronik hastalıklar için umut verici bir terapötik potansiyel olabileceği bildirilmiştir (10, 215).

Bitkisel kaynaklı gıdalarda meydana gelen esmerleşme fenol bileşiklerin tirozinazlar tarafından enzimatik oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Meydana gelen bu enzimatik reaksiyonun gıda sektöründe kalite kaybına neden olması araştırmacıları tirozinaz inhibitörlerinin arayışına sürüklemiştir. Bununla birlikte tirozinaz inhibitörlerinin hiperpigmentasyon tedavisinde kullanımında fayda sağlaması ve cilt beyazlatıcı etkisinin

gözlenmesi bu bileşikler ilaç ve kozmetik sektööründe önem arz eden ajanlar haline getirmiştir. Fakat bu faydalarının yanında yüksek toksisite, düşük stabilite göstermeleri piyasada sınırlı sayıda ticari inhibitör ajanlarının olmasına sebebiyet vermiştir. Gıda ve ilaç sektöründe kullanımının önem arz etmesi yeni tirozinaz inhibitörlerinin araştırılması konusunda çalışmaları da beraberinde ihtiyaç haline getirmiştir (220). Yapılan literatür taramalarında *Hedysarum* türlerinde tirozinaz inhisyonuna yönelik çalışmalarda Zengin ve ark. tarafından *H. varium*'un etanol, metanol ve su ekstrelerinde IC₅₀ değeerlerinin 2.63±0.035, 2.50±0.014 ve 3.46±0.012 mg/mL olarak bulunduğu bildirilmiştir (10). Çalışma kapsamında α-kojik asit standartı kullanılarak bitki ekstrelerinin tirozinaz inhibitör etkinliği değeerlendirilmiştir. Kojik asit standardının, su ve metanol ekstresinin IC₅₀ değeerleri sırasıyla 61.362±2.16, 65.266±1.45 ve 43.118±2.24 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında her iki ekstrenin de tirozinaz enzimi üzerinde güçlü bir inhibitör etkinliğe sahip olduğu bulunurken, metanol ekstresinde gözlenen inhibitör aktivitenin kojik asit standardından da yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında *H. nitidum*'un hiperpigmentasyon tedavisinde terapotik bir ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasının yararlı olacağı düşünölmektedir.

Alzheimer hastalığında meydana gelen kolinerjik nörotransmisyondaki eksiklik, bu hastalığın semptomları için birinci basamak tedavi yaklaşıımı olarak kullanılan kolinesteraz inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açtığı bilinmektedir. Bu inhibitör ajanlarının Alzheimer hastalarının biliş, işlev ve davranışlarında iyileşmelere ve stabilizasyon sağlama gibi klinik fayda ve etkileri mevcuttur (148). Yapılan literatür taramalarında *H. candidissimum*'un etanol, metanol ve su ekstrelerinin asetilkolinesteraz üzerindeki IC₅₀ değeerleri Altay ve ark. tarafından sırasıyla 44.23, 93.26, 103.08 ve 133.74 µg/mL olarak bulunmuştur (215). Yapılan bir başka çalışmada da Zengin ve ark. *H. varium*'un etanol, metanol ve su ekstrelerinde asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi için IC₅₀ değeerlerini 1.44±0.001, 1.50±0.044, 9.22±0.527 mg/mL olarak bulmuştur (10). Çalışmamızda bitki ekstrelerimizin asetil ve bütirilkolinesteraz enzimi inhibisyon yeteneklerini değeerlendirmek için standart olarak galantamin kullanılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktive çalışmasında galantamin standardı, su ve metanol ekstrelerinin IC₅₀ değeerleri sırasıyla 41.786±0.93, 47.622±1.45 ve 67.087±1.14 µg/mL bulunmuştur. Bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi çalışmasında ise IC₅₀ değeerleri sırasıyla 43. 246±0.26, 106.104±1.48 ve 281.323±2.24 µg/mL olarak bulunmuştur. Her iki kolinesteraz enziminin inhibisyon sonuçlarına bakılarak değeerlendirme yapıldığında su

ekstresinde gözlenen inhibitör etkinin metanol ekstresine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Asetilkolinesteraz enzimi inhibisyonunda su ekstresinde standarta yakın seviyede inhibitör aktivitenin sergilendiğinin gözlenmesi bitkinin yeni bir AChE inhibitörü kaynağı olarak yeni araştırma konularına ışık tutması bakımından yararlı olacaktır.

Diyabet, hastaların sağlığını, yaşam kalitesini ve yaşam beklentisini ve ayrıca sağlık bakım sistemini önemli ölçüde etkileyen kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. İnhibisyon yoluyla postprandiyal hipergliseminin düşürülmesi için Tip 2 diyabet ile bağlantılı anahtar enzimlerin kullanımı, hastalığın seyrini kontrol etmek için kullanılan kritik bir terapötik stratejidir (163). Yapılan literatür taramalarında *Hedysarum* türlerine yönelik α -glukozidaz enzimi inhibitör aktivitesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma raporlanmıştır. Altay ve ark. *H. candidissimum*'un etanol, metanol ve su ekstrelerinin α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesine yönelik yaptıkları çalışmada IC_{50} değerleri sırasıyla 57.02, 28.57 ve 37.25 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (215). Zengin ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada da *H. varium*'un etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin α -glukozidaz enzimi üzerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 3.77, 2.88 ve 5.18 mg/mL olarak saptanmıştır (10). Çalışmamızda, bitki ekstrelerimizin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerini inhibe etme yetenekleri akarboz standartı ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. α -Amilaz inhibisyon aktivitesi deneyinde akarboz, su ve metanol ekstrelerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 22.640 ± 1.13 , 78.288 ± 2.05 , 55.490 ± 1.07 $\mu\text{g/mL}$ bulunurken, α -glukozidaz inhibisyon aktivitesinde 20.794 ± 0.82 , 82.321 ± 1.14 , 39.537 ± 0.27 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. Elde edilen IC_{50} değerlerine bakıldığında metanol ekstrelerinde su ekstrelerine göre daha yüksek enzim inhibisyonu aktivitesi sergilendiği saptanmış olup akarboz benzeri α -glukozidaz inhibitör aktivite sergileyen bileşiklerin özellikle metanol ekstreleri açısından zengin olduğu sonucunu doğrulamaktadır. Bu bilgiler ışığında *H. nitidum*'un α -glukozidaz enzimi üzerinde standarta yakın bir seviyede sergilediği inhibitör aktivitesi, postprandiyal hiperglisemi için etkili bir tedavi ajanı olarak değerlendirmesinde yararlı olacaktır.

Elde edilen IC_{50} değerlerine bakıldığında metanol ekstrelerinde su ekstrelerine göre daha yüksek enzim inhibisyonu aktivitesi sergilendiği saptanmış olup akarboz benzeri α -glukozidaz inhibitör aktivite sergileyen bileşiklerin özellikle metanol ekstreleri açısından zengin olduğu sonucunu doğrulamaktadır. Bu bilgiler ışığında *H. nitidum*'un α -glukozidaz enzimi üzerinde standarta yakın bir seviyede sergilediği inhibitör aktivitesi, postprandiyal hiperglisemi için etkili bir tedavi ajanı olarak değerlendirmesinde yararlı olacaktır.

Türe yönelik yapılan literatür taramalarında *H. polybotrys*'in köklerinden elde edilen HPS-1'in insan hepatoselüler karsinoma HEP-G2 hücrelerinin ve insan mide kanseri MGC-803 hücrelerinin in vitro proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe edici etkisinin olduğu çalışma bulgularına rastlanmıştır (51). Uyar ve ark. tarafından yapılan çalışmada *H. aucheri*'nin diklorometan ekstresinin (0-50 µg/mL) U87MG, A549, HeLa, CaCo-2, MCF-7 ve U87MG hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi incelenmiştir. Diklorometan ekstresi için üzerinde çalışılan hücre hatlarında CaCo-2, MCF-7 ve U87MG için daha düşük oranlarda hücre canlılığı bulunurken U87MG, A549 ve HeLa için hücre canlılığı yüksek konsantrasyonlarında anlamlı bir azalış göstermiştir (216). Çalışmamızda *H. nitidum* metanol ekstresinin 10, 30, 100 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında; su ekstresinin 30, 100 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında anlamlı azalma bulunmuştur ($p < 0.001$). Buna karşın en yüksek ekstre konsantrasyonu olan 300 µg/mL'de dahi hücre canlılık oranı %50'nin üzerinde bulunmuştur (*H. nitidum* su ekstresi için 68 ± 6.1 ; metanol ekstresi için 78 ± 0.9).

Günümüzde mikrobiyal kaynaklı bulaşıcı hastalıkların prevalansı ve komplikasyonları, hastalıkla mücadelede kullanılan antimikrobiyallere karşı geliştirilen direnç nedeniyle gün geçtikçe artış göstermektedir. Dünya çapında bir sorun haline gelen antibiyotik direnci araştırmacıları yeni antimikrobiyallerin keşfine yönelik çalışmalara teşvik etmektedir. Bununla birlikte, yeni tanıtilen antimikrobiyal ajanlara karşı direncin hızlı ve yaygın bir şekilde ortaya çıkmasına ilişkin geçmiş kayıtlar, yeni antimikrobiyal ajan ailelerinin bile kısa bir yaşam beklentisine sahip olacağını göstermektedir. Bu nedenle çoğu araştırmacı ilgisini sentetik bileşiklerle karşılaştırdıklarında daha güvenli olduğunu düşündükleri bitkilere yönlendirmiştir. Bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerinden sekonder metabolitlerin sorumlu olduğu görülmekte olup antimikrobiyal özelliklere sahip başlıca fitokimyasal grupları fenolikler ve polifenoller (flavonoidler, kinonlar, tanenler, kumarinler), terpenoidler, alkaloidler, lektinler ve polipeptitlerdir (221). Yapılan literatür taramalarında Gonchig ve ark.'nın yaptığı çalışmada aynı bölgede yetişen *H. inundatum* ve *H. alpinum*'un Gram (-) bakteriler üzerinde etkisinin olduğu bunun yanı sıra *H. alpinum*'un Gram pozitif bakterilere de etki gösterdiği bulunmuştur (222). Türe yönelik yapılan bir diğer antimikrobiyal aktivite çalışmasında da Serebryanaya ve ark., *H. caucasicum*'un Gram (+) ve (-) bakterilere karşı aktivite etkili olduğunu bildirmiştir (223). Uyar ve ark. tarafından *H. aucheri*'den elde edilen su, metanol, bütanol ve hekzan ekstratlarından hareketle *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Candida albicans* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivite tayini çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en iyi aktivitenin hekzan ekstresinde olduğu ve metanol ekstresinde su ekstresinden daha iyi bir aktivite gözlemlendiği raporlanmıştır (216). Çalışma kapsamında bitki ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ve minimal inhibisyon yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Standart ilaç etken maddesi olarak Ampisilin, Streptomisin ve Flukonazol kullanılmıştır. Gram (-) bakterilerinden *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* ve *Pseudomonas aeruginosa* 'nın, Gram (+) bakterilerden *Enterococcus faecalis* 'in *H. nitidum* ekstralarına karşı duyarlı olmadığı tespit edilmiştir. *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* maya mantarları ile antifungal etkinlik açısından değerlendirme yapıldığında herhangi bir aktivitenin görülmediği gözlenmiştir. *H. nitidum* 'un su ekstresinde antimikrobiyal etkinlik görülmediği metanol ekstresinin Gram (+) bakterilere karşı spesifik etkinlik gösterdiği saptanmıştır.

Yapılan literatür taramalarında türe yönelik gerçekleştirilen YPSK analizi çalışmalarının oldukça sınırlı olduğu gözlenmiştir. Liu ve ark. 'nın *H. polybotrys* (seksiyon Obscura), *H. gmelinii* (seksiyon Multicaulia), *H. ferganense* (seksiyon Subacaulia) ve *H. multijugum* (seksiyon Fruticosa) olmak üzere 4 farklı seksiyonu temsilen seçtikleri bitkiler üzerinde gerçekleştirdiği YPSK analizi çalışmasında ononin, formononetin-7-O- β -D-glukozid-6"-O-malonat, formononetin ve medikarpin gibi izoflavonoid bileşiklerin varlığına rastlandığı bildirilmiştir (224). Ayrıca buna ek olarak *H. gmelinii* ve *H. ferganense* 'de paratokarpin A, paratokarpin C, kanzonol C ve 4-hidroksi-lonkokarpin gibi kalkan bileşiklerinin; hedysarimbenzofuran B, hedysarimpterokarpen A, hedysarimisoflavon A, hedysarimbenzofuran A, hedysarimkoumestan D, hedysarimpterokarpen B, hedysarimkoumestan H, 5,7-dihidroksi-8-C-prenil-4'-metoksi isoflavon gibi çeşitli fenolik bileşik gruplarının bulunduğu rapor edilmiştir. Salah ve ark. yaptığı araştırmada *H. carnosum* 'un YPSK analizinde ononin, soyasaponin ve nikotiflorinin bulunduğu bildirilmiştir (225). Bir yem bitkisi olan *H. neglectum* için Dyshlyuk ve ark. yaptığı çalışmada fenolik bileşiklerden kuersetinrhampiranosid, kuersetin, gallik asit ve mangiferin varlığına rastlandığı bildirilmiştir (226). Yapılan bir başka çalışmada Bektaş ve ark. tarafından *H. cappadocicum* 'da fenolik bileşiklerden gallik asit, protokateşik asit, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, 4-kumarik asit ve kuersetinin bulunduğu belirtilmiştir (217). Çalışma kapsamında *H.*

nitiduma'a ait metanol ekstresi üzerinde yapılan YPSK analiz çalışmasında fenolik bileşiklerden 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit ve 2- hidroksisinnamik asit bulunmuştur.

Türe yönelik yapılan literatür taramalarında *H. Aucheri*'nin hekzan ekstresinin kimyasal bileşimi GC-MS ile belirlenmiş olup toplam yağın %84.20'sini temsil eden 39 bileşenin yapısının aydınlatıldığı rapor edilmiştir. Ana bileşen olarak alfa-linolenik asit (ALA- ω -3) (%32.37), palmitik asit (%24.69), linoleik asit (LA- ω -6) (%9.16), stearik asit (%7.11), arakidik asit (%3.14) ve fitol (%12.01) bulunmuştur (216). Salah ve ark. yaptığı çalışmada *H. carnosum* çiçeklerine yönelik yapılan GC-MS çalışmasında baskın bileşikler olarak palmitik asit (%20.24), linoleik asit (%14.77) ve linolenik asit (%42.36) tespit edilmiştir (225). Yapılan diğer bir çalışmada *H. pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Hekzan ekstresinin metil esterlerine ait GC-MS analiz çalışmasında 28 tane bileşen tespit edildiği bildirilmiştir. Bu bileşenlerden yapısı aydınlatan alfa-linolenik asit, linoleik asit, palmitik asit, fitol ve stearik asit bileşiklerinin toplam bileşen miktarının %65'ini teşkil ettiği raporlanmıştır (227). Çalışma kapsamında hidrodistilasyon yöntemiyle *H. nitidum*'dan elde edilen uçucu yağın bileşenlerinin tayin çalışması hekzan ekstresinin GC-MS analizi ile yapılmıştır. Çalışma sonucu 33 adet uçucu bileşenin yapısı aydınlatılmış olup aldehit (8 adet) sınıfı bileşiklerin %31.48 oranla ana bileşik olduğu tespit edilmiştir. *H. nitidum* bitkisinden aydınlatılan uçucu bileşenler aldehit, monoterpen, monoterpenoid, seskiterpen, seskiterpenoid, terpenoid, diterpenoid, alkol grubu bileşikler olarak gruplandırılmıştır. Aldehit grubu bileşiklerde n-Octanal (%14.95), seskiterpen sınıfı bileşiklerde phyton (heksahidrofarneasil aseton) (%11.09), seskiterpenoid sınıfı bileşiklerde humulen epoksit-II (%9.81), monoterpenoid sınıfı bileşikler içinde α - terpineol (%9.12) ve hidrokarbon türü bileşikler içinde eikosan (%8.96) ana bileşiklerdir.

Tez kapsamında *H. nitidum* üzerinde antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyonu, sitotoksikite, YPSK ve GC-MS çalışmaları gerçekleştirilmiş olup elde edilen bulgular literatüre yeni bir kazanım niteliğindedir. Bitki ekstraktları üzerinde gerçekleştirilen tüm çalışmalardan elde edilen verilere göre *H. nitidum*'un iyi bir antioksidan kapasiteye ve güçlü enzim inhibisyonu etkinliğine sahip olduğu görülmüştür. Bitkinin tirozinaz, α -glukozidaz ve asetilkolinesteraz enzimleri üzerinde güçlü inhibitör etkinliğe sahip olması hiperpigmentasyon, Alzheimer ve diyabet gibi rahatsızlıkların tedavisinde yeni bir terapötik ajan kaynağı olarak düşünülmesi ve yeni araştırma konularına ışık tutması bakımından önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* 21(5): 559.
2. Gasparetto JC, Martins CA, Hayashi SS, Otuky MF, Pontarolo R (2012). Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. *J Pharm Pharmacol.* (2): 172-89.
3. Kaileh M, Vanden Berghe W, Boone E, Essawi T, Haegeman G (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *J Ethnopharmacol* 113(3): 510-516.
4. World Health Organization (1999). WHO monographs on selected medicinal plants: Volume1, World Health Organization, Geneva 1: 1-5.
5. Eruygur N (2014). Türkiye’de yetişen bazı *Echium* türlerinin yara iyileştirici aktivitesinin araştırılması. Doktora tezi, Gazi Üniviversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Ana Bilim Dalı, Ankara.
6. Encarnación Dimayuga R, Keer Garcia S (1991). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. *J Ethnopharmacol* 31(2): 181-192.
7. Okan O, Hülya Varlıbaş, Öz M, Deniz İ (2013). Antioksidan analiz yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 13 (1): 48-59.
8. World Health Organization (2022). Noncommunicable diseases. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.
9. Yeşil Y, İnal İ (2021). Ethnomedicinal plants of Hasankeyf (Batman-Turkey). *Frontiers in Pharmacology* 11: 624710.
10. Zengin G, Guler GO, Aktumsek A, Ceylan R, Picot CMN, Mahomoodally MF (2015). Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey. *Hindawi Publishing Corporation Advances in Pharmacological Sciences* 2015: 410675.
11. Çekin MD, Altuncan F, Yakut A, Tınmaz MZ (2011). Bitkilerle tedavi sempozyumu. Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği, İstanbul.

12. Davis PH (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 3. Edinburgh University Press, Edinburgh.
13. Wang W, Liang H, Wang B, Tu GZ, Chen HB, Zhao YY (2005). A new natural product from the roots of *Hedysarum multijugum*. Journal of Peking University. Health sciences 37(5): 532-535.
14. Liu Y, Yang JS (2005). Studies on chemical constituents isolated from *Hedysarum polybotrys*. Chin Pharm J 40: 1215-1216.
15. Chen SG (2007). Studies on the chemical constituents of *Hedysarum scoparium* and *Inula Hupehensis*. Yüksek Lisans Tezi: Lanzhou Üniversitesi, Çin.
16. Neretina OV, Fedorov SV, Gromova AS, Lutsii VI, Elkin YN (2002). Flavonoids of *Hedysarum setigerum*. Chemistry of Natural Compounds 38: 194-195.
17. Neretina OV, Gromova AS, Lutsii VI, Semenov AA, Ushakov IA, Makareva TN, Owen NL (2004). Secondary metabolites from *Hedysarum setigerum*. Chemistry of Natural Compounds 40: 91-92.
18. Glyzina GS, Komissarenko NF (1967). The flavonoids of *Hedysarum gmelini*. Khim Prir Soedin 3: 116.
19. Glyzina GS, Bykov VI (1969). Phenolic compounds of *Hedysarum neglectum*. Khim Prir Soedin 5: 272.
20. Komissarenko AN, Nadezhina TP, Komissarenko NZ (1994). Flavonoids and xanthenes of *Hedysarum connatum* and *H. alpinum*. Chemistry of Natural Compounds 30: 521–522.
21. Glyzin VI, Bykov VI, Glyzina GS (1968). The phenolic compounds of *Hedysarum komarovii*. Khim Prir Soedin 4: 324.
22. Glyzin VI, Bankovsii AI, Pavlova HS (1970). Phenolic compounds of *Hedysarum sachalinense* and *H. brandtii*. Khim Prir Soedin 6: 372.
23. Alaniya MD (1983). Flavonoids of *Hedysarum sericeum* and *H. caucasicum*. Plenum publishing corporation 19: 612-613.

24. Nechepurenko IV, Polovinka MP, Komarova NI, Korchagina DV, Salakhutdinov NF, Nechepurenko SB (2008). Low-molecular-weight phenolic compounds from *Hedysarum theinum* roots. *Chemistry of Natural Compounds* 44: 31-34.
25. Liu Y, Zhao YY, Chen HB, Wang B, Zhang QY (2010). Chemical analysis of the principal flavonoids of *Radix Hedysari* by HPLC. *Natural Product Communications* 5(4): 541-544.
26. Hai LQ, Zhang QY, Liang H, Zhao YY, Du NS (2003). Study on chemical constituents of *Hedysarum polybotrys*. *Acta Pharm Sinica* 38(8): 592-595.
27. Wang W, Chen HB, Wang WM, Zhao YY (2002). Studies on flavonoid constituents of *Hedysarum multijugum*. *Acta Pharm Sinica* 37: 196-198.
28. Yang M, Wang W, Sun JH, Zhao YY, Liang H, Guo DA (2007). Characterization of phenolic compounds in the crude extract of *Hedysarum multijugum* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21(23): 3833-3841.
29. Liu Y, Zhao YY, Tu GZ, Chen HB (2005). Flavonoids of the roots of *Hedysarum kirghisorum*. *Biochem Syst Ecol* 33(8): 809-812.
30. Chen SG, Chen JJ, Gao K (2007). Prenylisoflavone derivatives from the roots of *Hedysarum scoparium*. *Chem Pharm Bull* 55: 1181-1184.
31. Chen SG, Li Y, Zhao J, Gao K (2008). Three new prenylfuranoisoflavonoids from the roots of *Hedysarum scoparium*. *Chin J Chem* 26: 531-535.
32. Li YZ, Huang J, Guo HC, Ren B (2009). Chemical constituents from *Hedysarum polybotrys* and their antitumor activities. *Chin Trad Herb Drugs* 40: 1195-1198.
33. Liu Y, Chen HB, Qiao L, Zhao YY (2005). Two new isoprenyl chalcones from *Hedysarum gmelinii*. *J Asian Nat Prod Res* 7(5): 723-727.
34. Nechepurenko IV, Polovinka NP, Salnikova OI, Pokrovskii LM, Komarova NI, Salakhutdinov NF, Nechepurenko SB (2007). Components of the ethylacetate extract of *Hedysarum theinum* roots. *Chemistry of Natural Compounds* 43: 5-9.
35. Rybachenko AI, Krivut BA, Georgievskii VP (1976). Fluorodensitometric determination of mangiferin and isomangiferin in *Hedysarum flavescens* and *H. Alpinum*. *Chemistry of Natural Compounds* 12: 395-396.

36. Denisova OA, Glyzin VI, Rusakova SV, Pimenov MG (1977). Xanthone C-glycosides of *Hedysarum denticulatum*. Chemistry of Natural Compounds 13: 245.
37. Dong Y, Tang D, Zhang N, Li Y, Zhang C, Li L, Li M (2013). Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum*. Chemistry Central Journal 7(1): 124.
38. Hai LQ, Zhang QY, Wang Y, Zhao YY (2006). Study on chemical constituents of *Hedysarum polybotrys* (IV). Lishizhen Med Materia Medica Res 17: 1659.
39. Li YS, Chen JJ, Liao XR, Wang HY, Luo SD (2001). Studies on chemical constituents of *Hedysarum sikkimense* var *Rigidum*. Chin Trad Herb Drugs 32: 489-490.
40. Liu Y, Zhang Z, Zhang QY, Pu XP, Zhao YY (2010). Study on chemical constituents and antioxidative activity of Radix Hedysari. China Pharm 24: 543-549.
41. Liu Y, Zhang QY, Chen HB, Wang B, An DG, Zhao YY (2006). Structural determination of saponins from *Hedysarum polybotrys*. Magn Reson Chem 44: 1128-1130.
42. Wang W, Hai LQ, Zhao YY, Chen HB, Wang B, Liang H (2007). Saponins from roots of *Hedysarum multijugum*. China J Chin Mat Med 32: 315-317.
43. Wang W, Zhao YY, Liang H, Jia Q, Chen HB (2006). Coumestans from *Hedysarum multijugum*. J Nat Prod 69: 876-880.
44. Liu Y, Ma XX, Chen HB, Tu GZ, He JM, Zhao YY (2005). Chemical constituents of *Hedysarum gmelinii*. J Chin Pharm Sci 14: 75-78.
45. Neretina OV, Gromova AS, Lutsikii VI, Semenov AA, Ushakov IA, Dmitrenok PS, Oven NL (2004). Isolariciresinol glucoside, berberine, and phenolic acid from the aerial part of *Hedysarum setigerum*. Chemistry of Natural Compounds 40: 609-610.
46. Wang W, Chen W, Chen HB, Liu JQ, Zhao YY (2001). Study on chemical constituents of *Hedysarum multijugum*. J Peking University (Health Sciences) 33: 205-208.
47. Hui HP, Feng SL, Zhao LG, Shi YK, Liu XH (2010). Purification and structure identification of HPS. LiShizhen Med Materia Medica Res 21: 2302-2303.
48. Miyase T, Fukushima S, Akiyama Y (1984). Studies on the constituents of *Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz. Chem Pharm Bull 32: 3267-3270.

49. Tava A, Biazzi E, Ronga D, Mella M, Doria F, Addabbo T, Candido V, Avato P (2021). Chemical identification of specialized metabolites from Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) collected in Southern Italy. *Molecules*, 26(15): 4606.
50. Li SG, Wang DG, Tian W, Wang XX, Zhao JX, Liu Z, Chen R (2008). Characterization and anti-tumor activity of a polysaccharide from *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. *Carbohydr Polym* 73: 344-350.
51. Hui HP, Feng SL, Hu FD, Cui F, Wu YQ (2010). Study on antioxidative activity of polysaccharide from Radix Hedysari in vitro. *J Anhui Agri Sci* 38: 4056-4057.
52. Hu FD, Li XD, Zhao LG, Feng SL, Wang CM (2010). Antidiabetic properties of purified polysaccharide from *Hedysarum polybotrys*. *Can J Physiol Pharm* 88: 64-72.
53. Mao XJ, Wang JZ, Wang FL (1989). Effects of Radix Hedysari polysaccharide (RHPS) & astragali polysaccharide (APS) on immune functions. *Chin Pharm Bull* 5:367-372.
54. Quan JX (1997). The pharmacological research on Hedysari. *LiShizhen Med Materia Medica Res* 8: 178-180.
55. Wang W, You CG, Wang Y, Wang CM, Hu JC, Zheng HJ (2000). The RHTS' enhancement to the function of mouse immunocytes and its relation with CaM levels in the cells. *J Lanzhou University* 5: 112-116.
56. Yu L, Cao Y, Wei X, Xu L, Fang TH (2010). The Immuno regulation effects of different extracts from radix Astragali and Radix Hedysari. *J Anhui Agri Sci* 38: 20623-20624.
57. Wei DF, Zhang LF, Cheng WD, Gui MM, Li XY, Wei YX, Bao YC (2012). Comparative study of Hedysari Radix and Astragali Radix alternative classic tonification prescriptions on humoral immunity in immunosuppressed mice. *Zhongyaocai* 35: 944-948.
58. Abdelguerfi-Berrekia A, Abdelguerfi A, Bounaga N, Guittonneau GG (1991). Répartition des espèces spontanées du genre *Hedysarum* selon certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages* 126: 187-207.
59. Simpson MG (2006). *Plant Systematics*. 1. Edition. Elsevier-Academic Press, New York.

60. Rahman AHMM, Parvin MIA (2014). Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. *Research in Plant Sciences* 2(1): 6-8.
61. Latifi A, Akan H (2020). Harran Üniversitesi Herbaryum (HARRAN)'undaki Fabaceae familyasının taksonları. *Turkish Journal of Bioscience and Collections* 4 (2): 64-104.
62. Omonhinmin CA, Ogunbodede OO (2013). Genetic diversity, taxonomy and legumins implications of seed storage protein profiling in Fabaceae. *African Journal of Biotechnology* 12(17): 2157-2163.
63. The Legume Phylogeny Working Group (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Phylogeny and classification of the Leguminosae* 66 (1): 44-77.
64. Ahmad F, Anwar F, Hira S (2016). Review on medicinal importance of Fabaceae family. *Pharmacology Online* 3: 151-156.
65. Carvalhoa AA, Santosa LR, Freitas JS, Chavesa MH (2020). Isoflavonoides da tribo dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília papilionoideae. *Química Nova* 43(9): 1294-1311.
66. Gözen BG (2012). İstanbul çevresinin burçak (*Vicia L.*) (Seksiyonlar: *Ervum* ve *Cracca*) taksonları üzerinde karpolojik ve mikromorfolojik araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul.
67. Baytop A (1991). *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını No:58, İstanbul, 224.
68. Yurkevich OY, Samatadze TE, Selyutina IY, Romashkina SI, Zoshchuk SA, Amosova AV, Muravenko OV (2021). Molecular cytogenetics of Eurasian species of the genus *Hedysarum* L. (Fabaceae). *Plants* 10(1): 89.
69. Choi BH, Ohashi H (2003). Generic criteria and an infrageneric system for *Hedysarum* and related genera (Papilionoideae-Leguminosae). *Taxon* 52(3): 567-576.
70. Linnaeus C (1753). *Species Plantarum*. Laurentius Salvius, Stockholm.
71. Yıldız B, Altoklu E (1996). Türkiye'nin *Hedysarum* L. (Fabaceae) cinsine ait türlerin revizyonu. TÜBİTAK, Temel Bilimler Araştırma Grubu, Proje No: TBAG-1147, 65 S.

72. Hedge IC (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Volume 3. Edinburgh University, UK; 549-590.
73. Tübives (2022). Türkiye Bitkileri Veri Servisi. Erişim adresi: [http:// www.tubives.com](http://www.tubives.com).
74. Saatçioğlu G (2017). Türkiye’de yetişen *Hedysarum L.* (Fabaceae) taksonlarının polen morfolojisi. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Bursa.
75. Halliwell B, Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Journal Biochemistry* 219(1): 1-14.
76. Mercan U (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15 (1-2): 91-96.
77. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 4(1): 50-59.
78. Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 9130976.
79. Buonocore G, Groenendaal F (2007). Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 12(4): 287-295.
80. Gutteridge JM (1993). Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* 19(3): 141-158.
81. Çetin E, Çetin N, Küçük O (2011). Toklularda Karayolu ile taşımanın oksidan antioksidan sistem üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 6(2): 103-109.
82. Özyürek M, Bekdeşer B, Güçlü K, Güngör N, Apak MR (2010). A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 689-698.
83. Fridovich I (1997). Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry* 272(30): 18515-18517

84. Sutton HC, Winterbourn CC (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med* 6(1): 53-60.
85. Yılmaz İA (2001). Mesane kanseri olguları ile plazma protein oksidasyonu arasındaki ilişki. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilimdalı, İstanbul.
86. Tabakoğlu E, Durgut R (2013). Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri. *AVKAE Derg.* 3(1): 69-75.
87. Pekcan Z, Çınar M, Gürkan M, Kumandaş A (2011). Ankara Keçilerinde Propofol ve İzofluran Anestezisinin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 6(3): 217-222.
88. Yarsan E (1998). Lipid Peroksidasyon Olayı ve Önlenmesine Yönelik Uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 9(1): 89-95.
89. Bautistaa CP, Ventoa M, Baquerob M, Pericás CC (2019). Lipid peroxidation in neurodegeneration. *Clinica Chimica Acta* 497: 178-188.
90. Wickens AP (2001). Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology* 128: 379-391.
91. Devasagayam TPA, Boloor KK, Ramasarma T (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). *Indian Journal Biochem. Biophys* 40(5): 300-308.
92. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lee RD (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India* 52: 794-804.
93. Akalın Z (2004). Aterosklerotik damar hastalıklarında oksidatif DNA hasarının incelenmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilimdalı, İstanbul.
94. Shinde A, Ganu J, Naik P (2012). Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A review. *Journal of Dental Allied Sciences* 1(2): 63-66.
95. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry Cell Biology* 39: 44-84.

96. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1(1): 65-76.
97. Ratnam VD, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. Journal of Control Release 113: 189-207.
98. Haida Z, Hakiman M (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. Food Science Nutrition 7: 1555–1563.
99. Yalçın AS (1998). Antioksidanlar. Klinik Gelişim 11(1-2): 342-346.
100. Şen S, Chakraborty R (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy 1: 1-37.
101. Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 54(3): 176-186.
102. Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of laboratory and clinical medicine 70(1): 158-159.
103. Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress, Critical Reviews in Biotechnology 30(3): 161-175.
104. Özkan A, Fışkın K (2004). Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler. Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi 14: 52-60.
105. Townsenda DM, Tewa KD, Tapiero H (2003). The importance of glutathione in human disease. Biomedicine Pharmacotherapy 57: 145-155.
106. Lewandowska JK, Kaspercak M, Bogut B, Heider R, Laber WT, Laber W, Borowicz MP (2020). The Impact of Health Resort Treatment on the Nonenzymatic Endogenous Antioxidant System. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 147: 1-9.
107. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Jimenez MA, Qin L (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. Journal of Pineal Research 61(3): 253-278.

108. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 582(13): 1783-1787.
109. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
110. Lee GY, Han SN (2018). The role of vitamin E in immunity. *Nutrients* 10(11): 1614.
111. Akdoğan A, Dinçer C, Torun M, Şahin H, Topuz A, Özdemir F (2008). Karotenoid bileşiklerin sağlık üzerine etkileri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 21-23 Mayıs 2008*, 1083-1086.
112. Kahraman A, Serteser M, Koken T (2002). Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 3: 1-8.
113. Albayrak S, Sağdıç O, Aksoy A (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 26(4): 401-409.
114. Özyürek M, Güçlü K, Apak R (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry* 30(4): 652-664.
115. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement* 28(4): 41-55.
116. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Özyurt D (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12: 1496-1547.
117. Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841- 1856.
118. Dönertaş HM, Cuesta SM, Rahman SA, Thornton JM (2016). Characterising complex enzyme reaction data. *Plos One* 11(2): e0147952.
119. Wolfenden R (2006). Degrees of difficulty of water-consuming reactions in the absence of enzymes. *Chemical Reviews* 106: 3379-3396.
120. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK (2015). Actinobacterial enzyme inhibitors. *Critical Reviews in Microbiology* 41(2): 261-272.

121. Bingöl G (1977). Vitaminler ve enzimler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara.
122. Tao Z, Dong B, Teng Z, Zhao Y (2020). The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access* 8: 89802-89811.
123. Nallapareddy MV, Dwivedula R (2021). Able: Attention based learning for enzyme classification. *Computational Biology and Chemistry* 94: 107558.
124. Saboury AA (2009). Enzyme inhibition and activation: a general theory. *Journal of the Iranian Chemical Society* 6: 219-229.
125. Amine A, Arduini F, Moscone D, Palleschi G (2016). Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics* 76: 180-194.
126. Aynacı E (2015). Asetilkolin biyosensörünün hazırlanması, Alzheimer tedavisi için yeni asetilkolinesteraz inhibitörlerinin sentezi, spektrofotometrik ve elektrokimyasal yöntemlerle inhibisyon özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
127. Kitz R, Wilson IB (1962). Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry* 237: 3245-3249.
128. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E (2002). Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 17(4): 207-218.
129. Ramsden CA, Riley PA (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22: 2388-2395.
130. Brenner M, Hearing VJ (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 84: 539-549.
131. Del Marmol V, Beermann F (1996). Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Letters* 381(3): 165-168.
132. Shen Z, Wang Y, Guo Z, Tan T, Zhang Y (2019). Novel tyrosinase inhibitory peptide with free radical scavenging ability. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34: 1633-1640.

133. Zolghadri S, Bahrami A, Khan MTH, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Ali Akbar Saboury (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34(1): 279-309.
134. Chang TS (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 10(6): 2440-2475.
135. Lee SY, Baek N, Nam T (2016). Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(1): 1-13.
136. Kahn V (1995). Effect of kojic acid on the oxidation of DL-DOPA, norepinephrine, and dopamine by mushroom tyrosinase. *Pigment Cell Research* 8(5): 234-240.
137. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F (1994). Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46(12): 982-985.
138. Briganti S, Camera E, Picardo M (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research* 16(2): 101-110.
139. Munoz-Munoz JL, Garcia-Molina F, Varon R, Garcia-Ruiz PA, Tudela J, Garcia-Cánovas F, Rodriguez-Lopez JN (2010). Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life* 62(7): 539-547.
140. Sun W, Wendt M, Klebe G, Röhm KH (2014) On the interpretation of tyrosinase inhibition kinetics. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 29(1): 92-99.
141. Cabezudo I, Ramallo IA, Alonsob VL, Furlan RLE (2021). Effect directed synthesis of a new tyrosinase inhibitor with anti-browning activity. *Food Chemistry* 341(1): 128232.
142. Haam J, Yakel JL (2017). Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of Neurochem* 142(2): 111-121.
143. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM (2016). Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology* 14(1): 101-115.

144. Koçancı FG, Aslım B (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture and Life Science* 6(1): 19-35.
145. Sanders LM, Zeisel SH (2007). Choline: dietary requirements and role in brain development. *Nutr Today* 42(4): 181-186.
146. Wilkinson DG, Francis PT, Schwam E, Jennifer Payne-Parrish J (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging* 21(7): 453-478.
147. Halder N, Lal G, (2021). Cholinergic system and its therapeutic importance in inflammation and autoimmunity. *Frontiers in Immunology* 12: 660342.
148. Talesa VN (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 122(16): 1961-1969.
149. Stanciu GD, Luca A, Rusu RN, Bild V, Chiriac SIB, Solcan C, Bild W, Ababei DC (2019). Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement. *Biomolecules* 10(1): 40.
150. Pohanka M (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(3): 219-229.
151. Tripathi A, Srivastava UC (2008). Acetylcholinesterase: A versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences* 15(4): 106-111.
152. Kia Y, Osman H, Kumar RS, Basiri A, Murugaiyah V (2014). Synthesis and discovery of highly functionalized mono- and bis-spiro-pyrrolidines as potent cholinesterase enzyme inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 24(7): 1815-1819.
153. Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine* 57: 513-533.
154. Kihara T, Shimohama S (2004). Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 64(1): 99-106.

155. Martinez A, Castro A (2006). Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 15(1): 1-12.
156. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141(7): 1917-1933.
157. Raina P, Santaguida P, Ismaila A, Patterson C, Cowan D, Levine M, Booker L, Oremus M (2008). Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 148(5): 379-397.
158. Sun Y, Lai MS, Lu CJ, Chen RC (2008). How long can patients with mild or moderate Alzheimer's dementia maintain both the cognition and the therapy of cholinesterase inhibitors: a national population-based study. *Eur. J. Neurol* 15(3): 278-283.
159. Grutzendler J, Morris JC (2001). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Drugs* 61(1): 41-52.
160. Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Bloch Jr C, Silva CP, Grossi de Sa MF (2001). Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry* 267(8): 2166-2173.
161. Yoon SH, Robyt JF (2003). Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV-alpha-maltohexaosyl and 4IV-alpha-maltododecaosyl analogues. *Carbohydrate Research* 338(19): 1969-1980.
162. Melo EB, Gomes AS, Carvalho I (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62(44): 10277-10302.
163. Sancheti S, Sancheti S, Lee SH, Lee JE, Seo SY (2011). Screening of Korean Medicinal Plant Extracts for α -Glucosidase Inhibitory Activities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10(2): 261-264.

164. Başak SŞ (2008). Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis* DEHNH.), Defne (*Laurus nobilis* L.) ve Mersin (*Myrtus communis* L.)’den elde edilen uçucu yağların, α -amilaz ile α -glukozidaza etkisi ve antioksidan özellikleri. Doktora tezi. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Sivas.
165. Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR, Joshi BN (2011). Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011: 810207.
166. Taslimi P, Gulçin İ (2017). Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glycosidase and α -amylase enzymes. J Biochem Mol Toxicol 31(10).
167. Chaudhry F, Choudhry S, Huma R, Ashraf M, Al-Rashida M, Munir R, Sohail R, Jahan B, Munawar MA, Misbahul AK (2017). Hetarylcoumarins: Synthesis and biological evaluation as potent α -glucosidase inhibitors. Bioorg. Chem. 73: 1-9.
168. Ecemiş GC, Atmaca MH (2012). Oral antidiyabetik ajanlar. Journal of Experimental and Clinical Medicine 29(1): 23-29.
169. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicol In Vitro 16(5): 599-607.
170. Erkekoğlu P, Baydar T (2021). Güncel in vitro sitotoksisite testleri. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 41(1): 45-63.
171. Bopp SK, Lettieri T (2008). Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. BMC Pharmacology 8(1): 8.
172. Schmalz G (1998). The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. Eur J Oral Sci. 106(2): 696–706.
173. Tuncer S, Demirci M (2011). Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 21(2): 141–149.
174. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV (2009). Biocompatibility of Resin-based dental materials. Materials 2(2): 514-548.

175. Aronsson, G, Dahlgren UI, Karlsson S (2000). Human and rat mononuclear cell proliferation show different sensitivity, in vitro, to single constituents of dental composite resins. *Journal of Biomedical Materials Research* 53(6): 651-657.
176. Erdem SS, Yılmaz M, Yıldırım H, Mayda AS, Bolu F, Durak AA, Şener Ö (2017). Düzce’de yaşayanların kanser ve kanser risk faktörleri hakkında bilgi düzeyi. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(1): 1-10.
177. Damyanov CA, Maslev IK, Pavlov VS, Avramov L (2018). Conventional treatment of cancer realities and problems. *Ann Complement Altern Med* 1(1): 1–9.
178. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 3(1): 7.
179. Chavda VP, Vihol D, Mehta B, Shah D, Patel M, Vora LK, Pereira-Silva M, Paiva-Santos AC (2022). Phytochemical-loaded liposomes for anticancer therapy: an updated review. *Nanomedicine* 17(8): 547-568.
180. Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V, Bazzaz BSF (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 8: 118.
181. Ababutain IM (2011). Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts From Some Medicinal Plant. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11): 678-683.
182. Masotti V, Juteau F, Bessiere JM, Viano J (2003). Seasonal and phonological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(24): 7115-7121.
183. Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/ leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(12): 4364-4370.
184. Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A (2015). Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(10): 1320–1323.

185. Ginovyan M, Petrosyan M, Trchounian A (2017). Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine 17: 50.
186. Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K (2014). Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. *BioMed Research International* 2014: 761741.
187. Yıldırım Y (2010). Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri; İlgili Metodlar, Sonuçların Yorumlanması ve Kanatlılarda Bulunan Bazı Bakterilerdeki Dirençlilik. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 7(2): 117-129.
188. Ankaralıgil P, Aydeniz-Güneşer B (2021). Fonksiyonel Gıda Bileşenlerinin Tespit Edilmesinde Enstrümental Analiz Tekniklerinin Önemi. *European Journal of Science and Technology* 28: 251-258.
189. Fidancı U R (2009). Kromatografi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi.
190. Öz S, Mutlutürk E (2020). Aletli Analiz Laboratuvarı. İksad yayınevi, Ankara.
191. Eser B, Sepici Dinçel A (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education* 2(2): 51-57.
192. Petrova OE, Sauer K (2017). High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. *Methods Mol Biol* 1657: 33–43.
193. Giri NC (2019). Introduction to probability and statistics. (2. baskı). Taylor and Francis Group, New York.
194. Weston, A.and Brown, P.R. (1997). HPLC and CE principles and practice. Academic Press, San Diego.
195. Forhergill WT (1968). Gas Chromatography. *Journal of the Royal Society of Medicine* 61(5): 525-528.
196. Orhun F (1968). Gaz Kromatografisi, Taşıyıcı Gazın Akış Hızının Tesirleri Üzerinde Tecrübi Araştırmalar ve Metodun Türkiye’deki Bazı Tabii Gazların Hidrokarbon Analizlerine Tatbiki. *Maden Tetkik ve Arama Dergisi* 70: 143-177.

197. Budak Ş (2022). Gaz Kromatografisi. Ankara Üniversitesi. Erişim adresi: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/192284/mod_resource/content/0/GC-MS.pdf
198. Öksüz E (2019). *Scorzonera pisdica* ve *S. sandrasica* bitkilerinin fitokimyasal analizleri ve biyolojik aktiviteleri. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Ana Bilim Dalı, Trabzon.
199. Atik G (2020). *Eryngium billardieri* bitki ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Ana Bilim Dalı, Trabzon.
200. Soysal Y, Öztekin S (1998). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Ekstraksiyon Yöntemleri. 18. Ulusal Tarımsal Mekanizasyon Kongresi, Tekirdağ, 17-18 Eylül 1998, 731-745.
201. Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
202. Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P (1994). Standardization of a propolis extract and identification of principal constituents. *Journal of Pharmacy* 49(6): 462-468.
203. Benzie IF, Strain JJ (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* 299: 15-27.
204. Likhitwitayawuid K, Sritularak B (2001). A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. *Journal of Natural Product* 64: 1457-1459.
205. Ellman GL, Courtney KD, Andres JV, Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
206. Palanisamy UD, Ling LT, Manaharan T, Appleton D (2011). Rapid isolation of geranin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chemistry* 127(1): 21-27.

207. Yang XW, Huang MZ, Jin YS, Sun LN, Song Y, Chen HS (2012). Phenolics from *bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia* 83(7): 1169-1175.
208. Abudayyak M, Güzel E, Özhan G (2017). Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells. *Neurochem Int.* 108: 7-14.
209. Perez C, Pauli M, Bazerque P (1990). An antibiotic assay by the well agar method. *Acta Biologia et Medicine Experimentalis* 15: 113-115.
210. Woods GL, Brown Elliott BA, Desmond EP, Hall GS, Heifets L, Pfyffer GE, Ridderhof JC, Wallace RJ, Warren NC, Witebsky FG (2003). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard. NCCLS document M24, 23.
211. Cuendet M, Hostettman K, Potterat O, Dyatmiko W (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80: 1144-1152.
212. S. Yıldırım, A. Kadioğlu, A. Sağlam, A. Yaşar (2017). Determination of phenolic acids and rutin in *Heliotropium thermophilum* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Instrum. Sci. Technol.* 45: 35–48.
213. Kaur C, Kapoor HC (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science Technology* 36: 703- 725.
214. Burlando B, Pastorino G, Salis A, Damonte G, Clericuzio M, Cornara L (2017). The bioactivity of *Hedysarum coronarium* extracts on skin enzymes and cells correlates with phenolic content. *Pharmaceutical Biology* 55(1):1984-1991.
215. Altay A, Yeniceri E, Taslimi P, Taskin Tok T, Yilmaz MA, Koksall E (2022). Biochemical Approach for *Hedysarum candidissimum* from Turkey: Screening Phytochemicals, Evaluation of Biological Activities, and Molecular Docking Study. *Chemistry and Biodiversity* 19:1-18.
216. Uyar Z, Koz Ö, Uyar E, Arslan Ü, Koyuncu İ, Nalbantsoy A (2017). Total phenolic, flavonoid, fatty acid contents and cytotoxic, antioxidant, and antimicrobial activities of *Hedysarum aucheri*. *Journal of Pharmaceutical Research International* 19(3): 1-13.

217. Bektaş E, Kaan Kaltalioglu K, Sahin H, Turkmen Z, Kandemir A (2018). Analysis of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of some endemic medicinal plants. *International Journal of Secondary Metabolite* 5 (2): 75–86.
218. Loizzo MR, Pugliese A, Bonesi M, Tenuta MC, Menichini F, Xiao J, Tundis R (2016). Edible flowers: A rich source of phytochemicals with antioxidant and hypoglycemic properties. *J Agric Food Chem.* 64(12):2467-2474.
219. Büyüktuncel E (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 17: 93-103.
220. Zolghadri S, Bahrami A, Khan MTH, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas, Saboury AA (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34: 279-309.
221. Ginovyan M, Petrosyan M, Trchounian A (2017). Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17: 50.
222. Gonching, Erdebebat E, Togtoo S, Bataa O, Genderam S, Kim O, Ryu YS, Yong S (2008). Antimicrobial activity of Mongolian medicinal plants. *Nat. Prod. Sci.* 14(1): 32.
223. Serebryanaya FK, Imachueva DR, Guseynova ZA (2020). Pharmacognostical investigations of *Hedysarum Caucasicum* Bieb.(Fabaceae) – An ethnomedicinal plant of Northern Caucasus, Russia, determination of mangiferin and antibacterial potentials. *Pharmacogn J.* 12(3): 510-518.
224. Liu Y, Yang H, Lie Y, Wang W, Zhao Y, Chen H, Liang H, Zhang Q (2019). Chemotaxonomy studies on the genus *Hedysarum*. *Biochemical Systematics and Ecology* vol. 86.
225. Salah NB, Casabianca H, Essaidi I, Chenavas S, Fildier A, Sanglar C, Jannet HB, Bouzouita N (2016). Isolation and structure elucidation of two new antioxidant flavonoid glycosides and fatty acid composition in *Hedysarum carnosum* Desf. *Industrial Crops and Products* 81: 195-201.

226. Dyshlyuk LS, Fotina NV, Milentyeva IS, Ivanova SA, Izgarysheva NV, Golubtsova YV (2021). Antimicrobial and antioxidant activity of *Panax ginseng* and *Hedysarum neglectum* root crop extracts. *Brazilian Journal of Biology* 84: 2024.
227. Tumbul F (2016). *Hedysarum Pycnostachyum*(Fabaceae) Bitkisinin içerdđi doğal bileşiklerin izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve biyolojik aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , Kimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

