



***TRIBULUS TERRESTRIS VE RUBIA
TINCTORIUM EKSTAKTLARININ TOPLAM
FENOLİK MADDE, ANTİOKSİDAN
KAPASİTELERİ VE KOLİNERJİK SİSTEM
ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ***

**2023
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA TOKSİKOLOJİSİ**

Nazrin NOVRUZLU

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Müslüm KUZU**

***TRIBULUS TERRESTRIS* VE *RUBIA TINCTORIUM* EKSTARKTLARININ
TOPLAM FENOLİK MADDE, ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ VE
KOLİNERJİK SİSTEM ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Nazrin NOVRUZLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Müslüm KUZU

T.C.

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalında

Yüksek Lisans Tezi

Olarak Hazırlanmıştır

KARABÜK

Aralık 2023

Nazrin NOVRUZLU tarafından hazırlanan “*TRIBULUS TERRESTRIS* VE *RUBIA TINCTORIUM* EKSTAKTLARININ TOPLAM FENOLİK MADDE, ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ VE KOLİNERJİK SİSTEM ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Müslüm KUZU

.....

Tez Danışmanı, Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 04/12/2023

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Müslüm KUZU (KBÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Şevki ADEM (ÇAKÜ)

.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Zeynep ÖZCAN

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Nazrin NOVRUZLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***TRIBULUS TERRESTRIS* VE *RUBIA TINCTORIUM* EKSTARKTLARININ TOPLAM FENOLİK MADDE, ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİ VE KOLİNERJİK SİSTEM ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Nazrin NOVRUZLU

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Müslüm KUZU

Aralık 2023, 66 sayfa

Bu çalışmada *Tribulus terrestris* (Demirtikan) ve *Rubia tinctorium* (Boyaqotu) bitkilerinden elde edilen farklı ekstrelerin (Petrol eteri, Kloroform, Metanol, Etanol) antioksidan ve toplam fenolik madde miktarı belirlenmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH, CUPRAC, FRAP ve ABTS yöntemleriyle incelenmiş, bunun yanında asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz aktiviteleri üzerine ekstraktların etkileri değerlendirilmiştir. Böylece bazı hastalıkların beslenmeyle önlenmesi ve bitkisel kaynaklı ilaçların üretiminde kullanılması gibi olasılıklar incelenmiş ve ayrıca *Rubia tinctorium* etanol ekstraktının içerik analizleri LC-MS/MS kullanılarak yapılmıştır.

Tribulus Terrestris ve *Rubia Tinctorium* yaprak ve çiçek kısımlarını birlikte içeren örneklerden maserasyon yöntemi ile metanol, etanol, kloroform ve petrol eteri

çözücüleri kullanılarak farklı ekstraktlar elde edildi. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek toplam fenolik madde miktarına her iki bitkinin metanol ekstraktında, en düşük toplam fenolik madde miktarına BOE ve DTP de rastlanmıştır. Aynı şekilde FRAP metodunda en yüksek sonuç BOK ve DTM, en düşük ise her iki bitkinin petrol eteri ekstraktında görülmüştür. CUPRAC metodunda sonuçlar GA > BHA > Troloks > DTM > BOK > DTE > BOP > BOM > DTK > BOE > DTP şeklindedir. ABTS yöntemine göre en yüksek antioksidan kapasiteye DTM ve BOM, en düşük kapasiteye ise BOE ve DTP ekstraktlarının sahip olduğu belirlendi. BOM ve DTM ekstraktının IC₅₀ değerine göre en güçlü DPPH• radikali giderme kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Benzer şekilde kolinesteraz enzimleri üzerine de en güçlü inhibisyon etkisi metanol ekstraktında görülmüştür.

Çalışmada kullanılan *Tribulus Terrestris* ve *Rubia Tinctorium* bitkilerinin antioksidan kapasitesi belirlenmiş ve asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Böylece söz konusu enzimlerin yeni ve kuvvetli inhibitörlerinin bulunması konusunda literatüre katkı sunulmuştur.

Anahtar Sözcükler : Antioksidan, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, *Tribulus terrestris*, *Rubia tinctorium*

Bilim Kodu : 10105.07

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF TOTAL PHENOLIC SUBSTANCE, ANTIOXIDANT CAPACITIES OF *TRIBULUS TERRESTRIS* AND *RUBIA TINCTORIUM* EXTRACTS AND THEIR EFFECTS ON THE CHOLINERGIC SYSTEM

Nazrin Novruzlu

Karabük University

Health Sciences Institute

Department of Food Toxicology

Thesis Advisor:

Prof. Dr. Müslüm KUZU

December 2023, 66 pages

In this study, the antioxidant and total phenolic substance amounts of different extracts (Petroleum ether, Chloroform, Methanol, Ethanol) obtained from *Tribulus terrestris* and *Rubia tinctorium* plants were determined. Antioxidant activities of the extracts were examined by DPPH, CUPRAC, FRAP and ABTS methods, and the effects of the extracts on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities were evaluated. Thus, the possibilities such as preventing some diseases through nutrition and using them in the production of herbal medicines were examined, and content analyzes of the *Rubia tinctorium* ethanol extract were performed using LC-MS/MS.

Different extracts were obtained by the maceration method of samples containing both leaf and flower parts using methanol, ethanol, chloroform, and petroleum ether solvents. According to the results obtained, the highest total phenolic substance amount was found in the methanol extract of both plants, and the lowest total phenolic

substance amount was found in BOE and DTP. Likewise, in the FRAP method, the highest result was seen in BOK and DTM, and the lowest was seen in the petroleum ether extract of both plants. In the CUPRAC method, the results are GA > BHA > Trolox > DTM > BOK > DTE > BOP > BOM > DTK > BOE > DTP. According to the ABTS method, the results show that the extract with the highest antioxidant capacity is DTM and BOM, and the extract with the lowest is BOE and DTP. It was observed that BOM and DTM extract had the strongest DPPH' radical scavenging capacity according to IC₅₀ value. Similarly, the strongest inhibition effect on cholinesterase enzymes was seen in methanol extracts.

The antioxidant capacity of the *Tribulus terrestris* and *Rubia tinctorium* plants used in the study was determined and their effects on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzyme activities were examined. Thus, significant contributions were be made to the literature in finding new and potent inhibitors of these enzymes.

Key Words : Antioxidant, Acetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, *Tribulus Terrestris*, *Rubia Tinctorium*

Science Code : 10105.07

TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐmasının planlanmasında, araŐtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, her koşulda yardımcı olan değerli tez danıŐmanım Prof. Dr. Müslüm KUZU hocama çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalıŐmalarında yardımcı olarak, daima desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. AyŐe Nihan AIKKAPI KİSBET'e teşekkür ederim.

Bitki seçimlerinde yardımcı olan hocam Fuad MAHMUDOV'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans yaptığım süreçte maddi manevi desteğini esirgemeyip, her daim yanımda olan aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu alıŐma KBÜBAP-22-YL-016 proje numarası ile Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiŐtir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. ANTIOKSİDAN	1
1.1.1. Endojen Antioksidanlar	3
1.1.2. Ekzojen Antioksidanlar.....	3
1.2. ENZİMLER.....	4
1.2.1. Asetilkolinesteraz	7
1.2.2. Bütilkolinesteraz.....	12
1.3. FENOLİK BİLEŞİKLER	13
BÖLÜM 2	14
TIBBİ BİTKİLER	14
2.1. BOYAQOTU-RUBIA TINCTORUM.....	14
2.2. DEMİRTİKAN-TRIBULUS TERRESTRIS	15
BÖLÜM 3	17
MATERYEL VE YÖNTEM.....	17
3.1. MATERYEL	17
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler	18
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	18

Sayfa

3.1.2.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	19
3.1.2.2. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler.....	19
3.1.2.3. CUPRAC metoduna göre indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler	19
3.1.2.4. DPPH İndirgeme Metodu ile İlgili Çözeltiler.....	20
3.1.2.5. ABTS ^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	20
3.1.2.6. Kolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler	20
3.2. YÖNTEM.....	21
3.2.1. Total Fenolik Madde Tayini	21
3.2.2. Antioksidan Kapasitesinin Tayini	21
3.2.2.1. FRAP İndirgeme Kapasitesi Tayini	22
3.2.2.2. CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi	22
3.2.2.3. DPPH Radikalini İndirgeme Aktivitesi Tayini.....	22
3.2.2.4. ABTS ^{•+} Radikali Giderme Aktivitesi	23
3.2.3. Kolinesteraz İnhibisyon belirlenmesi	23
3.2.4. LC-MS/MS ölçümü	24
BÖLÜM 4	25
ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1. ANTİOKSİDAN ÇALIŞMALARI İLE İLGİLİ ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.2. TOTAL FENOLİK BİLEŞİK MİKTAR TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇÖZELTİ BULGULARI.....	25
4.2.1. Ferrik İndirgeme Kuvveti Bulguları	27
4.2.2. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları.....	28
4.2.3. DPPH Radikalini İndirgeme Aktivitesi Bulguları	30
4.2.4. Cu ²⁺ - Cu ⁺ İndirgeme Kuvveti (CUPRAC Metodu) Bulguları.....	34
4.3. KOLİNESTERAZ ENZİM İNHİBİSYON BULGULARI.....	36
4.5. LC-MS/MS KROMATOĞRAFİSİ İLE ELDE EDİLEN BULGULARI	43
BÖLÜM 5	57
TARTIŞMA VE SONUÇ	57

	<u>Sayfa</u>
KAYNAKÇA.....	61
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1.	Enzimin yapısı.....	5
Şekil 1.2.	Asetilkolin Formülü.	8
Şekil 1.3.	Asetilkolinesterazın Üç Boyutlu Yapısı (Kryger et al., 1999).	8
Şekil 1.4.	Asetilkolinesterazın Biyolojik Fonksiyonu (Taylor ve Radic, 1994).	9
Şekil 1.5.	Fizosrigmin.....	11
Şekil 1.8.	Rivastigmin.	12
Şekil 2.1.	Rubia Tinctorum.	15
Şekil 2.2.	Tribulus terrestris.	16
Şekil 4.1.	Gallik asit standart eğrisi.	26
Şekil 4.2.	Fe ²⁺ Standart Eğrisi.	27
Şekil 4.3.	Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Sonuçları.....	28
Şekil 4.4.	Trolox Standart Eğrisi.	29
Şekil 4.5.	Kasyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS ^{•+}) Sonuçları.....	30
Şekil 4.6.	BOE ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.	30
Şekil 4.7.	BOM ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.	31
Şekil 4.8.	BOK ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.	31
Şekil 4.9.	BOP ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.	31
Şekil 4.10.	DTE ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.	32
Şekil 4.11.	DTM ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.	32
Şekil 4.12.	DTK ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.	32
Şekil 4.13.	DTP ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.....	33
Şekil 4.14.	Serbest Radikal Giderme Etkisinin (DPPH [*]) Sonuçları.	33
Şekil 4.15.	BO ekstraktları, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).	34
Şekil 4.16.	DT ekstraktları, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).	35
Şekil 4.17.	AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOE ekstraktları için aktivite (%) grafikler.	36
Şekil 4.18.	AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOM ekstraktları için aktivite (%) grafikleri.	36

Şekil 4.19. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	37
Şekil 4.20. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	37
Şekil 4.21. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	37
Şekil 4.22. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	38
Şekil 4.23. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	38
Şekil 4.24. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	38
Şekil 4.25. AChE enzim inhibisyonu sonuçları	39
Şekil 4.26. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	40
Şekil 4.27. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	40
Şekil 4.28. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	40
Şekil 4.29. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	41
Şekil 4.30. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	41
Şekil 4.31. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	41
Şekil 4.32. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	42
Şekil 4.33. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	42
Şekil 4.34. BChE enzim inhibisyonu sonuçları.....	43
Şekil 4.35. LC-MS/MS kromatografisi ile tayin edilen fenolik bileşik kromatogramı.	43
Şekil 4.36. Quinic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	45
Şekil 4.37. Fumaric asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	45
Şekil 4.38. Gallic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	45
Şekil 4.39. Pyrogallol için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	46
Şekil 4.40. Keracyanin Chloride için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	46
Şekil 4.41. Cyanidin-3-o-glucoside için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	46

Sayfa

Şekil 4.42. Chlorogenic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	47
Şekil 4.43. Catechin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	47
Şekil 4.44. Peonidin-3-o-glucoside için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	47
Şekil 4.45. 4-OH-Benzoic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	48
Şekil 4.46. Epicatechin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	48
Şekil 4.47. Epigallocatechin Gallate için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	48
Şekil 4.48. Caffeic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	49
Şekil 4.49. Vanilic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	49
Şekil 4.50. Syringic asid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	49
Şekil 4.51. Vitexin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	50
Şekil 4.52. Naringin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	50
Şekil 4.53. Ellagic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	50
Şekil 4.54. Hesperidin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	51
Şekil 4.55. p-Coumaric Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	51
Şekil 4.56. Sinapic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	51
Şekil 4.57. Taxifolin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	52
Şekil 4.58. Ferulicic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	52
Şekil 4.59. Rosmarinic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	52
Şekil 4.60. Vanilin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	53
Şekil 4.61. Myricetin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	53
Şekil 4.62. Resveratol için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	53
Şekil 4.63. Luteoln için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	54
Şekil 4.64. Quercetin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	54
Şekil 4.65. Apigenin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	54
Şekil 4.66. Naringenin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	55
Şekil 4.67. Isorhamnetin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	55
Şekil 4.68. Chrysin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	55
Şekil 4.69. Galangin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.....	56
Şekil 4.70. Curcumin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Antioksidanların sınıflandırılması ve bazı antioksidan maddeler.....	3
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal formülleri.....	17
Çizelge 3.2. Kullanılan cihaz ve aletleri.....	18
Çizelge 4.1. Bitki Ekstrelerinin kısaltılmış kodları.....	25
Çizelge 4.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	26
Çizelge 4.3. Ekstraktların FRAP değerleri.....	28
Çizelge 4.4. Ekstraktların Trolox eşdeğeri.....	29
Çizelge 4.5. Ekstrelerin indirgenen DPPH aktivitelerinin IC ₅₀ değerleri.....	33
Çizelge 4.6. GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri.....	35
Çizelge 4.7. Ekstrelerin AChE enzim inhibisyonu IC ₅₀ değerleri.....	39
Çizelge 4.8. Ekstrelerin BChE enzim inhibisyonu IC ₅₀ değerleri.....	42
Çizelge 4.9. LC-MS/MS kromatografisi ile tayin edilen fenolik bileşik miktarları (nanogram / 0,1 mg ekstre).....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

dk	: dakika
g	: gram
l	: litre
mL	: mililitre
mg	: miligram
M	: molar
mM	: milimolar
nm	: nanometre
μ l	: mikrolitre
μ M	: mikromolar
μ g	: Mikrogram

KISALTMALAR

AC	: Antioksidan kapasitesi
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [*]	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{*+}	: ABTS radikali
FRAP	: Ferrik Azaltıcı Antioksidan Gücü
CUPRAC	: Bakır Azaltıcı Antioksidan Kapasitesi
TFMM	: Toplam fenolik madde miktarı
E.C.	: Enzim Komisyonu
FCR	: Folin-Ciocalteau Reaktifi
AChE	: Asetilkolinesteraz
BChE	: Bütirilkolinesteraz

- AChI : Asetilkolinilyodür
GA : Gallik asit
GAE : Gallik asit eşdeğeri
BHA : Bütillenmiş hidroksianisol
BHT : Bütillenmiş hidroksitoluen
Troloks : 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
Tris : Trihidroksimetil Aminometan
DTNB : 5,5-Ditiyobis-2-Nitrobenzoik Asit
I : İnhibitör
IC₅₀ : Mevcut konsantrasyonu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. ANTIOKSİDAN

İnsan, hayatı boyunca canlılığını yapım ve yıkım sürecinin birbirini kusursuz olarak takip etmesi sonucu korur. Bu kusursuz döngüye metabolizma ismi verilmiştir. Bu döngüde beslenme süreci ile çevreden elde edilen çeşitli maddeler hücrel yıkım olayları neticesinde başka ürünlere çevrilir ve bu süreçte çeşitli yan ürünler veya atıklar oluşabilir. Atık adlandırdığımız bu maddeler, dokularda birçok sağlık sorunları oluşturma bilecek unsurlar arasındadır. Beslenme yoluyla vücuda aldığımız antioksidanlar bu atık maddelere karşı bizde korunmaya katkıda bulunur.

Son dönemlerde yoğun olarak incelenen konulardan biri, serbest radikaller ve antioksidanlar. Normal şartlarda, organizmanın metabolizması sağlıklı bir şekilde ilerlerken, antioksidanlar ve serbest radikaller arasında bir denge mevcuttur. Antioksidanlar, vücudun çeşitli streslere karşı tepki olarak ürettiği, hücrelere zarar verebilecek olan "kararsız moleküller" yani serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önleyebilen ve yavaşlatabilen bileşiklerdir. Başka bir deyişle, antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve genellikle yapısında fenolik özellik taşıyan moleküllerdir (Sehitoglu 2015). Antioksidanları kısaca ifade edersek, serbest radikallere karşı "savaşçı" diye adlandırabiliriz. Yukarıda bahsettiğimiz atık maddelerden biri de serbest radikallerdir. Serbest radikaller, vücut besinleri metabolize ederken ve çeşitli tepkilere yanıt olarak hücreler tarafından üretilen atık ürünler olarak kabul edilir. Ancak, eğer vücut serbest radikalleri etkili bir şekilde ortadan kaldıramaz veya dengeleyemezse, oksidatif stres meydana gelir. Bu durum, hücrelere ve genel vücut fonksiyonlarına zarar verebilir. Bunun yanı sıra serbest radikaller reaktif oksijen türleri olarak ta bilinmektedir. Bu moleküllerin aşırı üretimi, oksidatif stresin artmasına ve hücrelerin lipidlerine, proteinlerine ve DNA'larına zarar

vermesine neden olabilir. Bu tür hasarlar, yaşlanma sürecini hızlandırabilir ve çeşitli sağlık sorunlarına katkıda bulunabilir (Valko et al., 2007).

Antioksidanlar, vücutta bulunan serbest radikallerle reaksiyona girerek onları nötralize edebilen bileşiklerdir. Bu nedenle, dengeli bir antioksidan sistemi, serbest radikallerin kontrol altında tutulmasına ve hücrelere verdiği potansiyel zararın azaltılmasına yardımcı olabilir. Vücutta çeşitli faktörler nedeniyle serbest radikal üretiminin artmasına sebep olan bir dizi etken bulunmaktadır. Bu etkenlerden biri, içsel kaynaklı sebepler arasında yer alan iltihaplanmadır. Dış faktörler arasında ise çevresel kirlilik, sigara dumanı, UV ışın maruziyeti gibi etkenler bulunmaktadır. Serbest radikal kaynaklı oksidatif stresteki artış solunum hastalıkları, kalp krizi, felç, Parkinson, kanser, amfizem, artrit, bağışıklık sistemi hastalıkları ve inflamatuvar gibi hastalıklarla ilişkilidir. Antioksidanların serbest radikal oluşumunu engelleyerek genel sağlığa katkı sağladığı bilinir (Diplock, 1998).

Yukarıda belirtildiği gibi, oksidatif stresin neden olduğu etkileri ortadan kaldırmak için insan vücudu tarafından kullanılan birincil araç antioksidanlardır. Serbest radikalleri temizlenmesinde görev alan antioksidanlar hücre hasarını önleyebilen bileşenlerdir. Antioksidanlar doğal olarak vücutta bulunabileceği gibi dışarıdan da takviye olarak alınabilir. Bu, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak adlandırılır. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek savunma sistemini güçlendirir ve hastalık riskini azaltabilirler. Vücutta yeterli miktarda antioksidan bulunmaması durumunda serbest radikallerin artması gözlemlenebilir. Serbest radikal varlığındaki artış göz rahatsızlıkları, yaşlanmanın hızlanması, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında olduğu gibi beyin hücrelerinde hasar, artrit, kanser ve koroner hastalıklar gibi sağlık sorunlarının riskini artırabilir (Sonnen et al., 2008; Tsang and Chung, 2009).

Antioksidanlar, doğal olarak mevcut olabileceği gibi sentetik de olabilir. Bitkisel gıdaların genellikle antioksidan içeriklerinin yüksek olduğu bilinir. Marabolizma tarafından sentezlenen antioksidanlara endojen antioksidanlar, diyet ya da başka yollarla dışarıdan alınanlara ise eksojen antioksidanlar denir (Diplock et al., 1998).

Çizelge 1.1. Antioksidanların sınıflandırılması ve bazı antioksidan maddeler. (Sen and Chakraborty, 2011).

Ekzojen antioksidanlar		Endojen antioksidanlar	
Doğal	Sentetik	Enzimler	Küçük moleküller
Fenoller	BHA	Süperoksit dismutaz	Adrenalin
Tokoferoller	BHT	Katalaz	Glutasyon
Katekinler	TBHQ	Peroksidaz	Malatonin
Karotenler	Troloks	Glutasyon redüktaz	Seratonin

1.1.1. Endojen Antioksidanlar

Metabolizmada üretilen antioksidanlar iki gruba bölünür; enzim olan antioksidanlar ve enzim olmayan küçük moleküller. Glutasyon S-transferaz, glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutasyon redüktaz enzimatik savunma hattını oluşturur. Askorbik asit, indirgenmiş glutasyon, serotonin ve melatonin gibi küçük moleküllerde nonenzimatik antioksidanlar örnek olabilir (Gülçin et al., 2003a; 2003b).

1.1.2. Ekzojen Antioksidanlar

Endojen adlandırdığımız metabolizmada doğal olan antioksidan savunma sistemini desteklemek amacıyla dışarıdan alınan antioksidanlar ekzojen antioksidanlardır. Bu antioksidanlarda iki gruba ayrılıp, sentetik ve doğal antioksidanlardır. (Halliwell, 1991). Sentetik olarak kullanılan antioksidanlar arasında tersiyerbütillhidrokinon, bütillenmiş hidroksitoluen, bütillenmiş hidroksianisol, troloks, propil galat ve diğer sentetik antioksidanlar yer alır (Mavi, 2005). Bu sentetik antioksidanlar daha önceleri yaygın bir şekilde kullanılmış olsalar da çeşitli yan etkilere sahip oldukları belirlenmiştir. Bu istenmeyen yan etkiler nedeniyle, bu sentetik antioksidanların kullanımları sınırlandırılmıştır. Doğal antioksidanlardan olan askorbik asit ve α -tokoferol BHT, BHA, PG ve TBHQ gibi sentetik antioksidanlara kıyasla daha az etkili olmalarına rağmen, gıdaların üretim proseslerinde ve depolanma süreçlerinde yaygın bir biçimde kullanım alanı bulmaktadır. Hemen hemen bütün antioksidan yapıda olan maddelerin 4 farklı şekilde etki mekanizması vardır. (Halliwell, 2015)

- Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerine etkiyerek, onları tutarak, etkisi az olan daha zayıf yeni moleküle çevirir. Enzimatik antioksidanlar bu tip etki gösterirler.
- Onarıcı etki: Serbest radikallerin organizmada oluşturdukları zararı gidererek ya da azaltarak etki gösterir.
- Bastırıcı etki: Serbest oksijen türleri ile etkileşip bu moleküllere hidrojen vererek aktivitelerinde azalmaya veya tamamen ortadan kaldırmaya bastırıcı etki denir. Flavanoitler ve bazı vitaminler etkisini bu şekilde gösterir.
- Kırıcı etki: Antioksidanların radikal zincirlerini kırması, kırıcı veya engelleyici etki olarak isimlendirilir. Mineraller, seruloplazmin ve hemoglobin bu etkiye sahiptir.

Bu çalışmada *Tribulus Terrestris* ve *Rubia Tinctorium* bitkilerinden elde edilen ekstarktların antioksidan kapasitesini değerlendirmek için DPPH, FRAP, CUPRAC, ABTS yöntemleri kullanılmıştır.

1.2. ENZİMLER

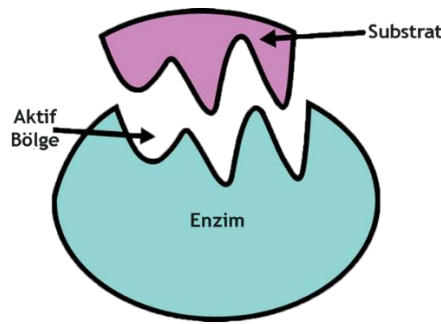
Enzimler, genellikle protein yapısına sahip, doğal olarak sadece canlı organizmalarca üretilen biyolojik katalizörlerdir. 18. yüzyıl sonlarına doğru, etinin midede salgılar yardımıyla sindirilebildiği ve tükürük ile bitkilerden elde edilen bazı özütlerin nişastayı şekere dönüştürdüğü bilinmesine karşın, bu süreçlerin nasıl gerçekleştiği tam olarak anlaşılammaktaydı (Berg et al., 2013).

Louis Pasteur, XIX. yüzyılda maya hücrelerince şekerden alkol elde edilmesini araştırdığı zaman bunun bu hücrelerdeki moleküller tarafından oluşturulduğunu anlamıştır. Bu moleküllerin yalnızca canlılarda işlev gördüğü düşünülmüştür. 1878'de Wilhelm Kühne tarafından, "maya içinde" manasında "wikt: enzim" ifadesi kullanmıştır. İlk başlarda canlı olmayan bileşikler için "ferment" terimi kullanılırken, daha sonraları canlı hücrelerde gerçekleşen kimyasal aktiviteler için "enzim" terimi benimsenmiştir. Canlılığın devamı için kritik olan iki ana şart, organizmanın kendini replike edebilmesinin yanı sıra meydana gelen reaksiyonları yüksek özgüllükte ve verimlilikle canlı ortamında katalizleyebilmesidir. Biyolojik sistemlerde, hücre

içindeki biyokimyasal olayların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan büyük proteinler olan enzimler rol oynar (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenir, ancak aktivitelerini gösterebilmeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez. Enzimler genellikle büyük protein molekülleridir ve oldukça özgün yapılara sahiptirler. Proteinlerin amino asitlerinin primer dizilimi, genetik materyalde kodlanan bir dizilime göre düzenlenir. Enzim proteinlerindeki rezidülerin özel dizilimi, enzimde belli bir konformasyon ve kuaterner yapının kazanılmasında kilit bir rol oynar (Berg et al., 2013).

Enzimlerin biyolojik aktivitesinin yanı sıra, enzim proteininin yapısı metabolik olayların kontrolü için de önemlidir. Bu yapı, enzimin spesifik reaksiyonları katalize etme yeteneğini belirler. Enzimler, substrat moleküllerine bağlanma, onları değiştirme ve ürünleri serbest bırakma gibi bir dizi karmaşık işlemi gerçekleştirebilecek şekilde evrimleşmiştir. Bu özellikleri, enzimlerin biyolojik organizmalardaki temel katalizörler olduğunu ve hücresel faaliyetlerin düzenlenmesinde kilit bir rol oynadığını gösterir (Gözükara, 1989). Fotosentez ve solunum reaksiyonları enzimler tarafından katalize edilir. Bu da demek oluyor ki, enzimler canlı hayatında çok büyük öneme sahiptir. Bütün bu önemli olaylar olurken canlı büyüyor, hareket ediyor, hücre ve dokuları yenileniyor.



Şekil 1.1. Enzimin yapısı.

Enzimler sadece canlı organizmaların yapısında görev almakla kalmaz, aynı zamanda birçok endüstriyel ve teknolojik uygulamada da yaygın olarak kullanılırlar. Enzimlerin çeşitliliği, kullanım alanlarını da genişletmiştir. Örneğin ekmek, şeker, peynir gibi birçok gıdanın üretim sürecinde enzimler görev alır. Ayrıca, kimyasal temizlik

ürünlerinin üretiminde, antibiyotik üretiminde ve hastalık teşhisinde kullanılan kan pıhtılaşmasını sağlayan ve yaraların temizliğinde kullanılan çözeltilerde de enzimlerin çeşitli türleri bulunmaktadır. Enzimler "Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB)'nin Enzim Komisyonu (E.C.)" tarafından 6 sınıfa ayrılmıştır. Enzimler, genelde Enzyme Commission (EC) adı verilen bir sistematik sınıflandırma kullanılarak numaralandırılır. Bu numaralar, enzimlerin katalizledikleri reaksiyonları ve sınıflandırıldıkları grupları belirtmek için kullanılır. EC numarası dört bölümden oluşur, her bir bölüm belirli bir bilgi düzeyini temsil eder. Enzimleri sınıflandırmak için kullanılan dört haneli sayı, birinci rakamı sınıfı, ikinci rakamı alt sınıfı, üçüncü rakamı alt alt sınıfı ve dördüncü rakamı ise aynı grupta bulunan enzimin sırasını belirtir. Enzimlerin gruplandırılması oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar şeklindedir (Nelson and Cox, 2012).

- Oksidoredüktazlar: Bu gruba dahil olan enzimler yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizler. Oksidazlar, dehidrojenazlar, redüktazlar, hidroksilazlar ve transhidrojenazlar gibi alt gruplara sahiptir.
- Transferazlar: Hidrojenin atomo haricindeki atom ya da grupların moleküller arası transferini sağlar. Alt gruplar: Transaçılazlar, transaminazlar, fosfotransferazlar.
- Hidrolazlar: Bağların bir su molekülü katılımı ile parçalanmasını katalize eden enzim sınıfıdır. Esterazlar, eterazlar, peptidazlar, asetanhidritazlar, glikozidazlar gibi alt gruplara sahiptir.
- Liyazlar: Su molekülü çıkışı olmadan bağları enzimlerdir. Alt gruplar: C-C liyazlar, C-O liyazlar, C-N liyazlar, C-S liyazlar.
- İzomerazlar: Molekül içinde değişiklikler yaparak uzayda dizilişi değiştiren enzim grubudur. Alt gruplar: Rasemazlar, epimerazlar, cis-trans izomerazlar.
- Ligazlar: Oksijen, karbon, azot ve kükürt arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Alt gruplar: C-O ligazlar, C-C ligazlar, C-S ligazlar, C-N ligazlar.

Bu sınıflandırmalar, enzimlerin katalizledikleri reaksiyon türlerine ve spesifikliklerine göre yapılmıştır. Her bir alt grup, belirli bir biyokimyasal işlevi yerine getiren enzimleri içerir (Taslimi et al., 2017).

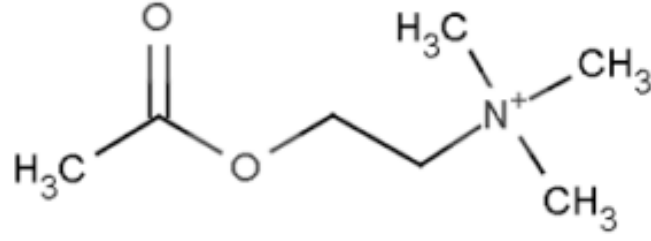
Enzimlerin hem *in vivo* ve hem *in vitro* aktivitelerini azalmaya neden olan ya da tamamen engelleyen bileşiklere inhibitör adı verilir. Bu olaya da inhibisyon denir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Biyolojik sistemlerde enzimlerin inhibe edilmesi temel kontrol mekanizmalarından biridir. Enzim inhibisyonu enzim kataliz mekanizmasının açıklanmasında da kullanılır. Özgül inhibitörler kataliz için gerekli olan katalitik birimlerin saptanmasında kullanılır (Nelson and Cox, 2012).

1.2.1. Asetilkolinesteraz

Hidroliz sınıfından olan yaygın adıyla bildiğimiz asetilkolinesteraz enzimi [EC.3.1.1.7], sistematik adı asetilkolin ve bilinen diğer isimleri; gerçek kolinesteraz, kolinesteraz I ve eritrosit kolinesterazıdır.

Asetilkolinesteraz 7. kromozomca şifrelenen, farmakolojik açıdan önemi özellikle Alzheimer ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan teröpatiklerin hedefi olmasıyla bağlantılıdır. AChE'nin amniyon sıvısındaki seviyesi bazı nöral tüp defektlerinde ve anomalilerde artış göstermektedir. Orak hücreli anemi hastası bireylerde AChE düzeyi serumda artarken, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri durumunda düşer. AChE, organizmada kolinerjik sinaps ve nöronlarda, nöromüsküler kavşak, akciğerde, eritrositlerde, beyin gri maddesinde ve dalakta bulunur. Asetilkolin enzimin en bilinen substratıdır ve penzim tarafından hızla hidroliz edilir (Kirby et al., 2001). Bunun yanı sıra kolin esterleri ve açıl grupları da bu enzimin substratları arasında yer almaktadır (Vale, 1998).

Alkaloid sınıfına dahio olan asetilkolin, en çok bilinmekte olan ve ilk tanımlanan nörotransmitterdir.



Şekil 1.2. Asetilkolin Formülü.

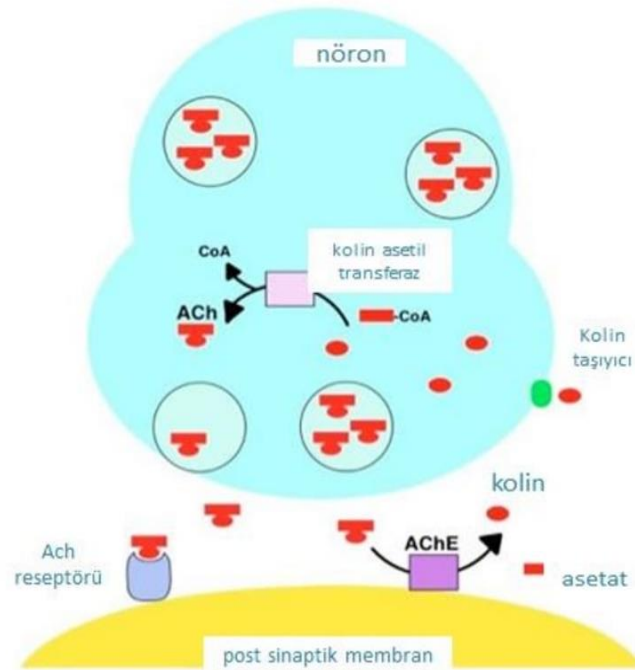
İlk olarak 1914'te bilim insanı Henry Hallet Dale'nin keşfettiği asetilkolin, 1921'de bilim insanı Otto Lewi'nin yapmış olduğu kurbağa kalpleri üzerindeki deneylerle bir nörotransmitter olarak doğrulanmıştır. Asetilkolin, günümüzde Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıkların tanısında ve tedavi edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Asetilkolinesteraz, muazzam bir etkinliğe sahiptir ve enzim moleküllerinin her bir saniyede ortalama 25.000 asetilkolin molekülünün parçalanmasını sağlar. Enzimin aktif bölgesinde, katyonik ve anyonik alt birimlerden vuku bulur. AChE'in üç boyutlu yapısı ile katalizlediği reaksiyona ait mekanizma, enzimin kristal yapısıyla ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Enzimdeki anyonik alt birim, asetilkolinin pozitif kuaterner aminine bağlanırken, bu bölge ile diğer katyonik özellikteki substratlar ile inhibitörler bağlanabilir. Katyonik özelliğe sahip substratların aktif bölgeye giden aralıktaki on dört aromatik amino asitle etkileşime girer, ancak anyonik bölgedeki negatif yüklü amino asitlerle bağlanmazlar. Bu 14 aromatik amino asit, özellikle triptofan 84, oldukça yüksek bir korumaya sahiptir. Triptofan 84'ün alanin amino asidi ile değiştirilmesi, enzim aktivitesinde 300 kat azalmaya neden olur. Aktif bölgeye giden bu aralık, yaklaşık olarak 20 angstrom uzunluğundadır (Koçancı and Aslım, 2016).



Şekil 1.3. Asetilkolinesterazın Üç Boyutlu Yapısı (Kryger et al., 1999).

Esteratik alt birimde asetilkolin, kolin ve asetat gruplarına parçalanır. Burada katalitik gruplar olarak serin-200, histidin-440 ve glutamat-327 amino asitleri yer alır. Üçüncü amino asitin aspartat yerine glutamat olması dışında bu üçlü amino asit grubu, serin proteazlardakine benzeyen diziyi bulundurur. Karboksil ester hidrolizi sonucu, açıl-enzim ile serbest haldeki kolin oluşumu gerçekleşir. Ardından, su molekülü açıl-enzim yapısına nükleofilik nükleofilik olarak saldırır. Histidin 440 amino asidi sayesinde asetik asit serbest hale gelirken enzimde serbest hale geçmiş olur (Koçancı and Aslım, 2016).

Nörotransmisyon esnasında, asetilkolinin nöronlardan sinaptik boşluğa salınması ve post-sinaptik membranda bulunan asetilkolin reseptörüne bağlanması gerçekleşir (Carr and Chambers, 2001). Bu bağlanma ile bir sinyal oluşumu vuku bulur. Benzer şekilde, post-sinaptik membrandaki AChE asetilkolinin hidrolizini gerçekleştirerek sinyal iletimininin durdurulmasını sağlar. Serbest hale gelen salgılandığı nöron tarafından alınarak ve kolin asetiltransferaz enziminin asetil-CoA molekülüyle reaksiyona asetilkolinin tekrardan sentezi gerçekleşir.

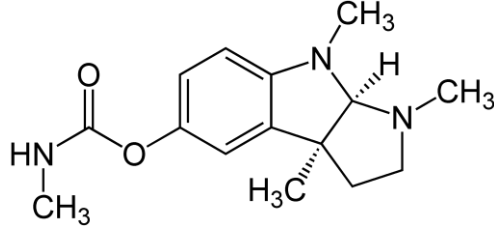


Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın Biyolojik Fonksiyonu (Taylor ve Radic, 1994).

AChE enziminin inhibitörlerce inhibisyonu asetilkolin parçalanmasını engelleyerek asetilkolinin konsantrasyonu ve etki ettiği süreyi artırır. AChE inhibisyonuna neden olan moleküller genellikle dönüşümlü veya yarı dönüşümlü şekilde etkisini gösterir. Tedavi amaçlı kullanılan çoğu AChE inhibitörü yarışmalı ve yarışmasız geri dönüşümlü olanlardır. Bu inhibitörlere örnek olarak fizostigmin, karbamatlar, neostigmin, pyridostigmin, demekaryum, ambenonium, fenantren türevleri, kafein, galantamin, takrin, edrofonyum, piperidinler, donepezil, ladostigil, Huperzin A, ungeremine ve lactucopicrin gösterilebilir (Sussman et al., 1991).

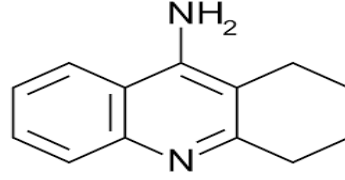
Geri dönüşümsüz ve yarı-geri dönüşümlü AChE inhibitörleri genellikle böcek öldürücülerde ve kimyasal silahların üretiminde kullanılır. Bu kategoriye giren örnekler arasında diizopropilfluorofosfat, organofosfatlar, cadusafos, ekotiofat, sarin, klorprifos, diklorvos, siklosarin, soman, dimethoat, tabun, VE, VX, VM, VG, malathion, diazinon, aldicarb, parathion, bufencarb, bendiocarb, karbaril, karbetamit, karbendazim, karbofuran, klorbufam, karbosülfan, klorprofam, etiyofenkarb, metiyokarb, formetanat, oksamil, fenmedifam, pinmikarb, propamokarb, pirimikarb, profam, , Huperzine A, propoksür, galantamin ve kumarinler bulunmaktadır (Taylor and Radic, 1994).

1980'lerin başında bir AChE inhibitörü olan fizostigmin Alzheimer hastalığının klinik tedavisinde ilk kez kullanılmıştır (Dasgupta, 2018). Fizostigmin, bitkilerde doğal olarak bulunan bir alkaloid olan eserinin bir türevidir. Sinir sistemi üzerinde etki eden ve asetilkolinesteraz inhibitörü olarak görev yapan bir bileşiktir. Asetilkolinesteraz, sinir hücrelerindeki asetilkolinin parçalanmasından sorumlu bir enzimdir. Fizostigmin, asetilkolinin yıkımını engelleyerek sinir iletimini artırır ve bu nedenle sinir hücreleri arasındaki iletişimi güçlendirir. Fizostigmin, özellikle Alzheimer hastalığı gibi nörolojik bozukluklarda sinir iletimini artırmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak, bu tür uygulamalarda istenmeyen yan etkiler ve güvenlik endişeleri nedeniyle kullanımı sınırlıdır.



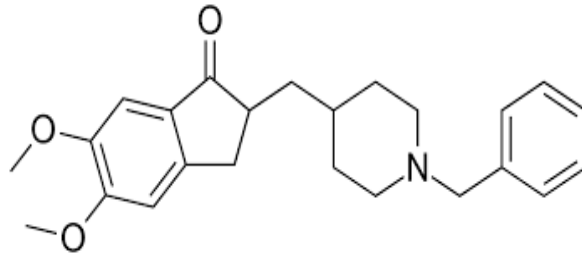
Şekil 1.5. Fizosrigmin.

Enzimin başka bir inhibitörü olan takrin 1980'lerin ortalarında Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanım alanı bulmuştur. Enzimin dönüşümlü bir inhibitörü olan bu molekül Amerika Gıda ve İlaç İdaresi tarafından Alzheimer hastalığının tedavisi için 1996 yılında onaylanarak bu alanda onay alan ilk ilaç olmuştur (Ritchie et al., 2001).



Şekil 1.6. Takrin.

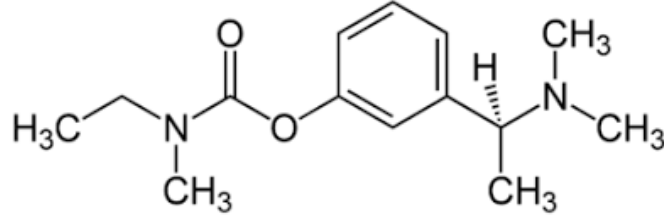
Donepezil, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan bir tersinir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Bu ilaç, hafif ve orta derecedeki Alzheimer hastalığının semptomlarını yönetmeye yardımcı olmak için kullanılır. Donepezil, sinir hücreleri arasındaki iletişimi artırarak çalışır ve Alzheimer hastalığının neden olduğu kognitif bozuklukları hafifletmeye yöneliktir (Birks, 1996).



Şekil 1.7. Donopezil.

Rivastigmin hidrogen tartarat, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Bu ilaç, geri dönüşümsüz bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Rivastigmin, sinir hücreleri arasındaki iletişimi artırarak Alzheimer hastalığının neden olduğu kognitif

bozuklukları hafifletmeye yöneliktir. İsviçre'de 1997 yılında kullanıma girmiş ve FDA tarafından Mayıs 1999'da onaylanmıştır (Rösler et al. 1999).



Şekil 1.8. Rivastigmin.

Alzheimer hastalığı tedavisi amacıyla ticari olarak satılan ve çeşitli başarı oranlarına sahip birçok farklı kolinesteraz inhibitörü bulunmaktadır. Yukarıda, bu inhibitörlerden en çok kullanılanları örnek olarak verilmiştir. Her geçen gün ise yeni AChE inhibitörleri sentezine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Demir ve Türkan, 2022).

1.2.2. Bütirikolinesteraz

Farklı bir kolinesteraz türü olan bütirikolinesteraz (BChE, E.C.3.1.1.8) genellikle karaciğerde sentezlenerek kana salınır (Chatonnet and Lockridge, 1989). Aynı zamanda ince barsak, yağ dokusu, beyin beyaz maddesi ve akciğer gibi çeşitli dokularda da bulunur (Dave et al., 2000). Plazmada çözülmüş halde bulunur (Darvesh et al., 2003). Ayrıca, bazı balıklarda ve kas dokularında büyük miktarda BChE aktivitesi tespit edilmiştir (Fulton ve Key, 2001).

Bu enzim, memelilerde bilinen biyolojik bir substrata sahip olmayan bir enzimdir (Kutty et al., 1989). Ancak, bütiriltiyokolin, BCh, propiyoniltiyokolin, propiyonilkolin gibi kolin esterlerini, aynı zamanda farmakolojik açıdan önemli bir rol oynayan süksinilkolin gibi bileşenleri hidrolize eder (Kutty and Payne, 1994). Bu enzimin molekül ağırlığı tahmini 342 KDa'dur ve bir tetramerik glikoproteindir (Barta et al., 2001).

BChE'nin biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamış olsa da fazla miktarda asetilkolinin varlığında AChE'nin inhibisyonuna neden olarak ACh'yi dokulardan uzaklaştırmak amacıyla görev yaptığı düşünülmektedir. BChE, memelilerde genellikle bilinen bir

biyolojik substrata sahip olmayan bir enzim olarak tanımlanmaktadır. Ancak, bütiriltiyokolin, BCh, propiyoniltiyokolin, propiyonilkolin gibi bazı kolin esterlerini hidroliz edebilir. Bu enzimin aktivitesi, çeşitli dokularda bulunabilir, özellikle karaciğerde sentezlenir ve kana salınır. Beyinde, plazmada ve diğer dokularda çözülmüş olarak bulunabilir. Günümüzde, organofosfat veya karbamat yapısındaki sinir gazları ve insektisitler gibi benzer kimyasalların neden olduğu zehirlenmelerde, bazı zehirlenmelerin tedavisinde BChE kullanılabilmektedir (Ashani et al., 1991). Ayrıca kolinesteraz inhibitörleri glokom veya myastenia gravis gibi hastalıkların tedavisinde de ilaç üretiminde işlev görür (Giacobini, 2000; Kawaguchi et al., 2004).

1.3. FENOLİK BİLEŞİKLER

Polifenoller aromatik halkaya bağlı bir veya daha çok sayıda hidroksil (OH) içeren moleküllerdir (Kahkonen et al., 1999; Ergün et al., 2002; Cemeroğlu et al., 2004). Flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere fenolik bileşikler iki gruba ayrılırlar. Gıdalarda bulunan fenolik bileşikler ve flavonoidler küçük molekülü ve çoğunlukla uçucu bileşiklerdir.

Flavanoidler, bitki çaylarının, meyve ve sebzelerin doğal bileşenlerinde bulunan polifenolik antioksidanlardır. Flavonoidlerin radikal süpürme, antialerjik, antiviral metal şelatlama ve antienflamatuar etki gösterirler (Tüzün, 1996).

Fenolik asit ise bitkilerde ve diğer doğal kaynaklarda bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkilerin renk, tat ve kokularından sorumludur. Fenolik asitlerin temel özelliği güçlü antioksidanlar olmalarıdır (Crozier et al., 2014).

BÖLÜM 2

TIBBİ BİTKİLER

2.1. BOYAQOTU-RUBİA TİNCUTORUM

Uzun, sürünen, silindirik şekilli ve yatay olarak uzanan kök sistemine sahip çok yıllık bir bitkidir. Boyagotlular ailesine aittir. Toprağın üstünde olan kısmı çok dallıdır, dallar dört lobludur, kenarları hassas dikenlidir. Yüksekliği 30 cm'den 1,5 metreye kadardır. Yapraklar mızrak şeklinde, parlak, genellikle çiftler halinde ve dalların eklem benzeri bölgelerinde 5-6 adet daire şeklinde bulunur. Çiçekler küçük, yeşilimsi sarı renkli, yarı şemsiye şeklinde olup, dalların üst kısımlarında salkımlar halinde bulunur. Meyveleri sulu, siyah ve içinde çekirdek bulunur. Bitki haziran-temmuz aylarında çiçek açar. Dağılım alanı geniştir, çoğunlukla dağ ve eteklerinde, çalılar arasında yetişir. Azerbaycanın birçok bölgelerinde bulunur. Tedavide bitkinin kökleri (kuru halde) kullanılır (Mahmudov, 2019).

Kimyasal bileşim: Bitkinin kökleri oksiantrakınon, oksi-simetilantrakınon ve bunların türevlerini içerir. Ana glikozit alizarindir. Ayrıca organik asitler, şeker, pektin ve dublin maddeleri, proteinler vb. bileşikler vardır. Yapraklar askorbik ve sitrik asitler, eser miktarda alkaloit vb. içerir (Clifford, 2000).

Vücuda etkileri ve uygulaması: Bitkinin kökleri idrar söktürücü, koleretik, antiinflamatuvar, büzücü vb. gibi özelliklere sahiptir Bitkisel ilaçların düzenli tüketilmesi sonucunda böbreklerde fosfat, oksalat ve diğer maddeleri içeren taşlar giderek yumuşar ve parçalanmaya başlar. Tıpta bitki esas olarak böbrek ve safra taşı hastalığı, gut, sistit, piyelit, anemi, raşitizm, splenit, kemik ve bağırsak tüberkülozu vb. için kullanılır (Stuart, 2006).

Bitkinin sağlık açısından evde kullanım talimatları: Bitkinin kurutulmuş ve ezilmiş köklerinden 1 yemek kaşığı alıp bir termosaya koyup, üzerine 250 ml kaynar su ekleyip akşamdan sabaha kadar bekletilir. Ertesi gün elde edilen solüsyon 4 parçaya bölünür ve 1/4 kısmını yemeklerden sonra içilir. Belirtilen dozu geçmemek çok önemlidir (Lea and Chambers, 2007).



şekil 2.1. Rubia Tinctorum.

2.2. DEMİRTİKAN-TRIBULUS TERRESTRİS

Toprak st kısmı toprakla kaplı, küçük tüylerle kaplı, çok dallı ve dal boyları 10-60 cm ve daha fazla olabilen tek yıllık bitkidir. Yapraklar bileşik, dikdörtgen-eliptik, çift pinnatlı ve 6-12 küçük yaprakıklıdır. Çiçeklerin rengi açık sarı renkte, küçük, az sayıda, yaprakların dibinde tek tek bulunur. iek tacı 5 adet sarı karşılıklı oval yapraktan oluşur. Meyveleri küçüktür, çok sert dikenlerle kaplıdır ve 5 küçük kozacığa bölünmüştür. Bitki Mayıs-Ağustos aylarında iek açar. Dağılımı çok geniş olup, bitkinin toprak üstü kısmı esas olarak tedavi amaçlı kullanılır.

Kimyasal bileşimi: Bitki, steroid glikozitler (trillin, dioscin, gracillin, protodioscin, kikusaponin), flavonoidler, alkaloidler, dubil maddeleri, saponinler, boyalar ve

reçine maddeleri, C vitamini, alkaloidler (meyvelerde) vb. bileşikler vardır (Ganzera et al., 2001).



Şekil 2.2. Tribulus terrestris.

Vücuda etkileri ve uygulaması: Bitki koleretik, tonik, idrar söktürücü, tonik, anti-aterosklerotik, antiinflamatuvar, zayıf sedatif vb. özelliklere sahiptir. Tıpta bitki esas olarak böbrek ve idrar yolu hastalıkları (piyelonefrit, glomerülonefrit, sistit, böbrek taşı hastalığı vb.), ateroskleroz, safra kesesi hastalıkları (kolesistit, kolanjit), iskemik kalp hastalığı (kalp kasılmalarını yavaşlatır) tedavisinde kullanılır. Miyokardiyal kasılmayı arttırır, koroner kan dolaşımını iyileştirir, arteriyel basıncı düşürür, kan damarlarını genişletir, metabolik bozukluklar, diyabet vb. gibi hastalıklarda kullanılır (Neychev and Mitev, 2005).

BÖLÜM 3

MATERYEL VE YÖNTEM

3.1. MATERYEL

Bu çalışmada kullanılan bitkiler *Rubia Tinctorium* ve *Tribulus Terrestris* 2022 yılının mayıs ayında Azerbaycanın Bakü şehrinden aktardan temin edilmiştir. Öğütücü kullanılarak 2022 yılının temmuz ayında Karabük Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Gıda Toksikolojisi laboratuvarında her bitkiden 50 gr alınarak öğütülmüştür. Her birinden 5gr olmak üzere 4 erlene alınmış ve üstüne 50 ml çözücü eklenmiştir. Burada çözücü olarak etanol, metanol, petrol eteri ve kloroform kullanılmıştır. Ekstreler Whatman tipi süzgeç kâğıdından süzülerek çözücülerini rotary evaporatör ile uzaklaştırma işlemleri yapılmıştır. Hazırlanan ekstreler kapaklı cam beherde oda sıcaklığında saklanmış ve daha sonra toplam antioksidan kapasitesi ve enzim inhibisyonlarının aktiviteleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal formülleri.

Kimyasal adı	Formül	Temin edildikleri firmalar
Etanol	C ₂ H ₅ OH	ISOLAB UN1170
Metanol	CH ₃ OH	Sigma-Aldrich UN1230
Kloroform	CHCl ₃	ISOLAB UN1888
Petrol eteri		ISOLAB UN1268
DMSO	C ₂ H ₆ OS	Sigma Aldrich
Gallik asid	C ₇ H ₆ O ₅	Sigma Aldrich G7384
Sodyum karbonat	Na ₂ CO ₃	Sigma Aldrich
Folin-Ciocalateu's phenol	C ₆ H ₆ O M _A = 94.11124	Merck 1.09001.0100
Demir (II) sülfat	FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma Aldrich
Demir (III) klorür (Ferrik klorür)	FeCl ₃	Merck 157740
TPTZ	C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄	Sigma Aldrich
Sodyum asetat	C ₂ H ₃ NaO ₂	Sigma Aldrich
Amonyum asetat	C ₂ H ₇ NO ₂	Sigma Aldrich
Hidroklorik asit	HCl	Sigma Aldrich

Neocuproine	$C_{14}H_{12}N_2$	Sigma Aldrich
Bakır (II) klorür	$CuCl_2$	Sigma Aldrich
Butylated hydroxyanisole (BHA)	$C_{11}H_{16}O_2$	Sigma Aldrich
DPPH	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	Sigma Aldrich D9132
ABTS	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	Sigma Aldrich
Potasyum persülfat	$K_2S_2O_8$	Sigma Aldrich
Disodyum fosfat	Na_2HPO_4	Sigma Aldrich
Sodyum klorür	$NaCl$	Sigma Aldrich
Nişasta		Sigma Aldrich
Sodyum hidroksit	$NaOH$	Sigma Aldrich
3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS)	$(O_2N)_2C_6H_2-2-(OH)CO_2H$	Sigma Aldrich
Potasyum Sodyum Tartarat	$KNaC_4H_4O_6$	Sigma Aldrich
Sodyum sülfat	Na_2SO_4	Sigma Aldrich

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Çizelge 3.2. Kullanılan cihaz ve aletleri.

Kullanılan alet ve cihazlar	Marka
Öğütücü	Waring Commercial Blender
Hassas Terazi	RADWAG
Etüv	MİPR LAB
Rotary Evaporatör Cihazı	IKA – HB 10 basic
Vortex Cihazı	WIGGENS – Vortex3000
Manyetik Karıştırıcı	WF – H380a
Otomatik pipetler	Isolab, Capp
pH metre	INSTRUMENTS
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV Visible UV-120-02
Santrifüj cihazı	Allegra X-30R
Su banyosu	MİPR LAB
Derin Dondurucu	Beko
Buzdolabı	Arçelik
96 kuyucuklu mikrolept	Thermo Fisher Scientific

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan çözeltilerin yeri ve hazırlanma şekli aşağıdaki gibidir.

3.1.2.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini ile İlgili Çözeltiler

- %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 0.20 g Na_2CO_3 tuzu mezür içerisinde 8 mL destile su ilave edilerek çözüldü ve son hacmi destile su ile 10 mL olacak şekilde tamamlandı.
- Galik asit çözeltisi (1mg/mL): 0.0305 g galik asit alınıp 28 mL destile su ilave edilerek çözüldü. Toplam hacim destile su ile 30.5 mL'ye tamamlandı.
- Folin-Ciocalteau Reaktifi.

3.1.2.2. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler

- 0,002 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,0068 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 12 mL destile su içerisinde çözüldü.
- 0,02 mM FeCl_3 : 0,054 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak ve 10 mL destile su içerisinde çözüldü.
- TPTZ çözeltisi: 0,015 g TPTZ tartıldıktan sonra 5 mL HCl kullanılarak çözüldü.
- Asetat tamponu: 0,0945 g NaCH_3COO tartıldı ve 40 mL destile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 3,6 olacak şekilde ayarlandı ve son hacimi 50 mL'ye tamamlandı.
- FRAP reaktifi: Asetat tamponundan 10 hacim, TPTZ'den 1 hacim ve 1 hacim de 0,02 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi karıştırılarak elde edildi.

3.1.2.3. CUPRAC metoduna göre indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler

- 1 M'lık amonyum asetat tamponu (pH: 6,5): 3,904 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 30 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 6,5'e ayarlanarak son hacmi 50 mL'ye destile suyla tamamlandı.
- 7,5 mM'lık neokuprin çözeltisi: 0,0078 g Neokuprin alındı ve 5 mL etanolde çözüldü.
- 10 mM'lık CuCl_2 çözeltisi: 0.0170 g CuCl_2 alındı ve 10 mL destile suda çözüldü.

- Butylated hydroxyanisole çözeltisi: 0.014 g C₁₁H₁₆O₂ alındı ve 14 mL etanolde çözüldü.

3.1.2.4. DPPH İndirgeme Metodu ile İlgili Çözeltiler

1. 0.1mM'lik DPPH çözeltisi: 0,006 mg DPPH alındı ve 25 mL etanolde çözüldü.

3.1.2.5. ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler

- 0,1 M fosfat tamponu (pH:7,4): 5,68 g Na₂HPO₄ alınarak 380 mL destile suda çözüldü. pH'sı 6,6'ya ayarlandıktan sonra son hacmi 400 mL'ye tamamlandı.
- 2 mM'lık ABTS^{•+} çözeltisi: 75 mg ABTS fosfat tamponunda (0,1 M, pH: 7,4) tamamen çözününceye kadar karanlıkta manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra son hacim hacim saf suyla 50 mL'ye tamamlandı.
- 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi: 50 mg K₂O₈S₂ 0,1M'lık ve pH'sı 7,4 olan 40 mL fosfat tamponunda tamamen çözüldü. Toplam hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.2.6. Kolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

- 1 M'lık Tris-HCl tamponu: 30,27 g Tris alındı ve 5 mM'lık 0,370 g EDTA 200 mL destile suda çözüldüten sonra pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.
- 10mM'lık asetilkolinyodat çözeltisi: 0.145 g asetilkolinyodat alındı ve bir miktar destile suda çözüldükten sonra son hacim 50 mL'ye ayarlandı.
- 10 mM'lık DTNB (5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) çözeltisi: 0.02 g DTNB ve 1 g sodyum sitrat alındı. Bir miktar suda çözümlenerek son hacim 50 mL'ye ayarlandı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Total Fenolik Madde Tayini

Bu çalışmada hazırladığımız bitki ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı tayininde FCR kullanıldı (Singleton et al., 1999). Gallik asit çalışmada standart fenolik madde olarak kullanıldı. Stok çözelti olarak 1 mg/mL derişiminde gallik asit kullanılarak hazırlanan çözelti kullanıldı. Bu çözülden standart grafik eldesi için seyreltilerek 5 farklı konsantrasyon (10 – 20 – 30 – 40 – 50 µl) kullanıldı. Bitkisel numuneleri seyreltilmeden kullanılmıştır.

Analiz için; Bütün örnek ve standartlardan 60 µL'lik miktar sırasıyla; 0,5 mL saf su ve 100 µL FCR ile karıştırılarak vorteks işleme tabi tutuldu. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, 300 µL (%2'lik) Na₂CO₃ ilave edilerek vorteks işleme tabi tutuldu. 2 saat oda sıcaklığındaki inkübasyon işlemi sonunda ölçümler gerçekleştirildi ve numuneler için üç tekerrür yapıldı.

İnkübasyon işlemi sonrasında spektrofotometre kullanılarak 760 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Hesaplamalar yapılırken üç tekerrür sonucu elde edilen değerden kör değeri çıkarılmış. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen galik asit ekivalent miktarı standart grafikten elde edilen aşağıdaki denklem yardımıyla bulundu ve galik asit ekivalent (GAE) ve mikrogram olarak verildi (r²: 0,9969).

$$\text{Absorbans } (\lambda_{760 \text{ nm}}) = 0,011 \times [\text{GAE } (\mu\text{g})]$$

3.2.2. Antioksidan Kapasitesinin Tayini

Bu tayin yönteminde antioksidan kapasiteyi belirlemek için Demir (III) iyonu indirgeyici kapasite (FRAP), Bakır (II) iyonu indirgeyici kapasite (CUPRAC), DPPH• radikal süpürme kapasitesi ve ABTS^{•+} radikali giderme kapasitesi yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.2.1. FRAP İndirgeme Kapasitesi Tayini

Çalışmamızda standart (FeSO_4) saf su ile seyreltilerek 5 farklı konsantrasyonu hazırlandı. Her bitki ekstrelerinden alındı. Stok çözeltiler, 300 mM asetat tampon çözeltisi (pH 3.6), 10 μM TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazin) çözeltisi ve 20 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (demir (III) klorür heksahidrat) çözeltisi idi. Asetat tampon solüsyonunun hazırlanması için 800 μL asetik asit (CH_3COOH) içerisine 0.0945 g sodyum asetat (NaCH_3COO) ilave edildi ve ardından su ile 40 mL'ye seyreltilerek 300 μM asetat tamponu hazırlandı. 10 μM TPTZ çözeltisinin hazırlanması için 0.015 g TPTZ, 5 mL HCl içinde çözüldü. 20 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solüsyonunun hazırlanması için, 0.054g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mL suda çözüldü. 25 mL asetat tamponu, 2.5 mL TPTZ solüsyonu ve 2.5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solüsyonu karıştırılarak FRAP solüsyonu hazırlandı.

Bu yöntemde örneklerden 20 μl alınarak, 250 μl FRAP çözeltisi (sodyum asetat tamponu, TPTZ ve Demir (III) Klorür (FeCl_3); 10:1:1) mikrolaka kuyucuklarına aktarılarak karıştırıldı. Sarı-turuncu renk, yoğun mavi renge dönüştü. Kör olarak su kullanıldı. Plakalar 10 dakika bekletildi ve sonra asetat tamponundan oluşan köre karşı 593 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.2.2. CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi

Bu metodta hazırladığımız bitki eksterelerini tüplere alındı. Üzerine 0,25 mL CuCl_2 çözeltisi (0,01 M), 0,25 mL etanolik neokuprin çözeltisi ve 0,25 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tampon çözeltisini (1 M) eklendi. 30 dk karanlıkta beklettikten sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Burada kör olarak saf su kullanıldı.

3.2.2.3. DPPH Radikalini İndirgeme Aktivitesi Tayini

Bu çalışmada DPPH çözeltisi taze olarak hazırlandı. İlk olarak 0,006 g DPPH alındı ve saf etanolde çözüldü. Daha sonra saf etanol kullanılarak bir şişede 25 mL'ye tamamlandı. Son olarak alüminyum folyo ile kapatılarak karıştırıcıda 6 saat karıştırıldı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstrelerinden alındı. Örneklerden 20 μl alınarak, 250 μl DPPH çözeltisi mikrolaka kuyucuklarında

karıştırıldı. Antioksidan bileşikler tarafından mor radikal karşılık gelen soluk sarı hidrazine indirgenme gözlemlendi. Burada kontrol olarak 20 µL saf etanol eklendi. Kör olarak 250 µL saf etanol kullanıldı. Son olarak DPPH çözeltisi kör numune hariç tüm karışıma ilave ederek karıştırıldı.

30 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe ettikten sonra köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü.

3.2.2.4. ABTS^{•+} Radikali Giderme Aktivitesi

Çalışmada standart olarak Troloks, etanol ile seyreltilmiş ve 6 farklı konsantrasyonu hazırlanmıştır. Her iki bitki ekstrelerinden alındı. ABTS çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır. 75 mg ABTS alındı ve saf suda çözülüp, sonra saf su kullanılarak hacimsel şişede 50 mL'ye tamamlandı. Alüminyum folyo kullanılarak kapatılıp karıştırıcıda 2 saat karıştırıldı. Radikalizasyon (ABTS^{•+} oluşumu) elde etmek için ABTS ve 0,245 mM otasyum persülfat çözeltileri karıştırıldı (1:1 v/v). Altı saat karanlıkta bekletildi.

Hazırlanan örneklerden 20 µl alınarak, 230 µL ABTS çözeltisi spektrometre küvetleri aktarılıp karıştırılmış. Koyu yeşil-mavi rengin renksiz dönüşümü gözlemlendi. Kontrol olarak 20 µL saf etanol eklendi. Kör olarak 250 µL saf etanol kullanıldı. ABTS çözeltisi kör numune hariç tüm karışıma ilave edilip vortekslenmiştir. Bu karışımda 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir.

3.2.3. Kolinesteraz İnhibisyon belirlenmesi

Çalışmada 0,1 M Tris HCl tampon çözeltisi kullanılmıştır. Tampon 4°C de muhafaza edip 2-3 gün arayla yenilenmiştir. Ellman reaktifi 3 mM 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) çözeltisi Tris-HCl tamponunda çözüldü. Bu çözelti her gün taze olarak hazırlanmıştır. Kolinesteraz substratı, 15mM asetiltiyokolin iyodür distille suda hazırlanmıştır. Kolinesteraz enzim çözeltisi 0,28 U/mL olacak şekilde tampon

çözeltisiyle seyreltilerek 0,5 mL alınarak ependorf tüplere alınmıştır. -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Mikroplate kuyucuklarına 125 µL DTNB, 25µL AChL, 50µL tampon ve 25µL inhibitor çözeltileri eklendikten sonra üzerine 25µL enzim çözeltisi ilave edildi.

Kontrol çözeltisi olarak bitki ekstresi yerine sulu ekstrelerde su, diğer çözücülerle hazırlananlarda ise DMSO kullanılmıştır. Örnek ve kontrol çözeltileri 37 °C sıcaklığa ayarlanmış Elisa okuyucuda 2 dk boyunca inkübe edilmiştir. 405nm de köre karşı absorbans değerleri okunmuştur.

3.2.4. LC-MS/MS ölçümü

LC-MS/MS Kromatografisi kullanılarak *Rubia tinctorium* etanol ekstraktının içerik analizi yapılmıştır. Analizde Agilent 6460 Triple Quad LC-MS/MS with 1290 Infinity UPLC system cihazı kullanılmıştır. Gradientli analiz metodu kullanılarak gerçekleştirilen işlem 20 dk sürmüştür. İyon başlığı Electro Spray Ionization ve enjeksiyon hacmi ise 5 µL'dir. Cihazda kolon olarak Reversed Phase C18 Column kullanılmış ve kolon sıcaklığı 30 °C olarak ayarlanmıştır. Mobil Faz-A olarak formik asit içeren ultra saf su, Mobil Faz-B olarak formik asit içeren asetronitril kullanılmış ve akış hızı 0,4 mL/dk olarak ayarlanmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. ANTİOKSİDAN ÇALIŞMALARI İLE İLGİLİ ARAŞTIRMA BULGULARI

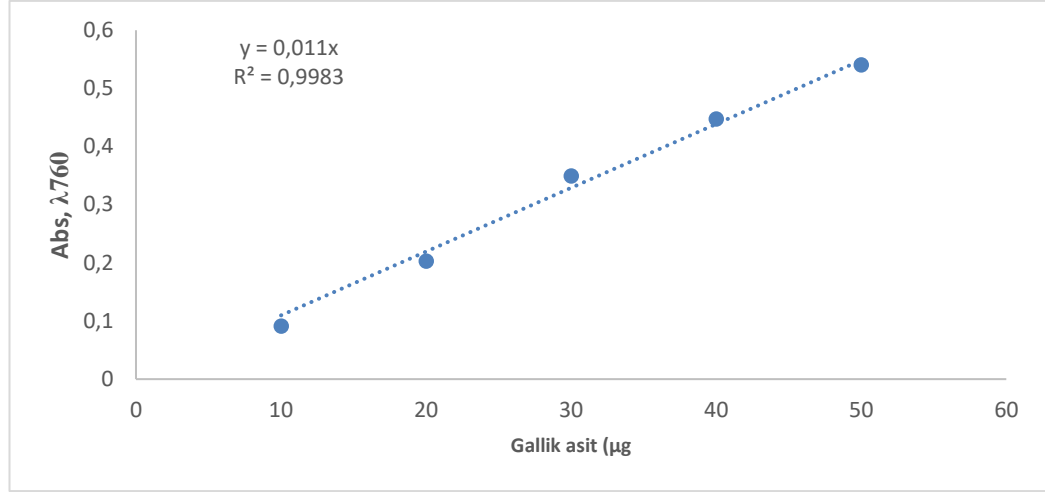
Bitkilerden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite analizleri yapıldı. Analizi yapılan bitki ekstraktları BOE, BOM, BOK, BOP, DTE, DTM, DTK ve DTP'dir. Standart antioksidan olarak BHA, GA ve Troloks kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Bitki Ekstrelerinin kısaltılmış kodları.

Bitki Ekstreleri	Kısaltmaları
RUBİA TİNCTORUM Etanol ekstraktları	BOE
RUBİA TİNCTORUM Metanol ekstraktları	BOM
RUBİA TİNCTORUM Kloroform ekstraktları	BOK
RUBİA TİNCTORUM Petroleteri ekstraktları	BOP
TRİBULUS TERRESTRİS Etanol ekstraktları	DTE
TRİBULUS TERRESTRİS Metanol ekstraktları	DTM
TRİBULUS TERRESTRİS Kloroform ekstraktları	DTK
TRİBULUS TERRESTRİS Petroleteri ekstraktları	DTP

4.2. TOTAL FENOLİK BİLEŞİK MİKTAR TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇÖZELTELTİ BULGULARI

Rubia tinctorum ve *Tribulus terrestris* bitkilerinden hazırlanan ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarını araştırmak için standart fenolik bileşik olarak galik asit kullanılmıştır. Gallik asit kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen standart grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Gallik asit standart eğrisi.

Aşağıdaki tabloda (Çizelge 4.2) bu yöntemle bitki ekstraktları için elde edilen absorban değerleri ile standart grafik denklemini kullanarak hesaplanan toplam fenolik madde miktarı (TFMM) gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı.

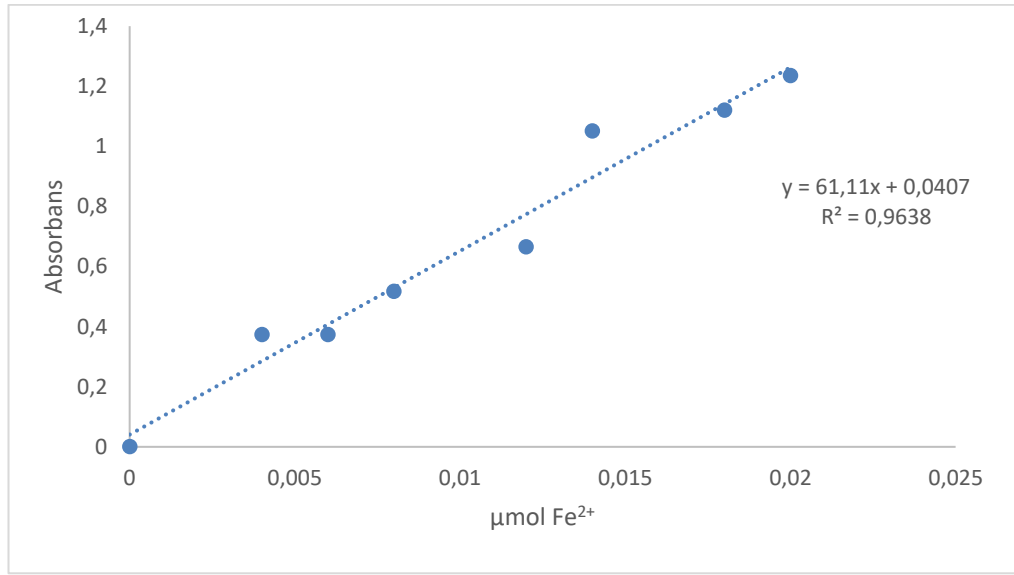
Ekstrakt türü	TFMM (µg gallik asit/mg ekstrakt)
BOE	21,82 ± 1,29
BOM	105,23 ± 56,26
BOK	66,92 ± 19,94
BOP	29,32 ± 12,72
DTE	53,84 ± 3,34
DTM	63,59 ± 4,33
DTK	46,87 ± 12,69
DTP	8,33 ± 2,15

Ekstrelerin absorban değerleri ve kalibrasyon denklemini kullanılarak ekstrelerdeki toplam fenol miktarları µg gallik asit eşdeğeri (GAE) / mg ekstre cinsinden hesaplandıktan sonra en yüksek toplam fenol miktarını BOM (105,23 ± 56,26 µg gallik asit/mg ekstrakt) ve DTM (63,59 ± 4,33 µg gallik asit/mg ekstrakt) ekstrelerinde ölçülürken; en düşük değerlere BOE (21,82 ± 1,29 µg gallik asit/mg ekstrakt) ve DTP (8,33 ± 2,15 µg gallik asit/mg ekstrakt) ekstrelerinde rastlanmıştır.

4.2.1. Ferrik İndirgeme Kuvveti Bulguları

FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottur. Bu metotta ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenir. Oluşan ferröz (Fe^{2+}) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluşturur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm’de maksimum absorbands gösterir.

FRAP reaktifi bu çalışmada taze hazırlanmıştır. Uygun oranda seyreltilmiş 20 μL ekstraktlar, 250 μL FRAP çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika beklenmiş ve 593 nm’de absorbands değeri okunmuştur. Kalibrasyon için Fe^{2+} ’nin değişen konsantrasyonları kullanılmıştır. Fe^{2+} ’in konsantrasyonlarındaki absorbands değerlerinden faydalanarak standart çalışma eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.2.).



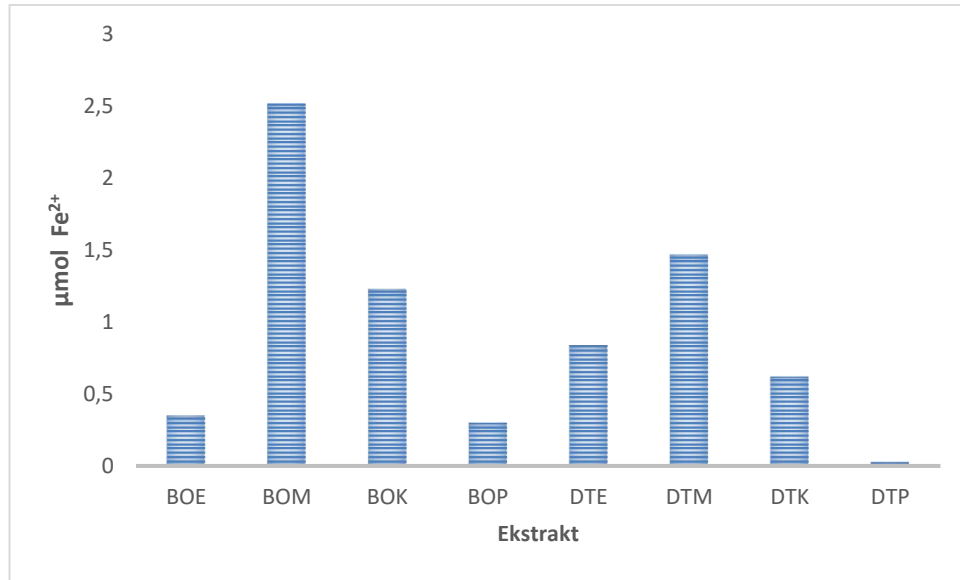
Şekil 4.2. Fe^{2+} Standart Eğrisi.

Yukarıdaki grafikten elde edilen formüle göre numunelerin antioksidan kapasiteleri Fe^{2+} eşdeğerinden hesaplanmıştır. Değer ile antioksidan kapasitesi arasında net bir şekilde doğru orantıdan bahsetmek mümkündür. Aşağıdaki çizelgede “ $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eşdeğeri / mg örnek” olarak hesaplanmıştır. FRAP yöntemine göre indirgeme kapasitesi en yüksek antioksidan kapasite BOK (1 mg ekstrakt 1,23 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) ve DTM (1 mg ekstrakt 1,47 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) ekstrelerinde ölçülürken; en düşük değerlere BOP (1 mg ekstrakt 0,3 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) ve

DTP (1 mg ekstrakt 0,027 mikromol Fe²⁺ eşdeğeri) ekstralarında rastlanmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Ekstraktların FRAP değerleri.

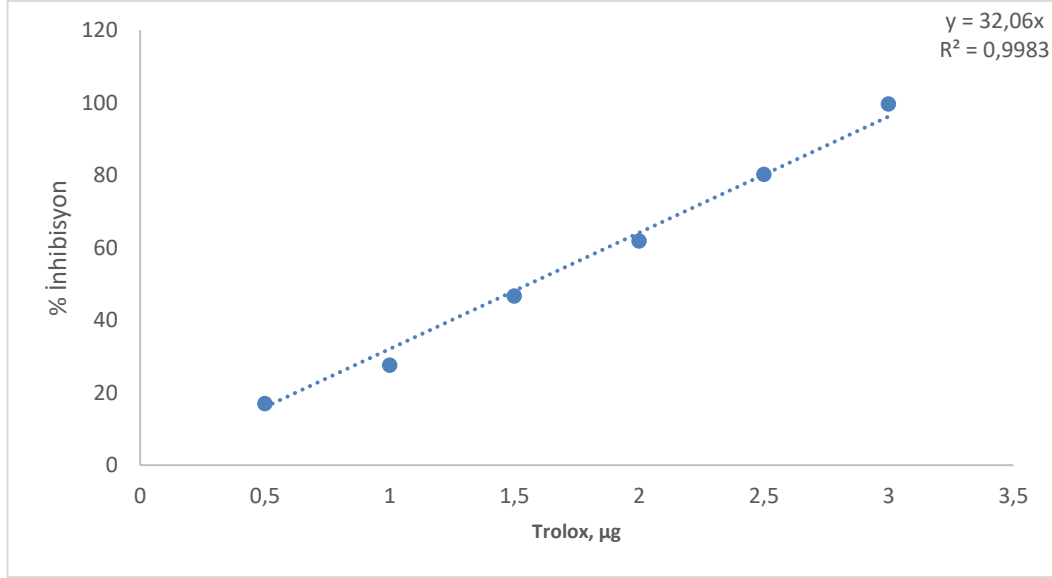
Eks.	Fe ²⁺ $\mu\text{mol} / \text{mg}$ ekstrakt
BOE	0.35
BOM	2.52
BOK	1.23
BOP	0.3
DTE	0.84
DTM	1.47
DTK	0.62
DTP	0.027



Şekil 4.3. Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Sonuçları.

4.2.2. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları

Bu çalışmada ABTS reaktifi taze hazırlanmıştır. Seyreltilmiş 20 μL ekstraktler, 230 μL ABTS çözeltisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra 30 dakika beklenmiş ve 743 nm’de absorbanslar ölçülerek inhibisyon yüzdeleri Troloks analitinden elde edilen sonuçların kullanımıyla oluşturulan Troloks kalibrasyon eğrisinin kullanımı ile Troloks’a eşdeğer (TE) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4.).

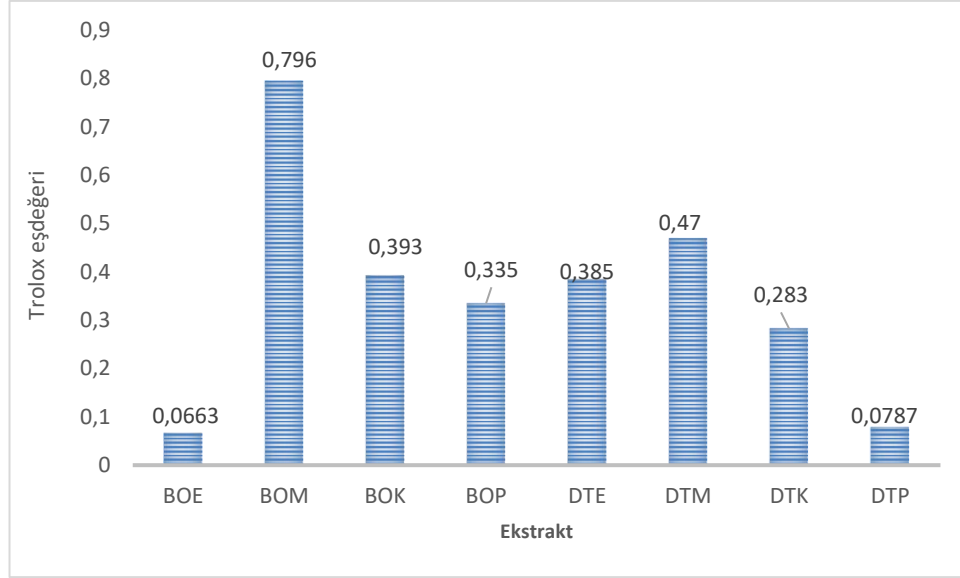


Şekil 4.4. Trolox Standart Eğrisi.

Bu grafikten elde edilen formüle göre antioksidan kapasitesi Trolox eşdeğiren göre hesaplanıp belirlenmiştir. Değer ile antioksidan kapasitesi birebir olarak doğru orantılıdır. Aldığımız sonuçlara göre numune ve standartı aşağıdaki şekil ve çizelgede olduğu gibi verilmiştir (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.5.). Elde edilen verilere göre ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi en yüksek olan ekstraktın DTM ve BOM, en düşük olduğu ekstraktın ise BOE ve DTP olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Ekstraktların Trolox eşdeğeri

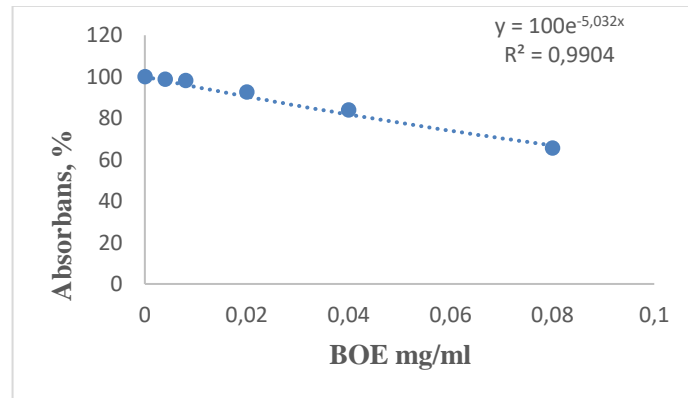
Eks.	Trolox eşdeğeri (µg troloks/ µg ekstrakt)
BOE	0,0663
BOM	0,796
BOK	0,393
BOP	0,335
DTE	0,385
DTM	0,47
DTK	0,283
DTP	0,0787



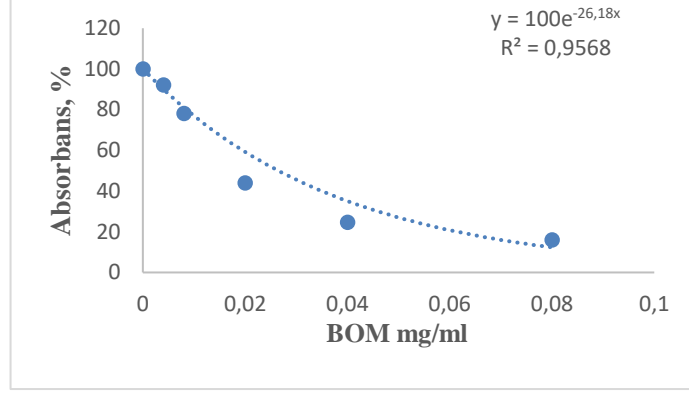
Şekil 4.5. Katyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS^{•+}) Sonuçları.

4.2.3. DPPH Radikalini İndirgeme Aktivitesi Bulguları

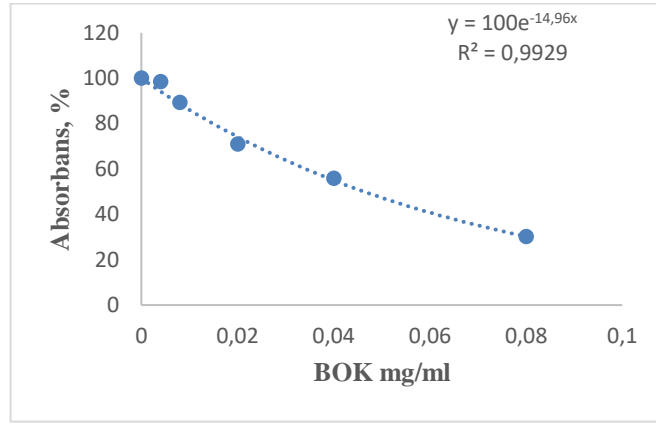
Çalışmada DPPH[•] radikalinin metanolik çözeltisi hazırlanmıştır. Uygun oranda seyreltilmiş 20 µL ekstraktler, 250 µL DPPH çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika beklenmiş ve 517 nm’de absorbans değeri okunmuştur. Ekstraktların konsantrasyonlara karşı % inhibisyon değerleri kullanılarak elde edilen grafik yardımıyla %50 inhibisyonu sağlayan konsantrasyon saptanmıştır Hesaplanan bu miktar IC₅₀ değeri olarak belirtilmiştir (Şekil 4.6-13).



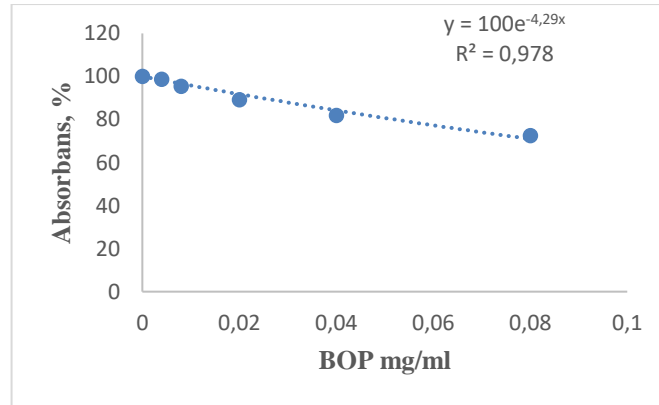
Şekil 4.6. BOE ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.



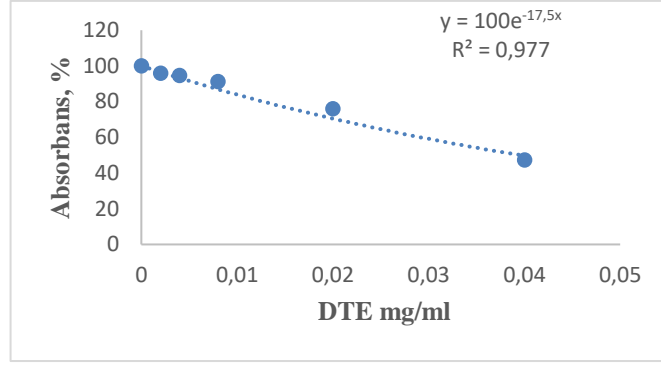
Şekil 4.7. BOM ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.



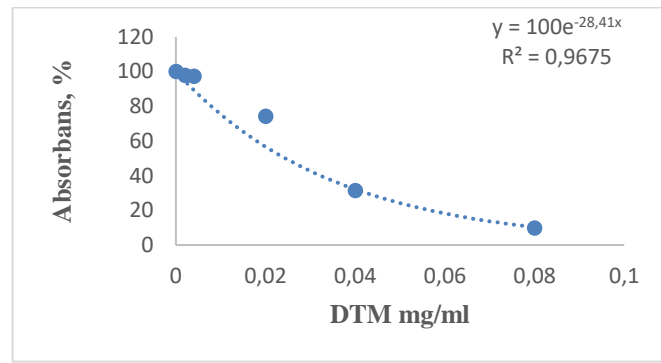
Şekil 4.8. BOK ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.



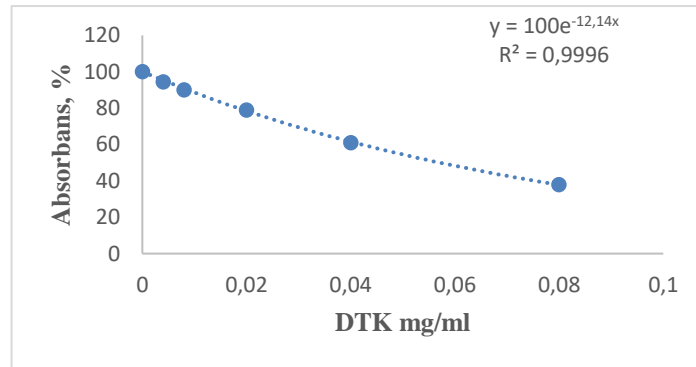
Şekil 4.9. BOP ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.



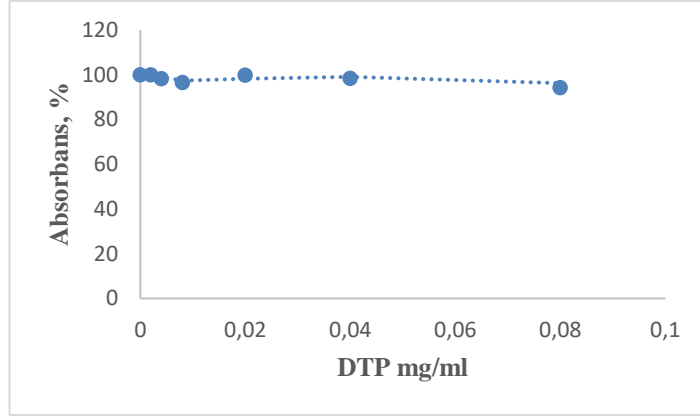
Şekil 4.10. DTE ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.



Şekil 4.11. DTM ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.



Şekil 4.12. DTK ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.

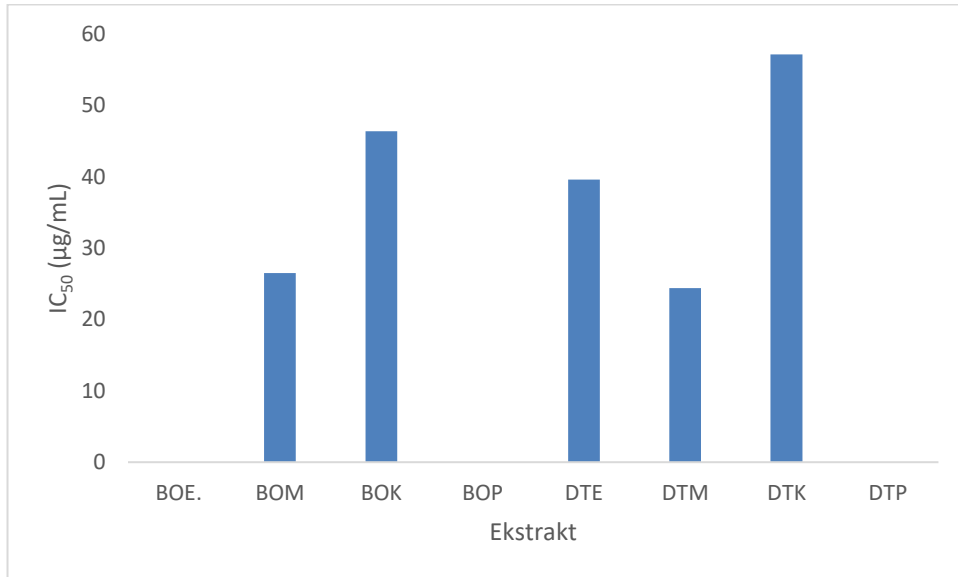


Şekil 4.13. DTP ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.

Çizelge 4.5. Ekstrelerin indirgenen DPPH aktivitelerinin IC₅₀ değerleri.

Bitki ek.	BOE	BOM	BOK	BOP	DTE	DTM	DTK	DTP
IC ₅₀ (µg/ml)	-	26,47	46,33	-	39,6	24,39	57,09	-

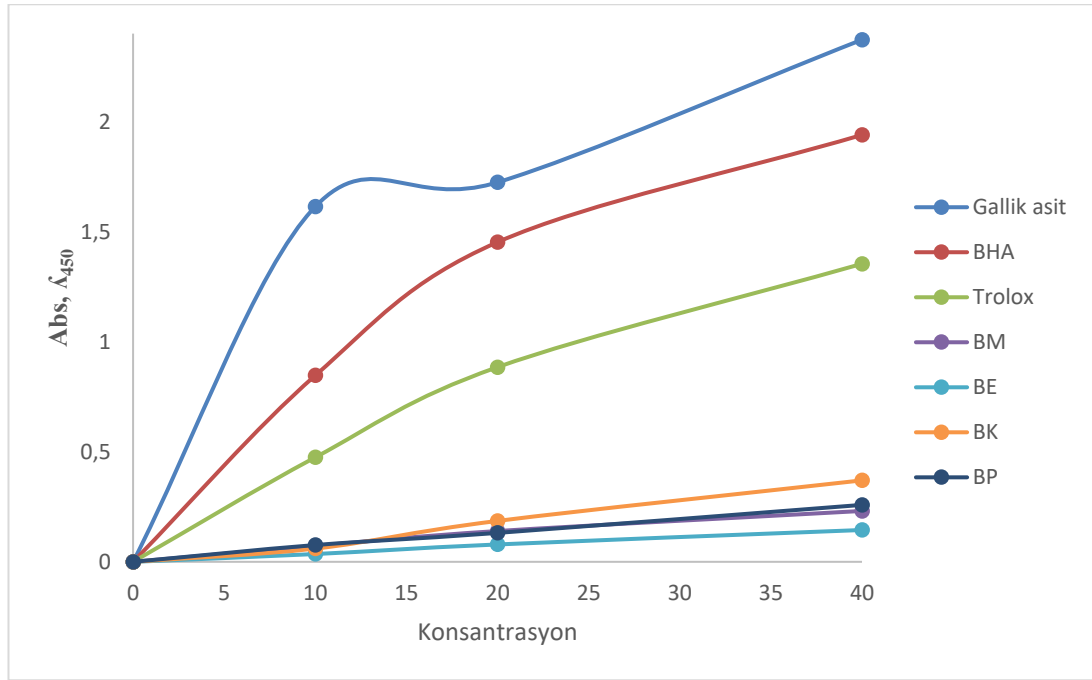
BOE 0,08 konsantrasyonda 34,56, BOP konsantrasyonda 27,55 DPPH giderimi sağlamıştır. DTP DPPH giderimi etkisi göstermemiştir. BOM ve DTM ekstraktının IC₅₀ değerine göre en güçlü DPPH• radikali giderme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5. ve Şekil 4.14.).



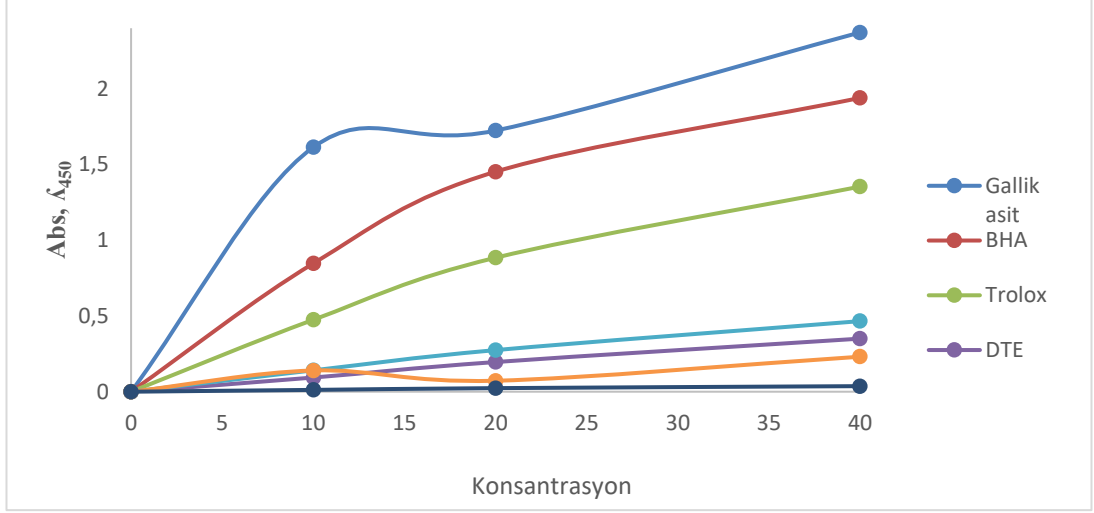
Şekil 4.14. Serbest Radikal Giderme Etkisinin (DPPH•) Sonuçları.

4.2.4. Cu²⁺ - Cu⁺ İndirgeme Kuvveti (CUPRAC Metodu) Bulguları

Kullandığımız metot antioksidan bileşiklerin Cu²⁺ iyonlarının Cu⁺’ya indirgenmesine dayanmaktadır. Bakır(I)-neokuproin şelatından oluşan sarı rengin şiddetine göre indirgeme kapasitesi belirlenmektedir. Ölçümler 450 nm’de yapılır. CUPRAC reaktifi çalışmada taze hazırlanıp kullanılmıştır. Uygun oranda seyreltilmiş 10 µL ekstraktler, 250 µL CUPRAC çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika bekledikten sonra 450 nm’de absorbans değeri okunmuştur. Ekstrelerin ve standartların (GA, BHA ve Trolox) Cu²⁺-Cu⁺ indirgeyici güç eğrileri, konsantrasyon (10-20-40 µg/mL) ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbanslar arasında çizilmiştir (Şekil 4.15-16).



Şekil 4.15. BO ekstraktları, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).



Şekil 4.16. DT ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).

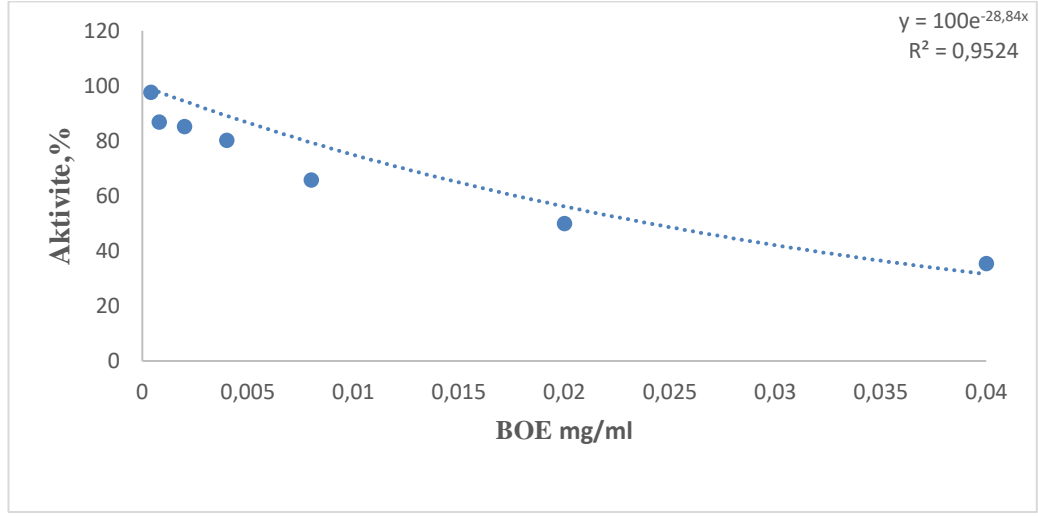
Çizelge 4.6. GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri.

Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC)	Konsantrasyon (µg / mL)		
	10 (µg / mL)	20 (µg / mL)	40 (µg / mL)
GA	1.6142	1.7243	2.3722
BHA	0.8469	1.4525	1.9397
Troloks	0.4748	0.8846	1.3541
BOE	0,0354	0,0789	0,1446
BOM	0,0724	0,1399	0,2311
BOK	0.062	0.1858	0.37
BOP	0.0762	0.1314	0.2586
DTE	0.0934	0.1959	0.3503
DTM	0.141	0.2746	0.4658
DTK	0.1399	0.0724	0.2311
DTP	0.0119	0.0235	0.0365

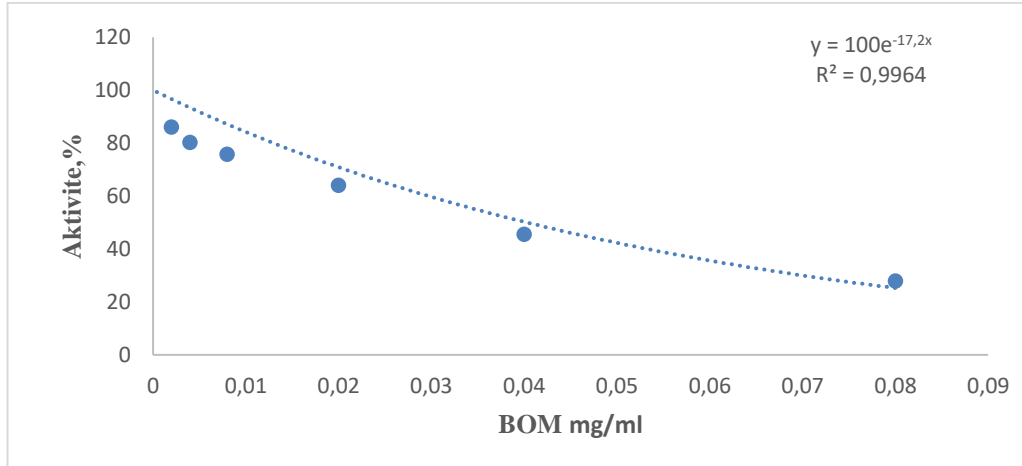
Artan absorbans indirgeme yeteneğinin de arttığını gösterir. Çalışmamızda bitki ekstraktlarının ve standart maddelerin Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme gücünün ekstre miktarına bağlı olarak arttığı görülmektedir. Çalışmamızda ekstraktler ve standartların bakır iyonlarını indirgeme gücü tüm konsantrasyonlarda $\text{GA} > \text{BHA} > \text{Troloks} > \text{DTM} > \text{BOK} > \text{DTE} > \text{BOP} > \text{BOM} = \text{DTK} > \text{BOE} > \text{DTP}$ şeklinde azalmaktadır (Çizelge 4.6.).

4.3. KOLİNESTERAZ ENZİM İNHİBİSYON BULGULARI

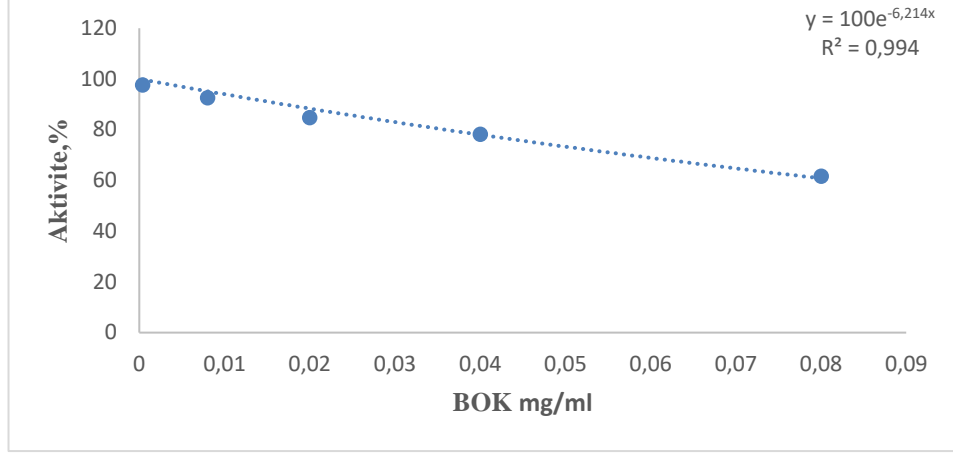
AChE yöntemine göre ölçümler yapıldı. Deney 3 kez tekrarlandıktan sonra aktivite grafiği çizilmiştir (Şekil 4.17-24) ve IC₅₀ (Çizelge 4.7.) değeri hesaplanmıştır. Grafikler her bitki için ayrı ayrı hazırlanıp aşağıda verilmiştir.



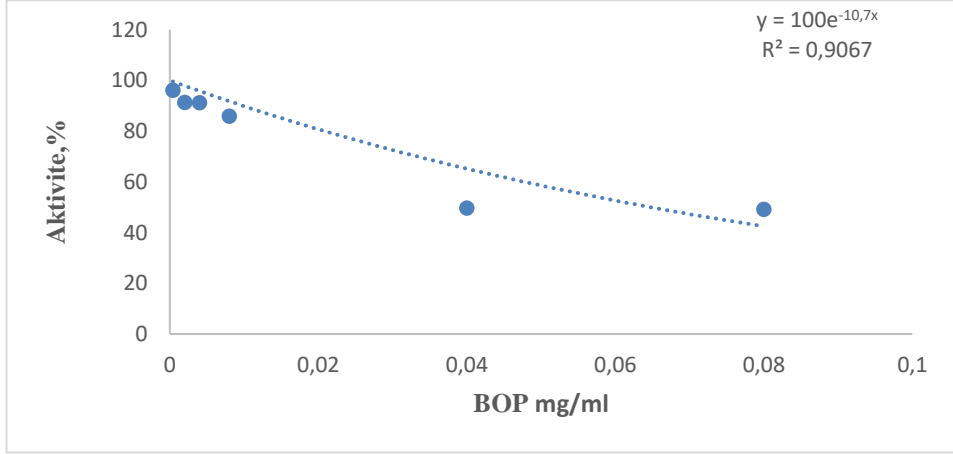
Şekil 4.17. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOE ekstraktları için aktivite (%) grafikleri.



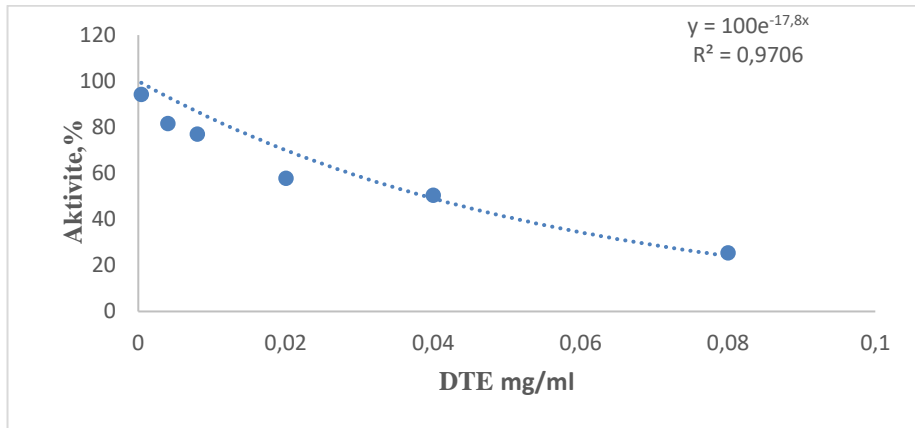
Şekil 4.18. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOM ekstraktları için aktivite (%) grafikleri.



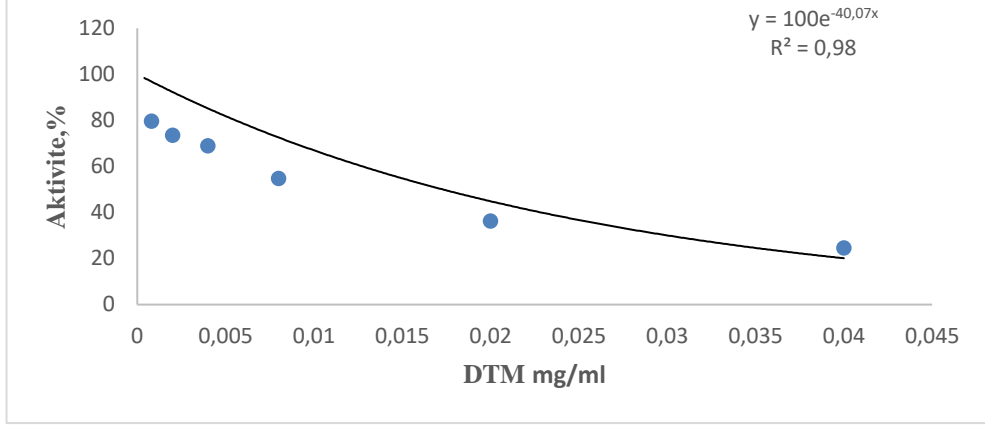
Şekil 4.19. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



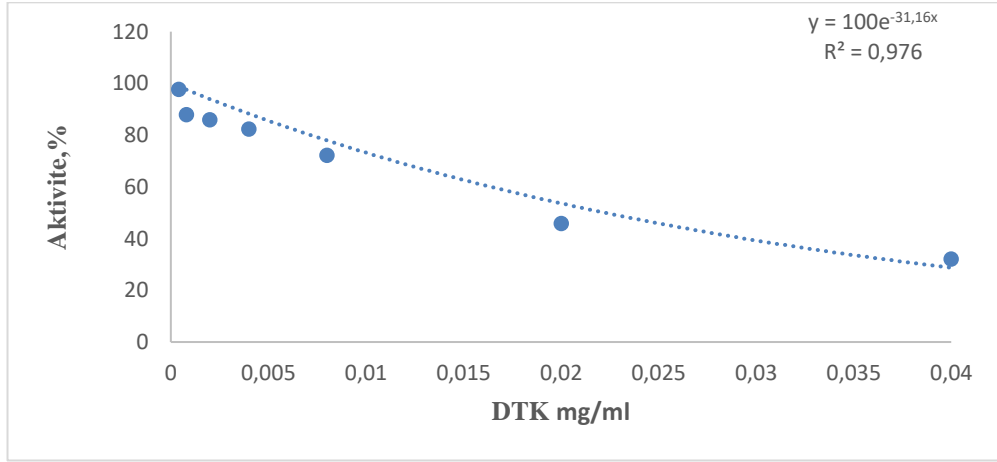
Şekil 4.20. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



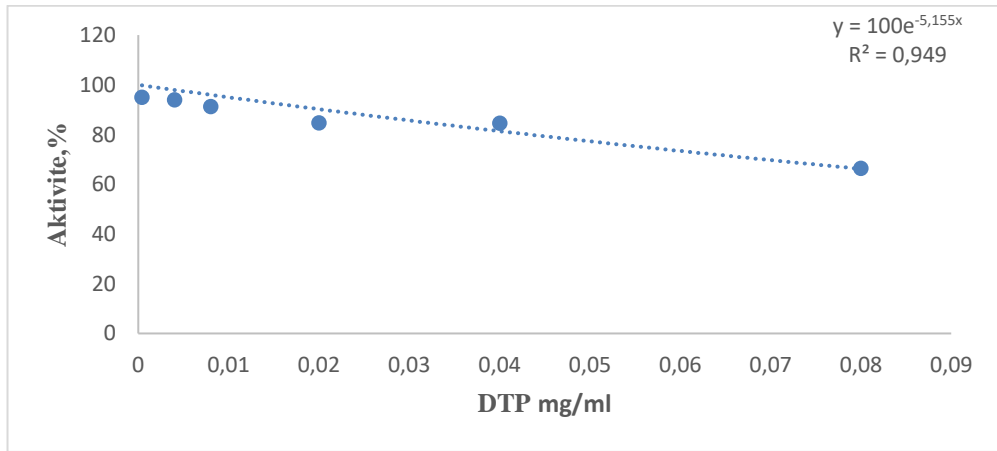
Şekil 4.21. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



Şekil 4.22. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



Şekil 4.23. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.

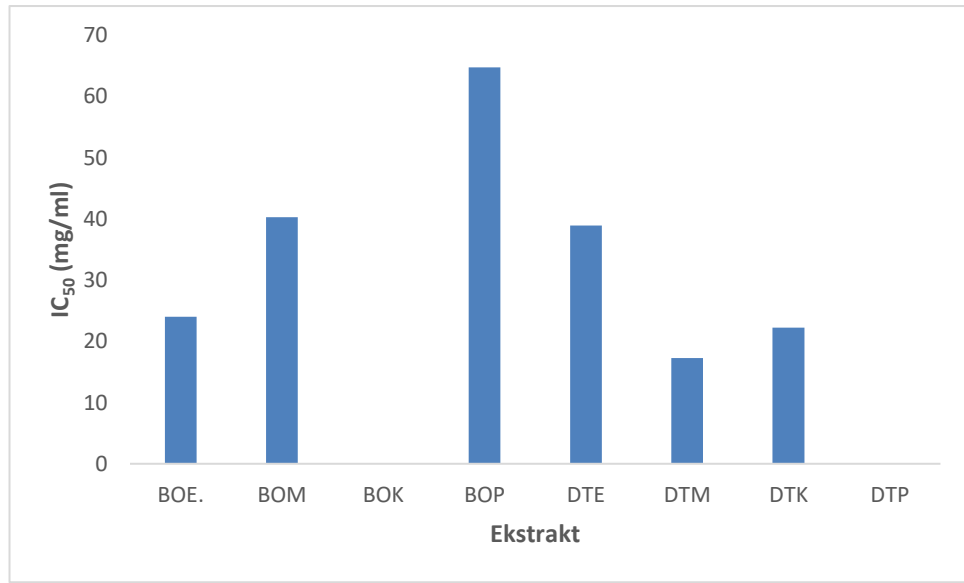


Şekil 4.24. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.

Çizelge 4.7. Ekstrelerin AChE enzim inhibisyonu IC₅₀ değerleri.

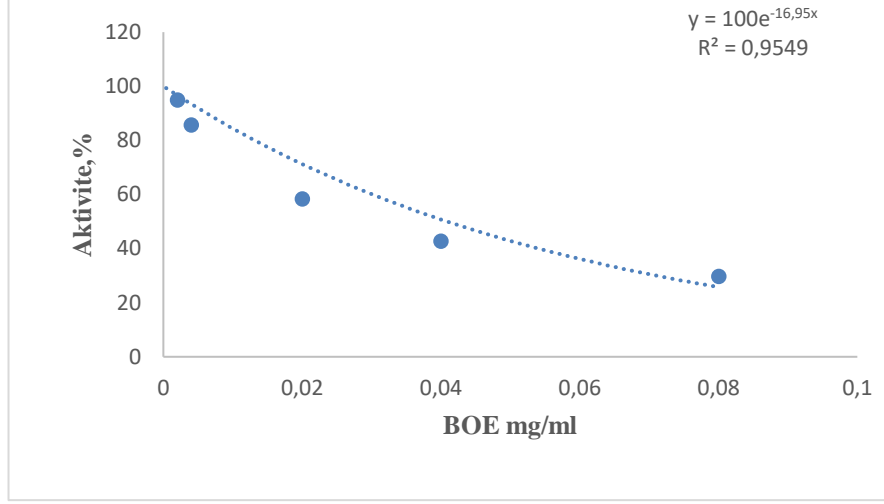
Bitki ek.	BOE	BOM	BOK	BOP	DTE	DTM	DTK	DTP
IC ₅₀ (µg/mL)	24,03	40,29	-	64,78	38,94	17,29	22,24	-

Bu bulgular uyarınca göre AChE enzimini in vitro olarak inhibe etme potansiyeli en yüksek olan ekstrenin DTM elde edilen ekstre olduğu belirlenmiştir. 0,08 mg/mL konsantrasyonunda BOK 33,55, DTP ise 39,56 AChE inhibisyonu sağlamıştır.

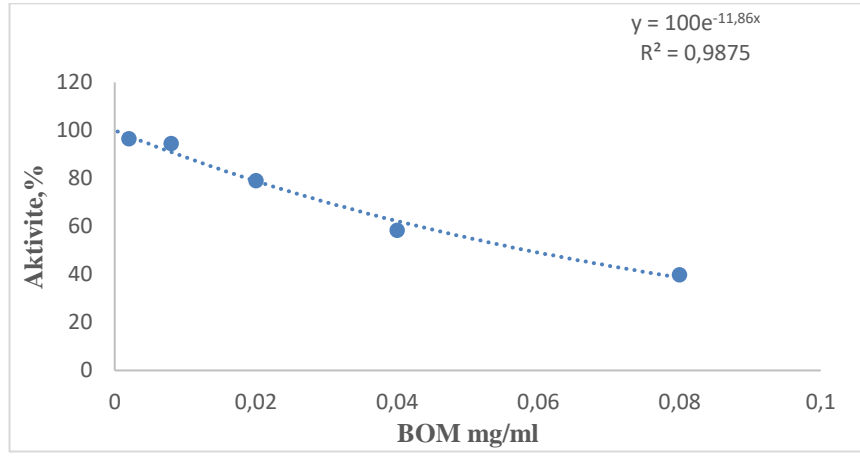


Şekil 4.25. AChE enzim inhibisyonu sonuçları

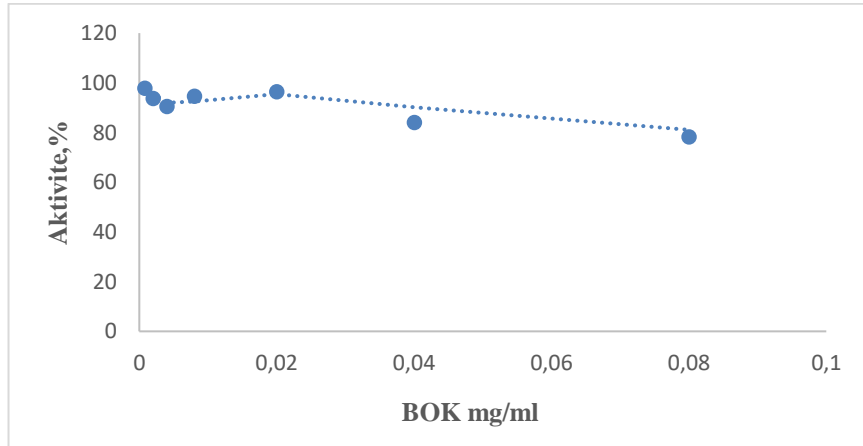
BChE enzimi de aynı AChE enziminde olduğu gibi ölçümler yapılmış, 3 kez tekrarlandıktan sonra aktivite grafikleri çizilmiştir. BChE enziminin Her bir bitki için hazırlanan grafikler ve hesaplanan IC₅₀ değeri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.26-33).



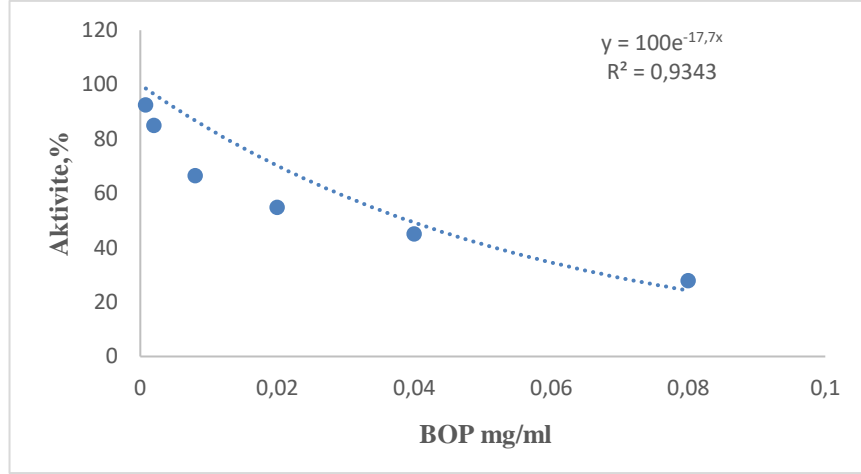
Şekil 4.26. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



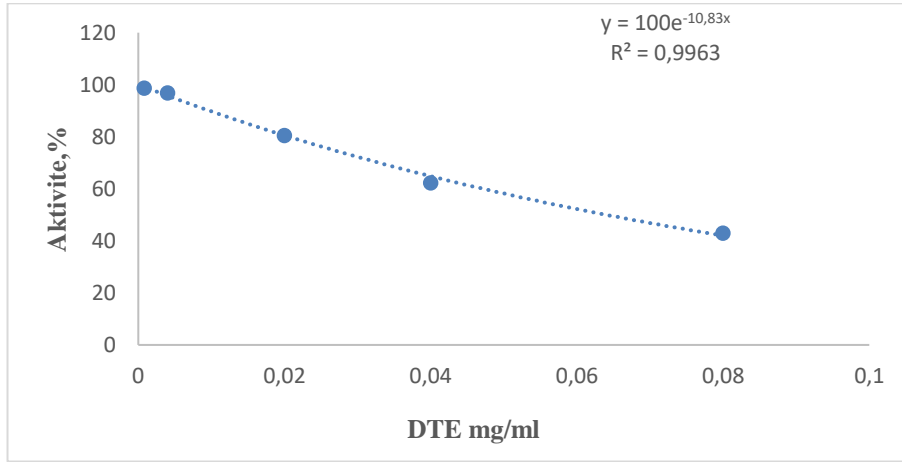
Şekil 4.27. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



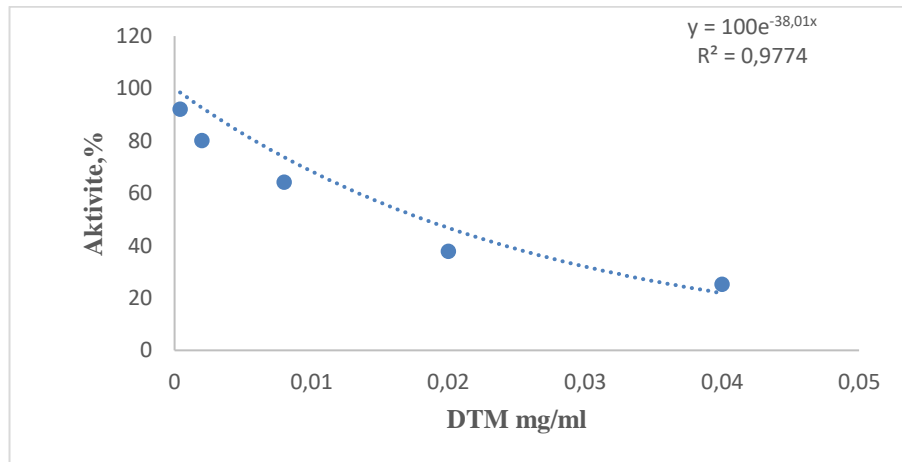
Şekil 4.28. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



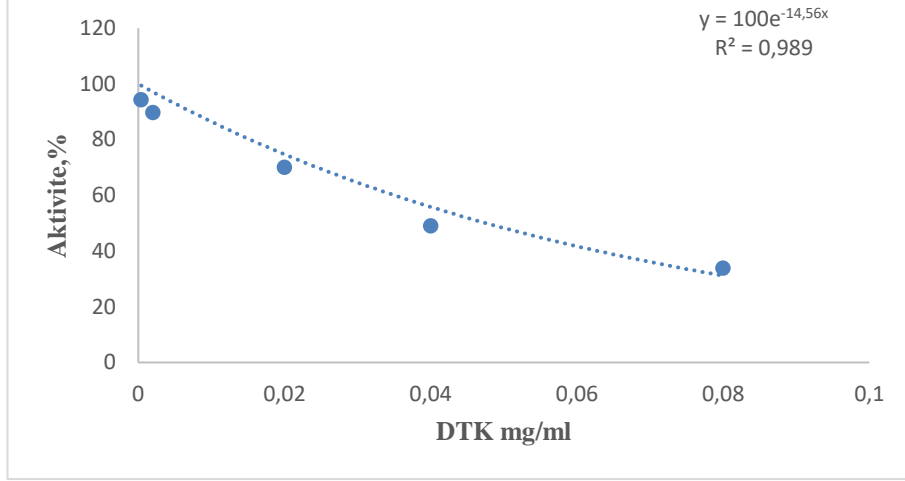
Şekil 4.29. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren BOP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



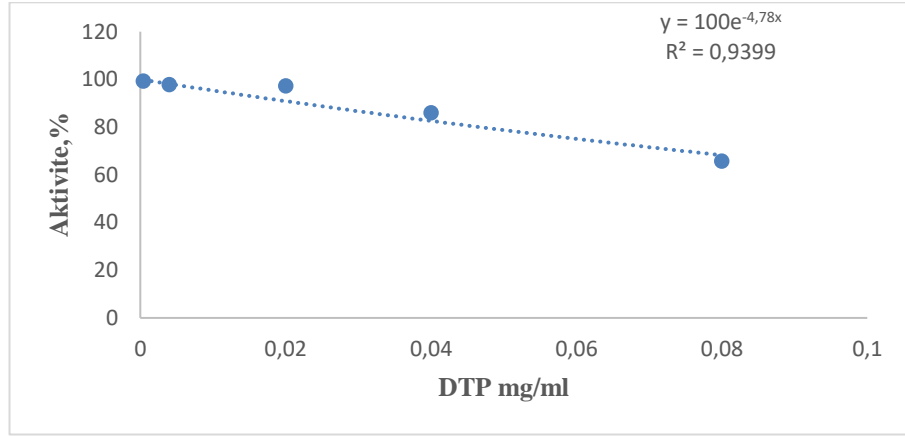
Şekil 4.30. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



Şekil 4.31. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



Şekil 4.32. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTK ekstraları için aktivite (%) grafikleri.

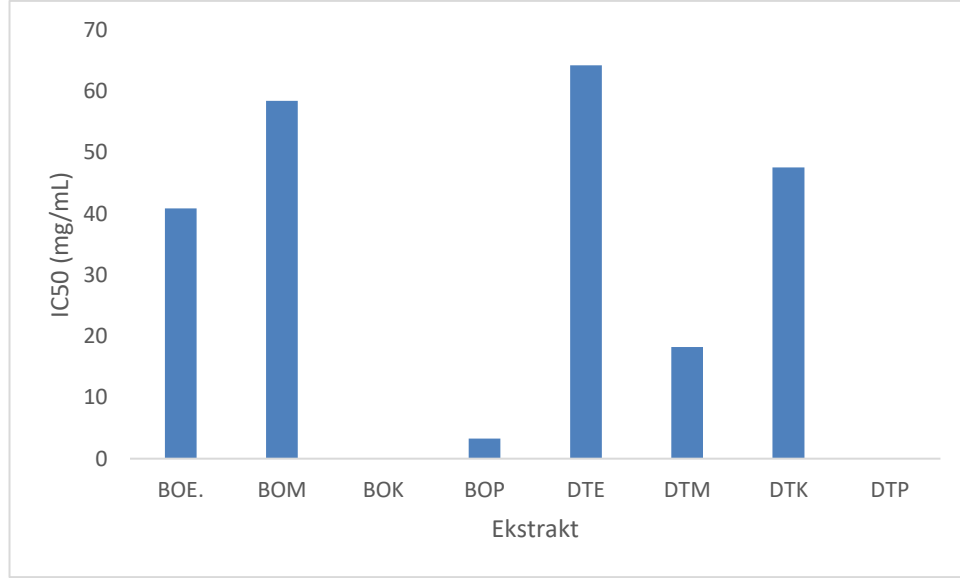


Şekil 4.33. BChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren DTP ekstraları için aktivite (%) grafikleri.

Çizelge 4.8. Ekstrelerin BChE enzim inhibisyonu IC₅₀ değerleri.

Bitki ek.	BOE	BOM	BOK	BOP	DTE	DTM	DTK	DTP
IC ₅₀	40,89	58,44	47,60	-	64,25	18,23	47,60	-

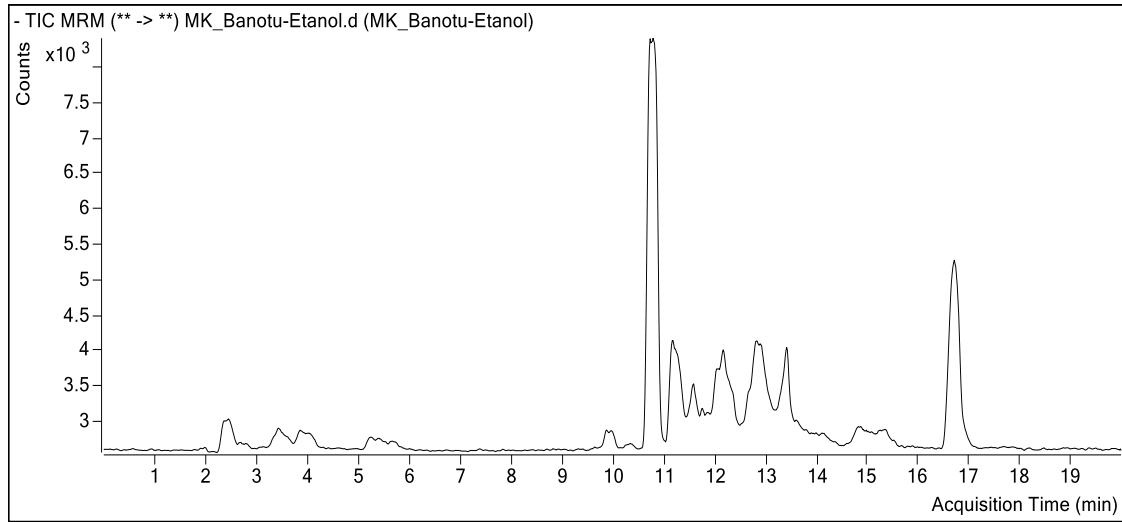
Bu bulgular uyarınca göre AChE enzimini in vitro olarak inhibe etme potansiyeli en yüksek olan ekstrelerin DTM elde edilen ekstre olduğu belirlenmiştir. 0,08 mg/ml konsantrasyonunda BOP 21,79, DTP ise 34,26 BChE inhibisyonu sağlamıştır (Çizelge 4.8.).



Şekil 4.34. BChE enzim inhibisyonu sonuçları.

4.5. LC-MS/MS KROMATOĞRAFİSİ İLE ELDE EDİLEN BULGULARI

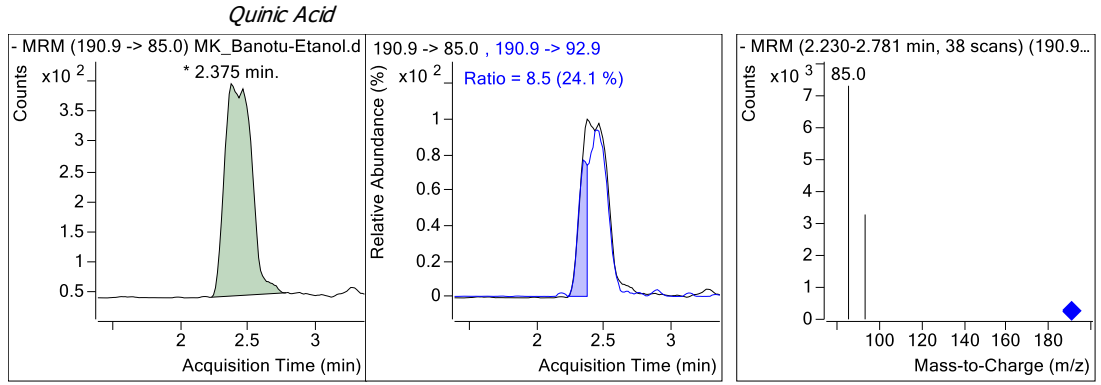
LC-MS/MS Kromatografisi kullanılarak *Rubia tinctorium* etanol ekstraktının içerik analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.



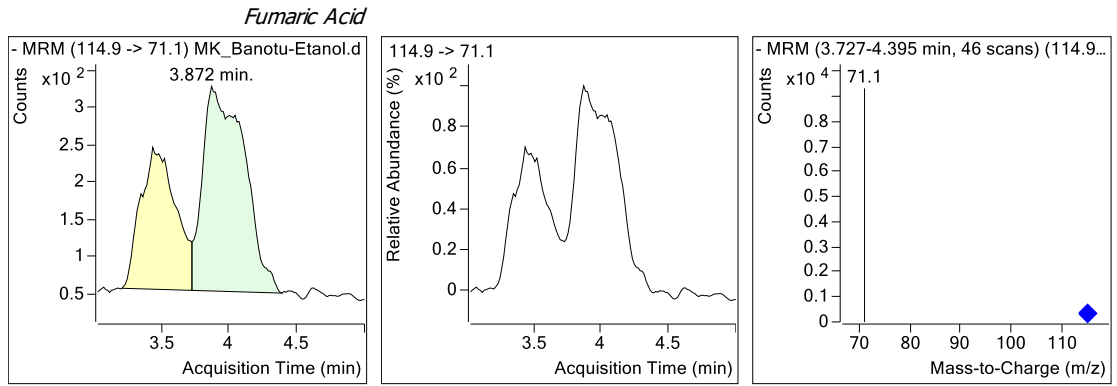
Şekil 4.35. LC-MS/MS kromatografisi ile tayin edilen fenolik bileşik kromatogramı.

Çizelge 4.9. LC-MS/MS kromatografisi ile tayin edilen fenolik bileşik miktarları (nanogram / 0,1 mg ekstre).

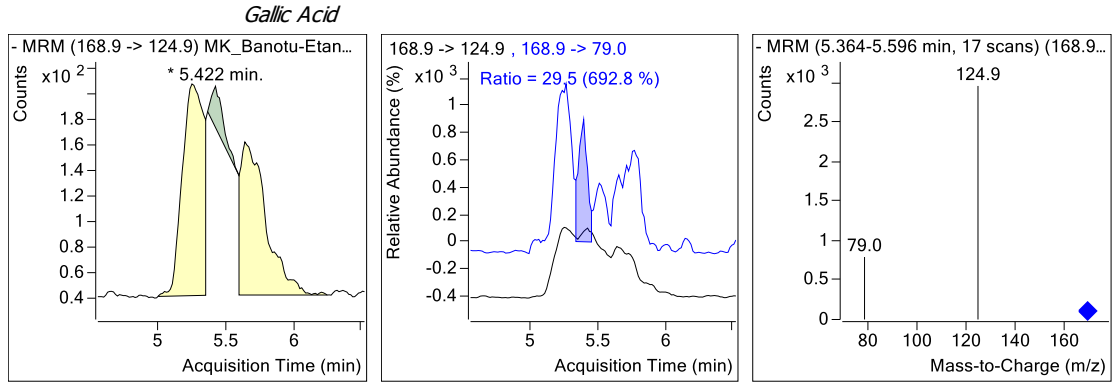
Compound	RT	Response	Conc
Quinic Acid	2,375	4890	1840,5279
Fumaric Acid	3,872	5896	3511,3209
Gallic Acid	5,422	191	0,0000
Pyrogallol	6,352	4	0,0000
Cyanidin-3-o-glucoside	10,430	174	17,5844
Keracyanin Chloride	10,530	0	0,0000
Chlorogenic Acid	10,794	77512	2925,8197
Catechin	10,884	18	0,0000
Peonidin-3-o-glucoside	10,908	0	0,0000
Epigallocatechin Gallate	11,053	1	0,0000
4-OH-Benzoic Acid	11,182	14249	861,1503
Epicatechin	11,233	19	0,0000
Hesperidin	11,574	1624	116,1665
Caffeic Acid	11,600	3157	0,0000
Vanillic Acid	11,673	243	441,0157
Syringic Acid	11,700	89	91,4468
Ellagic Acid	12,087	69	0,0000
Sinapic Acid	12,338	3	0,0000
p-Coumaric Acid	12,355	1386	0,0000
Naringin	12,358	308	4,2967
Vitexin	12,360	308	0,0000
Taxifolin	12,420	10	0,0000
Ferulic Acid	12,498	248	15,4559
Rosmarinic Acid	12,563	0	0,0000
Vanillin	12,602	0	0,0000
Myricetin	12,825	190	0,0000
Resveratrol	13,164	0	0,0000
Luteolin	13,409	16	0,0000
Quercetin	13,421	5174	38,0314
Apigenin	13,990	5	0,0000
Naringenin	14,192	4	0,0000
Isorhamnetin	14,262	62	0,0000
Galangin	15,382	918	1,0820
Chrysin	15,557	15	0,0000
Curcumin	16,030	1	0,0000



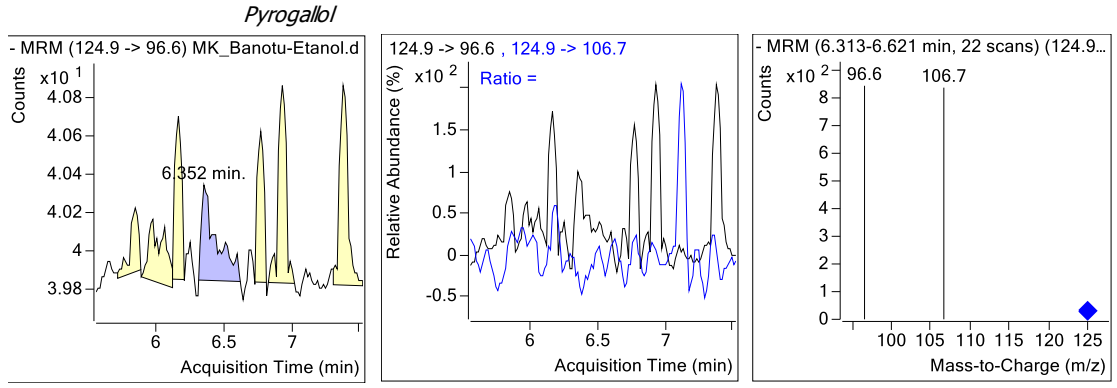
Şekil 4.36. Quinic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



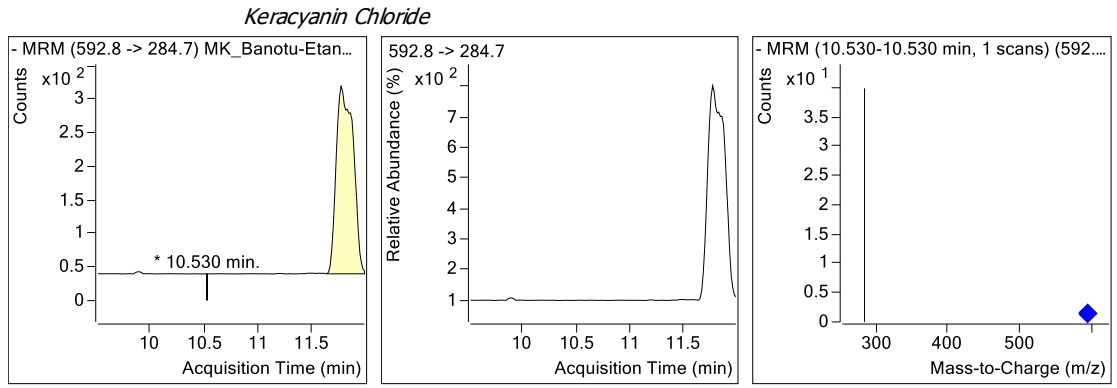
Şekil 4.37. Fumaric asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



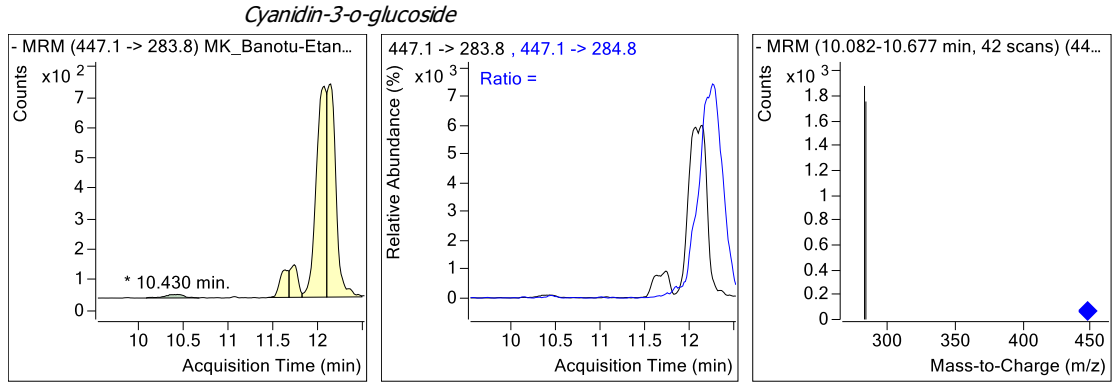
Şekil 4.38. Gallic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



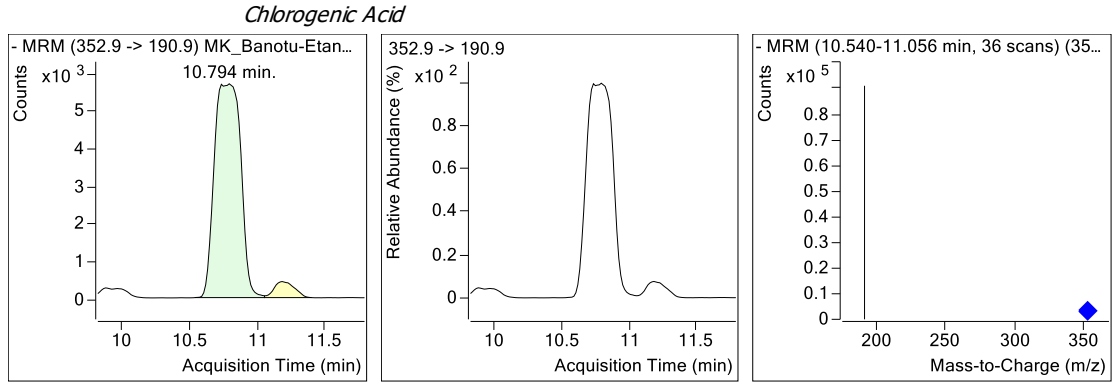
Şekil 4.39. Pyrogallol için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



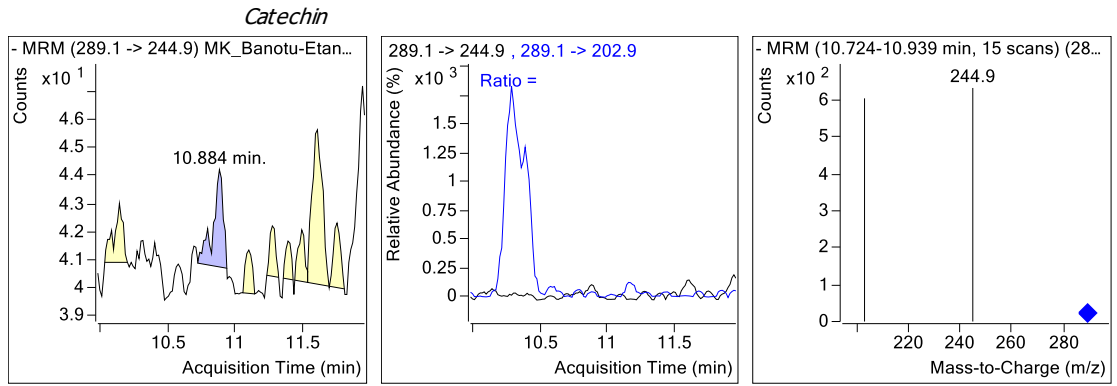
Şekil 4.40. Keracyanin Chloride için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



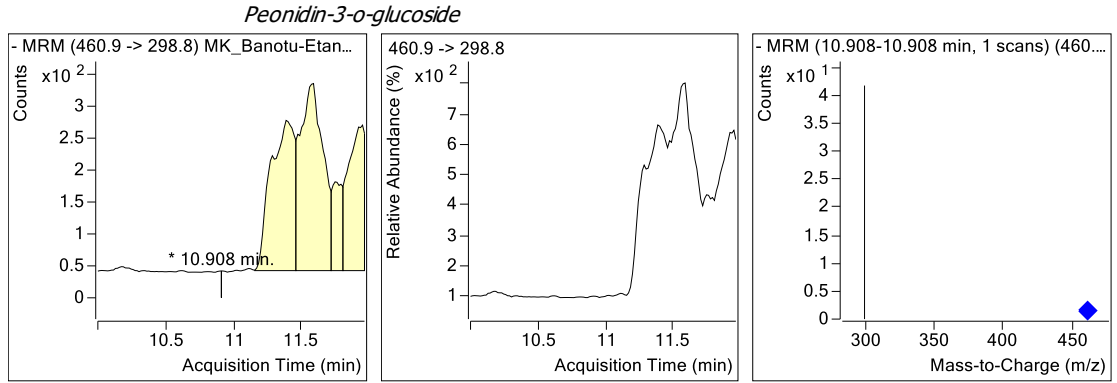
Şekil 4.41. Cyanidin-3-o-glucoside için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



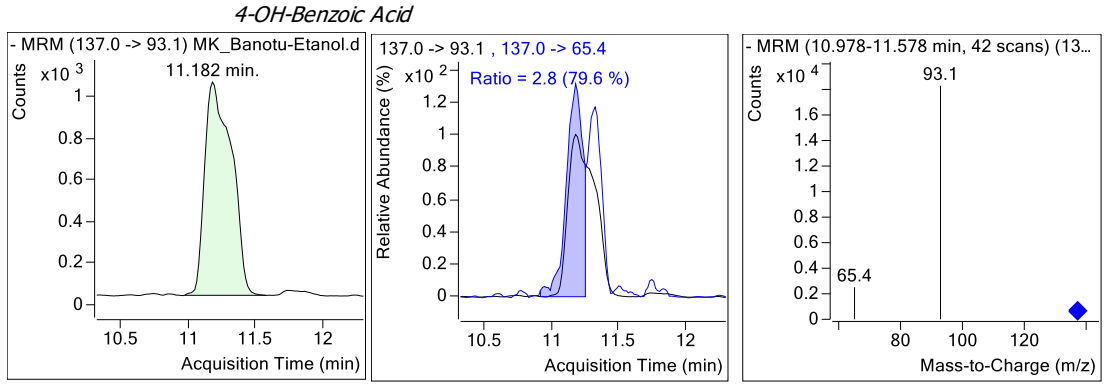
Şekil 4.42. Chlorogenic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



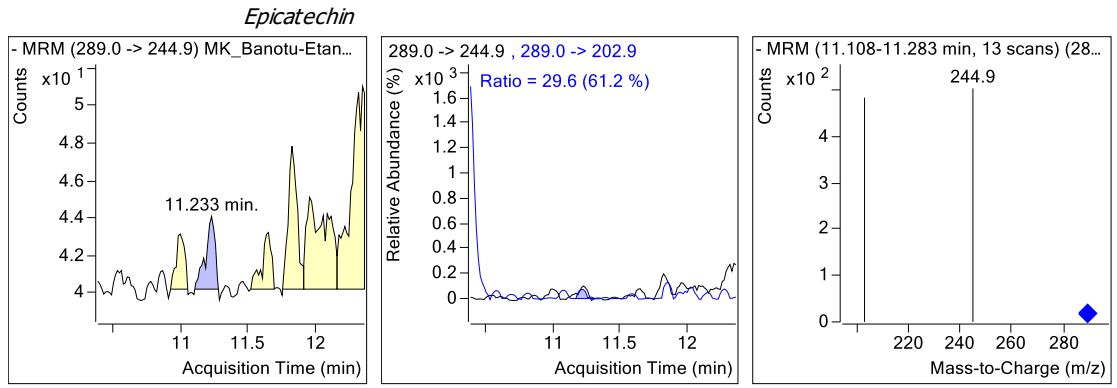
Şekil 4.43. Catechin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



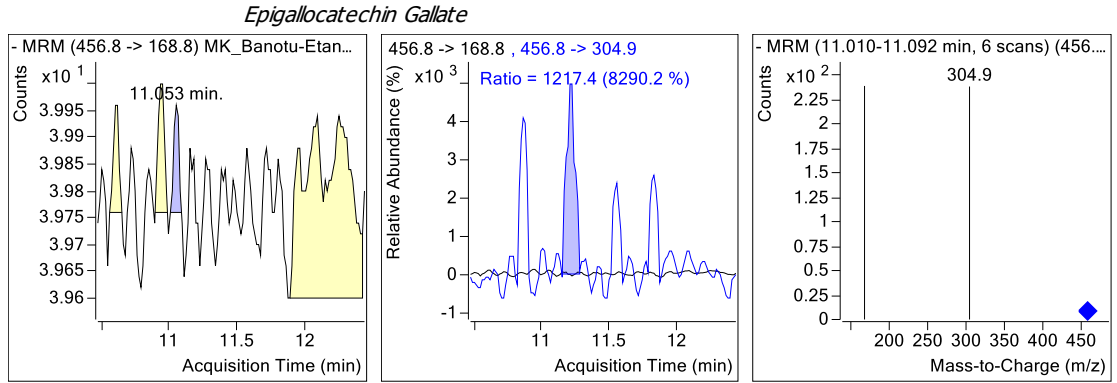
Şekil 4.44. Peonidin-3-o-glucoside için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



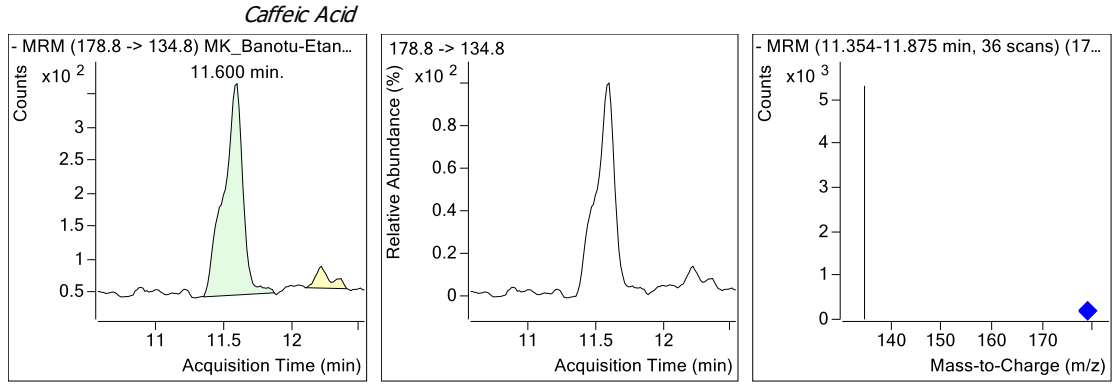
Şekil 4.45. 4-OH-Benzoic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



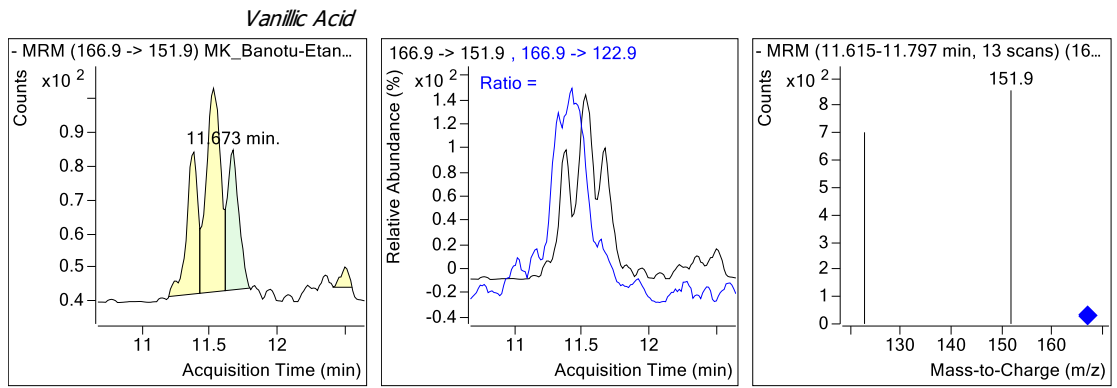
Şekil 4.46. Epicatechin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



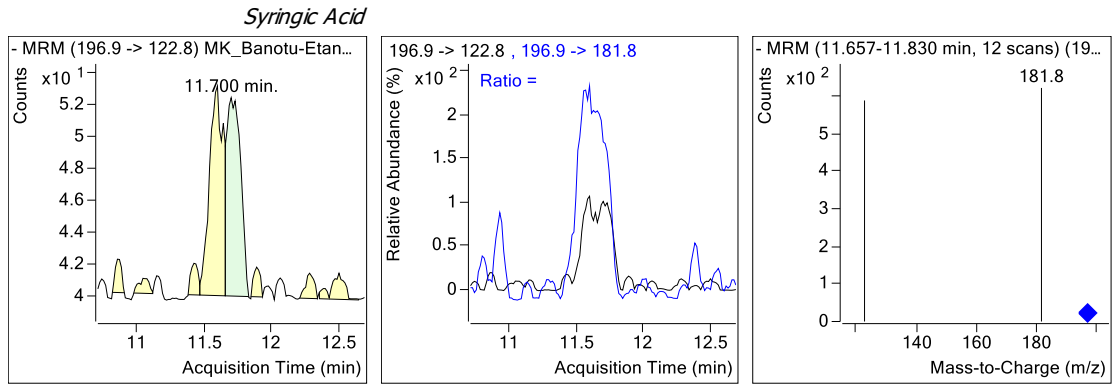
Şekil 4.47. Epigallocatechin Gallate için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



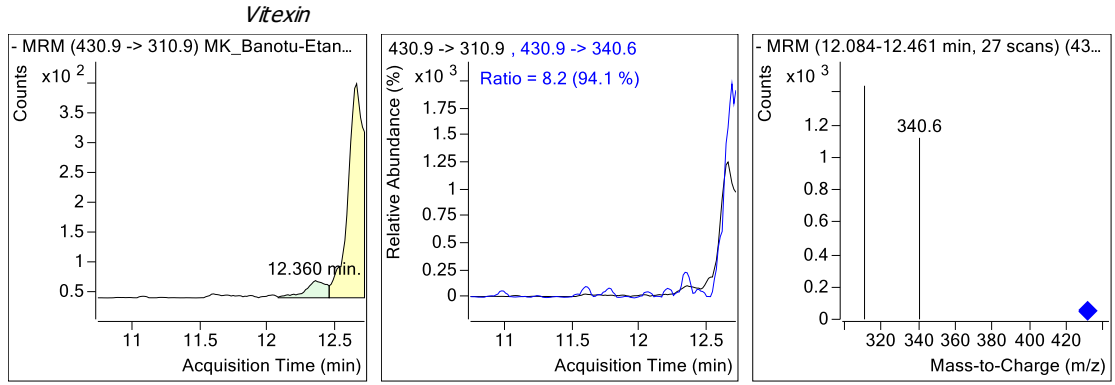
Şekil 4.48. Caffeic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



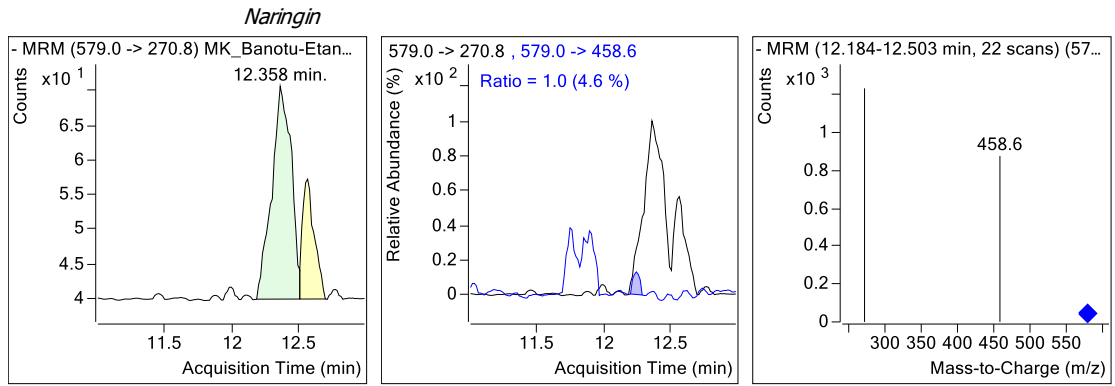
Şekil 4.49. Vanillic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



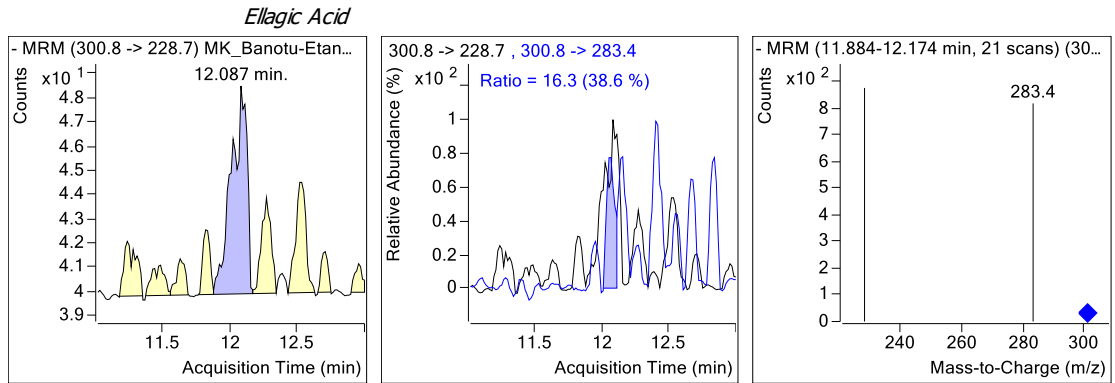
Şekil 4.50. Syringic asid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



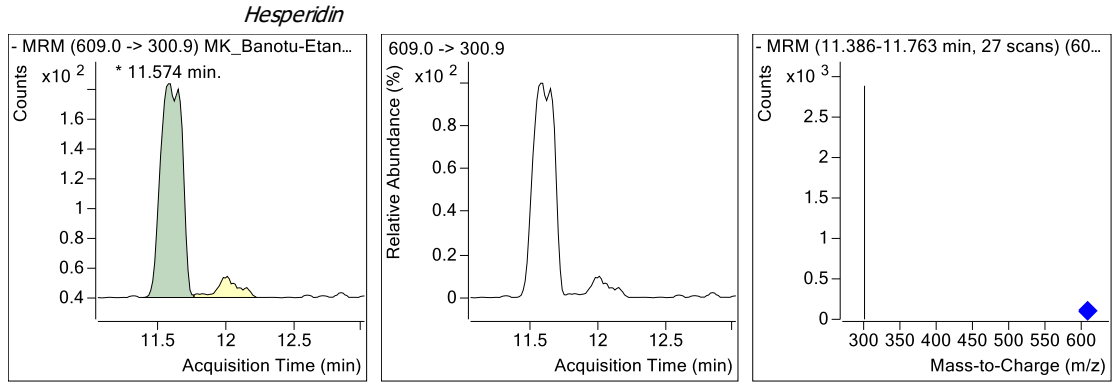
Şekil 4.51. Vitexin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



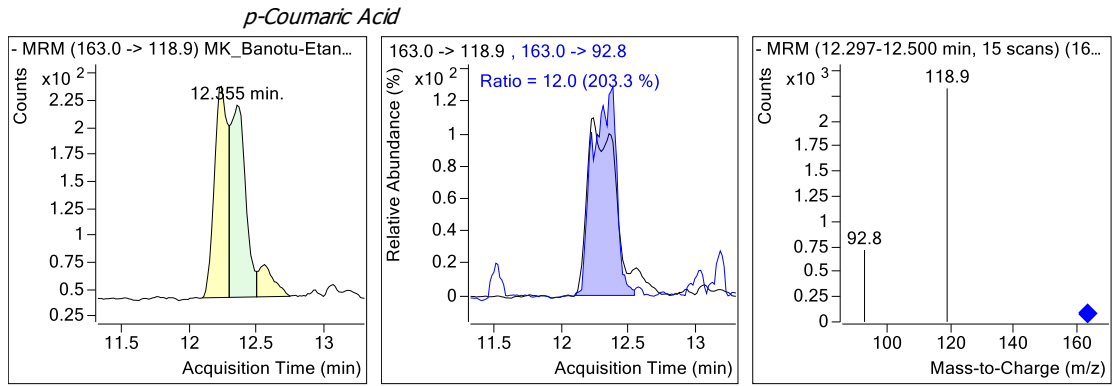
Şekil 4.52. Naringin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



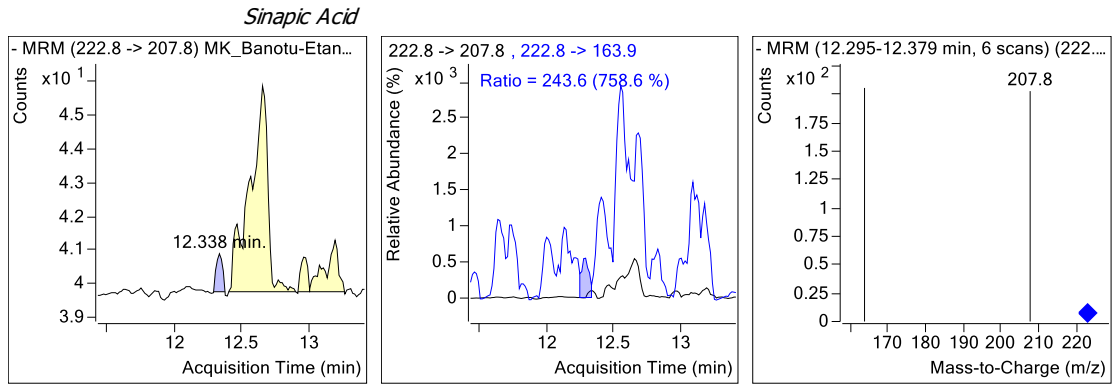
Şekil 4.53. Ellagic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



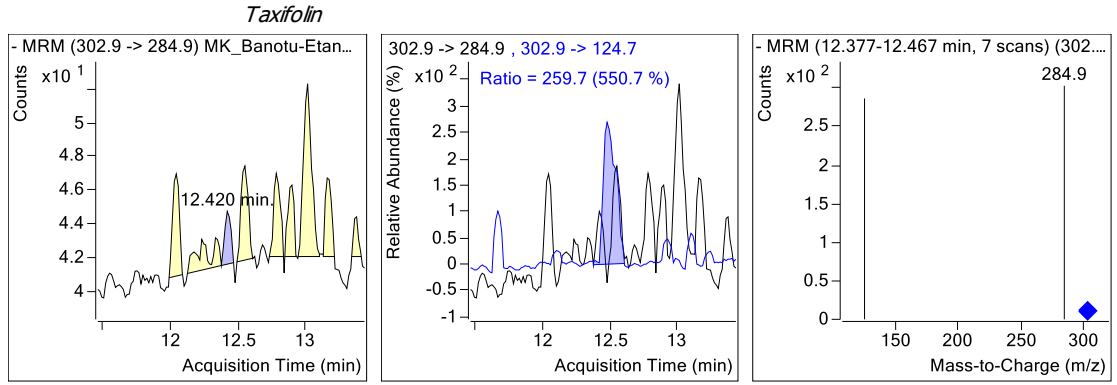
Şekil 4.54. Hesperidin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



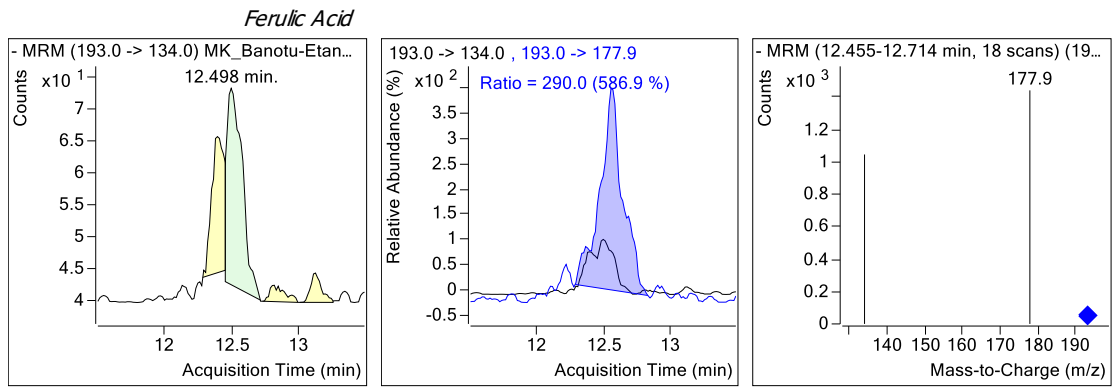
Şekil 4.55. p-Coumaric Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



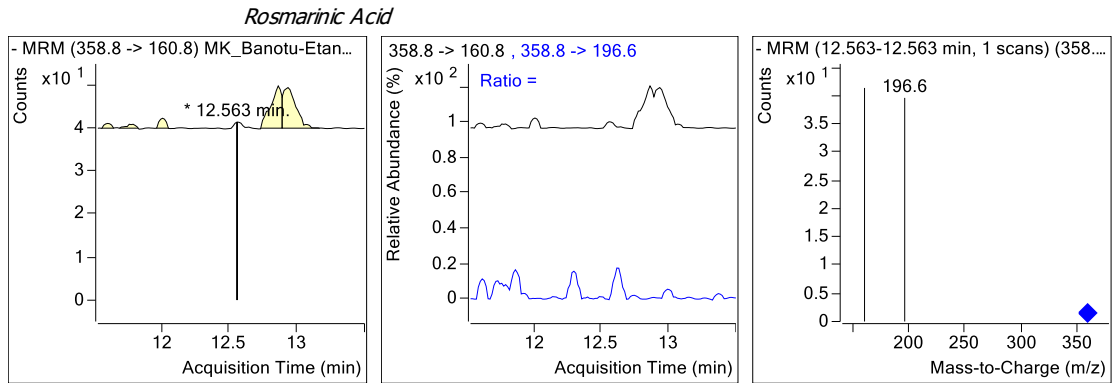
Şekil 4.56. Sinapic asit için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



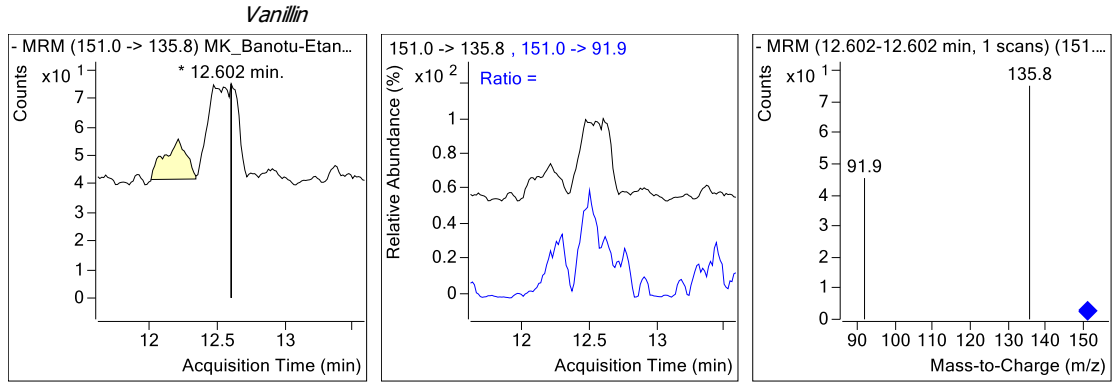
Şekil 4.57. Taxifolin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



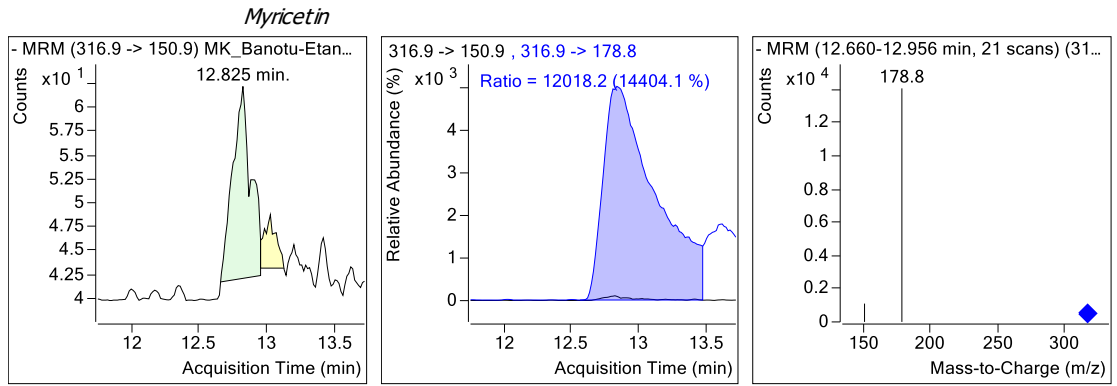
Şekil 4.58. Ferulic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



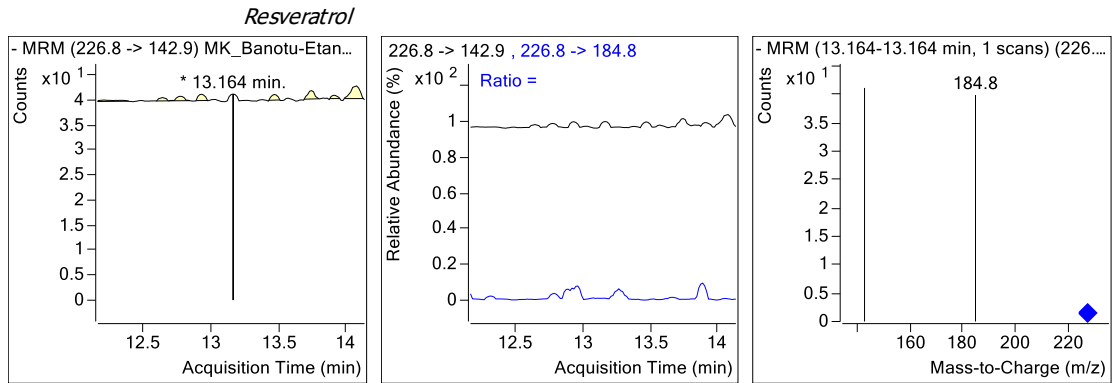
Şekil 4.59. Rosmarinic Acid için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



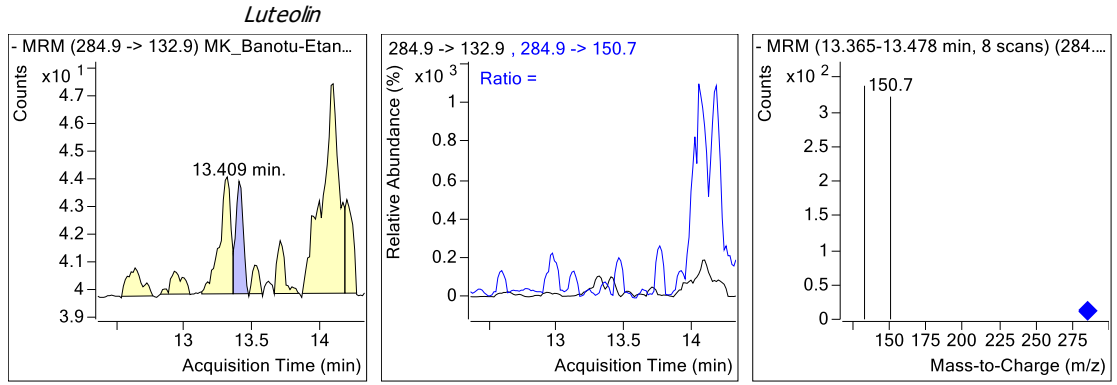
Şekil 4.60. Vanilin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



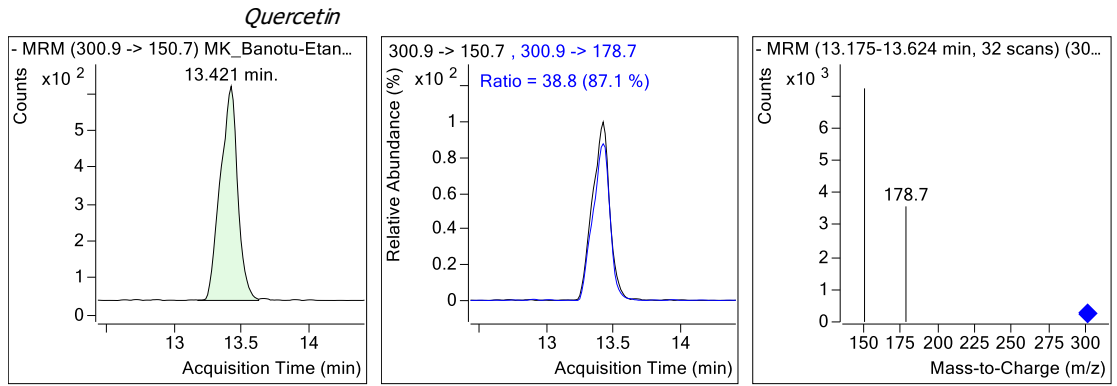
Şekil 4.61. Myricetin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



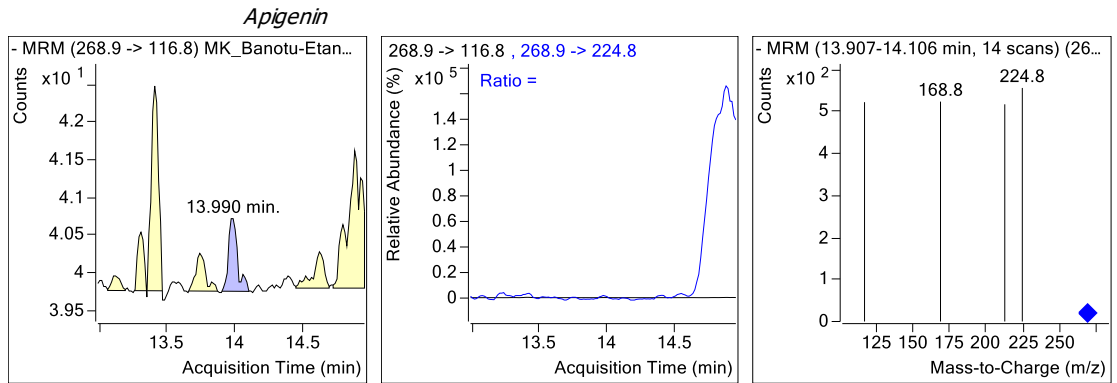
Şekil 4.62. Resveratrol için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



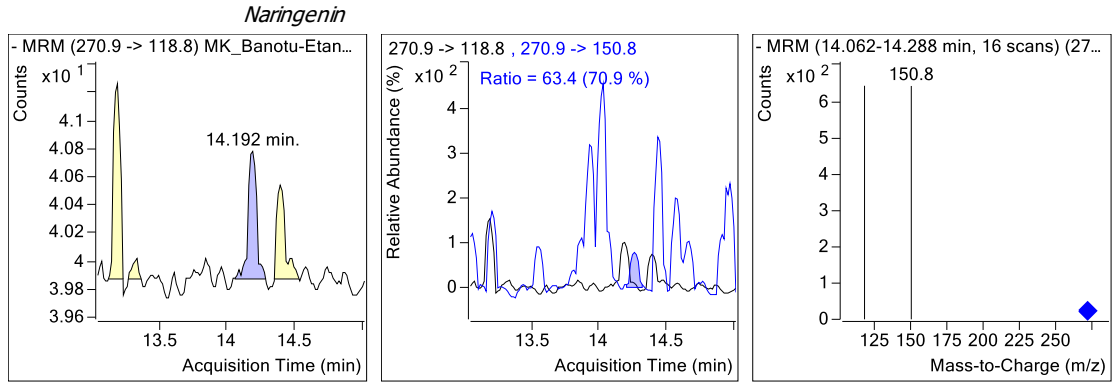
Şekil 4.63. Luteolin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



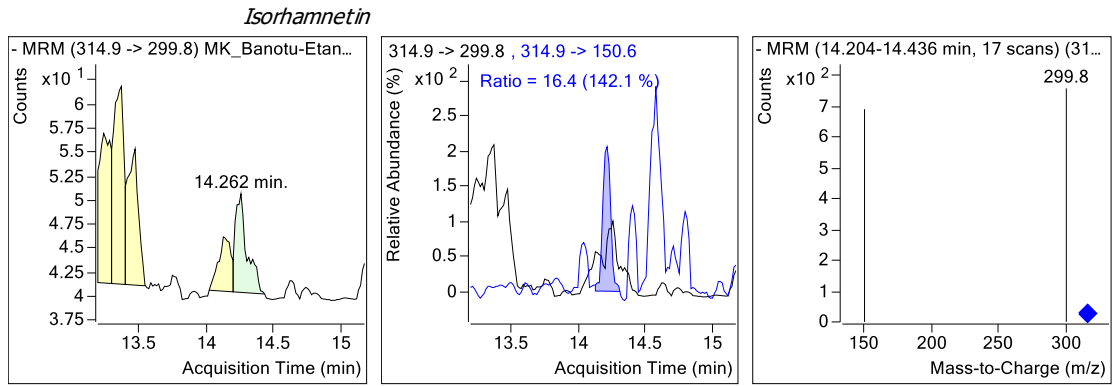
Şekil 4.64. Quercetin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



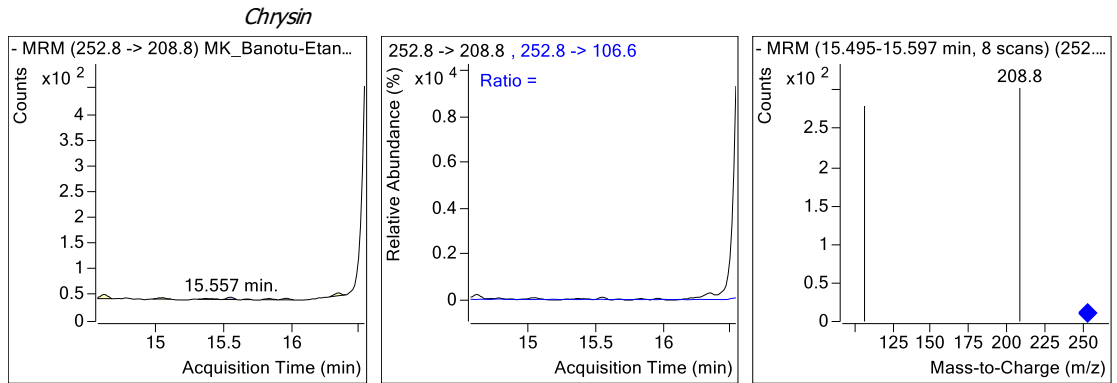
Şekil 4.65. Apigenin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



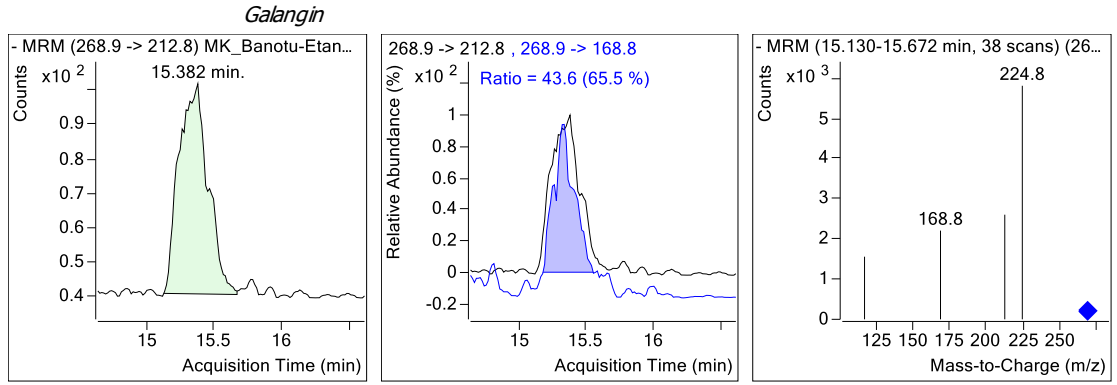
Şekil 4.66. Naringenin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



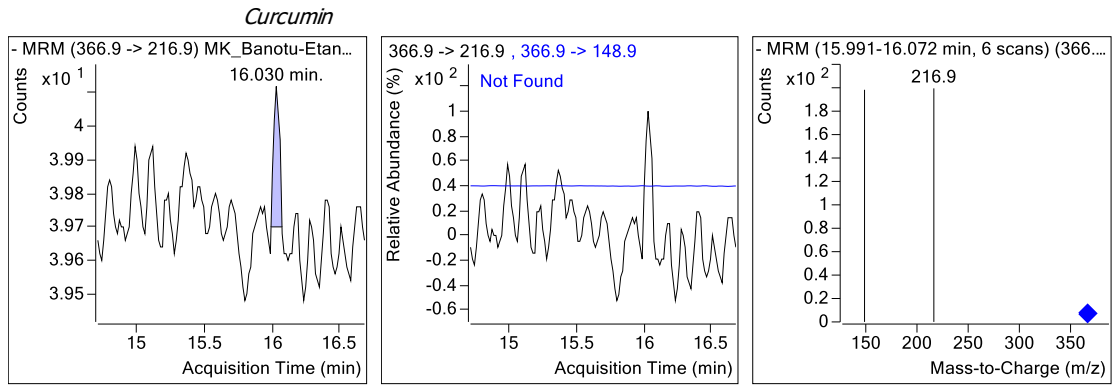
Şekil 4.67. Isorhamnetin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



Şekil 4.68. Chrysin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



Şekil 4.69. Galangin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.



Şekil 4.70. Curcumin için ölçüm sonucu elde edilen grafik.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında *Rubia tinctorium* ve *Tribulus terrestris* bitkilerinin kurutulmuş hali kullanılmıştır. Bu bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, toplam fenolik madde tayini, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Üzerine araştırma yapılan bitkilerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için birçok yöntem kullanıldı. Tez kapsamında antioksidan aktiviteyi belirlemek için çalışılan yöntemler aşağıda belirtilmiştir:

- Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi (FRAP metodu)
- Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (CUPRAC metodu),
- ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi
- DPPH radikal giderme aktivitesi

Yukarıda belirtilen bu yöntemler kullanılarak *Rubia tinctorium* ve *Tribulus terrestris* bitkilerinin çiçek ve yaprak kısımları karıştırılıp öğütülerek metanol, etanol, petrol eteri ve kloroform kullanılarak maserasyon yöntemiyle ekstraktlar elde edilmiştir. Elde edilen bu ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Yapılmış olan bu tez çalışmasından elde edilen bulgular BHT, Troloks ve BHA gibi farklı endüstri dallarında yaygın olarak kullanılan antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar antioksidan kapasitelerini incelediğimiz farklı ekstraktların antioksidan aktivitesi karşılaştırma yaptığımız standart antioksidan aktiviteleri ile benzer ya da daha düşük olduğunu göstermiştir.

Rubia tinctorium bitkisinde elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde tayini yapıldı ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri verildi. Sonuçlara göre en fazla fenolik madde içeriğine sahip ekstraktın BOM olduğu belirlenmiştir. $105,23 \pm 56,26$ µg gallik asit/mg ekstrakt eşdeğeri olduğu bulundu. Biçer ve arkadaşları tarafından yapılan bir

çalışmada *Rubia tinctorium* bitkisinin köklerinde toplam fenolik madde miktarı tayini yapılmıştır (Biçer et al., 2017). Folin Ciocalteu yöntemine göre spektrofotometrede okumalar 765 nm'de yapılmış olup, standart olarak gallik asitin kullanıldığı çalışmada, köklerdeki fenolik madde miktarları mg/g KA(kafeik asit) olarak tespit edilmiştir. Araştırmada en yüksek toplam fenolik madde miktarı 40,30 mg/g KA ile 2 mM kafeik asit ve 100 uM Metil jasmonat'nin birlikte uygulandığı köklerde tespit edilmiş olup, bu uygulama ile toplam fenolik madde miktarının kontrolle kıyaslandığında 2,8 kat arttığı tespit edilmiştir.

Rubia tinctorium bitkisinin FRAP sonuçlarına göre en yüksek indirgeme kapasitesinin 1.23 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ ekstrakt değeri ile BOK ekstraktı olduğu belirlenmiştir. Houari ve arkadaşları tarafından antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan FRAP yöntemi ile yapılan çalışmada 2,5 mL fosfat karışımı tampon (0,2 M, pH 6,6) ve 2,5 mL potasyum ferrisiyanür %1'i 0,2 mL seyreltilmiş numuneyle karıştırılmıştır. Bitkinin toprak üstü kısmının hidrometanolik ekstraktı, $1,51 \pm 0,22 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ ekstrakt sonucunu vermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz değerle kıyaslandığında daha yüksek sonuç alınmıştır (Houari et al, 2021).

Rubia tinctorium bitkisinin CUPRAC metodunun sonuçlarına göre elde ettiğimiz değerler baz alınarak en yüksek indirgeme kapasitesine sahip ekstraktın BOM olduğu belirlenmiştir. Akyol ve Yener tarafından yapılan bir araştırmada antioksidan kapasitesinin CUPRAC metoduna göre belirlenmesi sonucunda etanol ekstraktının $83,98 \pm 1,09 \mu\text{g}/\text{mL}$ değeri ile en yüksek indirgerme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Akyol ve Yener, 2021).

Rubia Tinctorium ile ilgili yaptığımız DPPH ve ABTS çalışmalarına göre en yüksek antioksidan kapasitesine metanol ekstarktının $26,47 \mu\text{g}/\text{ml}$ IC₅₀ değeri ile en güçlü DPPH• radikali giderme kapasitesine, $0,796 \mu\text{g}/\text{mL}$ trolox eşdeğeri ile ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesine sahip olduğu belirlemiştir. Houari ve arkadaşları *Rubia Tinctorium* bitkisinin DPPH giderme aktivite tayini yönteminde bitkinin toprak üstü kısımlarını kullanmıştır. Çalışmada kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır ve sonuçlar metanol ekstraktına göre $0.073 \pm 0,02 \text{ mg}/\text{ml}$ olarak verilmiştir (Houari et al, 2021). Karataş tarafından yapılan bir çalışmada bitkinin kök kültürlerinin antioksidan kapasitesinin

tayini ABTS yöntemi ile yapılmıştır. Sonuçlar radikalın başlangıç konsantrasyonunu %50 oranında azaltan örnek konsantrasyonu (IC₅₀) olarak verilmiştir. Sonuç olarak *Rubia tinctorum* ekstraktlarının yüksek FRAP ve ABTS radikal giderme aktivesine sahip olduğu ifade edilmiştir. Bu yüksek antioksidan aktivitenin fenolik bileşik, antrakinon ve flavonoid içeriğinden ileri geldiğini bildirilmiştir (Karataş, 2021).

Yukarıda bahsettiğimiz gibi Alzheimer gibi birçok hastalığın tedavisinde AChE ve BChE kullanılmaktadır. Biz de yaptığımız bu çalışmamızda AChE ve BChE enzimleri için yeni ve kuvvetli inhibitörlerin ortaya koymaya çalıştık. Yapılan çalışma sonucunda *Rubia tinctorum* ethanol ekstraktının AChE için 24,03 µg/mL, BChE için 40,88 µg/mL IC₅₀ değerleri ile en güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu görülmüştür. Çalışmada kullandığımız ikinci bitki ise *Tribulus terrestris* olmuştur. Bitkinin yaprak ve çiçeklerinden elde edilen elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde tayini yapıldı ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak verildi. Sonuçlara göre en fazla fenolik madde içeriğine sahip ekstraktın 63,59 ± 4,33 µg gallik asit/mg değeri ile DTM olduğu belirlenmiştir.

Uzun zamandan beri, dünyadaki pek çok kültür tarafından, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde *Tribulus terrestris* bitkisi kullanılmıştır. Çömlekçioğlu ve Çırak tarafından yapılan bir çalışmada *Tribulus Terrestris* bitkisinin metanol ve etanol ekstraktları kullanılarak toplam fenolik madde miktarı belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde değeri 2,20-18,77 mg arasında değişmektedir. Elde edilen ekstraktların absorbans değerleri yüksek olsa da düşük ekstrakt verimi sonuçları etkilemiştir (Çömlekçioğlu ve Çırak 2021). Aynı çalışmada FRAP ve DPPH yöntemleri etanol ekstraktı kullanılarak antioksidan kapasiteleride belirlenmiştir. Kontrol olarak her iki yöntemde askorbik asit kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre FRAP değeri 6,16-23,50 µg Fe²⁺ eşdeğeri, DPPH IC₅₀ değeri 1,54-10,54 µg mL arasında değişmektedir (Çömlekçioğlu ve Çırak, 2021). Bizim yaptığımız çalışmada en yüksek FRAP indirgeme kapasitesi 1,47 µmol Fe²⁺/mg ekstrakt değeri ile DTM olduğu görüldü. DPPH yönteminde ise metanol ekstraktı en yüksek giderme aktivesine sahiptir. Bir diğer çalışma Uysal ve arkadaşları tarafından *Tribulus terrestris* metanol ve etil asetat kullanarak farmakolojik ve kimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Çalışmada DPPH yöntemi için 30,50 mg/g , ABTS yöntemi için 44,49 mg/g trolox eşdeğeri ile etil asetat ekstraktı

ile en yüksek sonuçları göstermiştir (Uysal et al., 2023). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada metanol ekstraktı ABTS ve CUPRAC yöntemlerine göre en yüksek sonuçları göstermiştir.

Asetilkolinesteraz (ACHE) ve bütirikolinesteraz (BCHE) enzimlerinin her ikisi de beyinde bulunur ve nörofibriler karışıklıklar ve nöritik plaklar arasında tespit edilir (Rosenberry, 1975). AD'nin bilinmeyen etiyojisine rağmen, AChE enzim inhibisyonu yoluyla asetilkolin miktarının yükselmesi AD'ye karşı en etkili tedavi stratejisi olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, AChE ve BCHE inhibitörleri AD tedavisinde dikkate değer alternatifler haline gelmiştir. Bununla birlikte, AChE inhibitör aktivitesine sahip mevcut ilaçlar (tacrin, rivastigmin ve donepezil) bazı yan etkilere sahiptir ve sadece hafif AD tipine karşı etkilidir ve henüz BCHE inhibitör aktivitesi ile ilgili böyle kesin sonuçlar mevcut değildir. Sonuç olarak, AD ile mücadele etmek için yeni ilaçlar geliştirmek zorunludur. Elde edilen sonuçlara göre DTP ekstraktı hariç diğer ekstraktların her iki enzim üzerine de kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Her iki enzim için en güçlü inhibisyon etkisine sahip ekstraktın AChE için 17,29 µg/mL, BChE için 18,23 µg/mL IC₅₀ değeri ile DTM olduğu görüldü. Yapılan başka bir araştırmada etil asetat ekstraktı, en yüksek enzim inhibisyon aktivitesini AChE 1.56 mg GALAE/g ekstrakt; (mg gallik asit eşdeğeri), BChE: 2.14 mg GALAE/g (galantamin eşdeğeri) göstermiştir. Bu araştırmada, *Tribulus terrestris* doğal antioksidan ve enzim inhibisyon kaynaklarının geliştirilmesi için kullanılmıştır (Uysal et al., 2023).

Bütün bu çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalarda yol gösterici olabileceği, bulunan sonuçların Alzheimer gibi hastalıkların araştırılması açısından önemli olabileceği ve bu maddenin ileride tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların içeriği ve farmakolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada bazı hastalıkların tedavisi için belirtilen bitkilerin kullanıp kullanamayacağının ortaya konulması hedeflenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların ileride yapılacak deneysel, biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

Akyol, G., Yener, E. “Enzimatik Ön İşlem Uygulanan Pamuklu Kumaşların Kök Boya ile Renklendirilmesi”. *İleri Mühendislik Çalışmaları ve Teknolojileri Dergisi*, 2(1), 21-29(2021).

Ashani Y., Shapiro S, Levy D., Wolfe AD, Doctor BP, Raveh L., “Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice”. *Biochemical Pharmacology*, 41, 37-41(1991)

Barta C., Sasvari-Szekely M., Devai A., Kovacs E., Staub M., Enyedi P”. Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia”. *Mol. Genet. Metab.* 484-488 (2001)

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, “Biochemistry”, 7.Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Denizli A., Özden A. K.), *Palme Yayıncılık* (2013)

Biçer, P. O., Demirci, T., Asci, O. A., & Baydar, N. G. “Effects of methyl jasmonate and caffeic acid applications on secondary metabolite production in madder (*Rubia tinctorum*) root cultures”. *Indian J Pharm Edu*, 51, 508-512. (2017).

Birks, J. S., “Cochrane Dementia and Cognitive Improvement Group. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease”. *Cochrane Database Syst. Rev* (1996).

Carr, R. L., Janice E. C., “Toxic responses of the nervous system.” *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts* 2: 27-95 (2001).

Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Ozkan, M., “Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işletme teknolojisi” 1-174. In Ed. B. *2. Baskı, Başkent Matbaacılık*, Ankara (2004).

Chatonnet, A., & Lockridge, O. “Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase.” *Biochemical Journal* 260.3 625 (1989).

Clifford, M., N., “Anthocyanins–nature, occurrence and dietary burden”. *J. Sci. Food Agric*, 80(7), 1063-1072 (2000).

Çömlekçioğlu, N., Çırak, R., Comparison of fatty acid composition and antioxidant contents of *Tribulus Terrestris* L. collected from different localities. *TURJAF* 9(8), 1448-1454 (2021).

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." *Nat. Prod. Rep.*, 26(8), 1001-1043 (2009).

Darvesh, Sultan, David A., Hopkins, Changiz G., "Neurobiology of butyrylcholinesterase." *Nature Reviews Neuroscience* 4.2 131-138 (2003).

Dasgupta, A. "Physostigmine." In *Critical Care Toxicology* (pp. 1-4) *Springer*, Cham (2018).

Dave, Amish S., Daniel M., "Song replay during sleep and computational rules for sensorimotor vocal learning." *Science* 290.5492 812-816 (2000).

Demir, Z., Türkan, F., "Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Enzimlerinin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi". *JIST* 12(4), 2386-2395 (2022).

Diplock, A. T., Charuleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., ... "Vina-Ribes, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species". *British journal of nutrition*, 80(S1), S77-S112(1998).

Diplock, A., "Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients". *ILSI Europe concise monograph series*, 59(1998).

Ergün, A., Tuncer, D., Colpan, Ş., Yalcın, S., Yıldız, G., Kucukersan M.K., Kucukersan, S., Onol, AG., Muğlalı, OH., Şehu, A., Yemler, "Yem hijyenive teknolojisi." *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Pozitif Matbaacılık*, Ankara, 465 s (2002).

Fulton, M. H., & Key, P. B. "Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects" *Environ. Toxicol. Chem.* 20.1 37-45 (2001).

Ganzera, M., Bedir, E., Khan, I. A. "Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection". *J. Pharm. Sci.*, 90(11), 1752-1758 (2001).

Giacobini E., "Cholinesterase inhibitors: From the Calabar bean to Alzheimer therapy". *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*, 181– 226 (2000).

Gözükara, E. M. "Biyokimya", *Ofset Repromat Ltd. Şti*, Ankara, 531-549 (1989)

Gulçin, İ., Buyukokuroglu, M. E., & Kufrevioglu, O. I. "Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin." *J. Pineal Res.*, 34(4), 278-281 (2003b).

Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts". *Food Chem*, 83(3), 371-382 (2003a).

Halliwell, B., Aruoma, O. I., "DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems". *FEBS letters*, 281(1-2), 9-19 (1991)

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., "Free radicals in biology and medicine". *Oxford university press*, USA (2015).

Houari, F. Z., Erenler, R., & Hariri, A. "Biological activities and chemical composition of *Rubia tinctorum* (L) root and aerial part extracts thereof", *Acta Biol. Colomb.*, 27 (3): 403-414 (2022).

Kahkonen, MP., Hopia, AI., Vuorela, HJ., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, TS., Heinonen M., "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds". *J. Agric. Food Chem* 47, 3954- 3962 (1999).

Karataş, İ. "Rubia tinctorum L. (Kökboya) bitkisinin in vitro kök kültürlerinde hormon ve eksplant kaynaklarının sekonder metabolit üretimi ve antioksidan aktivitelerine etkileri." *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi* 24.5 939-947 (2021).

Kawaguchi N., Kuwabara S., Nemoto Y., Fukutake T., Satomura Y., Arimura K., Osame M., Hattori T. "The study group for Myasthenia gravis in Japan. Treatment and outcome of Myasthenia gravis: retrospective multi-center analysis of 470 Japanese patients", 1999-2000. *J. Neurol. Sci.* 224,43-7 (2004).

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. Ş., "Biyokimya", *Aktif Yayınevi*, Erzurum (2004)

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. Ş., "Biyokimya", *Aktif Yayınevi*, Erzurum (2005)

Kirby, Eric, Kelin W. , "Quantifying differential rock-uplift rates via stream profile analysis ". *Geology* 29.5 415-418(2001).

Koçancı, F. G., Aslım, B., "Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants." *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19-35 (2016).

Kryger, G., Silman, I., Sussman, J. L. "Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 : implications for the design of new anti-Alzheimer drugs". *Structure*, 7(3), 297-307 (1999).

Kutty K. M, Payne R. H., "Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism ". *J. Clin. Lab. Anal*, 8:247-50 (1994).

Kutty K. M., Annanpurna V., Prabhakaran V., Pseudocholinesterase: "A protein with functions unrelated to its name." *Biochemical Society Transactions*,7, 555-556 (1989).

Lea, D., Chambers, S. M. Rubia: "The ancient source of red dye". *Economic Botany* 61(4), 374-383 (2007).

Mahmudov F., "Tedadavi amaçlı kullanılan birkilerin tıpta rolü" *Nasir* bask., (2019)

Mavi, A., "İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi." Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum (2005).

Nelson DL., Cox M. M., "Lehninger Principles of Biochemistry". 6th ed. *Freemman W. H Company*; Neü York. (2012).

Neychev, V., Mitev, "V. Pro-sexual and androgen enhancing effects of Tribulus terrestris L.: Fact or Fiction". *J. Ethnopharmacol*, 101(1-3), 1-3(2005).

Ritchie, C. W., Ames, D., Clayton, T., Lai, R. "Metaanalysis of randomized trials of the efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer disease" *Am J Geriatr Psychiatry*, 12(4), 358-369 (2004).

Rosenberry, T. L., "Acetylcholinesterase". *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 43, 103-218 (1975).

Rösler, M., Anand, R., Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y., Dal-Bianco, P., ... Group, E. S. "Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial". *Bmj*, 318(7184), 633-638(1999).

Sehitoglu, M. H., Han, H., Kalin, P., Gülçin, İ., Ozkan, A., Aboul-Enein, H. Y. "Pistachio (*Pistacia vera* L.) gum: A potent inhibitor of reactive oxygen species". *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30(2), 264-269 (2015).

Singleton, Vernon L., Rudolf O., Rosa M., Lamuela-Raventós. "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent." *Methods in enzymology*. Vol. 299. Academic press, 152-178 (1999).

Sonnen, J. A., Breitner, J. C., Lovell, M. A., Markesbery, W. R., Quinn, J. F., & Montine, T. J. "Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models". *Free Radic. Biol. Med.* 45(3), 219-230 (2008).

Stuart, D., "Plants for Natural Dyes." *Timber Press* (2006).

Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., & Silman, I. "Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein". *Science*, 253(5022), 872-879 (1991).

Taslimi, P., Sujayev, A., Garibov, E., Nazarov, N., Huyut, Z., Alwasel, S. H., Gulçin, İ. "Synthesis of new cyclic thioureas and evaluation of their metal-chelating activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase inhibition profiles". *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(7), e21897 (2017).

Taylor, P., Radic, Z., “The cholinesterases: from genes to proteins”. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34(1), 281-320(1994).

Tsang, A., H., K., Chung, K. K. K., “Oxidative and ntsaitrosative stress in Parkinson's disease”. *BBA*, 1792, 643-650 (2009).

Tüzün, C., “Organik Kimya”. Ankara: *Palme Yayıncılık*, 597-598 (1996).

Uysal, S., Senkardes, I., Jekő, J., Cziáky, Z., Zengin, G. “Chemical characterization and pharmacological profile of Tribulus terrestris extracts: A novel source of cosmeceuticals and pharmaceuticals”. *Biochem. Syst. Ecol.*, 107, 104600 (2023).

Vale, J.A., “Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning”. *Toxicology Letters*, 66, 649-652 (1998).

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(1), 44-84,(2007).

ÖZGEÇMİŞ

İlk okul ve liseyi öğrenimini Azerbaycanda tamamlamıştır. 2013 yılında Azerbaycan Pedagoji Üniversitesi kimya öğretmenliğini lisans bölümünü kazanmış, 2017 yılında bitirmiştir. 2020 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Toksikolojisi anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Şu an evli ve Türkiye’de yaşamaktadır.