



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KENEVİR (*Cannabis sativa* L.) BİTKİSİNİN
KİMYASAL BİLEŞİK İÇERİĞİNİN,
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN VE
ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ
İNHİBİSYONUNUN BELİRLENMESİ**

Vefa VEFAOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı

Mayıs-2024
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KENEVİR (*Cannabis sativa* L.) BİTKİSİNİN
KİMYASAL BİLEŞİK İÇERİĞİNİN,
ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN VE
ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ
İNHİBİSYONUNUN BELİRLENMESİ**

Vefa VEFAOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Kenan BULDURUN

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Abdussamat GÜZEL

**Mayıs-2024
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL ve ONAYI

Vefa VEFAOĞLU tarafından hazırlanan “Kenevir (*Cannabis sativa* L.) Bitkisinin Kimyasal Bileşik İçeriğinin, Antioksidan Aktivitesinin ve Asetilkolin Esteraz Enzimi İnhibisyonunun Belirlenmesi” adlı tez çalışması 29/04/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Kenan BULDURUN

Muş Alparslan Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Danışman

Prof. Dr. Ercan BURSAL

Muş Alparslan Üniversitesi,

Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Abdussamat GÜZEL

İnönü Üniversitesi,

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Yukarıdaki sonuç;
Enstitü Yönetim Kurulu/...../..... Tarih ve/..... nolu kararı
ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Selçuk SAĞIR

FBE Müdürü

Bu tez çalışması Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından BAP-22-SYO-4902-01 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Vefa VEFAOĞLU

29/04/2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KENEVİR (*Cannabis sativa* L.) BİTKİSİNİN KİMYASAL BİLEŞİK İÇERİĞİNİN, ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN VE ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ İNHİBİSYONUNUN BELİRLENMESİ

Vefa VEFAOĞLU

Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Bu çalışmada kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin farklı kısımlarının biyokimyasal içerik analizi ve biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Bu kapsamda fenolik ve organik bileşik içeriklerinin tespiti, antioksidan aktivitelerinin tayini ve asetilkolinesteraz enzimi inhibisyonunun belirlenmesi gerçekleştirildi. Ayrıca kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kök, lif, yaprak ve bitkinin tümüne ait kısımlarının ayrı ayrı ekstraksiyonları hazırlanarak *in vitro* biyoanalitik çalışmalar karşılaştırmalı olarak gerçekleştirildi.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin antioksidan aktiviteleri ABTS (2,2-Azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) radikal giderme aktivitesi, DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi, FRAP (ferrik iyonları indirgeme gücü) ve CUPRAC (kuprik iyonları indirgeme kapasitesi) *in vitro* biyoanalitik yöntemleri ayrı ayrı çalışılarak belirlendi. Antioksidan çalışmalarda elde edilen sonuçlar BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı. Bu çalışmanın sonucunda kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin farklı kısımlarının etanol ekstratlarının antioksidan aktiviteleri, kullanılan standartlara kıyasla daha düşük ama genel olarak orta düzeyde olduğu belirlendi.

Bu çalışmanın diğer kısmında ise kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin farklı kısımlarının asetilkolinesteraz enzimine karşı inhibisyon potansiyeli *in vitro* enzim aktivite yöntemi ile belirlendi. Enzimin azalan aktivitesinden inhibisyon yüzdeleri ve IC₅₀ değerleri belirlendi. Sonuçlara göre kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak ekstresinin IC₅₀ değeri 10.19±2.28 μ M, lif ekstresinin IC₅₀ değeri 23.47±3.21 μ M ve standart takrin maddesinin IC₅₀ değeri 23.33±9.88 μ M olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak ekstresinin takrine göre daha iyi inhibitör etkisi ve lif kısmının ise takrine yakın inhibisyon etkisi bulunmuştur.

Çalışmanın diğer bir kısmında, kenevir bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen ekstratlarının HPLC yöntemi ile organik asit ve fenolik bileşik tayinleri gerçekleştirildi. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin tüm kısımlarını içeren numune ile lif kısmını içeren numunede kantitatif olarak en fazla miktarda bulunan majör organik bileşiklerin askorbik asit, absisik asit, kurkumin ve apigenin olduğu HPLC analizleri sonucunda belirlenmiştir. Bunun yanında kök ve yaprak kısmında ise en fazla bulunan bileşik ise absisik asit ve askorbik asit olarak bulunmuştur.

Çalışmanın son kısmında yapılan moleküler doking analizlerinde ise AChE enzimi ile kenevir bitkisinin kantitatif olarak en yüksek miktarda tespit edilen kurkumin, apigenin, absisik asit ve askorbik asit bileşikleri arasındaki moleküler etkileşimler bulunmuştur.

2024, 54 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, asetilkolinesteraz, *Cannabis sativa*, enzim inhibisyonu, fenolik bileşik, kenevir

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF CHEMICAL COMPOUND CONTENT, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ACETYLCHOLINE STERASE ENZYME INHIBITION OF CANNABIS PLANT (*Cannabis sativa* L.)

Vefa VEFAOĞLU

Muş Alparslan University
Institute of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Ercan BURSAL

In this study, the biochemical content analysis and biological activities of different parts of the cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) were determined. In this context, determination of phenolic and organic compound contents, determination of antioxidant activities and determination of acetylcholinesterase enzyme inhibition were carried out. In addition, *in vitro* bioanalytical studies were carried out by preparing separate extractions of the root, fiber, leaf and whole plant parts of the cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) comparatively.

Antioxidant activities of cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) extracts were determined by ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzo-thiaroline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) free radical scavenging activity, FRAP (ferric ions reducing power) and CUPRAC (capacity to reduce cupric ions) *in vitro* bioanalytical methods. The results obtained in antioxidant studies were compared with standard antioxidants such as BHT (Butylated hydroxy toluene), ascorbic acid (Vitamin C) and α -tocopherol (Vitamin E). According to the this study, it was determined that the antioxidant activities of the ethanol extracts of the cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) were lower than the standards used, but generally at a moderate level.

The inhibition potential of different parts of the *Cannabis sativa* L. plant against the acetylcholinesterase enzyme was determined by the *in vitro* enzyme activity method. Inhibition percentages and IC_{50} values were determined from the decreasing activity of the enzyme. According to the results, the IC_{50} value of cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) leaf ethanol extract was determined as 10.19 ± 2.28 μ M, the IC_{50} value of fiber extract was 23.47 ± 3.21 μ M, and the IC_{50} value of standard tacrine was 23.33 ± 9.88 μ M. According to these results, cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) leaf extract had a better inhibitory effect than tacrine and the fiber part extract had an inhibition effect close to tacrine.

In another part of the study, organic acid and phenolic compound determinations were carried out using the HPLC method of extracts obtained from different parts of the cannabis plant. As a result of HPLC analysis, it was determined that the major organic compounds found in the highest quantitative amounts in the sample containing all parts of the cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) and the sample containing the fiber part were ascorbic acid, abscisic acid, curcumin, and apigenin. In addition, the most abundant compounds in the root and leaf parts were found to be abscisic acid and ascorbic acid.

In the final part of the study, molecular docking analyses were carried out and molecular interactions were evaluated between the AChE enzyme and the maior compounds of the cannabis plant, namely curcumin, apigenin, abscisic acid, and ascorbic acid, which were detected in the highest quantitative amounts.

2024, 54 Page

Key Words: Antioxidant, acetylcholinesterase, *Cannabis sativa*, enzyme inhibition, phenolic compound, hemp

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim dönemi süresi içerisinde bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, liyakati ve kişiliği ile yolumu aydınlatan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ercan BURSAL'a çok teşekkür ederim. Kenevir bitkisinin temininde Malatya ilinde ÇKS (çiftçi kayıt sistemi) belgesi üzerinden resmi olarak kenevir yetiştiriciliği ve üretimi iznine sahip Sayın Selma ÖLEŞ'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmaları sırasında her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Laboratuvar sorumluları ve çalışanlarına da ayrıca çok teşekkür ederim.

Yine bu kapsamda BAP-22-SYO-4902-01 nolu projemize finansal destek sağlayan Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimine teşekkürlerimi sunarım.

Vefa VEFAOĞLU

MUŞ-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Kenevir Bitkisi (<i>Cannabis sativa</i> L.)	2
1.2 Enzimler	5
1.2.1 Asetilkolin esteraz (AChE)	5
1.3 Serbest radikaller	7
1.3.1 Serbest radikal kaynakları	8
1.3.2 Serbest radikallerin sınıflandırılması	8
1.4 Antioksidanlar	9
1.5 Fenolik Bileşikler	11
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1 Materyal	16
3.1.1 Kullanılan bitki materyali	16
3.1.2 Kullanılan cihazlar	17
3.1.3 Yöntemler için kullanılan kimyasal maddeler	17
3.1.4 Antioksidan yöntemlerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	18
3.1.4.1 ABTS yöntemi çözeltileri	18
3.1.4.2 DPPH yöntemi çözeltileri	18
3.1.4.3 FRAP yöntemi çözeltileri	18
3.1.4.4 CUPRAC yöntemi çözeltileri	19
3.1.4.5 Asetilkolinesteraz aktivite yöntemi çözeltileri	19
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Bitkilerin ekstrelerinin hazırlanması	19
3.2.2 DPPH yöntemi	20
3.2.3 ABTS radikali giderme aktivitesi	21

3.2.4 FRAP metoduna göre indirgeme kuvveti tayini	22
3.2.5 CUPRAC metoduna göre indirgeme kuvveti tayini	23
3.3 Asetilkolinesteraz enzim aktivite ve inhibisyonu metodu	24
3.4 HPLC ile fenolik bileşik içerik analizi	24
3.5 Moleküler doking analizleri.....	25
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA	27
4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	27
4.2. Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Aktiviteleri.....	29
4.2.1 CUPRAC yöntemi sonuçları.....	29
4.2.2 FRAP yöntemi sonuçları.....	30
4.2.3 ABTS yöntemi sonuçları	32
4.2.4 DPPH yöntemi sonuçları	33
4.3 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi sonuçları	35
4.4 HPLC ile fenolik bileşik tayinleri	36
4.5 Moleküler doking çalışmaları	41
5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	46
5.1 Sonuç	46
5.2 Öneriler	49
KAYNAKLAR	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	: Mikrolitre
dk	: Dakika
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
$^{\circ}\text{C}$	: Celcius Santigrat Derece
α	: Alfa

Kısaltmalar

ABTS	: 2,2-Azino-Bis-3-Etilbenzo-Tiyazolin-6-Sülfonik Asit
AChE	: Asetilkolin Esteraz
AChI	: Asetilkolin İyodat
BHA	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
DTNB	: 5,5-Dithio-Bis-(2-Nitrobenzoik Asit)
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	: Potasyum Persülfat
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	: Potasyum Ferrosiyanür
DPPH	: 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil
Na_2HPO_4	: Disodyum Fosfat
Cu^{2+}	: Kuprik iyonu
Neokuprin	: 2,9-Dimetil-1,10-Fenatrolin
FRAP	: Ferric ion Reducing Antioxidant Power
CuCl_2	: Bakır (II) Klorür
CUPRAC	: Cupric Reducing Antioxidant Capacity
FeCl_2	: Demir (II) Klorür
FeCl_3	: Demir (III)Klorür
TCA	: Trikloroasetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kenevir (<i>Cannabis sativa</i> L.)	3
Şekil 1.2 Türkiye’de kenevir yetiştiriciliği izni verilen iller (Anonim, 2019)	4
Şekil 1.3 Asetilkolinin AChE enzimi ile reaksiyonu.....	6
Şekil 1.4 İki alt birimli yapıya sahip asetilkolinesteraz enziminin görüntüsü.....	6
Şekil 1.5 Metil anyon, metil katyon ve metil radikalleri	8
Şekil 1.6 Antioksidanların hücre içerisindeki etkileri (Engin, 2007)	10
Şekil 1.7 Bazı fenolik asitlerin kimyasal yapıları	11
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan <i>Cannabis sativa</i> L. türünün kısımlarının fotoğrafları...	16
Şekil 3.2 ABTS ⁺ radikal katyonun yapısı.....	22
Şekil 3.3 CUPRAC reaktifinin antioksidan bir madde ile etkileşimi (Karakaş,. 2019). 23	
Şekil 4.1 Ekstraksiyon için hazırlanan kenevir bitkisi kısımları	27
Şekil 4.2 Bitki kısımlarının ekstraksiyon işlemleri	28
Şekil 4.3 Bitki numunelerinin rotary evaporatördeki damıtma işlemi	28
Şekil 4.4 Bitki ve standart ekstrelerinin spektrofotometre cihazındaki absorban ölçümleri	29
Şekil 4.5 CUPRAC yöntemi ile numunelerin antioksidan aktivitesi belirlenmesi.....	30
Şekil 4.6 FRAP yöntemi ile numunelerin antioksidan aktivitesi belirlenmesi.....	31
Şekil 4.7 ABTS katyon radikali giderme aktivitesi	32
Şekil 4.8 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi	34
Şekil 4.9 Kenevir bitkisinin yaprak ve lif kısımları ile standart takrin maddesinin AChE enzim inhibisyonu.....	35
Şekil 4.10 Kenevir bitkisinin yaprak kısmına ait etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramlarını göstermektedir.	37
Şekil 4.11 Kenevir bitkisinin kök kısmına ait etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramlarını göstermektedir.	38
Şekil 4.12 Kenevir (<i>Cannabis sativa</i> L.) bitkisinin tümüne ait kısımlarının etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramlarını göstermektedir.	39
Şekil 4.13 Kenevir (<i>Cannabis sativa</i> L.) bitkisinin lif kısmına ait etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramlarını göstermektedir.	40
Şekil 4.14 Absisik asit, askorbik asit, kurkumin ve apigenin moleküllerinin kimyasal yapılarının 2D görüntüleri	41
Şekil 4.15 Apigenin ile AChE asit arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri.....	43
Şekil 4.16 AChE ile absisik asit arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri	43
Şekil 4.17 AChE ile askorbik asit arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri.....	44
Şekil 4.18 AChE ile kurkumin arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Serbest radikallerin sınıflandırılması.....	8
Çizelge 3.1 HPLC analizleri için kullanılan deneysel koşullar	25
Çizelge 4.1 CUPRAC yöntemi farklı üç deney sonuçlarının ortalaması	30
Çizelge 4.2 FRAP yöntemi ile farklı üç deney sonuçlarının ortalaması	31
Çizelge 4.3 ABTS yöntemi ile farklı üç deney sonuçlarının ortalaması	32
Çizelge 4.4 DPPH yöntemi ile farklı üç deney sonuçlarının ortalaması	34
Çizelge 4.5 Kenevir bitkisi yaprak ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikleri	36
Çizelge 4.6 Kenevir bitkisinin kök kısmına ait etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikleri	37
Çizelge 4.7 Kenevir bitkisinin tümüne ait ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikleri	38
Çizelge 4.8 Kenevir bitkisinin lif kısmına ait etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikleri	39
Çizelge 4.9 Kenevir bitkisinin majör fenolik bileşikleri ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimler	42

1. GİRİŞ

Tarihsel olarak kenevir bitkisi (*Cannabis sativa* L.) antik çağlardan beri yetiştirilerek günümüze kadar gelmiştir. Eski çağ döneminde Mezopotamya'da yiyecek ve lif üretmek amacıyla yetiştirilirken, Antik Çin'de M.Ö. 6500 civarında kenevir yetiştirilmeye başlanmış ve daha sonra tıpta kullanılmıştır. Orta Doğu, Afrika ve Asya'da ise M.Ö. 2700'lerde ip, kumaş, yiyecek ve ilaç olarak kenevir kullanılmıştır. M.Ö. 2700'lerden itibaren pek çok alanda kullanılan kenevir Avrupa coğrafyasında 400 yıl sonra kullanılmaya başlanmıştır. M.Ö. 1000'den 19.yüzyıl'da kenevir dünyadaki en popüler tarım ürünü olarak yerini almış ve aynı zamanda karton ve kâğıt yapımında da kullanılmıştır. 1606 yılında, Nova Scotia'da bir Fransız botanikçi Kuzey Amerika'daki ilk kenevir mahsulünü elde etmiştir (Anonim, 2019).

İnsanlar, tarih boyunca hastalıkların etkisi ile ilaçları doğadaki şifalı bitkilerin yapraklarından, tohumlarından, meyvelerinden ve kabuklarında aramışlardır. Günümüz bilimi de bitkilerin bu özelliğini kabul ederek binlerce yıldır kullanılan bitki içerikli ilaçları modern farmakoterapiye dâhil etmiştir (Petrovska, 2012).

Şifalı bitkilerden ilaç yapımı 250'den fazla (henbane, haşhaş ve mandrake vb.) alkaloid türleri ihtiva eden ve yaklaşık 5000 yıl önce Nagpur'da eski Sümerlilere ait kil levhası üzerinden yazılı olarak bulunmuştur (Bottcher, 1965). Kur'an-ı Kerim'de, incir ve zeytin gibi bitkileri ve yine Talmud ve Hristiyanların kutsal kitabı İncil'den alınan bilgiler eşliğinde mersin ve tütsü gibi bitki türlerinden tedavi amaçlı yararlanılmıştır (Dimitrova, 1999). 15. yüzyıl sonlarında yaşayan Paracelsus (1493-1541), ilaçların bitkilerden ve mineral maddelerden hazırlanmasını savunurken ayrıca bunların astrolojik olarak seçilmesine de inanırdı. Bu inanca göre; Allah, şifalı bitkiler üzerine işaret koymuş ve hangi organın tedavisinde kullanılacağına yol göstermiştir. Örneğin; haselwort bitkisi karaciğere benzemektedir; bu nedenle karaciğer hastalıklarının tedavisinde, *Hypericum perforatum* L. bitkisinin ise yaprakları sokulmuş gibi görüldüğü için yara ve sokmalar tedavisinde kullanılmalıdır (Sovilj ve Spasojević, 2001).

Dünya genelinde tıbbi bitkiler önemli ilaç kaynaklarının başında gelmektedir. Günümüzde ise 1300'den fazla şifalı bitki Avrupa'da kullanılmakta ve bunların %90'ını yabani bitki türlerinden oluşmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde reçete edilerek satılan 150 ilahtan 118'i doğal kaynaklardan üretilmektedir. Ayrıca gelişmekte olan

ülkelerde hastaların %80'lik kısmı temel sağlık hizmetleri için tamamen bitkisel ilaçlar kullanmakta ve reçete ile alınan ilaçların %25'inden fazlası yabani bitki türlerinden üretilmektedir. Çağımız artık bitkisel ilaçlara yönelirken, özellikle de doğal sağlık ürünlerine ve tıbbi bitkilerin sekonder metabolitlerine yüksek oranda talep olduğu görülmektedir (Chen ve ark., 2016). Bitkiler insanların giyim, barınma, koku ve tat gibi temel ihtiyaçlarının ana kaynağını oluşturmaktadır. Çin, Ayurveda, Unani gibi gelişmiş geleneksel tıp sistemlerinde bugün hala kullanılan bazı önemli ilaçların üretilmesin de bitkiler temel kaynak olmaktadır. Günümüzde yeni molekül arayışı, etnobotanik ve etnofarmakognozi bilimi kimyacıları farklı bileşik kaynaklarına yönlendirmiştir (Gurib-Fakim, 2006).

Sadece tıp da değil kozmetik firmaları da bitki özlerini çevre dostu ve biyolojik değeri yüksek olarak gördükleri için alternatif hammadde olarak kullanmaktadır. Biyolojik olarak aktif maddelerin içeriği yönünden bitki türünün değeri, etkilerinin sinerjisi ve insan vücudu üzerindeki asimilasyon uyumu, bitki özlerini değerli bir aktif madde kaynağı haline getirmektedir (Harhaun ve ark., 2020).

Örneğin aspirinin icadı 3500 yıl kadar eskiye dayanıp, ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılmış, ilk olarak söğüt ağacının kabuğundan elde edilmiştir (Desborough ve Keeling, 2017). O dönemlerde eski Sümerler ve Mısırlılar tarafından söğüt kabuğundaki aktif maddenin salisilin olduğu bilinmiyordu, Söğüt ağacının analjezik ve ateş düşürücü etkisi 1862'lerde ortaya çıkmıştır. Kahire'de Edwin Smith (1822-1906) isimli bir Amerikalı tüccarın, kaynağı bilinmeyen satın aldığı, bir çift eski belge, MÖ. 1500 yıllarına kadar uzanan bu parşömenler tıptaki en değerli tarihi belgeler arasında yer almaktadır (Bryan, 1931).

Bu çalışmanın temelinde ise zengin biyolojik etki ve içeriğine sahip olduğu düşünülen kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kök, lif, yaprak ve bitkinin tüm total kısmının antioksidan seviyelerini farklı metotlarla belirlemek HPLC cihazından yararlanarak fenolik bileşiklerini tespit etmek ve yine sinir sisteminde etkili bir enzim olan asetilkolin esterase enzimine karşı *in vitro* ve *in silico* etkilerini belirlemek amaçlanmıştır.

1.1 Kenevir Bitkisi (*Cannabis sativa* L.)

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisi ilaç, kâğıt, gıda, tekstil, biyoyakıt, inşaat, otomotiv ve kozmetik sektörüne kadar uzanan oldukça çeşitli bir kullanım alanına sahiptir. *Cannabaceae* familyasında yer alan kenevir (*Cannabis sativa* L.) tek yıllık, otsu ve çok yönlü bir endüstri bitkisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Adaptasyon

uyumunun yüksek olması bitkinin ekolojik ve topografi isteklerinin oldukça düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitki tohumları %25 protein, %35 yağ içerir ve omega-3 açısından zengindir. Verimi ve lif oranının yüksek olması nedeniyle sanayide hammadde kullanımında büyük bir paya sahip olmasına rağmen, narkotik etken madde içermesi nedeniyle dünyanın birçok ülkesinde yasaklanmıştır. Endüstriyel amaçlı yetiştirilen bu bitki, geleneksel kenevirin (*Cannabis sativa* L.) aksine çok yönlü bir bitkidir. Birçok ülkede kenevir yetiştiriciliği her geçen gün artmakta olup ülke ekonomisine büyük katkı sağlamaktadır (Göre ve Kurt, 2020).

Anavatanı Orta Asya olan kenevir (*Cannabis sativa* L.) dünyada birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bitkiden elde edilen yaprak, çiçek, tohum, kök, öz ve yaprakları birçok alanda kullanılmaktadır. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisine ait liflerden uzun yıllar boyunca urgan, halat, ip, halat, dokuma vb. üretilmiştir (Yılmaz ve Yazıcı, 2022).



Şekil 1.1 Kenevir (*Cannabis sativa* L.)

Şekil 1.1’de görseli verilen kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin boyu 1.2-4.5 m yüksekliğine kadar yetişebilen endüstriyel bir bitki türüdür. Sistematigi ise şu şekilde yapılmıştır.

Alem: Bitkiler

Sınıf: Çift çelenkliler

Şube: Güller

Takım: Urticales (kültürü yapılan kenevir)

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisi tıpta ve tekstil alanlarında eski zamanlardan günümüze kadar hammadde olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle kenevire (*Cannabis sativa* L.) olan ilginin yüksek olması çok amaçlı uygulamalarda kullanılan bir ürün olmasından kaynaklanmaktadır. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin selülozik ve odunsu lif yapısı özelliği sayesinde yağ oranı yüksek ve zengin tohumlar elde edilirken, işlenmesi sırasında geri kazanılan kalıntılar ile fitokimyasallar için bir hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bitki tohumunun yağındaki bioaktif bileşiklerin antiinflamatuar, antibakteriyel, insektisidal ve terapötik özelliklere sahip olması ve dünya çapında uçucu yağların yaygın olarak kullanılması kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisi yetiştiriciliğine olan ilgiyi artırmaktadır (Frag ve Kayser, 2017).

Ülkemizde Kenevir (*Cannabis sativa* L.) yetiştiriciliği bakanlıkça izne tabi tutulmuş ve kontrolü hakkında çıkartılan yönetmeliğin 5. maddesinde yetiştiricilik izni verilebilecek Antalya, Çorum, Kütahya, Amasya, Karabük, Bartın, Samsun, Burdur, Tokat, İzmir, Rize, Kastamonu, Yozgat, Malatya, Ordu, Sinop, Uşak, Kayseri ve Zonguldak illerinde ve bu illerin bütün ilçelerinde yapılabilir ibaresi geçmektedir. Ülkemizde kontrollü bir şekilde yetiştirilen kenevirin yukarıda bahsedilen iller dışında ekimi ve yetiştirilmesi yasaklanmıştır.



Şekil 1.2 Türkiye’de kenevir yetiştiriciliği izni verilen iller (Anonim, 2019)

Ancak, bilimsel araştırma amacıyla ve yönetmelik hükümlerine uymak şartı ile tali veya ana bitki olarak kenevir ekimine yönetmelik dışındaki bölgelere de bakanlıkça izin verilebilir hükmü yer almaktadır (Bakanlık, 2016).

1.2 Enzimler

Enzimler protein yapıda ve biyolojik reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılan ve canlı hücrelerde faaliyet gösteren özel yapı kazanmış türlerdir. Proteinleri oluşturan aminoasitlerin pirimer dizilişleri genler tarafından belirlenmektedir, aminoasitlerin özel dizilişleri ile enzimin konformasyonunu ve kuaterner yapıda oluşumunu sağlamaktadır. Canlılar binlerce türden enzim ihtiva etmeleri sebebiyle yaşamsal faaliyetlerini yerine getirmektedir. Enzimlerin aktivitelerini gösterebilmesi için ihtiyaç duyduğu organik kompleks moleküllere koenzim, protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından oluşan kısımlarına da kofaktör olarak tanımlanmaktadır.

Enzimler aynı zamanda hücrenin genel metabolizmasını sağlayan binlerce reaksiyonu koordine eden moleküllerdir. Tarihte ilk olarak 1760 ve 1825 yılları arasında sindirim enzimleri üzerinden çalışmalar yapılmıştır. O yıllarda enzimoloji tarihinde ileri sürülen üç kavram şu şekilde yer almaktadır;

- Enzimlerin yapıları proteinlerden oluşmaktadır,
- Katalitik aktivitelerin enzim proteinin özel yapısından dolayı etkilenmektedir,
- Enzimler substratları ile ara kompleksler oluşturarak görev yapan aktif katalizörlerdir.

Enzim aktiviteleri sırasında ise katalizlenen reaksiyonların hızını etkileyen sıcaklık, pH, enzim derişimi (konsantrasyon), substrat derişimi, inhibitör etkisi, zaman, reaksiyon ürünü, çeşitli iyonların derişimleri ve ışık gibi fiziksel faktörlerdir (Gözükara, 1990).

Son zamanlarda enzimler sadece biyolojik sistemlerde değil yem, gıda, kâğıt, tarım, tekstil ve deri endüstrilerinde çok sayıda farklı alanlarda kullanılmaktadır. Yine günümüz teknolojik gelişmeler neticesinde kimya ve ilaç endüstrilerinde enzim teknolojisini etkin bir biçimde kullanıldığı görülmektedir (van Beilen ve Li, 2002).

1.2.1 Asetilkolin esteraz (AChE)

Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi fosfolipidlerle bileşik veya dokularda inert halde bulunan, non spesifik olarak asetilkolini hidrolizleyen bir enzim olarak tanımlanmaktadır (Güven, 2000).

Bir alkaloid olan asetilkolin ise en çok bilinen ve ilk tanımlanan nörotransmitterdir. Kimyasal formülü $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N} + (\text{CH}_3)_3$ olan asetilkolin,

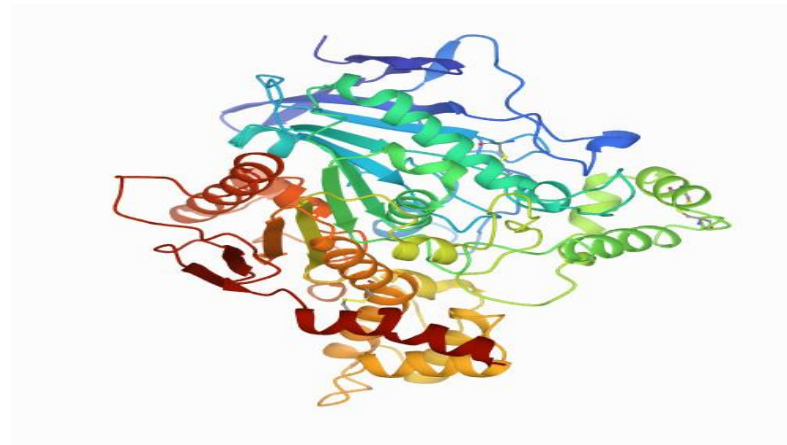
kolin bazı ve asetik asidin bir esteridir ve ilk olarak 1914 yılında İngiliz Henry Hallet Dale isimli bir bilim adamı tarafından araştırılmıştır. 1921 yılında ise Otto Lewi isimli bir bilim adamı, kurbağa kalpleri üzerinde yapılan deneyler sonucunda, asetilkolinin bir nörotransmitter olduğunu saptamıştır. Yapılan bu çalışmalar 1936'da Nobel Ödülünü bu bilim adamlarına kazandırmıştır. Asetilkolinin günümüzde Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisi ve teşhisi için kullanılmaktadır (Kent, 2015).

Asetilkolin esteraz başta kas ve sinir dokusunda bulunmak üzere merkezi ve periferik birçok dokuda yaygın olarak görülür ve asli görevi asetilkolini hidrolize ederek sinir iletimini durdurmaaktır. Asetilkolin esteraz enzimi asetilkolini, parçalayarak asetat ve koline dönüştürüp inaktive eden enzimdir. Asetilkolin esterazın katıldığı reaksiyon Şekil 1.3'de gösterilmektedir.



Şekil 1.3 Asetilkolinin AChE enzimi ile reaksiyonu

Asetilkolin esterazın üç boyutlu yapısı Şekil 1.4'te gösterilmektedir. Eğer sinaptik boşluklardaki asetilkolin çok fazla inaktive edilirse sinirsel iletimi durduracaktır (Melanson ve ark., 1985).



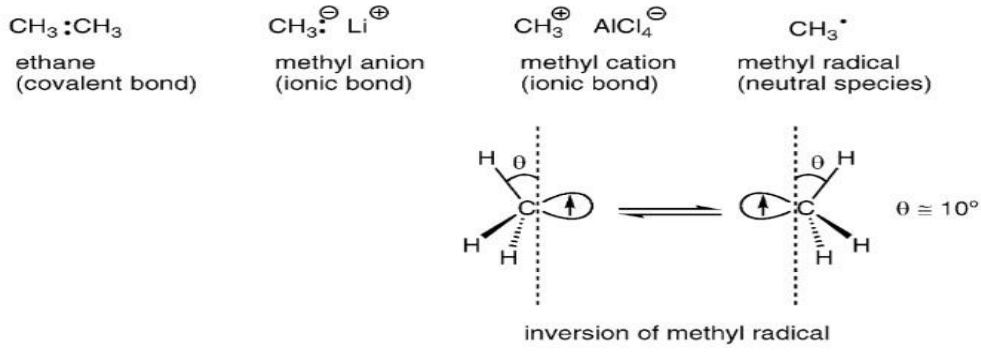
Şekil 1.4 İki alt birimli yapıya sahip asetilkolinesteraz enziminin görüntüsü

1.3 Serbest radikaller

Bulundukları ortamda oldukça yüksek reaksiyon eğilimine sahip ve üzerinde ortaklanmamış elektron çifti taşıyan molekül veya atomik haldeki yapılar serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller metabolizmanın doğal sürecinde ya da radyasyon, karsinojik maddeler, zararlı ışınlar gibi çevresel etkenlerden kaynaklı oluşabilmektedir. Aerobik organizmaların yaşamsal unsuru moleküler oksijen (O_2)'dir ve canlı hücrelerinde oksijen kullanılarak aerobik metabolizma gerçekleşir ve metabolik faaliyetler için enerji kaynağı olan ATP sentezlenmektedir. Ayrıca 4 basamaktan oluşan reaksiyon sonucunda bir oksijen molekülü elektron alarak H_2O 'ya kadar indirgenmektedir (Bursal, 2009).

Serbest radikaller biyolojik reaksiyonlarda önemli bir etkiye sahiptir. Atomun yapısında bulunan elektronlar orbitallere ikişer olarak bir birlerine zıt yönde hareket ederek yerleşmektedirler. Atom üzerinde elektronların bu hareketlerine spin denilmektedir. Spin halinde ve son yörüngesinde ortaklanmamış elektron taşıyan moleküller kendi çevresinde manyetik bir alan oluşturmaktadırlar. Orbitallerin de ortaklanmış elektron çiftine sahip yapılar daha kararlı ve sabit bir yapıya sahiptirler. Serbest radikallerde elektronlar çiftleşmediğinden her hangi bir molekül ile bir elektron vererek veya kopararak kararlı hal almaya çalışmaktadır (Konukoğlu, 2007).

Serbest radikaller metabolizmada toksik etki yaparak nükleik asitler, protein ve lipitlere bağlanarak, hücreye zarar vermektedirler. Bu etki kanser, diyabetik retinopati (iltihapsız retina hastalığı), yaşlanma, katarakt, kalp rahatsızlıkları, sepsis (toksin karışması) gibi birçok rahatsızlığın sebebi olmaktadır. Bunun tersine bağışıklık sisteminin fonksiyonlarını düzenleyen antioksidanlar ise karbonhidrat, lipit, protein ve DNA gibi fonksiyonel ve yapısal moleküllerin radikal etkilerden koruyarak çok düşük konsantrasyonlar da bile oksidan substratlara karşı direnen türler arasında yer almaktadır (Ekici ve Sağdıç, 2008).



Şekil 1.5 Metil anyon, metil katyon ve metil radikalleri

1.3.1 Serbest radikal kaynakları

Endojen ve eksojen etkenli olarak serbest radikal kaynakları iki ana gruba ayrılmaktadır. Eksojen etkenli olarak ağır metal iyonları ve toksik içeren gıda türleri, alkol, sigara, hastalıklar, radyoaktif etkenler gibi etkenler kaynak olarak gösterilebilir. Endojen etkenli kaynaklar ise peroksizom, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerin yani hücre içerisinde meydana gelen çeşitli reaksiyonlardır (Erol, 2020).

1.3.2 Serbest radikallerin sınıflandırılması

Serbest radikaller kendi arasında reaktif oksijen, nitrojen, sülfür türleri olarak üç grupta sınıflandırılarak Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Finaud ve ark., 2006).

Çizelge 1.1 Serbest radikallerin sınıflandırılması

	Çeşitli Reaktif İsimleri	Formülleri
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Süperoksit radikali	$\text{O}_2^\bullet$
	Singlet Oksijen	O^2
	Ozon	O^3
	Hidroksil Radikali	$\text{HO}^\bullet$
	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
	Hipobromik Asit	HOBr
	Hipoklorik Asit	HOCl
	Peroкси Radikali	$\text{ROO}^\bullet$
	Alkoksil Radikali	$\text{RO}^\bullet$
	Hidroperoksil Radikali	$\text{ROOO}^\bullet$
Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	Azot Dioksit	$\text{NOO}^\bullet$
	Nitrik Oksid	$\text{NO}^\bullet$
	Nitroz asit	HNO_2
	Nitroksi anyonu	$\text{NO}^\bullet$
	Nitrozil katyonu	NO^+
	Diazot tetraoksit	N_2O_4
	Peroksinitril asit	ONOOH
	Nitronyum katyonu	NO_2^+
	Nitroz asit	HNO^2
	Peroksinitrik	$\text{ONOO}^\bullet$
	Alkilperoksi nitrit	ROONO
	Thiyl Radikali	$\text{RS}^\bullet$
Reaktif Sülfür Türleri (RSS)		

Oksijen kaynaklı oluşan radikaller biyolojik sistemlerdeki en önemli türler arasında yer almaktadır. Ortaklanmamış elektrona sahip olmadıkları için serbest radikal olarak değerlendirilemez, fakat hücre duvarından rahatlıkla geçerek hücre içerisinde etkili olabilmektedirler. Dolayısıyla radikal olamayan türler “Reaktif Oksijen Türleri” (ROS) olarak adlandırılmaktadır (Mccord, 1993).

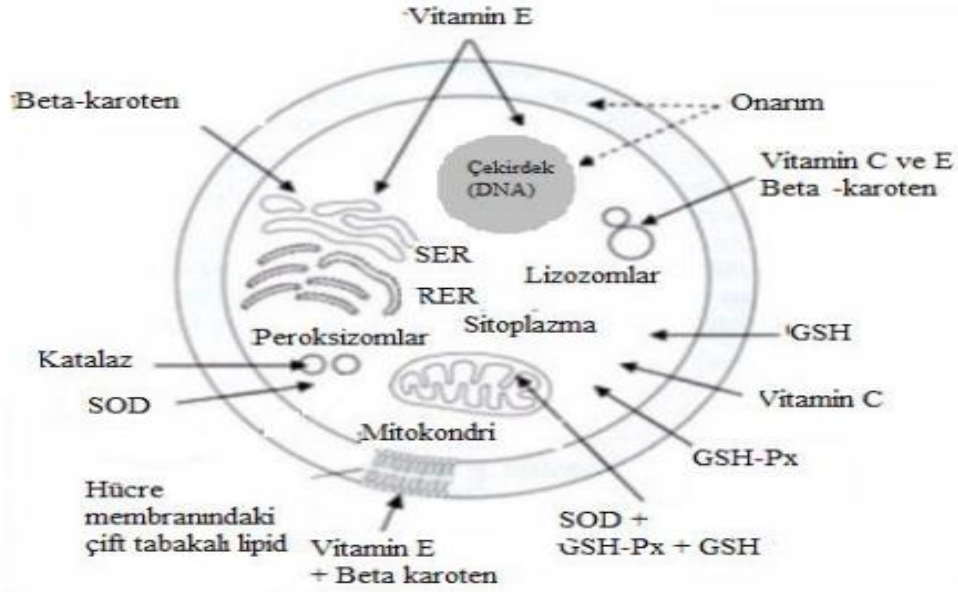
1.4 Antioksidanlar

Son yıllarda antioksidanlar üzerinde çalışmalara yoğunluk verilmiş ve standart koşullarda serbest radikal düzeyleri ve antioksidan üretimi normal seviyede olması gerekmektedir. Ancak aralarındaki denge serbest radikaller yönünde arttığında oksidatif strese bağlı olarak hastalıkların arttığı görülmektedir. İnsan vücudunda bu dengenin bozulmasında tütün, alkol ve çevre kirliliği ile beraber UV radyasyonu, X ışınları gibi dış etkenlerden kaynaklı serbest radikallerin oluşumu neticesinde oksidasyona sebebiyet vererek insan vücudundaki karbonhidrat, yağ, protein ve DNA’nın zarar görmesine neden olmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Antioksidanların başlıca dört önemli etkisi vardır bunlar meydana gelen serbest radikalleri bir araya getirerek zincir kırıcı etkisiyle radikal oluşumuna neden olan reaksiyonları inhibe etmek, baskılayıcı etki sağlayarak reaksiyon hızını yavaşlatmak ve yine biyolojik molekül ve dokuları onarıcı etkisi ile onarmak, organizmada mevcut antioksidan enzimlerin sentezini artıcı etki göstermektir (Dündar, 2000).

Canlı organizmalarda biyokimyasal fonksiyonlarını ve yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi için antioksidanlar ve pro-oksidanlar arasında dengeyi sağlayacak bir kontrol sistemi olması gerekmektedir (Kohen ve Nyska, 2002).

Şekil 1.6’da görüldüğü gibi antioksidanlar hücre içerisindeki organallerde meydana gelen oksidatif hasarı gidermek için mücadele etmektedir.



Şekil 1.6 Antioksidanların hücre içerisindeki etkileri (Engin, 2007)

Antioksidanlar metabolizmada işlevleri ve bulundukları yerlere göre farklı şekilde sınıflandırılır. Endojen ve eksojen kaynaklı olacak şekilde antioksidanlar iki gruba altında nitelendirilmiştir (Walz ve ark., 2002).

Endojen antioksidanlar organizmada olası bir oksidasyon sonucunda devreye girerek enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan olarak ikiye ayrılmaktadır (Pham-Huy ve ark., 2008).

Eksojen antioksidanlar ise vücut tarafından üretilmeyen dış kaynaklı olarak sağlanan vitamin, ilaç veya besinler gibi takviye olarak alınan antioksidanlardır. Yüksek miktarda kullanıldıklarında prooksidan etki göstererek hasarlara yol açabilirler ancak fizyolojik miktarda kullanıldığında ise yararlı olmaktadır (Bouayed ve Bohn, 2010).

Antioksidanlar özelliklerine ve türlerine göre sınıflandırılmıştır. Yapılarına göre antioksidanlar enzimatik (Süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidazlar, süperoksit redüktaz vb.) ve enzimatik olmayan (A vitamini, E vitamini, C vitamini, proteinler, hormonlar, fenolik bileşikler vb.) olarak iki ana gruba sınıflandırılmıştır (Teber ve Bursal, 2020).

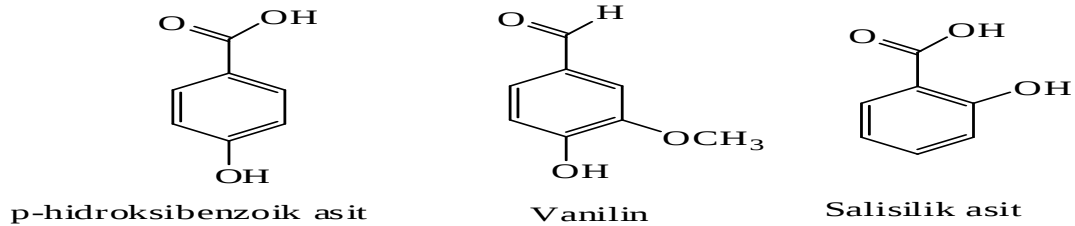
Ayrıca bu iki grup içerisinde çözünürlüklerine (su ve lipit), kaynaklarına (endojen ve eksojen) ve yerleştikleri (intraseküler, ekstraseküler) yere göre kendi içerisinde sınıflandırılmıştır. Enzimatik ve suda çözünen antioksidanlara örnek C vitamini, glikoz, ürik asit, sistein verilebilir yine enzimatik olmayan ve dışarıdan alınan (eksojen) antioksidanlara örnek olarak adenosin, allopurinol gösterilebilir

(Baykal,1998). Endojen antioksidanlar bitkilerin her kısmında bulunabilir. Bu tür antioksidanlar içerisinde vitamin, flavonoid, glutalyon ve fenoller barındırır. Bitki kaynaklı olan antioksidanlar peroksit yıkıcı, enzim inhibitörü, sinerjist ve serbest radikal süpürücü olarak işlev görürler (Larson, 1998). Bitkilerin kök, gövde, yaprak ve meyve gibi kısımlarında oldukça fazla bulunan antioksidanlar yeterince tüketilmesi halinde bağışıklık sistemini güçlendirerek ölümcül hastalık risklerinde düşüşlere sebep olabilmektedir (Ames ve ark., 1993).

1.5 Fenolik Bileşikler

Bir veya birden fazla hidroksil gruplarının aromatik halka (benzen) üzerine doğrudan bağlanması ile oluşan moleküller fenolik bileşik olarak tanımlanmaktadır. Birden fazla benzen halkasına hidroksil guruplarının bağlanması ile oluşan moleküllere ise polifenoller denilmektedir. Bitkiler için fenolik bileşikler karakteristik olup glikozit veya ester formda bulunmaktadır.

Basit fenolikler bir hidroksil gurubu ile bir radikal grubunun benzen halkasına bağlanması ile oluşan yapılardır. Örnek olarak şekil 1.7’de kimyasal yapıları gösterilen ve benzen halkası üzerine hidroksil grubu ve karboksil grupların bağlanması ile oluşan aromatik yapılar ise fenolik asitler olarak tanımlanır (Vermerris ve Nicholson, 2007). Bu bileşikler protein sentezi, enzim aktivitesi, hücre iskelet yapısı, fotosentez, tohum, kök ve yapraklarda besin alımı gibi çeşitli fizyolojik aktivitelere katılırlar (Oral, 2011).



Şekil 1.7 Bazı fenolik asitlerin kimyasal yapıları

Antioksidan özelliğe sahip ve serbest halde bulunmayan fenolik asitlerin karboksil grupları aminoasitler, proteinler veya karbonhidratlar ile reaksiyona girebilir ve alkol bileşikleri ile fenol esterleri, amino bileşikleri ile amitleri oluşturmaktadır (Akyüz, 2011).

Fenolik asitler, bitki fenolik bileşiklerinin temel gruplarından olup meyve kabukları, tohum ve sebze yapraklarında yüksek konsantrasyonda bulunan türlerdir.

Fenolik asitler genel olarak hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asit olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Tsao ve Deng, 2004). Bu asitler, iyi bilinen *in vitro* antioksidan vitaminlerden bile daha yüksek antioksidan özelliği taşımaktadır (Kumar ve Goel, 2019). Fenolik asitler daha çok bitkisel besinlerde bulunabilen ve günlük diyetimizin önemli bir bölümünü oluşturan ikincil veya sekonder metabolitler olarak adlandırılmaktadır. Canlılar doğal olarak bu bileşikleri sentezleyemezler ve dışarıdan sadece besinler aracılığı ile elde edebilmektedirler. Meyveler, sebzeler ve tahıllar iyi birer fenolik asit kaynakları arasında yer almaktadır. İnsan sağlığı için oldukça önemli olan ve zengin besin değeri taşıyan bu yapılar bütün meyve, sebze ve gıdalarda doğal olarak bulunmaktadır. Fenolik asitler ayrıca besinlerin tadını, rengini ve lezzetini de etkilemektedir. Aynı zamanda fizyolojik alanda oksidatif strese bağlı hastalıkların oluşumunu engelleyerek kronik hastalıkların tedavisinde koruyucu ajanlar gibi biyoaktif rol oynamaktadırlar (Onat ve ark., 2021).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin endüstriyel, kozmetik, zirai, eczacılık gibi pek çok alanda yapılan çalışmaları literatürde yer almıştır.

Önceki çalışmalar da kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisine ait uçucu yağ asit tayinleri ve fenolik içerik tayinleri gibi pek çok araştırmalar yapılmıştır. Ancak yapılan literatür araştırmalarında kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin tüm kısımlarının detaylı ve karşılaştırmalı olarak antioksidan aktivite ve fenolik içerik tayin çalışmalarının yeterli seviyelerde olmadığı görülmüştür.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin tohum kısmından elde edilen esansiyel yağ asitlerini belirleme ve kanser hücresi (akciğer) üzerinde *in vitro* olarak antikanserojenik özelliği araştırılmış, yapılan deneysel çalışmalarda kenevir tohumu içeriğinde %35.5 oranında yağ asidi bulundurduğu elde edilen yağ asitlerinden Ala ve la alfa linoleik asiti'nin hücre büyümesini düzenlediği, lipid peroksidasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptoza sürüklenme gibi antikanser etkileri olduğu araştırılmıştır (Yaman, 2021).

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisi içeriğinde majör kannabinoidlerin tespiti için ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak optimizasyonu araştırılmıştır (Boualı, 2021).

Çalışılan bir derlemede, kenevir (*Cannabis sativa* L.) içeriğinde ki fitokimyasallarının zengin spektrumu, terpenler, kannabinoidler ve fenolik bileşikler dâhil olmak üzere endüstriyel açıdan oldukça fazla ihtiyaç duyulan moleküller ele alınarak araştırılmıştır. Bu inceleme kapsamında, kenevirin endüstri için önemi ve biyo-ekonomiye katkısı vurgulanmıştır ayrıca spesifik olarak, kenevirin biyokütlesinin (yani liflerin) kullanım alanlarını, endüstriyel öneme sahip kenevir molekülleri (yani kannabinoidler, terpenler ve fenolik bileşikler) tartışılmış ve yine kenevir trikomlarının etkisi ile alakalı ilaç sanayisindeki bitki hücresi süspansiyonu ve tüylü kök kültürlerinin kullanımını açıklayarak genetik mühendisliğindeki önemi tartışılmıştır (Andre ve ark., 2016).

Cannabis sativa L. bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi Çin Halk Cumhuriyeti Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümünde bir makale olarak ele alınmış çalışma içeriğinde bitkinin anatomik yapısı ile farklı ülkelerdeki adlandırması belirlendikten sonra bitkinin tohumlarından elde edilen yağı, petrol eteri ve metanol özleri, Gram pozitif bakteri (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) ve Gram negatif bakteri

(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) muamele edilerek sonuçları tartışılmıştır (Ali ve ark., 2012).

Tıbbi esrarlar da kimya ve morfoloji arasındaki etkileşim araştırılmış, mevcut çalışma bitki gövde kısmındaki kimyasal türler (kannabinoidler ve iyonon) ile yerel ayarlar arasındaki etkileşimi araştırılmıştır. Kannabinoidlerin kimyasal profilleri, iyonon ve fizyolojik özellikler üzerindeki pozisyonu ve organa özgü tesirleri incelenmiştir (Bernstein ve ark., 2019).

Türkiye'de gayri resmî kenevir (*Cannabis sativa* L.) üretimi ve bunula ilgili mücadele politikalarıyla alakalı derlenen makale içeriğinde dünya genelinde ve ülkemizde çok fazla kullanılan narkotik madde olarak bilinen kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinden elde edilen esrarın Türkiye'de illegal yetiştiriciliği ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Makale aynı zamanda illegal yetiştiricilik ile alakalı mücadeleye yönelik nitel araştırmalar yapılarak önleyici faaliyet yöntemleri ortaya koymuştur. Ayrıca, kenevir ekimi ile alakalı yasa dışı ekimin, yasal ekimin önüne geçtiği yine terör örgütlerine finansal kaynak olduğu yönünde değerlendirmelerde bulunulmuştur (Akgül, 2014).

Başka bir çalışmada Malatya Turgut Özal Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde üretilen kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisine ait kısımların (kök, gövde ve diğer) atıklarından kimyasal aktivasyon ve karbonizasyon yöntemi uygulanarak aktif karbon elde edilerek karakterizasyon deneyleri uygulanmıştır (Çapcioğlu ve Kenevir, 2017).

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin sağlık ve tıp alanındaki kullanımı ile alakalı derlenen bir makalede bitkinin genel kullanım alanları, geçmişten günümüze kadar sağlık alanındaki önemi yine kenevirin fitokimyasal içeriği ve etkileri araştırılmış, içerisinde ihtiva ettiği kimyasal bileşenleri ve miktarları tanımlanarak (THC, THCV, terpenoitler, d-limonen, β -mirsen, a-pinen, β -karyofilen, karyofilen oksit vb.) terapötik kullanımı ile Alzheimer, anksiyete, anoreksiya, diyabet, epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar ile özleştirip yorumlanmıştır (Yıldırım ve Çalışkan, 2020).

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) saplarından kâğıt hamuru ile kâğıt elde edilmesi yönünde yapılan çalışmada bitki sapları liflerinden arındırılarak morfolojik özellikleri belirlendikten sonra kâğıt üretimi için; bitki sapları içeriğinde miktarca %52.0 selüloz, %79.7 holoselüloz ve %22.2 lignin ihtiva ettiği yine 0.60 mm lif uzunluğu, 13.4 μ m lümen çapı, 28.8 μ m lif genişliği olduğu anlaşılmış yapılan çalışmada Kraft yöntemi ile kenevir saplarından kâğıt üretimi yapılmış elde edilen numunenin viskozite değerleri ile

kopma uzunluğu ve parlaklık değerleri nicel olarak hesaplanmış, ürün veriminin yüksek kalite ve değerde olduğu anlaşılmıştır (Tutuş ve ark., 2021).

Tekstil üretim ve tasarımında önemle değer kazanan kenevir lifi; anti bakteriyel özellik, yüksek elektrostatik, UV koruma sağlama, aşınmaya karşı mukavemet gösterme, boncuklanmama, nem çekme, nefes alabilirlik ve yüksek mukavemette özellik göstermesi sebebiyle kenevir lifi tekstilde çokça tercih edilmektedir.

Kullanım alanları açısından farklı kaynaklara bakıldığında 50.000'den fazla ürün üretiminde kullanıldığı ve kenevir çeşitli alanlarda kullanılması yönüyle sanayi keneviri olarak adlandırılmıştır (Kurtuldu ve İşmal, 2019).

Asetilkolinesteraz enzimi ile alakalı Alzheimer tanısında kolinerjik bir madde eksikliğinden kaynaklanan ve nörotransmitter olan asetilkolin, hastalığın enzim aktivesinin amiloid protein oluşumunu tetiklediğini ve yine hastalığın teşhisi ve tedavisi üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Lolak ve ark., 2020).

Yine başka bir çalışmada AChE'nin kuvvetli bir inhibitörü olan kurtayağı (*Club moss*) bitkisine ait ekstresinde bulunan huperzinenin yüksek afitineli substrat olduğu görülmüştür (Boyle ve ark., 1997).

Bitkisel kökenli kaynaklardan elde edilen doğal antioksidanlara olan ilginin artması neticesinde daha önceden yapılan çalışmalara ait bitki türleri; Turunçgiller (Saleh ve ark., 1998), nane (Elmastas ve ark., 2005), zeytinyağı (Blekas ve Boskou, 1998), kivi (Bursal, 2009), adaçayı (*Melisa officinalis*) (Koksal ve ark., 2011), lavanta, maydanoz (Wong ve ark., 2006) ve karanfil (Gulcin ve ark., 2004) gibi çok çeşitli bitki kaynaklarında antioksidan çalışmalar yapılmıştır. Benzer şekilde 2006 yılında yapılan bir çalışmada kişniş bitkisi üzerinden yapılan fenolik bileşik tahini ve bu bileşikler üzerinden antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır (Wong ve Kitts, 2006).

Bilimsel veri tabanlarında yapılan literatür taramasında kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisine ait detaylı ve bitki kısım karşılaştırmalı olarak yapılmış antioksidan aktivite çalışmaların, fenolik bileşik içerikleri yönünden incelemelerin ve AChE enzim etkileşimi ile alakalı çalışmaların yeterli seviyede olmadığı düşünülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin farklı kısımlarının analiz ve karakterizasyonu için başlıca olarak HPLC ile organik asit içerik analizleri, *in vitro* AChE enzim inhibisyon aktiviteleri, antioksidan özelliklerinin belirlenmesi ve moleküler doking (kenetleme) analizleri kısımlarından oluşmaktadır.

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan bitki materyali

Çalışmanın ilk aşamasında Şekil 3.1’de gösterilen kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kısımları temin edilmiştir. Bitki numuneleri “kenevir yetiştiriciliği izni” ve ÇKYS (Çiftçi Kayıt ve Yönetim Sistemi) belgesi olan üretici Selma ÖLEŞ tarafından Malatya Battalgazi ilçesinden elde edilmiştir. Bitki numuneleri Adıyaman Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ömer KILIÇ tarafından teşhis edilmiş ve *Cannabis sativa* L. olarak sınıflandırılması yapılmıştır. Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimince yapılan ihale ve satın alma işlemleri neticesinde, projede kullanılan kimyasal malzemeler, otomatik pipet takımı ve sarf malzemeler teslim alınarak çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan *Cannabis sativa* L. türünün kısımlarının fotoğrafları

3.1.2 Kullanılan cihazlar

- Evaporatör: Heidolph 94200, Bioblock Scientific
- HPLC cihazı: Agilent Technologies 1260 Infinity II
- İnkübatör: Elektro-Mag (0-300 °C)
- Liyofilizatör: Heidolph Scientific
- Magnetik karıştırıcı: Stuart Scientific
- Otomatik mikropipetler: Eppendorf Research® plus
- pH metre: Hanna Instrument
- Distile su cihazı: Liston A 1210, Rusya
- Hassas terazi: Scaltec SBA 41
- Spektrofotometre (tekli numune): Shimadzu, UV-1208
- Spektrofotometre (çoklu numune): Thermo Scientific, Multiskan
- Spektrofotometre küveti: Quartz küvet
- Vorteks: Four E's Scientific Vortex Mixer

3.1.3 Yöntemler için kullanılan kimyasal maddeler

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kök, lif ve yaprak kısımları ile bitkinin bütününe ait ekstrelerin antioksidan etkilerinin tespitine yönelik yapılan deneysel çalışmalarda kullandığımız kimyasal maddelerin bazıları BAP-22-SYO-4902-01 no'lu proje ile Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu tarafından satın alınmıştır. Asetilkolinesteraz enzimi (*Electrophorus electricus*), asetilkolin iyodür, CDNB (1-kloro-2,4 dinitrobenzen) ve DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kimyasalları, Sigma-Aldrich'ten proje bütçesi ile satın alındı. Muş Alparslan Üniversitesi Laboratuvarında bulunan ve daha önceki projelerden alınmış olan ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit), neokuprin (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline), BHT (bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit, α - tokoferol, potasyum persülfat, FeCl_3 , Na_2HPO_4 , FeCl_2 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, NH_4SCN , TCA (triklor asetik asit), kimyasalları ile metanol, saf su, etanol gibi çözücüler ile beher, erlen, balon joje, cam tüpler gibi cam malzemeler kullanılmıştır.

Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında bulunan HPLC cihazında yapılan organik asit ve fenolik bileşik analizleri için kullanılan standart fenolik bileşikler ve diğer kimyasallar merkezi laboratuvar bünyesinde önceden temin edilmiştir.

3.1.4 Antioksidan yöntemlerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

3.1.4.1 ABTS yöntemi çözeltileri

1. Fosfat tamponu (pH 6.4; 0.1 M): Fosfat tampon çözeltisini hazırlamak için 13.6 g KH_2PO_4 maddesi hassas terazide darası alınmış bir beher içerisinde tartımı yapıldıktan sonra üzerine 100 mL distile su ilave edilerek tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra HCl ile pH'sı 6.4'e ayarlandı. Çözelti hacmi distile su ile toplamda 500 mL'ye tamamlandı.

2. ABTS çözeltisi (2 mM): 110 mg katı ABTS maddesi hassas terazide tartımı yapıp beher içerisine alındıktan sonra üzerine distile su ilave edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3. Potasyum persülfat çözeltisi (2.45 mM): Bunun için 66.25 mg $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ hassas terazide tartıldı daha önceden hazırlanmış olan 0.1M (pH:7.40) fosfat tamponunda oda sıcaklığında tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak son hacim 100 mL'ye distile su ilave edilerek çözelti hazırlandı.

3.1.4.2 DPPH yöntemi çözeltileri

DPPH çözeltisi (1 mM): 39 mg DPPH kimyasal maddesi darası alınmış erlen içerisinde üzerine 100 mL etanol eklenerek çözüldü daha sonra karanlık bir ortamda 12 saatlik süre ile manyetik karıştırıcı vasıtasıyla tamamen çözünmesi sağlanarak DPPH serbest radikali çözeltisi hazırlandı.

3.1.4.3 FRAP yöntemi çözeltileri

1. Fosfat tamponu (0.2 M/500 mL): Bunun için 13.6 g NaH_2PO_4 katı maddesi darası alınmış bir erlen yardımı ile hassas terazide tartımı yapıldıktan sonra üzerine azar azar distile su eklenerek çözünmesi sağlandı ve son hacmi 500 mL'ye tamamlandıktan sonra NaOH çözeltisiyle pH'sı 6.7'ye ayarlandı.

2. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi (%1'lik): çözelti için katı $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ maddesi 2.5 g tartılarak bir erlen yardımıyla distile suda azar azar çözülmesi sağlandıktan sonra çözeltinin son hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

3. TCA çözeltisi (%10'luk): Bu çözelti için katı TCA maddesi 5 g tartılarak bir erlen yardımıyla distile suda azar azar çözülmesi sağlandıktan sonra çözeltinin son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

4. FeCl_3 çözeltisi (%0.1): çözeltisi için katı $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ maddesi 166 mg tartılarak bir erlen yardımıyla distile suda azar azar çözülmesi sağlandıktan sonra çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.4.4 CUPRAC yöntemi çözeltileri

1. CuCl_2 çözeltisi (0.01 M): çözeltisi için katı CuCl_2 maddesi 170.45 mg tartılarak bir erlen yardımıyla distile suda azar azar çözülmesi sağlandıktan sonra çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

2. Neokuprin çözeltisi (7.5 M): çözeltisi için katı neokuprin maddesi 78 mg tartılarak bir erlen yardımıyla etanolde azar azar çözülmesi sağlandıktan sonra çözeltinin son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

3. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponu (1 M): tampon çözeltisi için katı $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ maddesi 15.4 g tartılarak 150 mL distile suda çözüldükten sonra NaOH pH'sı 6.5'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su eklenerek 200 mL'ye tamamlandı.

3.1.4.5 Asetilkolinesteraz aktivite yöntemi çözeltileri

1. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0) elde etmek için; hassas terazide 12.1 g Tris tartıldıktan sonra 80 mL distile su ilave edilerek çözüldü. 0.1 M HCl çözeltisinden yararlanılarak pH:8.0 olarak ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 mL ye tamamlandı.

2. Asetilkolin iyodat çözeltisi (10 mM) elde etmek için; hassas terazide 0.136 g Asetilkolin iyodat 50 mL distile suda çözüldü.

3. DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi (10 mM) elde edilmesi için; hassas terazide 0.01 g DTNB ve 0.5 g sodyum nitrat, 50 mL distile suda çözüldü.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitkilerin ekstralarının hazırlanması

Cannabis sativa L. bitkisinin etanol ekstraları aşağıdaki verilen yöntemde belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan *Cannabis sativa* L. bitkisi kök gövde ve yaprak kısımları birbirinden ayrıştırılarak doğrudan güneş ışınlarına maruz bırakılmadan oda şartlarında kurutulup bir mikser yardımı ile parçalanıp toz haline getirilmiştir.

Etanol ekstreleri hazırlanmasında ise numunelerden kurutulmuş halde 10 g alınarak 100 mL etanol ile (1/10: w/v) oranında bir beher içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak ekstraksiyon (özütme) sağlandı. Yaklaşık olarak 40 dk sonra karışım bir süzgeç kağıdında süzildükten sonra süzüntüler bir evaporatörde (Heidolph 94200, Bioblock Scientific) 65 °C'de evapore edilerek etanol çözücüsünden ayrıştırılmıştır.

3.2.2 DPPH yöntemi

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikali kullanılarak yapılan antioksidan analizi, çeşitli saf veya sentetik maddelerin, bitki ekstralarının, gıda ve ilaç numunelerinin radikal giderme durumlarını gözlemlemek için kullanılan basit ve hızlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Köksal ve ark., 2009). Bir azot radikali olarak sınıflandırılan ve mor renge sahip DPPH oldukça uzun ömürlü bir bileşik olup, ortamda bulunan ortaklanmamış nitrojen elektronlarını tespit etmektedir. Antioksidan özellikte olabileceği düşünülen standart ve bitki ekstartları çözeltileri ile DPPH radikalının reaksiyona girmesi sağlanarak ortamda bulunan radikal türleri giderme ve reaktivitelerini ölçmekte kullanılan metotlardan biridir ve reaksiyon sonunda çözeltilerde renk değişiminin olduğu (sarı renk) görülmüştür. Oluşan bu renk değişiminin nedeni ise DPPH radikallerinin indirgenerek difenilpikrilhidrazine dönüşmesidir. 517 nm'de absorbans azalışı gözlemlenerek reaksiyon neticesinde ortamda geriye kalan DPPH çözeltisi miktarı belirlenerek serbest radikal giderme aktivitesi hesaplanır (Bursal ve ark., 2019).

Başlangıçtaki DPPH derişiminin %50'sinin azalması antioksidan aktivite miktarını ifade eden IC₅₀ (etkin konsantrasyon) değeri ile verilmektedir (Brand ve ark., 1995).

Kenevir bitkisinin çeşitli kısımları (kök, gövde, yaprak ve kenevir tüm) ile standart antioksidan maddeler olan BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) derişime bağlı reaksiyonları ile spektrofotometrik yöntemler ile DPPH antioksidan analizleri yapılmıştır.

Bu yönteme göre 1 mM'lık DPPH çözeltisi serbest radikal olarak kullanılmaktadır. Öncelikle *Cannabis sativa* L. bitkisinin çeşitli kısımlarının 1 mg/mL konsantrasyonundaki çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler ile standart olarak kullanılan antioksidan numuneleri farklı deney tüplerine sırasıyla (0 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L) miktarda aktararak toplam hacimleri 1700 μ L olacak şekilde etanol ile tamamlandıktan sonra her bir numune tüpüne önceden hazırlanan DPPH

çözeltisinden 300 µL eklendi. Hazırlanan numuneler inkübe için karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika dinlendirildikten sonra spektrofotometre cihazında içerisinde yalnızca etanol bulunan küvete (köre) karşı gelecek şekilde, kontrol olarak ise 300 µL DPPH ve 1700 µL etanol içeren numuneden 2 mL radikal çözeltisi kullanılarak dalga boyu 517 nm’de absorbans değerleri ölçülüp kayıt edildi. Kontrol absorbansının 1.5 ve 2.0 aralığında ayarlanması etanol ile seyreltme ile yapılarak numuneler için en uygun DPPH radikali oranı saptanmıştır. Elde edilen absorbans sonuçlarından yararlanarak DPPH serbest radikali giderme aktivitesi yüzdesi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

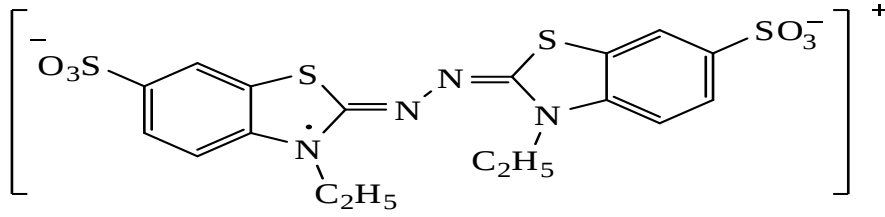
3.2.3 ABTS radikali giderme aktivitesi

Radikal giderme metotlarından DPPH yönteminde olduğu gibi ABTS yöntemi de oldukça sık kullanılan ve bitki ekstratları ile standart olarak kullanılan çözeltilerin ABTS⁺ katyon radikal giderme aktivitelerinde önemli bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Miller ve ark. tarafından yapılan yöntemle göre 660, 734 ve 820 nm dalga boylarında ABTS radikal katyonu maksimum absorbans göstermektedir. Ortamdaki antioksidan etkisiyle çözeltideki ABTS radikalinin absorbans azalmasının ölçülmesi ve katyonun H₂O₂ ile metilmiyoglobinin reaksiyonu sonucunda ferrilmiyoglobin ile ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) arasında ki tepkimeden ileri gelmektedir (Miller ve ark., 1993).

ABTS radikal giderme, Witayapan yöntemi ile kenevir kısımlarının antioksidan özellikleri belirlenmiştir (Aslan ve ark., 2023).

Bu yöntemler ışığında katyon radikali ihtiva eden ABTS dalga boyu 734 nm’de maksimum absorbans değeri verebilen renkli bir maddedir. Antioksidan maddeler, Şekil 3.2’de kimyasal yapısı verilen ABTS⁺ radikal katyonu ile kimyasal tepkimesinde bir elektron sağlayarak ortamda radikal olmayan ABTS maddesini oluşturmaktadır. Reaksiyon sonunda aynı dalga boyundaki absorbans düşüşü antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır.



Şekil 3.2 ABTS⁺ radikal katyonun yapısı

Deneyin ilk aşamasında ABTS radikalleri üretmek için, 110 mg ABTS 100 mL distile suda çözülerek 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözelti içerisine 66.25 mg ve persülfat çözeltisi (2.44 mM) ve 0.1 M ve pH'sı 6.4 olan fosfat tamponu eklendikten sonra karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 6 saat süre ile manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

Daha sonra spektrofotometre cihazında içerisinde yalnızca saf su bulunan küvete (köre) 800 µL distile su üzerine 200 µL ABTS radikali eklendi. Kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 1.00 ± 0.20 nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesi ölçülecek olan kenevir bitkisinin (kök, yaprak, lif ve bitki tüm) kısımlarını içeren ve standart olarak kullanılacak numunelerin BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) sırasıyla 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL saf sudaki farklı konsantrasyonlarına 200'er µL ABTS radikal çözeltisi ilave edildikten sonra 30 dakika inkübe edilmesi sağlandı. Spektrofotometre cihazında köre karşı dalga boyu 734 nm'de verilen absorbans değerleri kaydedildi. Elde edilen absorbans sonuçları kullanılarak, ABTS katyon radikali giderme aktivitesi ve IC₅₀ değerleri yüzdesi hesaplandı.

3.2.4 FRAP metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

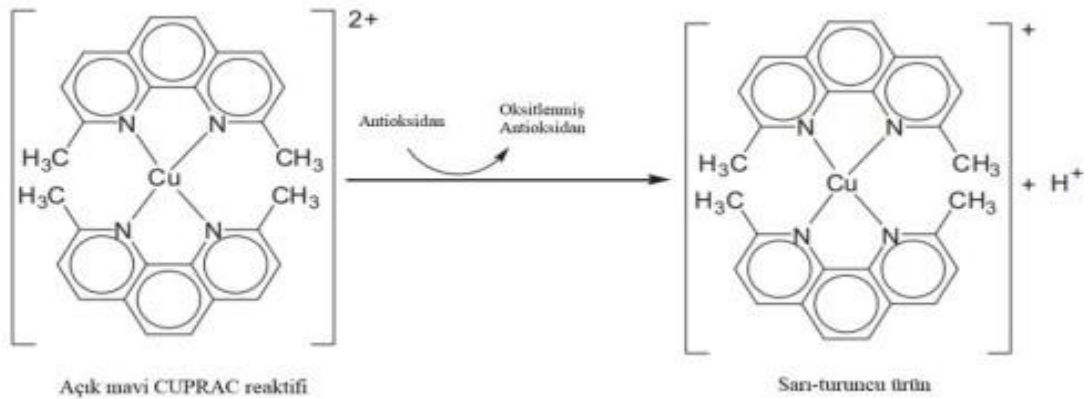
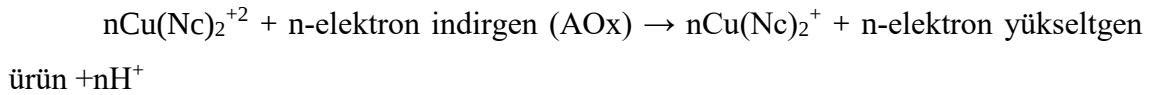
FRAP metodu diğer yöntemlere nazaran daha hızlı ve basittir ancak bazı durumlarda istenilen sürede sonuç veremeyebilir. Bunun nedenlerinden biri ise kafeik asit, kesterin, ferulik, tannik asit gibi polifenollerin bu yöntem reaksiyonunda daha ağır hareket etmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bu metot yalnızca demir iyonlarını referans aldığından fizyolojik ve mekanik antioksidan aktiviteleri belirlemede uygun olmamaktadır (Prior ve ark., 2005). FRAP yönteminde az bir miktarda oluşan Fe(III) antioksidanların etkisiyle 700 nm'de maksimum absorbans değeri vererek koyu mavi renge Fe(II) kompleksine indirgenmektedir (Okan ve ark., 2013).

Bitki kısımlarının antioksidanlarının toplam miktarını belirlemeyi amaçlayan bu yöntemde demir (III)'in indirgenme kapasitesi belirlenerek yapılmaktadır. Bu yöntem için daha önceden hazırlanan kenevir bitkisinin (kök, lif, yaprak ve bitki tüm) kısımları ile standart örneklerin 10 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltileri cam tüplere alınarak her bir deney tüpüne 500 µL ve 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.4) ve %1'lik 500 µL potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] eklendi ve karışım 50 °C'de 20 dk etüvde inkübe edildi. Bu işlemlerin ardından reaksiyon karışımına %10'luk 500 µL triklorasetik asit (TCA) ve %0.1'lik 125 µL FeCl₃ ilave edilerek spektrofotometre cihazında kör olarak kullanılan saf suya karşı 700 nm'de absorbans değerleri okundu.

3.2.5 CUPRAC metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

CUPRAC yöntemi (kuprik indirgeyici antioksidan kapasite) Apak ve arkadaşlarının literatüre kazandırmış olduğu bir yöntem olup antioksidan çözeltisinin (direkt veya asit hidrolizinden sonra) pH 7'de ve 30 °C'de bir bakır(II) klorür çözeltisi ile neokuprin (neocuproine) alkollü çözeltisi ve bir amonyum asetat sulu tampon karıştırıldıktan sonra dalga boyu 450 nm'de gelişmiş absorbansın ölçülmesini içermektedir (Apak ve ark., 2004).

CUPRAC reaksiyonları genellikle 30 dk süre içerisinde sonuçlanır. Geliştirilen CUPRAC yönteminin kromofor içeren oksitleyici reaktifi, yani Cu(II)-Nc, n-elektron indirgeyici antioksidanlarla (AOx) reaksiyonu aşağıdaki gibi seyir etmektedir:



Şekil 3.3 CUPRAC reaktifinin antioksidan bir madde ile etkileşimi (Karakaş 2019).

Bu yöntemden esinlenerek deney tüplerine 0.01 M'lık 0.25 mL CuCl_2 çözeltisi ilave edildi. Bunun üzerine 7.5 mM'lık etanolik neokuprin çözeltisi ile 0.25 mL 1 M'lık amonyum asetat tamponu aktarıldı.

Çözelti karıştırıldıktan sonra daha önceden hazırlanmış olan standart numuneler BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini) ile kenevir bitkisinin (kök, lif, yaprak ve bitki tüm) kısımlarının farklı konsantrasyonlarda (10-50 $\mu\text{g/mL}$) numune ilave edilerek saf su ile son hacimler 1 mL'ye tamamlanıp yaklaşık 30 dk'lık inkübasyondan sonra spektrofotometre cihazında 450 nm'de absorpsanları ölçüldü. Reaksiyon karışımının yükselen absorpsansı artan kuprik iyon (Cu^{+2}) indirgeme kapasitesini göstermektedir.

3.3 Asetilkolinesteraz enzim aktivite ve inhibisyonu metodu

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kısımlarının ve doğal ürünlerinin asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için Ellman metodunun güncellenmiş bir versiyonu kullanılmıştır. Bu amaçla IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlenmiştir. Yöntemin esasında AChE enziminin asetilkolin maddesinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlemesi vardır (Bursal ve ark., 2021a). Ürünler kısmında açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyonuyla da sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur ve meydana gelen renkli bileşik 412 nm'de absorpsan vermektedir. Bu metoda göre 20 μL 1 M Tris-HCl tampon çözeltisinden alınıp deney tüplerine aktararak her bir deney tüplerine ayrı ayrı 200 μL distile su ilave edildikten sonra bitki numuneleri ve standart ekstrelerinden sırasıyla 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL , 50 μL miktarlarda eklenip 10 mM DNTB çözeltisi ile enzim çözeltileri karıştırılır ve 10 dakika süre ile 30°C'de etüvde bekletilerek inkübe işleminden sonra üzerine 10 mM'lık asetilkolin iyodür çözeltisinden 10 μL eklenerek 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorpsan değerleri ölçülmektedir.

3.4 HPLC ile fenolik bileşik içerik analizi

Bu çalışmada HPLC yönteminde başlıca askorbik asit, kaempferol, gallik asit, absisik asit, kuersetin, apigenin, mirisetin, kurkumin, vanillin, kafeik asit, sinamik asit, rosmarinik asit ve salisilik asit gibi standartlar kullanıldı ve bitki içeriği ile karşılaştırıldı. Öncelikle bu standartların son konsantrasyonları 10 mg/mL olacak şekilde tartılıp 50 mL'lik balon jojeler içerisine konuldu. Standartlar %1'lik asetik asit içerisine 9/1 oranında asetonitril ilave edildikten sonra 1/1 oranında metanol katılarak

hazırlanan çözelti ile stok çözeltiler 100 mM, 75 mM, 50 mM, 25 mM ve 10 mM oranda 5 farklı noktali olacak şekilde hazırlandı (Bursal ve ark., 2019). Bu metotta uygulanan mukayese standartları, çözücü türleri, çözücü gradientleri, sıcaklık, akış hızı, kolon şartları ayarlanıp, HPLC cihazında bulunan %1'lik asetik asit (Çözücü A) ve %100'lük asetonitril (Çözücü B) çözücüler mobil faz olarak kullanıldı. Daha sonra HPLC cihaz açıldı ve bu iki çözücü sisteme aktarıldı. İlk olarak gazların pompadan çıkması sağlandı. Dengeleme işlemi için sisteme A çözücüsü ve B çözücüsünün giriş yapması sağlanarak, kenevir bitkisinin kök, lif, yaprak ve bitkinin tümüne ait kısımlarının etanol ekstraktlarından alınıp HPLC metoduna göre numuneler cihaza yüklendi. Kolonların dengelenme işlemi doğru yani düz kromatogram (baseline) halini alana kadar sürdürüldü.

Bitki örneklerinden elde edilen özütler 10 mg/mL olacak şekilde seyreltilmiş ve 0.45 µm'lik membran filtreden geçirilerek viallere aktarıldıktan sonra HPLC cihazı çalıştırıldı. Bu analiz Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan HPLC cihazı ile yapılarak tamamlanmıştır.

Çizelge 3.1 HPLC analizleri için kullanılan deneysel koşullar

HPLC koşulları		Gradient elüsyonu		
Model	Agilent Technologies 1260 Infinity II	zaman(dk)	A(%)	B(%)
Kolon	ACE 5 C18 (250x4.6 mm id)	0	90	10
Kolon firması	G7130A	25	60	40
Dedektör	1260 DAD WR	39	40	60
Pompa	1260 Quat Pump VL	50	10	90
Mobil faz	A: %1 Asetik asit, B: Asetonitril	55	90	10
Dalga boyları	272, 280 ve 310 nm			
Otosampler	1260 Vialsampler			
Akış hızı	1 ml/min			
Kolon sıcaklığı	28 °C			
Enjeksiyon miktarı	20 µl			

3.5 Moleküler doking analizleri

Bitki numunelerinin içerik analizlerinde tespit edilen en fazla orandaki bileşiklerin asetilkolin esterase enzimi üzerine etkisi AutoDock Vina bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır (Balcı ve ark., 2023). Protein Veri Bankası internet sitesinden

(<https://www.rcsb.org/structure/4EY7>) AChE enziminin (insan, PDB id: 4EY7) kimyasal yapısı indirilmiştir.

Discovery Studio Visualizer programında faydalanılarak AChE enziminin yapısı optimize edilip, enzim yapısı Chimera yazılımına yüklenmek için pdb formatına çevrildi. Pubchem web sayfasındaki online yazılımı kullanılarak bileşiklerin yapıları çizildikten sonra pdb formatına aktarıldı ve optimize edilmek için Avogadro görselleştirme uygulamasına aktarıldı (Cetin ve ark., 2021). Optimize işlemi sonrası yapılar pdb formatında kaydedildi ve ligand olarak yükleme yapılarak Chimera yazılımı başlatıldı (Shapovalov ve Dunbrack, 2011). En iyi doking moleküler bağlanma etkileşimi ve enerji değerleri Discovery Studio Visualizer ile analiz edildi (Yılmaz ve ark., 2023).



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

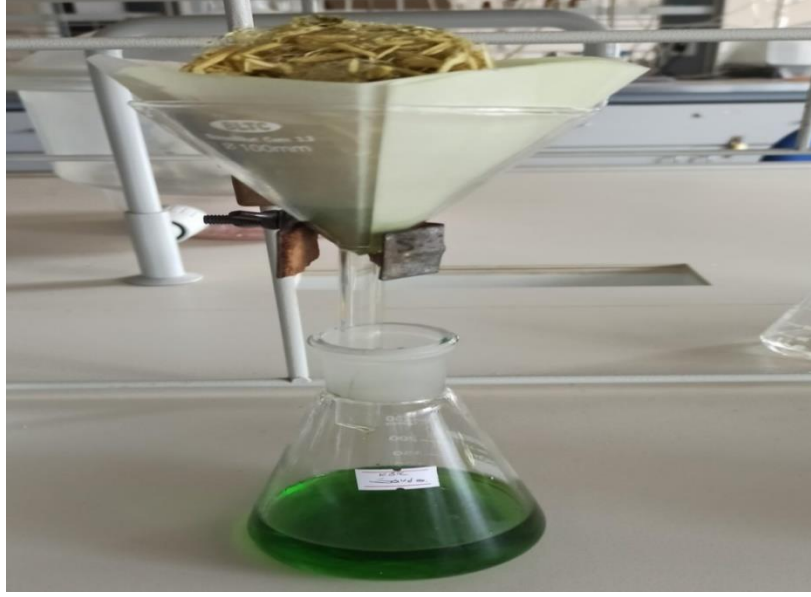
4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Daha önceden yaş olarak temin edilen kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kök, lif, yaprak ve bitkinin tümüne ait kısımları oda koşullarında güneş ışınlarına direkt maruz bırakılmadan kurutulmuş daha sonra blender yardımıyla öğütülüp toz haline getirilerek kök, lif, yaprak ve bitkinin tümüne ait kısımlarından 25 g tartılarak ayrı ayrı beher içerisine alınıp etiketlendirme işlemi yapıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Ekstraksiyon için hazırlanan kenevir bitkisi kısımları

Etiketlendirme işleminden sonra elde edilen her bir numune beher içerisine alınarak üzerine 250 mL etanol (1/10: w/v) olacak şekilde eklenerek manyetik karıştırıcı ile 12 saat karıştırılarak dinlenmeye bırakılmıştır. Daha sonra Şekil 4.2’de görüldüğü gibi cam huni içerisine süzgeç kâğıtlarından yerleştirilmiş her bir numunenin ayrı ayrı süzgeç kâğıdı yardımıyla tortularından arındırılarak süzülmesi sağlanmıştır.



Şekil 4.2 Bitki kısımlarının ekstraksiyon işlemleri

Her bir numenin ayrı ayrı süzme işlemi sağlandıktan sonra rotary evaporatöre alınması işlemine geçildi. İki fonksiyonlu olan bu cihaz içerisinde özütleme neticesinde bitki özlerini elde edebilmek için çözücü olarak kullanılan etanolün ortamdan uzaklaştırılması amaçlanmıştır (Şekil 4.3).



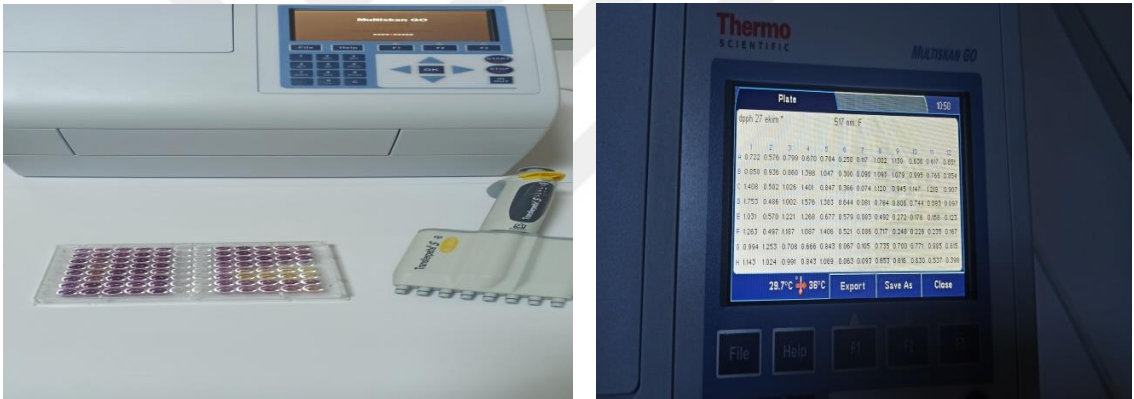
Şekil 4.3 Bitki numunelerinin rotary evaporatördeki damıtma işlemi

Süzme işleminin tamamlanması ile elde edilen karışımlar, evaporatör yardımıyla 65 °C’de damıtma işlemi yapıp balon jojelerin ağırlıkları tartılarak, net ağırlıkları

hesaplandı. Kök kısmından 0.836 g, lif kısmından 0.776 g, yaprak kısmından 0.46 g ve bitkinin tümüne ait kısım da ise 0.159 g elde edildi. Balon jojeden bitki kalıntıları kazınarak kök kısmından 866 mg, lif kısmından 776 mg, yaprak kısmından 46 mg ve bitkinin tümüne ait kısmından ise 150 mg tartılarak konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde etanol eklenerek bitki ekstraları hazırlandı.

4.2. Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Aktiviteleri

Bitkilerin biyolojik aktivitelerini belirlemek için çeşitli yöntemler ile antioksidan tayinleri sıklıkla gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada da hazırlanan kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisi ekstralarının antioksidan aktivitelerini belirlemek için *in vitro* CUPRAC, FRAP, DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılmıştır. Spektrofotometrede elde edilen sonuçlar BHT, askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı (Şekil 4.4).



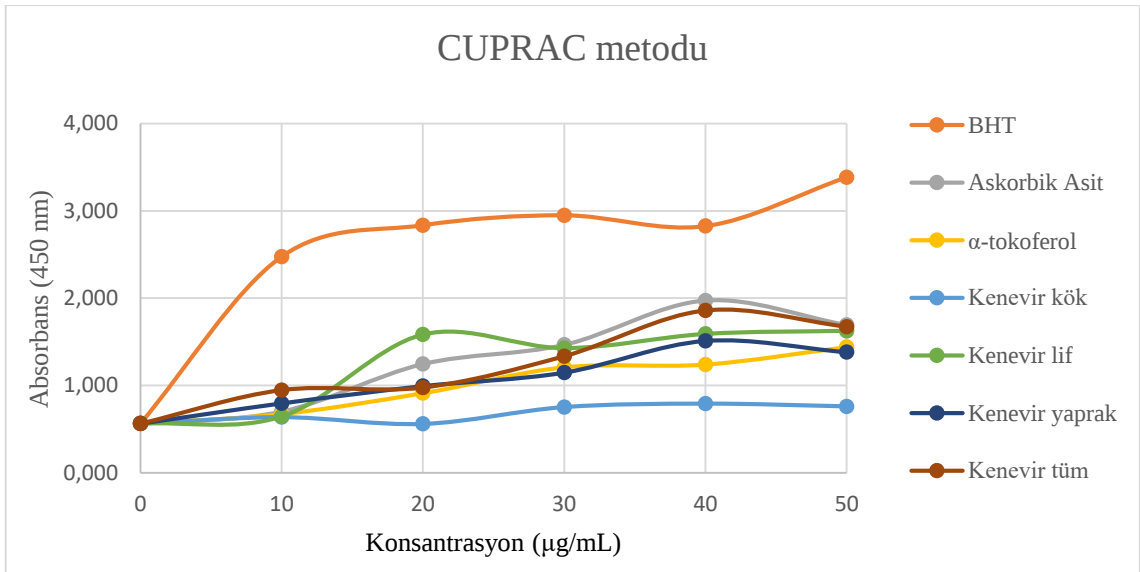
Şekil 4.4 Bitki ve standart ekstralarının spektrofotometre cihazındaki absorbans ölçümleri

4.2.1 CUPRAC yöntemi sonuçları

CUPRAC indirgeme aktivite çalışmalarında 450 nm’de artan absorbans değerleri güçlü antioksidan aktivitesini vermektedir. Deney tüplerine veya mikropate kuyucuklarının her birine ayrı ayrı bitki ekstratları ile standart madde numuneleri yöntemdeki gibi eklenerek, inkübasyon işlemi için 30 dk beklendikten sonra çözeltiler dalga boyu 450 nm’de UV-Vis spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülüp elde edilen absorbans verileri Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi kayıt edilerek grafik haline getirildi.

Çizelge 4.1 CUPRAC yöntemi farklı üç deney sonuçlarının ortalaması

	0 µL	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	50 µL
BHT	0.563	2.475	2.835	2.949	2.825	3.385
Askorbik Asit	0.563	0.701	1.246	1.466	1.974	1.694
α - tokoferol	0.563	0.673	0.912	1.208	1.240	1.439
Kenevir kök	0.563	0.638	0.561	0.752	0.791	0.761
Kenevir lif	0.563	0.644	1.582	1.427	1.590	1.626
Kenevir yaprak	0.563	0.795	0.993	1.147	1.510	1.381
Kenevir tüm	0.563	0.947	0.976	1.335	1.858	1.673



Şekil 4.5 CUPRAC yöntemi ile numunelerin antioksidan aktivitesi belirlenmesi

450 nm'deki absorbans değerinin artması kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme miktarını göstermektedir. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kök, lif, yaprak ve bütününe ait kısımların ile BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) standartlarının CUPRAC metoduna göre indirgeme aktiviteleri Şekil 4.5'de görüldüğü gibi konsantrasyona bağlı olarak genel olarak artmıştır. En yüksek antioksidan etki BHT, askorbik asit ve kenevir tüm kısmına ait numune göstermiş olup antioksidan özellikte olduğu belirlendi. Bu bitkiye ait kök kısmının değişen konsantrasyonda indirgeme aktivitesinde değişiklik yok denilecek kadar az eğilim gösterdiğinden antioksidan özellikte olmadığı anlaşıldı.

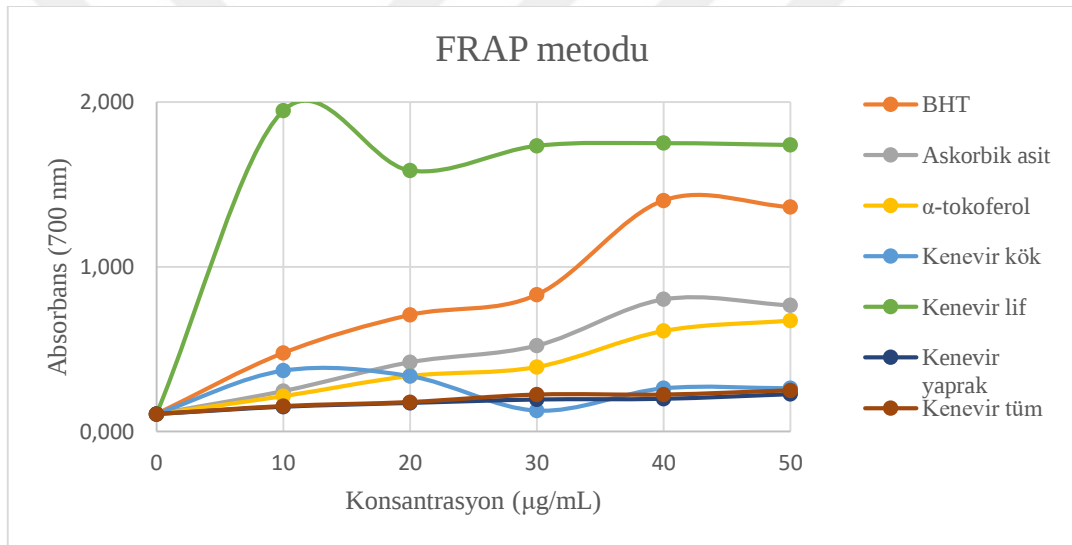
4.2.2 FRAP yöntemi sonuçları

FRAP yöntem indirgeme aktivitesi çalışmalarına göre hazırlanan Absorbans (700 nm)-Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) grafiğinde artan absorbans miktarı ile orantılı olarak

artan antioksidan aktivite belirlenmiştir. Bu şekilde hazırlanan bitki ve standartlara ait ekstraller 700 nm'deki dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek sonuçlar Çizelge 4.2'deki gibi kaydedilip elde edilen değerlerin konsantrasyona bağlı grafikler çizildi.

Çizelge 4.2 FRAP yöntemi ile farklı üç deney sonuçlarının ortalaması

	0 μ L	10 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	50 μ L
BHT	0.106	0.476	0.707	0.830	1.403	1.362
Askorbik asit	0.106	0.245	0.421	0.522	0.803	0.767
α - tokoferol	0.106	0.214	0.337	0.391	0.610	0.673
Kenevir kök	0.106	0.370	0.337	0.127	0.262	0.263
Kenevir lif	0.106	1.948	1.585	1.735	1.751	1.740
Kenevir yaprak	0.106	0.150	0.174	0.195	0.199	0.227
Kenevir tüm	0.106	0.154	0.178	0.224	0.224	0.249



Şekil 4.6 FRAP yöntemi ile numunelerin antioksidan aktivitesi belirlenmesi

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin kısımlarına ait numuneleri indirgeme aktivitesi BHT (Bütillenmiş hidroksi tolueen), α - tokoferol (E vitamini) ve askorbik asit (C vitamini) standartlarının FRAP yöntemine göre indirgeme aktivitesi Şekil 4.6'ya göre karşılaştırıldığında standart maddelerin absorbans değerleri, artan konsantrasyon ile artmıştır. *Cannabis sativa* L. bitkisinde ise sadece lif kısmındaki numunenin artan konsantrasyon miktarı ile absorbans değerinin yükseldiği ancak bitkiye ait diğer kısımlardaki numunelerde bir değişiklik olmadığı görüldü. Absorbans değerlerindeki artış yani antioksidan etki sırasıyla *Cannabis sativa* L. bitkisinin lif kısmı, BHT, askorbik asit ve α - tokoferol olarak değerlendirildi. En yüksek antioksidan etkiyi FRAP

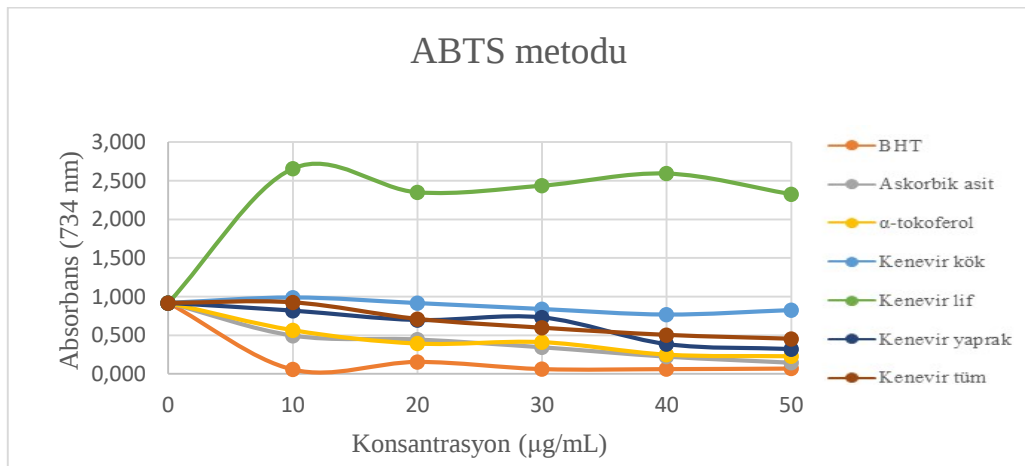
yöntemi ile *Cannabis sativa* L.'nin lif kısmı numunesinin gösterdiği anlaşıldı. Bu durumda *Cannabis sativa* L. bitkisinin lif kısmındaki numune FRAP yöntemine göre antioksidan özellikte olduğu ancak bitkinin diğer kısımlarındaki numunelerin ise artan konsantrasyon miktarı ile absorbans değerlerinde değişiklik gözlemlenemediğinden antioksidan özellik göstermediği sonucuna varıldı.

4.2.3 ABTS yöntemi sonuçları

ABTS radikali antioksidan reaktifler ile reaksiyona girdiğinde elektron aktarımı ile indirgenerek radikal olmayan ABTS'ye dönüşür. Artan konsantrasyon miktarı ile 734 nm'de absorbansın miktarının değişmesi esası ile antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Özetle konsantrasyona bağlı artış ile absorbans değerinin düşmesi numunenin antioksidan etkisinin yüksek olması demektir. Bu yöntemle göre hazırlanan bitki ve standart numunelerin ekstraktları belirtilen dalga boyunda ölçümleri yapılarak sonuçlar Çizelge 4.3'deki gibi kayıt edildi. Konsantrasyona bağlı olarak absorbans değerleri grafiği çizilerek IC_{50} değerleri $\mu\text{g/mL}$ hesaplandı.

Çizelge 4.3 ABTS yöntemi ile farklı üç deney sonuçlarının ortalaması

	10 μL	20 μL	30 μL	40 μL	50 μL	IC_{50}
BHT	0.058	0.156	0.064	0.063	0.071	27.5
Askorbik asit	0.497	0.446	0.346	0.225	0.147	39.2
α -tokoferol	0.566	0.394	0.412	0.251	0.230	41.9
Kenevir kök	0.988	0.916	0.839	0.768	0.825	450.0
Kenevir lif	2.659	2.351	2.437	2.595	2.328	-14.8
Kenevir yaprak	0.818	0.697	0.730	0.386	0.322	70.1
Kenevir tüm	0.925	0.711	0.597	0.504	0.454	82.0



Şekil 4.7 ABTS katyon radikali giderme aktivitesi

ABTS katyon radikali giderme aktivitesi metodundaki Şekil 4.7’de gösterilen Absorbans (734 nm)-Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) grafiğine göre; *Cannabis sativa* L. bitkisinin kısımlarının oluşturduğu numunelerin aktivitesi, BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), α -tokoferol (E vitamini) ve askorbik asit (C vitamini) standartlarının ABTS katyon radikali giderme aktivitesi ile karşılaştırıldığında standart maddelerin absorbans değerleri artan konsantrasyon ile ters orantılı olarak azalmıştır. Absorbans değerlerindeki azalmaya bağlı olarak antioksidan etkinin artması beklendiğinden standartlar için sırasıyla BHT, askorbik asit ve α -tokoferol antioksidan etki göstermiştir. *Cannabis sativa* L. bitkisine ait numunelerin farklı konsantrasyondaki absorbans değerlerine bakıldığında ise lif kısmındaki numunenin sağlıklı sonuç vermediği absorbansın artan konsantrasyonla orantılı olarak arttığı dolayısıyla antioksidan özellik göstermediği ancak bitkinin diğer kısımlarına ait numunelerin artan konsantrasyon miktarına karşılık absorbans değerinin düştüğü gözlemlendiğinden bu kısımların antioksidan özellik gösterdikleri anlaşılmaktadır.

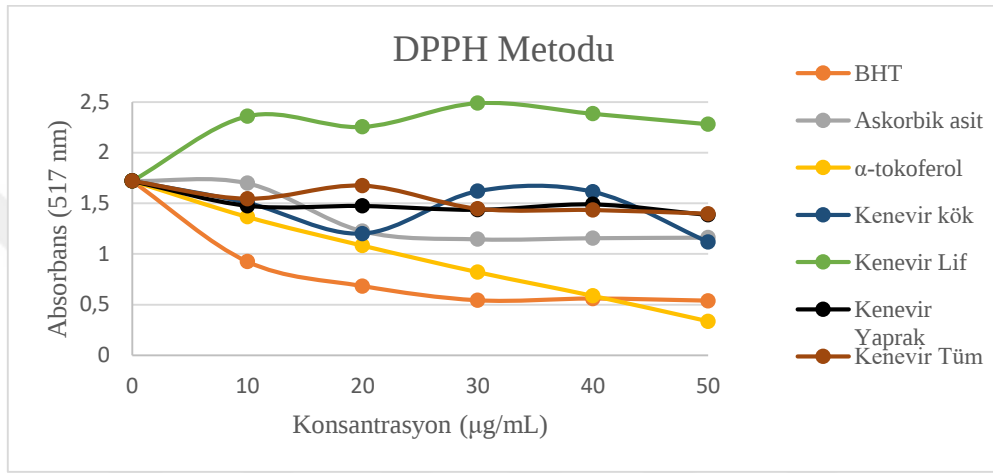
4.2.4 DPPH yöntemi sonuçları

DPPH yöntemine göre kenevir bitkisine ait kısımların ekstraterlerinden antioksidan değerleri ölçüldü. DPPH etanolde çözülerek 0.1 mM’lık çözeltisi hazırlandı Ayrıca 10 mg/mL derişiminde bitki numunelerinin çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin ve standart olarak kullanılan BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) antioksidanlar farklı konsantrasyonlarda deney tüplerine alınarak 300 μL DPPH çözeltisi üzerlerine eklendi. Karanlık ortamda inkübe işlemi için 30 dk numuneler bekletildikten sonra 517 nm’de UV-Vis spektrofotometrede absorbansları ölçülerek kaydedildi.

Ölçümü yapılan numunelerin karşılığı (kontrol grubu) olan etanol kullanılarak absorbansının 1.5-2.0 arasında olması için etanol ile DPPH radikali oranı ayarlanıp, her bir ölçüm için absorbans verileri Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi kayıt edilerek Microsoft Excel programında grafikleri çizildi. Buna bağlı olarak absorbans değerlerindeki düşüş ortamdan giderilmiş olan DPPH serbest radikal miktarını göstermektedir.

Çizelge 4.4 DPPH yöntemi ile farklı üç deney sonuçlarının ortalaması

	10 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	50 μ L	IC ₅₀
BHT	0.924	0.682	0.542	0.559	0.538	40.1
Askorbik asit	1.698	1.225	1.145	1.156	1.162	96.9
α -tokoferol	1.366	1.083	0.820	0.587	0.336	48.7
Kenevir kök	1.505	1.200	1.620	1.614	1.118	138.9
Kenevir lif	2.359	2.254	2.489	2.384	2.281	-68.0
Kenevir yaprak	1.476	1.474	1.436	1.490	1.385	160.0
Kenevir tüm	1.546	1.675	1.446	1.434	1.397	194.3

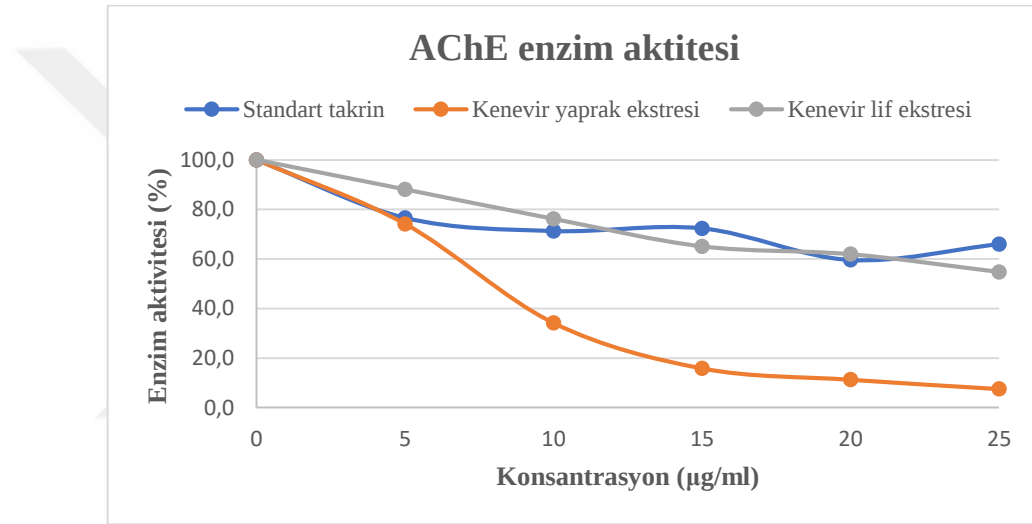


Şekil 4.8 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Absorbans (517 nm)-Konsantrasyon (μg/mL) grafiğine göre; Azalan absorbans miktarından serbest radikal giderme aktivitesi ve antioksidan aktivite belirlenmektedir. Yapılan üç farklı deney sonuçlarının ortalamalarına göre Şekil 4.8’de gösterilen grafikte kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin farklı kısımlarının oluşturduğu bileşiklerin aktivitesi ile BHT (Bütillenmiş hidroksi tolueen), askorbik asit (C vitamini) ve α-tokoferol (E vitamini) standartlarının şekilde görüldüğü gibi artan konsantrasyon değerlerine karşılık absorbans değerlerinin azaldığı görülmektedir ancak kenevir bitkisi lif kısmının bulunduğu numune ABTS yönteminde olduğu gibi tersinir etki sergileyerek antioksidan özellikte olmadığı ancak bitkinin diğer kısımlarının dalgalanmalı da olsa artan konsantrasyon miktarı ile absorbans değerlerinde kısmi olarak yani yok denecek kadar az miktarda azalma görüldüğünden DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi yöntemine göre antioksidan eğilimlerinin çok az olduğu sonucuna varıldı.

4.3 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi sonuçları

Enzim aktivite yönteminde açıklandığı gibi standart takrin çözeltisi ve bitki ekstratlarından mikropipet yardımı ile numuneler mikrolate kuyucuklarına eklendi. Spektrofotometre cihazında dalga boyu 412 nm’de birer dakika aralıklar ile absorbans değerleri ölçülerek reaksiyon 10 dakika süre ile takip edildi ve ölçülen değerler kayıt edilerek deneyler üç defa tekrarlandıktan sonra sonuçların ortalamaları hesaplandı. Microsoft Excel programından yararlanarak absorbans verilerini Aktivite %-Konsantrasyon grafiği Şekil 4.9’da görüldüğü gibi çizilerek elde edilen sonuçlar ile IC₅₀ değerleri ve inhibisyon değerleri hesaplandı.



Şekil 4.9 Kenevir bitkisinin yaprak ve lif kısımları ile standart takrin maddesinin AChE enzim inhibisyonu

Yapılan çalışmalar ile 5 µg/mL-25 µg/mL konsantrasyonları aralığında AChE aktivite ve inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Enzimin inhibitörü olan standart takrin ile mukayese edildiğinde özellikle kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak etanol ekstresinin çok güçlü inhibisyon etki gösterdiği enzim aktivitenin düşmesinden anlaşılmıştır.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak ve lif etanol ekstratlarının ve takrinin AChE enziminin %50’sini inhibe eden konsantrasyonları yani IC₅₀ değerleri belirlendi. Sonuçlara göre kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak etanol ekstresinin IC₅₀ değeri 10.19±2.28 µM, kenevir (*Cannabis sativa* L.) lif etanol ekstresinin IC₅₀ değeri 23.47±3.21 µM ve standart takrin IC₅₀ değeri 23.33±9.88 µM olarak hesaplandı.

Elde edilen sonuçlara göre kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak etanol ekstresinin standart takrinden daha düşük IC₅₀ değeri olduğu için takrine göre daha iyi inhibitör olduğu bulundu. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) lif etanol ekstresinin IC₅₀ değeri

ile standart takrin IC₅₀ değerleri birbirlerine çok olduğu anlaşıldığından benzer AChE inhibisyonu gösterdikleri anlaşıldı.

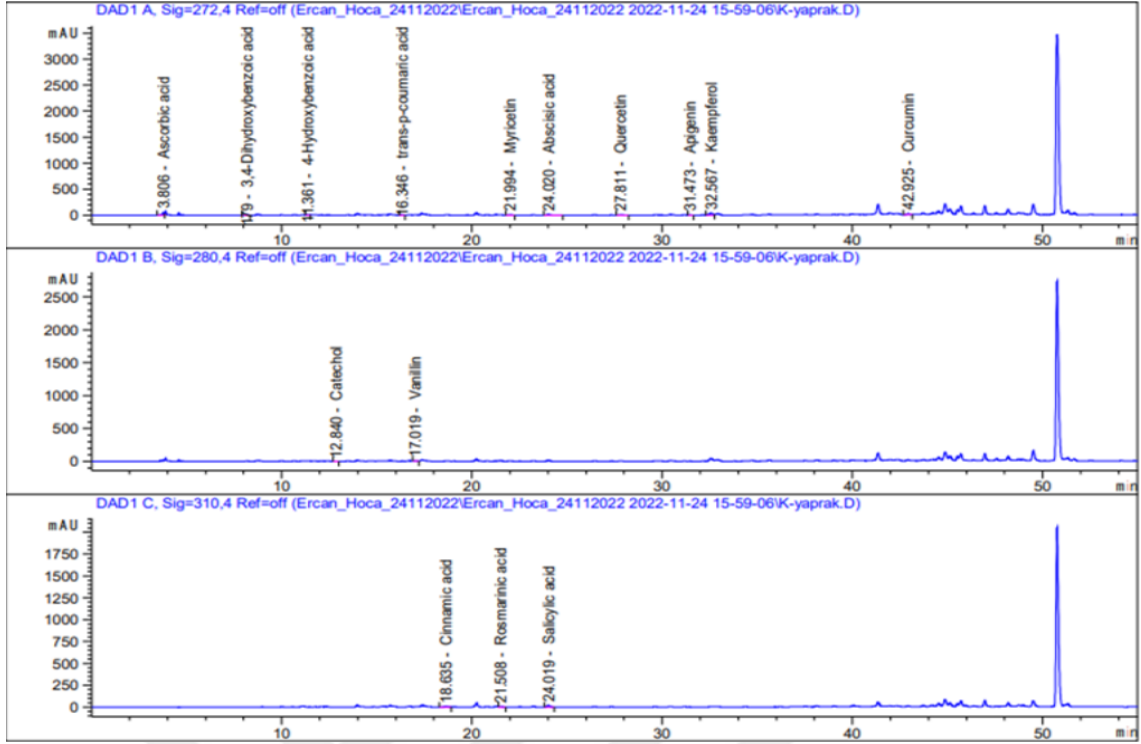
4.4 HPLC ile fenolik bileşik tayinleri

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin yaprak, lif, kök ve bütününe ait kısımlarını içeren numunelerin ekstratlarının etanolik çözeltileri hazırlanarak HPLC yönteminde *Cannabis sativa* L. bitkisine ait kısımların ekstratları 272 nm, 280 nm ve 310 nm dalga boylarında incelendi ve bu çözeltilerin kromatogramları ile 17 çeşit standart bileşik kromatogramları mukayese edilerek bitki kısımlarına ait içerik kantitatif olarak değerlendirilmiştir. *Cannabis sativa* L. bitkisinin yaprak kısmına ait etanol ekstresinin HPLC metodu ile fenolik içerik analizi Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Kenevir bitkisi yaprak ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikler

S.no	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area[mAU*s]	Miktar((µg/mL)
1	Askorbik asit	3.81	360.7	3.95±2
2	Gallik asit	5.41	ND	ND
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	8.17	30.55	0.00
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.36	36.88	3.96±2
5	trans-p-kumarik asit	16.34	80.14	2.98±2
6	Mirisetin	21.99	48.34	6.88±2
7	Absisik asit	24.02	124.23	8.30±2
8	Quersetin	27.81	67.26	2.23±2
9	Apigenin	31.47	20.63	1.51±1
10	Kaempferol	32.56	480.9	4.38±2
11	Kurkumin	42.92	154.8	2.70±1
12	Katekol	12.84	11.00	2.22±2
13	Vanillin	17.01	25.12	0.00
14	Kafeik asit	13.06	ND	ND
15	Sinamik asit	18.63	115.2	1.32±2
16	Rosmarinik asit	21.51	48.28	2.34±2
17	Salisilik asit	24.01	198.7	1.73±2

Çizelge 4.5 verileri ve Şekil 4.10’da verilen HPLC kromatogramlarından anlaşılabacağı üzere *Cannabis sativa* L. bitkisinin yaprak kısmı etanol ekstresinin içeriğinde toplam 17 çeşit standart bileşiklerden başta absisik asit olmak üzere 14 adet fenolik bileşik olduğu görüldü.

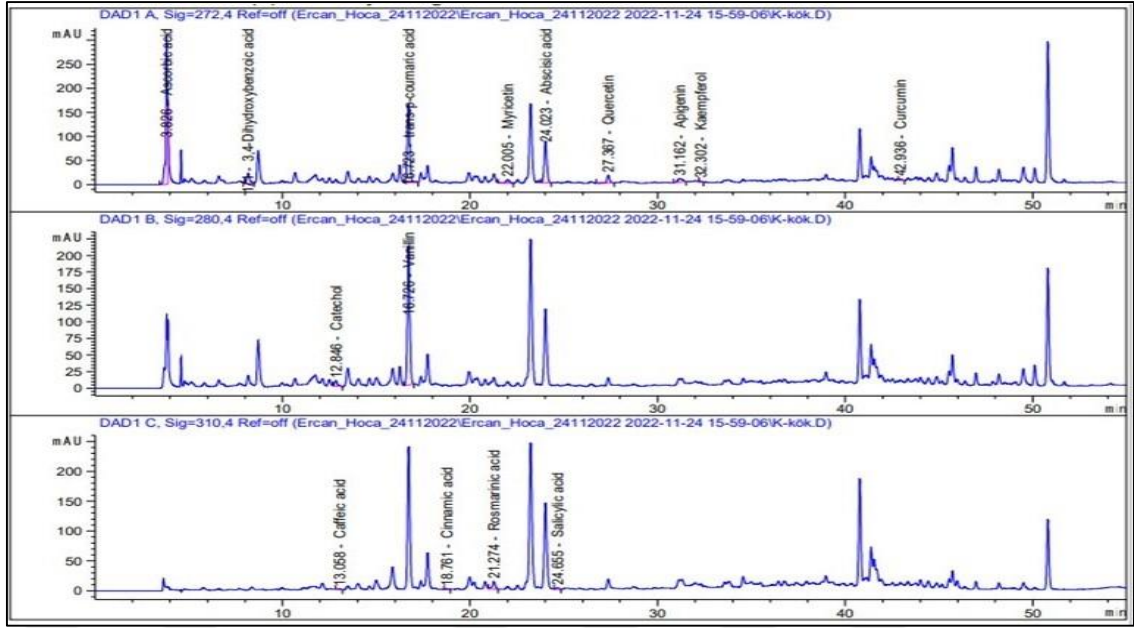


Şekil 4.10 Kenevir bitkisinin yaprak kısmına ait etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramlarını göstermektedir.

Aynı şekilde yapılan kenevir bitkisinin kök kısmına ait etanol ekstresinin HPLC metodu ile fenolik içerik analizi Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Kenevir bitkisinin kök kısmına ait etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikler

S.no	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area[mAU*s]	Miktar((µg/mL)
1	Askorbik asit	3.86	1756	68.07
2	Gallik asit	5.41	ND	ND
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	8.17	225.2	3.34
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.3	ND	ND
5	trans-p-kumarik asit	16.7	1551	25.11
6	Mirisetin	22.0	90.42	5.12
7	Absisik asit	24.0	870.5	71.43
8	Quersetin	27.3	150.6	3.66
9	Apigenin	31.1	127.2	21.92
10	Kaempferol	32.3	22.93	1.48
11	Kurkumin	42.9	33.15	10.5
12	Katekol	12.8	87.10	2.59
13	Vanillin	16.7	1927	16.3
14	Kafeik asit	13.1	15.89	ND
15	Sinamik asit	18.7	11.32	7.68±1
16	Rosmarinik asit	21.2	143.1	2.31
17	Salisilik asit	24.6	22.93	ND



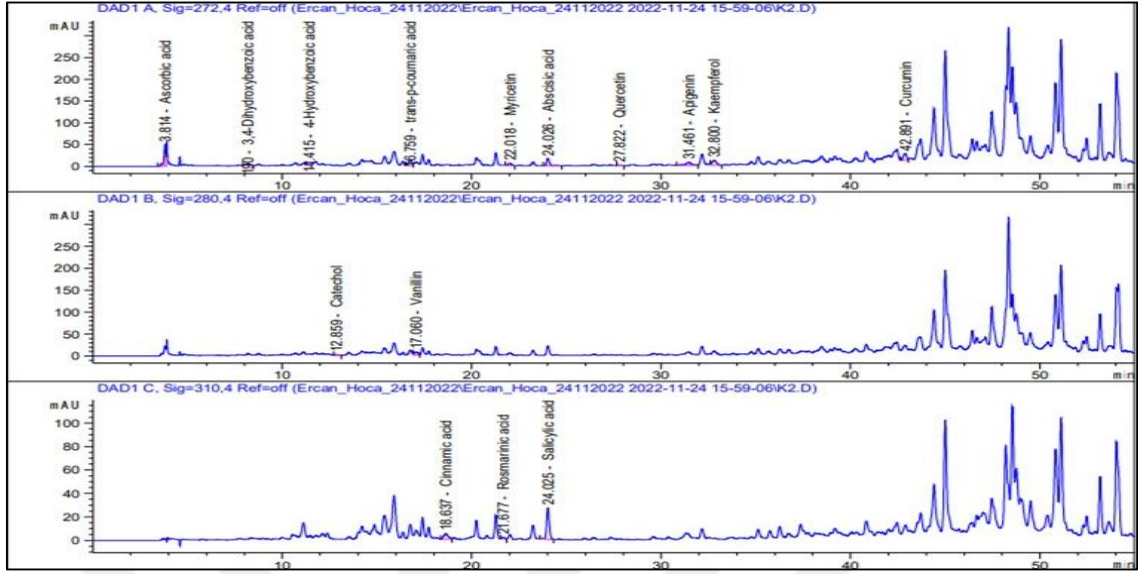
Şekil 4.11 Kenevir bitkisinin kök kısmına ait etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramlarını göstermektedir.

Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11’de verilen HPLC kromatogramlarından anlaşılaçağı üzere *Cannabis sativa* L. bitkisinin kök kısmının etanol ekstresi içeriğinde toplam 17 çeşit standart bileşiklerden başta absisik asit ve askorbik asit ile beraber 14 adet fenolik bileşik olduğu görüldü.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin tümüne ait kısmının etanol ekstresinin HPLC metodu ile fenolik içerik analizi Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Kenevir bitkisinin tümüne ait ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikleri

S.no	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area[mAU*s]	Miktar((µg/mL)
1	Askorbik asit	3.81	291.1	11.58
2	Gallik asit	5.41	ND	ND
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	8.19	46.58	ND
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.41	28.43	1.35
5	trans-p-kumarik asit	16.75	136.6	3.26
6	Mirisetin	22.01	58.57	3.76
7	Absisik asit	24.02	164.9	13.67
8	Quersetin	27.82	13.30	1.09±1
9	Apigenin	31.46	158.2	27.38
10	Kaempferol	32.54	27.14	1.66
11	Kurkumin	42.89	178.9	48.1
12	Katekol	12.85	12.64	2.95±1
13	Vanillin	17.06	99.89	ND
14	Kafeik asit	13.06	ND	ND
15	Sinamik asit	18.63	75.48	1.23
16	Rosmarinik asit	21.67	16.19	7.31
17	Salisilik asit	24.02	269.5	5.76



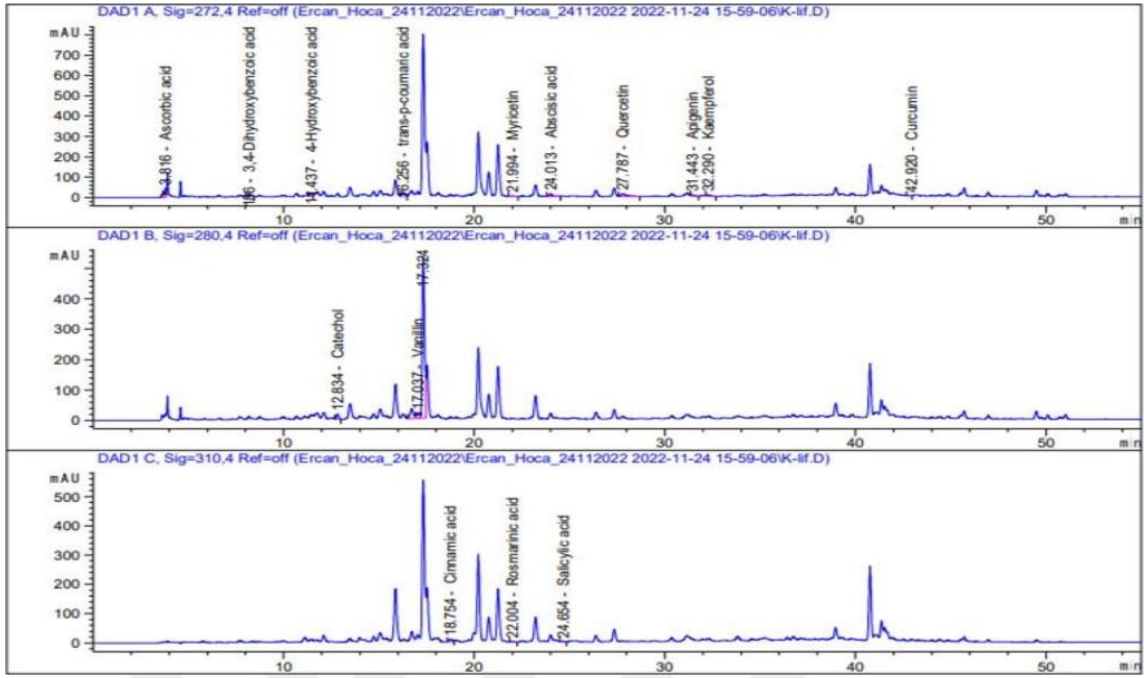
Şekil 4.12 Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin tümüne ait kısımlarının etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramları

Çizelge 4.7 ve Şekil 4.12’de verilen HPLC kromatogramlarından anlaşılacağı üzere (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin tümüne ait kısmının etanol ekstresi içeriğinde toplam 17 çeşit standart bileşiklerden başta kurkumin ve apigenin olmak üzere 14 adet fenolik bileşik olduğu görüldü.

Kenevir bitkisinin lif kısmına ait etanol ekstresinin HPLC metodu ile fenolik içerik analizi Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Kenevir bitkisinin lif kısmına ait etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle elde edilen organik bileşikleri

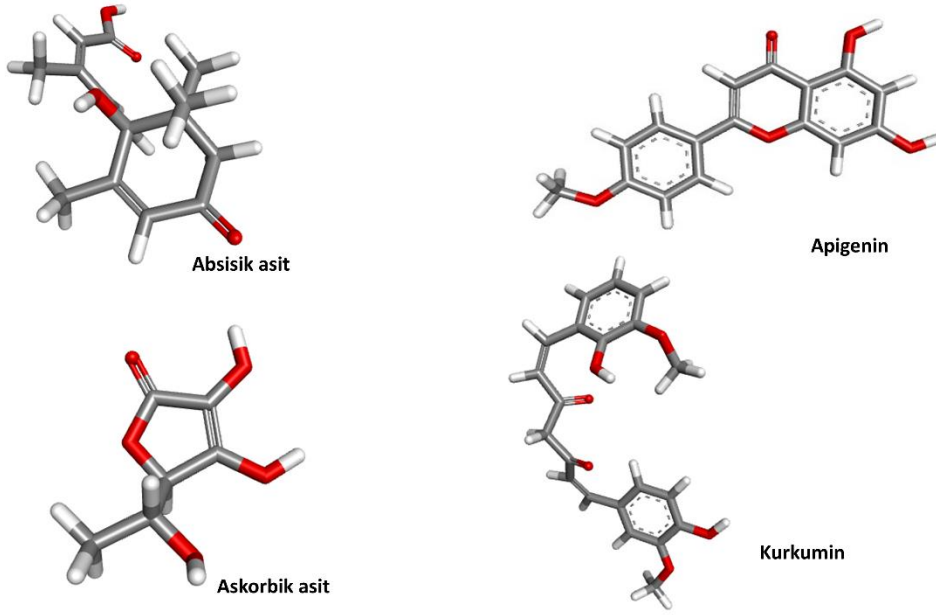
S.no	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area[mAU*s]	Miktar((µg/mL)
1	Askorbik asit	3.81	281.3	11.21
2	Gallik asit	5.41	ND	ND
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	8.19	106.7	5.85
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.41	101.6	2.30
5	trans-p-kumarik asit	16.75	328.4	6.22
6	Mirisetin	22.01	27.98	2.46
7	Absisik asit	24.02	137.7	11.44
8	Quersetin	27.82	259.1	6.46
9	Apigenin	31.46	70.50	11.92
10	Kaempferol	32.54	84.13	4.10
11	Kurkumin	42.89	27.11	9.00
12	Katekol	12.85	144.1	4.34
13	Vanillin	17.06	174.7	ND
14	Kafeik asit	13.06	ND	ND
15	Sinamik asit	18.63	98.80	1.40
16	Rosmarinik asit	21.67	22.98	8.16
17	Salisilik asit	24.02	20.05	ND



Şekil 4.13 Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin lif kısmına ait etanol ekstresinin 272 nm, 280 nm ve 310 nm’de ki HPLC kromatogramları

Çizelge 4.8 ve Şekil 4.13’te verilen HPLC kromatogramlarından anlaşılabacağı üzere *Cannabis sativa* L. bitkisinin lif kısmının etanol ekstresi içeriğinde toplam 17 çeşit standart bileşiklerden başta askorbik asit, absisik asit, kurkumin ve apigenin olmak üzere 14 adet fenolik bileşik olduğu görüldü.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinde en fazla bulunan absisik asit, askorbik asit, kurkumin ve apigenin moleküllerinin kimyasal yapıları Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14 Absisik asit, askorbik asit, kurkumin ve apigenin moleküllerinin kimyasal yapılarının 2D görüntüleri

4.5 Moleküler doking çalışmaları

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin içerik analizleri HPLC ile belirlenmiş olup bitkinin kök, sap, yaprak ve bitkinin tümüne ait kısımlarında kantitatif olarak tespit edilen en fazla miktarda bulunan organik bileşikler absisik asit, apigenin, askorbik asit ve kurkumin olarak tespit edildi. Bu bağlamda *in silico* yöntemler ile enzim inhibisyonunun tespiti için AutoDock Vina bilgisayar yazılımı kullanılarak AChE enzimi ile absisik asit, askorbik asit, apigenin ve kurkumin bileşikleri arasındaki moleküler etkileşimler bulundu (Türkan ve ark., 2022).

Moleküler doking çalışmaları sonuçlarına göre analiz edilen organik bileşiklerin bağlanma enerji seviyeleri belirlenerek, moleküler bağlanma enerji seviyeleri AChE enzimini standart inhibitörü olan takrin molekülü ile karşılaştırıldı. Bitki ekstraktlarında en fazla miktarda bulunan fenolik bileşiklerin moleküler doking enerji seviyeleri takrin enerjisine yakın olarak belirlendi. Majör bileşikler ve takrinin bağlanma enerjileri, bağ türleri ve bağlanma amino asit rezidüleri Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Kenevir bitkisinin majör fenolik bileşikleri ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimler

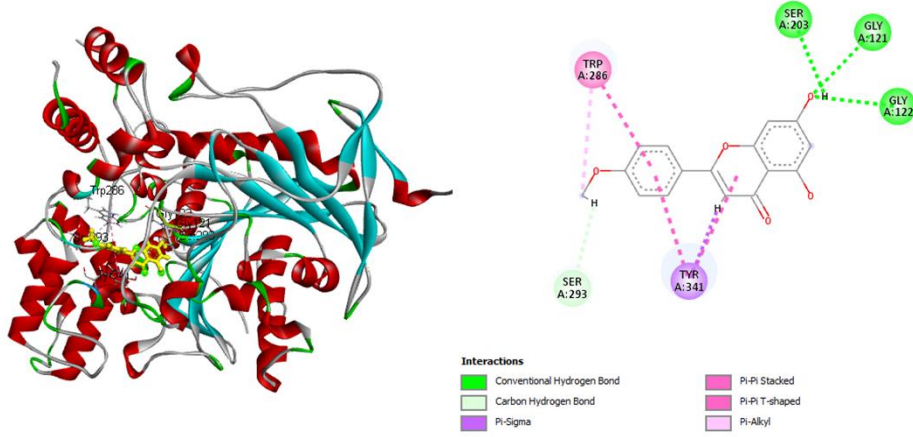
Bileşik adı	Affinite (Enerji)	Etkileşim bağ türü	Etkileşim rezidüsü
Absisik asit	-8.1 kcal/mol	Karbon Hidrojen Bağı	HIS A:447
		Pi-Alkil	TYR A:337; PHE A:338
		Pi-Sigma	TRP A:86
Askorbik asit	-5.8 kcal/mol	Konvansiyonel Hidrojen Bağı	GLY A:117; GLU A:199
		van der Waals	GLY A:118; GLY A:123; TYR A:130; SER A:200; HIS A:438; GLY A:439; ILE A:442
		Pi-Alkil	TYR A:328
		Pi-Sigma	TRP A:83
Apigenin	-10.1 kcal/mol	Konvansiyonel Hidrojen Bağı	GLY A:121; GLY A:122; SER A:203
		Karbon-Hidrojen Bağı	SER A:293
		Pi-Alkil	TRP A:286
		Pi-Sigma	TYR A:341
Kurkumin	-9.9 kcal/mol	Konvansiyonel Hidrojen Bağı	ASP A:74; TRP A:86; GLY A:121; GLY A:122
		Karbon-Hidrojen Bağı	TYR A:124
		van der Waals	GLN A:71; ASN A:87; GLY A:120; SER A:125; GLY A:126; TYR A:119; LEU A:130; TYR A:133; TYR A:337; HIS A:444; GLY A:448; ILE A:442
		Pi-Pi	TYR A:328; PHE A:329; TYR A:332
Takrin	-8.7 kcal/mol	Konvansiyonel Hidrojen Bağı	HIS A:447
		Pi-Alkil	TRP A:86
		Pi-Sigma	PHE A:338

Bu sonuçlara göre majör bileşiklerden olan absisik asit için bağlanma enerjisi -8.1 kcal/mol, apigenin için -10.1 kcal/mol, askorbik asit için -5.8 kcal/mol ve kurkumin için -9.9 kcal/mol bulunurken, aynı yöntem ile AChE enziminin standart inhibitörü olan takrin için bu değer -8.7 kcal/mol olarak ölçüldü. Burada düşük enerji seviyesi enzim ile molekül arasındaki daha yüksek bağlanma etkileşimini göstermektedir. Bitkide bulunan bu majör fenolik bileşikleri ile AChE enziminin standart inhibitörü olan takrinin birbirlerine yakın bağlanma enerjileri belirlendi.

Bağlanma etkileşim seviyeleri sırasıyla apigenin, kurkumin, takrin, absisik asit ve askorbik asit olacak şekilde sıralanıp, genel olarak bağlanma türleri Konvansiyonel hidrojen bağları, Karbon-Hidrojen, Pi-Pi bağları ve diğer bağların detaylı olarak 2D ve 3D görüntüleri şekillerde gösterilmiştir.

Apigenin ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılabacağı üzerine absisik asit molekülü AChE enzimin aktif bölgesinin amino asit rezidüleri arasındaki etkileşimler;

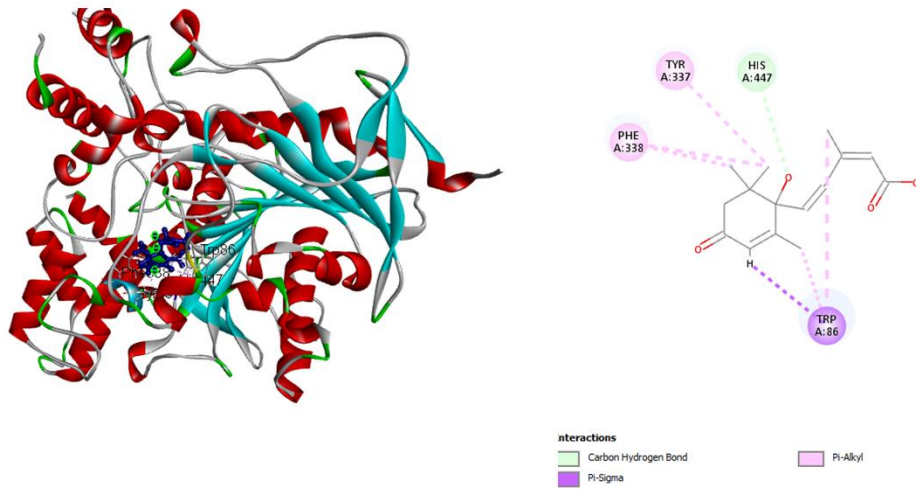
- Konvansiyonel Hidrojen Bağları (GLY A:121; GLY A:122; SER A:203),
- Karbon Hidrojen Bağı (SER A:293),
- Pi-Alkil (TRP A:286) ve Pi-Sigma (TYR A:341) şeklinde bulundu.



Şekil 4.15 Apigenin ile AChE asit arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri

Absisik asit ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 4.16’da gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere absisik asit molekülü AChE enzimin aktif bölgesinin amino asit rezidüleri arasındaki etkileşimler;

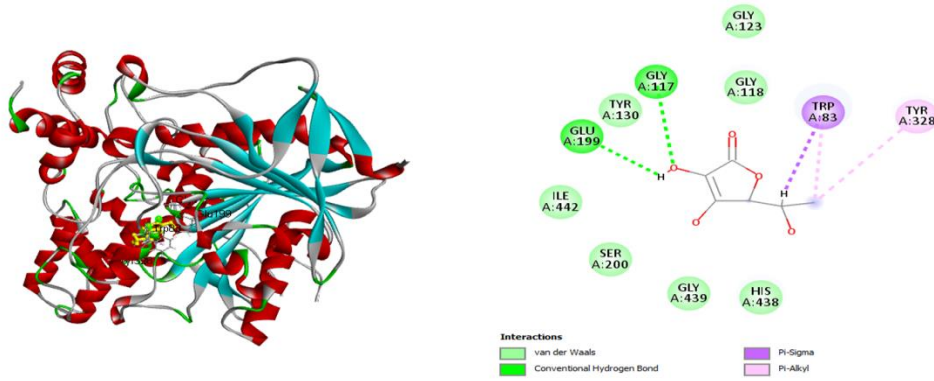
- Karbon Hidrojen Bağı (HIS A:447),
- Pi-Alkil (TYR A:337; PHE A:338)
- Pi-Sigma (TRP A:86) şeklinde bulunmuştur.



Şekil 4.16 AChE ile absisik asit arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri

Askorbik asit ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere askorbik asit molekülü AChE enzimin aktif bölgesinin aminoasit rezidüleri arasındaki etkileşimler;

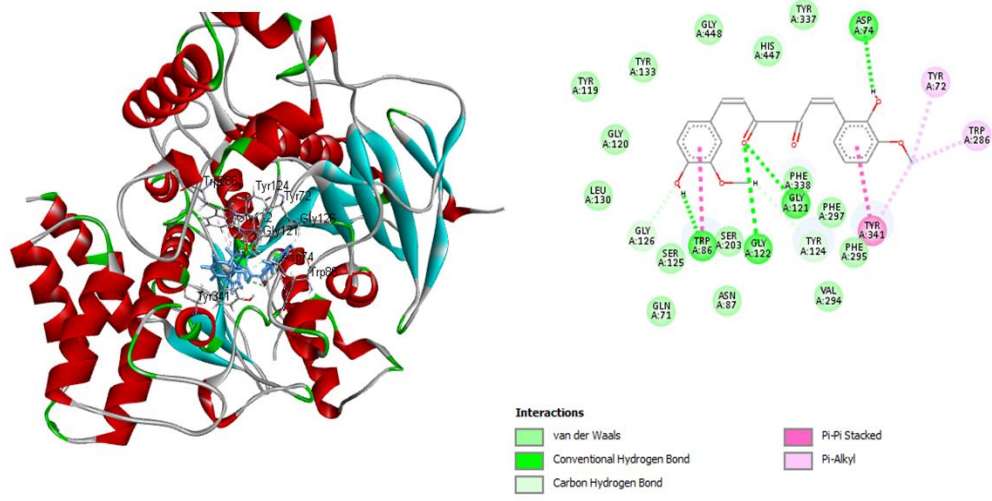
- Konvansiyonel Hidrojen (GLY A:117; GLU A:199),
- van der Waals etkileşimi (GLY A:118; GLY A:123; TYR A:130; SER A:200; HIS A:438; GLY A:439; ILE A:442),
- Pi-alkil bağı (TYR A:328) ve Pi-Sigma (TRP A:83) şeklinde bulundu.



Şekil 4.17 AChE ile askorbik asit arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri

Kurkumin ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere kurkumin molekülü AChE enzimin aktif bölgesinin amino asit rezidüleri arasındaki etkileşimler;

- Konvansiyonel Hidrojen (ASP A:74; TRP A:86; GLY A:121; GLY A:122),
- Karbon-Hidrojen Bağı (TYR A:124),
- van der Waals etkileşimleri (GLN A:71; ASN A:87; GLY A:120; SER A:125; GLY A:126; TYR A:119; LEU A:130; TYR A:133; TYR A:337; HIS A:444; GLY A:448; ILE A:442),
- Pi-Pi (TYR A:328; PHE A:329; TYR A:332) şeklinde bulundu.



Şekil 4.18 AChE ile kurkumin arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisi endüstriyel anlamda pek çok alanda kullanılmaktadır. Son yıllarda birçok ülkede endüstriyel anlamda kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Bitkiden elde edilen kök, sap, çiçekler ve yaprak gibi kısımlarından farklı ürünler elde edilmiştir. Örneğin lif kısımlarından urgan, ip, halat vb. ürünler elde edilmiştir. Halen ülkemizde tarım sanayisine kazandırılmak üzere 20 ilimizde üretimine izin verilerek ekonomik kalkınmada oldukça etkili olmuştur (Yılmaz ve Yazıcı, 2022). Ayrıca uzun yıllar boyunca bitkiye ait tohum ve lif kısımlarından faydalanılarak çeşitli amaçlarla kâğıt, tekstil, kozmetik, ilaç sanayisi gibi birçok alanda hammadde olarak kullanılmaktadır (Yıldırım ve Çalışkan, 2020).

Aromatik ve doğal bitkiler sadece besin kaynağı olarak değil aynı zamanda antioksidan, antibakteriyel ve antimikrobiyal kaynak olarak pek çok biyolojik aktiviteye sahiptirler. Yapılan çalışmalarda bu tür bitkilerin antioksidan özellik göstererek serbest radikalleri giderdiği tespit edilmiştir.

İnsan sağlığını olumsuz etkileyen ve hastalıkların oluşumunun başında serbest radikallerin etkisi görülmektedir. Tüketilen hazır gıdaların birçoğunun içeriğinde katkı maddeleri olduğundan gıda endüstrisinde, antioksidanlar yaygın olarak bulunmaktadır. Gıdaların içinde bulunan antioksidanlar, ürünün erkenden bozulmasını ve küflenmesini önleyerek raf ömürlerini uzatmaktadır (Bursal ve ark., 2021b).

Metabolik aktivitelerimizin devamı için gıdalardan besin öğelerini temin etmekteyiz. Bazı besin öğeleri antioksidan bileşikler içerdiğinden sağlığımızı olumlu yönden etkilemektedirler. Sağlıklı beslenmede antioksidanların büyük önemi vardır ancak dengesiz beslenme neticesinde vücudumuzda birçok etki oluşturan serbest radikaller türemektedir. Redüksiyon ve oksidasyon reaksiyonları organizmada normal olarak serbest radikaller oluşturduğu gibi farklı dış kaynaklar sebebiyle de oluşabilmektedir. Antioksidanlar oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıran veya azaltıcı etkiye sahip bileşiklerdir. Doğal olarak alınan antioksidanlar savunma mekanizmasını kuvvetlendiren, bireyin metabolik faaliyetlerini dengeleyen unsurların başında gelmektedir doğal antioksidanlar daha çok hayvan ve bitki dokularında görülen bileşiklerdir (Öğüt, 2014).

Bu çalışmada kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin antioksidan etki ve aktivitelerini belirlemek hedeflenmiştir.

Antioksidan ölçümleri için ABTS radikal temizleme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal temizleme aktivitesi, ferrik iyon indirgeme gücü (FRAP) ve bakır indirgeme gücü (CUPRAC) *in vitro* biyoanaliz yöntemleri kullanılarak incelendi.

Çalışmanın bu aşamasında antioksidan özellikte olan standart BHT, askorbik asit ve a-tokoferolün farklı konsantrasyonlu ekstreleri ile kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin köklerinden, liflerinden, yapraklarından ve tüm kısımlarından elde edilen farklı konsantrasyonlu ekstreler karşılaştırılıp radikal giderme için ABTS ve DPPH yöntemleri kullanıldı.

ABTS+ radikal temizleme yöntemi çalışmasında, kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinden elde edilen lif kısmındaki numunenin iyi bir sonuç vermediği absorbansın artan konsantrasyonlarda dalgalı artış gösterdiğinden antioksidan özellikte olmadığı ancak bitkinin diğer kısımlarına ait ekstrelerin artan konsantrasyon miktarına karşılık absorbans değerinin düştüğü gözlemlendiğinden bu kısımların, standart bir antioksidanlar kadar radikal temizleme aktivitesi olmasa da düşük değerlerde antioksidan özelliklere sahip olduğu görüldü.

DPPH serbest radikal temizleme yöntemi, kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin lif kısmındaki numunenin ABTS yönteminde olduğu gibi iyi bir sonuç vermediği artan konsantrasyon miktarına karşı absorbans değerlerinin arttığı dolayısıyla antioksidan özellik taşımadığı bulundu. Ancak kök, yaprak ve bitkinin tümüne ait kısımlarının ekstratlarını içeren numunelerin absorbans değerleri artan konsantrasyona bağlı olarak az miktarda azalma gözlemlendiğinden bitkiye ait bu kısımların DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi yöntemine göre antioksidan eğilimlerinin ABTS yönteminde olduğu gibi çok az olduğu sonucuna varıldı.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin farklı kısımlarının farklı konsantrasyonlu ekstrelerin içeriğindeki maddelerin radikallere elektron sağlayarak indirgeme kapasiteleri antioksidan tayini FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile denendi.

FRAP metodu ile kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin sadece lif kısmındaki numunenin artan konsantrasyon miktarı ile absorbans değerinin arttığı ancak bitkiye ait diğer kısımlardaki numuneler de bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. En yüksek antioksidan etkiyi FRAP yöntemi ile kenevir bitkisinin lif kısmı numunesi göstermiştir. Bu durumda kenevir bitkisinin lif kısmına ait numune FRAP yöntemine göre antioksidan özellikte olduğu sonucuna varıldı.

CUPRAC metodunda kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin lif, yaprak ve bitkinin tümüne ait kısımları ile BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini) ve α - tokoferol (E vitamini) standartlarının indirgeme aktiviteleri konsantrasyona bağlı olarak genel olarak artmış ancak bitkiye ait kök kısmının indirgeme aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak yok denilecek kadar az eğilim gösterdiği anlaşılmış, en yüksek antioksidan etki BHT, askorbik asit ve kenevir tüm kısmına ait numune gösterdiğinden bu numunelerin antioksidan özellik 'de oldukları sonucuna varıldı.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) HPLC ile içerik analizleri çalışılmış ve bitkinin yaprak, kök, lif ve tümüne ait kısımlarının tamamında kantitatif olarak belirlenen miktarca en fazla majör organik bileşik absisik asit olarak tespit edildi. Bitkinin ayrı ayrı kısımları incelendiğinde lif kısmında; askorbik asit, absisik asit ve apigenin, kök kısmında; absisik asit ve askorbik asit, yaprak kısmında; absisik asit, bitkinin tümüne ait kısımda ise kurkumin ve apigenin bileşikler tespit edildi.

Yapılan bu çalışmalar neticesinde kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin yaprak, kök, lif ve tümüne ait kısımlarına ait etanol ekstraktları üzerinde kantitatif ve kalitatif olarak çeşitli fenolik bileşik ihtiva ettiği sonucuna varıldı.

Fenolik bileşikler tek ya da daha fazla aromatik halka ile benzer şekilde tek veya daha fazla hidroksil grubuyla birlikte karakterize edilen aromatik maddelerdir. Üzerlerinde ihtiva ettikleri fenol zincirlerinin miktarına ve birbirlerine bağlanmış yapısal elementlere göre tanenler, flavonoidler, lignanlar, stilbenler, fenolik asitler ve oksitlenmiş polifenoller olarak sınıflandırılmıştır (Manach, 2004).

Ayrıca kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisine ait kısımların ekstraktlarının AChE enzimi üzerine etkisi *in vivo* ve *in silico* olarak belirlenmiştir. *In vivo* enzim inhibisyonu çalışmasında asetilkolinesteraz enzimi için sıklıkla kullanılan biyoanalitik bir yöntem uygulanmıştır. Çalışmada AChE inhibisyon yüzdeleri 5 $\mu\text{g/mL}$ -25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları aralığında ölçüldü. Enzimin inhibitörü olan standart takrin ile mukayese edildiğinde özellikle kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak etanol ekstresinin çok güçlü inhibisyon etki gösterdiği anlaşıldı.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak ve lif etanol ekstraktlarının ve takrinin AChE enziminin %50'sini inhibe eden konsantrasyonları yani IC_{50} değerleri hesaplandı. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) yaprak etanol ekstresinin standart takrinden daha düşük IC_{50} değeri olduğu için takrine göre daha iyi inhibitör olduğu sonucuna varıldı. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) lif etanol ekstresinin IC_{50} değeri ile standart takrin IC_{50} değerleri birbirlerine

çok yakın çıktığı için bu sonuçlara göre benzer AChE inhibisyonu gösterdiği sonucuna varıldı.

In silico enzim inhibisyonunun tespiti için AutoDock Vina bilgisayar programı kullanılarak AChE enzimi ile absisik asit, apigenin, askorbik asit ve kurkumin bileşikleri arasındaki moleküler etkileşimler bulunmuştur. Enerji seviyesindeki düşük değer enzim ile molekül arasındaki yüksek bağlanma etkileşimini ifade etmektedir.

Absisik asit, apigenin, askorbik asit ve kurkumin fenolik bileşiklerinin bağlanma enerjileri belirlenirken standart olarak bilinen takrin bileşiğinin bağlanma enerjisine yakın değerde olduğu bulundu.

5.2 Öneriler

Sonuç olarak bu tez çalışması verilerine göre kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin yüksek miktarda olamasa da kullanılan standart maddelere kıyasla orta seviyede antioksidan özelliğe sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Bitkinin fenolik içerik yönünden HPLC analizi sonuçlarından anlaşılabileceği üzere oldukça çeşitli kimyasal bileşikler ihtiva ettiği söylenebilir. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkisinin belirlemiş olduğumuz fenolik içerikleri açısından önemli bir kaynak olduğu yine üretimi ve katkıda bulunduğu alanlar ele alındığında endüstriyel ve ekonomik açıdan değerli bir ürün olduğu, antioksidan etkisi ile tıp ve eczacılık alanlarında değerlendirileceği, ekstrelerinin veya etken maddelerinin farklı enzimler üzerine inhibisyon etkisini inceleme çalışmalarının kıymetli olduğu ve bu alana katkı sunacağı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmalara ek olarak farklı metotlar ile bitkinin zengin içeriği araştırılarak *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akgül, A. 2014. Türkiye'de yasadışı kenevir ekimi ve mücadele politikaları, Uluslararası Güvenlik ve Terörizm Dergisi, 5 (1), 119-140.
- Akyüz, E. (2011). *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* ve bazı endemik digitalis türlerinin ekstraktlarında mevcut kardiyak glikozitleri ve fenolik bileşiklerin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi.
- Ali, E.M., Almagboul, A.Z., Khogali, S.M., Gergeir, U.M. 2012. Antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L, Chinese Medicine, 3 (1), 61-64.
- Ames, B.M. Shigena, M.K. and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antiaxidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 90, 7915-7922.
- Andre, C.M., Hausman, J.-F., Guerriero, G. 2016. *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules, *Frontiers in plant science*, 7, 1-17.
- Anonim, 2019, Kenevir Yetiştiriciliği, https://www.oran.org.tr/images/dosyalar/20190318134910_0.pdf[Erişim Tarihi: 2022].
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (26), 7970-7981.
- Aslan, K., Yılmaz, M., Gülçin, İ., 2023, Mavi Haşhaş Ekstrelerinin Antioksidan Kapasitelerinin ve Bazı Metabolik Enzimler Üzerine Etkilerinin Araştırılması ve Fitokimyasal İçeriğinin LC MS/MS Kromatografisi Tekniği ile Aydınlatılması, *XXI. Kromatografi Kongresi*, Aydın, Türkiye, 90.
- Bakanlık, G.T.v.H. 2016. Kenevir Yetiştiriciliği ve Kontrolü Hakkında Yönetmelik, Türkiye Cumhuriyeti Devleti. Resmi Gazete.
- Balcı, N., Çelik, H., Türkan, F., Çelebioğlu, N., Çelik, T., & Bursal, E. (2023). Schiff Base Synthesis with a New Reliable Method and Investigation of Their Inhibition Effects on Glutathione S-Transferase and Cholinesterase Enzymes. *ChemistrySelect*, 8(18), e202204566.
- Baykal, A., 1998. Serbest radikaller, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, Kars.
- Bernstein, N., Gorelick, J., Koch, S. 2019. Interplay between chemistry and morphology in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.), *Industrial Crops and Products*, 129, 185-194.
- Blekas, G., Boskou, D. 1998. Antioxidative activity of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid and α -tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. Effect of acidity, *Grasas y aceites*, 49 (1), 34-37.
- Bottcher, H. 1965. Miracle drugs. *Zagreb: Zora*, 23-139.
- Boualı, M. (2021), "Kenevir (*Cannabis sativa*) bitkisinde bulunan majör kannabinoidlerin tanımlanması ve ekstraksiyon yöntemlerinin optimizasyonu", Yüksek Lisans, *Biyokimya*, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 89.
- Bouayed, J., Bohn, T. 2010. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3 (4), 228-237.
- Boyle, N.A., Talesa, V., Giovannini, E., Rosi, G., Norton, S.J. 1997. Synthesis and study of thiocarbonate derivatives of choline as potential inhibitors of acetylcholinesterase, *Journal of medicinal chemistry*, 40 (19), 3009-3013.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bryan, C.P., 1931, *The papyrus ebers*, D. Appleton, London,
- Bursal, E. (2009), "Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu", Doktora Tezi, *Fen bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Taslimi, P., Gören, A. C., & Gülçin, İ. (2019). Phytochemical content, antioxidant activity, and enzyme inhibition effect of *Salvia eriophora* Boiss. & Kotschy against acetylcholinesterase, α -amylase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes. *Journal of food biochemistry*, 43(3), e12776.
- Bursal, E., Yılmaz, M. A., Aras, A., Türkan, F., Yildiko, Ü., Kılıç, Ö., & Dey, A. (2021a). Determination of phenolic content, biological activity, and enzyme inhibitory properties with molecular docking studies of *Rumex nepalensis*, an endemic medicinal plant. *Journal of Food and Nutrition Research*, 9(3), 114-123.
- Bursal, E., Aras, A., Doğru, M., Kılıç, Ö. (2021b). Phenolic content, antioxidant potentials of *Saponaria prostrata* endemic plant, *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 5 (1), 1-8.
- Cetin, A., Türkan, F., Bursal, E., & Murahari, M. (2021). Synthesis, characterization, enzyme inhibitory activity, and molecular docking analysis of a new series of thiophene-based heterocyclic compounds. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 57(4), 598-604.
- Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11, 1-10.
- Çapcıoğlu, İ., Kenevir, F. 2017. Türkiye’de Din Sosyolojisinin Kurumsallaşması Sürecinde Ankara Üniversitesi İlahiyat Fakültesi, *İslami İlimler Dergisi*, 12 (1).
- Desborough, M.J., Keeling, D.M. 2017. The aspirin story—from willow to wonder drug, *British journal of haematology*, 177 (5), 674-683.
- Dimitrova, Z. (1999). The history of pharmacy. *Sofija: St Clement of Ohrid*, 13-26.
- Dündar, Y., 2000, Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar, *Afyon Kocatepe Üniversitesi*, Afyon,
- Ekici, L., Sağdıç, O. 2008. Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu, *Gıda*, 33 (5), 251-260.
- Elmastas, M., Gulcin, I., Ozturk, L., Gokce, I. 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.), *Asian Journal of Chemistry* 17, 137-148.
- Engin, M.S. (2007), "Taflan (*Laurocerasus officinalis* Roem.) bitkisinin meyve, çekirdek ve yapraklarının mevsim değişikliğine göre antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik tayini", Yüksek Lisans, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat,
- Erol, H.S. 2020. İnflamasyon ve serbest radikaller. in: *Sağlık Bilimleri Alanında Güncel Çalışmalar*, (Eds.) G. Goncagül, E. Günaydın, Duvar Yayınları. Ankara, pp. 71.
- Farag, S., Kayser, O. 2017. The cannabis plant: botanical aspects. in: *Handbook of cannabis and related pathologies*, (Ed.) V.R. Preedy, Elsevier, pp. 3-12.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. 2006. Oxidative stress: relationship with exercise and training, *Sports medicine*, 36, 327-358.

- Göre, M., Kurt, O. 2020. Bitkisel üretimde yeni bir trend: Kenevir, *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4 (1), 138-157.
- Gözükara, E.M., 1990, *Biyokimya, Reprint LTD.ŞTİ.*, Ankara, 1103.
- Gulcin, İ., Şat, I., Beydemir, G., Elmastaş, Ş., Küfrevioğlu, O.I. 2004. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.), *Food Chem*, 87, 393-400.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Şifalı bitkiler: dünün gelenekleri ve yarının ilaçları. *Tıbbın moleküler yönleri*, 27 (1), 1-93.
- Güven, A. 2000. Asetilkolinesterazın önemi ve inhibitörleri, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6 (1-2), 145-151.
- Harhaun, R., Kunik, O., Saribekova, D., Lazzara, G. 2020. Biologically active properties of plant extracts in cosmetic emulsions, *Microchemical Journal*, 154, 104543.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş. 2016. Antioksidanlar, *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1 (1), 65-76.
- Karakaş, Ö. (2019). Çeşitli deniz alglerinin antioksidan bileşenlerinin ve toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi (Master's thesis, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü).
- Kent, M., 2015, *Advanced biology, Oxford University Press-Children*,
- Kohen, R., Nyska, A. 2002. Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic pathology*, 30 (6), 620-650.
- Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., Gulcin, I. 2011. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (2), 217-222.
- Konukoğlu, D. 2007. Serbest radikaller ve önemleri, *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 1 (4), 197-200.
- Köksal, E., Gülçin, I., Beyza, S., Sarıkaya, O., Bursal, E. 2009. In vitro antioxidant activity of silymarin, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24 (2), 395-405.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports*, 24, e00370.
- Kurtuldu, E., İşmal, Ö.E. 2019. Sürdürülebilir tekstil üretim ve tasarımında yeniden değer kazanan lif: Kenevir, *Art-E*, 12 (24).
- Larson, R.A., 1998. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.
- Lolak, N., Akocak, S., Türkeş, C., Taslimi, P., Işık, M., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Durgun, M. 2020. Synthesis, characterization, inhibition effects, and molecular docking studies as acetylcholinesterase, α -glycosidase, and carbonic anhydrase inhibitors of novel benzenesulfonamides incorporating 1, 3, 5-triazine structural motifs, *Bioorganic chemistry*, 100, 103897.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L. 2004. Polifenoller: gıda kaynakları ve biyoyararlanım. *Amerikan klinik beslenme dergisi*, 79 (5), 727-747.
- Melanson, S.W., Yun, C.-h., Pezzementi, M.L., Pezzementi, L. 1985. Characterization of acetylcholinesterase activity from *Drosophila melanogaster*, *Comparative Biochemistry and physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 81 (1), 87-96.
- Mccord, J.M. 1993. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance, *Clinical biochemistry*, 26 (5), 351-357.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993).

- A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 84(4), 407-412.
- Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. 2013. Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler, *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 13 (1), 48-59.
- Onat, K. A., Sezer, M., & Cöl, B. (2021). Fenolik bileşiklerden Sinamik Asit, Kafeik Asit ve p-kumarik Asit'in bazı biyolojik aktiviteleri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(4), 2587-2598.
- Oral, A. R. (2011). Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Üretilmesi, Bazı Fenolik Bileşiklerin ve Ekstraktların Maillard Reaksiyon Ürünleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Erciyes Üniversitesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kayseri*.
- Öğüt, S. 2014. Doğal antioksidanların önemi, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11 (1), 25-30.
- Petrovska, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacognosy reviews*, 6 (11), 1.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health, *International journal of biomedical science: IJBS*, 4 (2), 89.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (10), 4290-4302.
- Saleh, M.M., Hashem, F.A.E.-M., Glombitza, K.W. 1998. Study of Citrus taitensis and radical scavenger activity of the flavonoids isolated, *Food chemistry*, 63 (3), 397-400.
- Shapovalov, M. V., & Dunbrack, R. L. (2011). A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*, 19(6), 844-858.
- Sovilj, M. ve Spasojević, M. (2001). Yerli şifalı bitkilerden uçucu yağların üretimi ve uygulanması. *Kişisel gizlilik/PTEP ile enerji ve enerji sağlama sürecinin özeti*, 5 (1-2), 34-38.
- Teber, İ., & Bursal, E. (2020). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Nepeta nuda* subsp. *albiflora*. *International Letters of Natural Sciences*, 79.
- Tutuş, A., Çiçekler, M., Yemşen, B., Kara, S.B., Sözbir, T. 2021. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) saplarından kağıt hamuru ve kağıt üretiminin araştırılması, *Turkish Journal of Forestry*, 22 (3), 311-317.
- Türkan, F., Taslimi, P., Cabir, B., Ağırtaş, M. S., Erden, Y., Celebioglu, H. U., & Gulcin, I. (2022). Co and Zn Metal phthalocyanines with bulky substituents: anticancer, antibacterial activities and their inhibitory effects on some metabolic enzymes with molecular docking studies. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 42(7), 4475-4486.
- Tsao, R., & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of chromatography B*, 812(1-2), 85-99.
- van Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview, *Current Opinion in biotechnology*, 13 (4), 338-344.
- Vermerris, W. ve Nicholson, R. (2007). *Fenolik bileşik biyokimyası*. Springer Bilim ve İşletme Medyası.
- Walz, C., Juenger, M., Schad, M., Kehr, J. 2002. Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes, *The Plant Journal*, 31 (2), 189-197.

- Wong, P.Y., Kitts, D.D. 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts, Food chemistry, 97 (3), 505-515.
- Yaman, Z. (2021), "Kenevir tohumu yağının esansiyel yağ asitlerinin belirlenmesi ve akciğer kanser hücresi üzerinde in vitro olarak antikanserojenik özelliğinin araştırılması", Yüksek Lisans, *Biyoloji*, İnönü Üniversitesi, Malatya, 81.
- Yıldırım, S., Çalışkan, U.K. 2020. Kenevir ve sağlık alanında kullanımı, Ankara Ecz. Fak. Dergisi, 44 (1), 112-136.
- Yılmaz, G., Yazıcı, L. 2022. Dünya’da Yükselen Değer; Endüstriyel Kenevir (*Cannabis sativa* L.), Bozok Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 1 (1), 54-61.
- Yılmaz, M. A., Taslimi, P., Kılıç, Ö., Gülçin, İ., Dey, A., & Bursal, E. (2023). Unravelling the phenolic compound reserves, antioxidant and enzyme inhibitory activities of an endemic plant species, *Achillea pseudoaleppica*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(2), 445-456.

