





**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**BAZI TIBBİ BİTKİLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ VE AKTİF FENOLİK BİLEŞİKLERİN  
ANALİZİ**

**Hazırlayan  
Fatma Gülrüy AYDIN**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Üyesi Emir Alper TÜRKOĞLU**

**Farmakognozi Anabilim Dalı  
Farmakognozi Yüksek Lisans Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ARALIK 2020**

## BAZI TIBBİ BİTKİLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE AKTİF FENOLİK BİLEŞİKLERİN ANALİZİ

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı *Achillea setacea*, *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*, *Tanacetum macrophyllum*, *Paeonia mascula* subsp. *arietina*, *Plantago lanceolata* ve *Hypericum perforatum* bitkilerinden elde edilen farklı ekstrelerin (petrol eteri, kloroform, etanol) biyolojik aktivitelerini (antioksidan, antiasetilkinesteraz, antiüreaz ve esteraz aktiviteleri) incelemek ve güçlü biyolojik aktivite gösteren ekstrelerin içerdiği majör fenolik bileşikler HPLC-DAD sistemi ile analiz etmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Bitkilerden elde edilen farklı ekstrelerin içerdiği total fenolik madde miktarı FCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH, CUPRAC, FRAP ve ABTS/TEAC yöntemleriyle incelenmiştir. Ayrıca ekstrelerin antiasetilkinesteraz, antiüreaz ve esteraz aktiviteleri sırasıyla Ellman, İndofenol ve Esteraz yöntemleri ile tayin edilmiştir. Güçlü aktivite gösteren ekstrelerin içerdiği majör fenolik bileşikler HPLC-DAD ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Elde edilen sonuçlara göre *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkisinden elde edilen etanol ekstresi antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden DPPH ( $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,0001$  mg/mL) ve ABTS/TEAC ( $52,843 \pm 0,0001$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) yöntemlerinde en güçlü aktivite göstermiştir. Aynı ekstre insan karbonik anhidraz (hCA) II enzimini en güçlü inhibe eden ekstre ( $IC_{50}$ :  $0,0028$  mg/mL;  $K_i$ :  $0,0019$  mg/mL) olarak belirlenmiştir. *T. macrophyllum* bitkisinden elde edilen kloroform ekstresinin ( $0,733 \pm 0,035$  mM  $FeSO_4$ /mg ekstre) en iyi demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücünü (FRAP) gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteye *Achillea setacea* bitkisinden elde edilen etanol ekstresinin ( $5,502 \pm 0,072$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu ekstre aynı zamanda diğer ekstrelerden daha yüksek antiüreaz ( $\%13,475 \pm 3,710$ ) aktivite göstermiştir. Antiasetilkinesteraz aktivite sonuçları incelendiğinde en yüksek inhibisyon *A. millefolium* subsp. *millefolium* bitkisinin kloroform ekstresinde ( $\%82,819 \pm 2,747$ ) görülmüştür.

**Sonuç:** Etkili biyoaktivite gösteren bitkiler iyileştirici potansiyele sahiptir ve daha ileri araştırmalar ile ila sanayinde yeni bulguların elde edilebilmesini sağlayabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** antioksidan, antiasetilkolinesteraz, antiüreaz, esteraz, HPLC-DAD



## INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME MEDICAL PLANTS AND ANALYSIS OF ACTIVE PHENOLIC COMPOUNDS

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to examine the biological activities (antioxidant, antiacetylcholinesterase, antiurease and esterase activities) of different extracts (petroleum ether, chloroform, ethanol) obtained from *Achillea setacea*, *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*, *Tanacetum macrophyllum*, *Paeonia mascula* subsp. *arietina*, *Plantago lanceolata* and *Hypericum perforatum* using the Soxhlet extraction and to determine the major phenolic substances contained in extracts with strong biological activity with HPLC-DAD system.

**Material and Methods:** The total amount of phenolic substance in the extracts prepared by the Soxhlet extraction was determined using the FCR method. The antioxidant activities of the extracts were examined by DPPH, CUPRAC, FRAP and ABTS/TEAC methods. Antiacetylcholinesterase, antiurease and esterase activities of different extracts were determined by Ellman, Indophenol and Esterase methods, respectively. Major phenolic substances contained in the strongly active extracts were analyzed by HPLC-DAD system.

**Results:** According to the results, ethanol extract obtained from *Paeonia mascula* subsp. *arietina* showed the strongest activity in the antioxidant activity determination methods DPPH ( $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,0001$  mg/mL) and ABTS/TEAC ( $52,843 \pm 0,0001$  mM Trolox equivalent/mg extract). The same extract was determined as the most potent inhibitor of human carbonic anhydrase (hCA) II enzyme ( $IC_{50}$ :  $0,0028$  mg/mL;  $K_i$ :  $0,0019$  mg/mL). It was determined that chloroform extract ( $0,733 \pm 0,035$  mM  $FeSO_4$ /mg extract) obtained from *T. macrophyllum* showed the best iron (III) ion reducing antioxidant power (FRAP). It was determined that ethanol extract ( $5,502 \pm 0,072$  mM Trolox equivalent/mg extract) obtained from *Achillea setacea* plant had the highest copper (II) ion-reducing antioxidant capacity. This extract also showed higher antiurease ( $13,475\% \pm 3,710$ ) activity than other extracts. When the antiacetylcholinesterase activity results were examined, the highest inhibition was

observed in the chloroform extract of *A. millefolium* subsp. *millefolium* (82,819%±2,747).

**Conclusion:** Plants with effective bioactivity have therapeutic potential and provide new findings in the pharmaceutical industry.

**Keywords:** antioxidant, antiacetylcholinesterase, antiurease, esterase, HPLC-DAD



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin planlanmasında, yürütülmesinde, gerekli ortamın sağlanmasında ve tezin her aşamasında sonsuz tecrübesini, bilgisini, zamanını paylaşan; karşılaştığım her zorlukta yardımlarını esirgemeyen, yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emir Alper TÜRKOĞLU'na,

Tez çalışmam kapsamında mesleki bilgi ve tecrübelerini büyük bir sabır ve özveri ile aktaran, yüksek lisans tez çalışmamda sahip olduğu tüm olanakları çalışmalarım için kullanmamı sağlayan değerli eş danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Turgut TAŞKIN'a,

Tez verilerinin analizleri sırasında yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu TAŞKIN'a,

Tezin raporlama, son okuma ve kontrol süreçlerinde yardım ve desteğini esirgemeyen, değerli zamanını ayıran Sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu TÜRKOĞLU'na,

Tüm hayatım boyunca bana her türlü konuda destek olan aileme,

Sevgi, teşekkür ve saygılarımı iletiyorum.

*Yüksek lisans tez çalışmamı, tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her türlü fedakarlığı yapan, hedeflerime ulaşmamda çok büyük katkıları olan, değerli 'Babama' ithaf ediyorum.*

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin 2019/073 numaralı projesiyle desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                              |      |
|------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                    | iv   |
| ABSTRACT.....                                                                | vi   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                | viii |
| İÇİNDEKİLER .....                                                            | ix   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                       | xiii |
| ÇİZELGELER LİSTESİ .....                                                     | xv   |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ .....                                        | xvii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                       | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                      | 5    |
| 2.1. SERBEST RADİKALLER.....                                                 | 5    |
| 2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri .....                                         | 5    |
| 2.1.1.1. Süperoksit radikali .....                                           | 5    |
| 2.1.1.2. HO• radikali.....                                                   | 6    |
| 2.1.1.3. Hidrojen peroksit.....                                              | 6    |
| 2.1.1.4. Singlet oksijen.....                                                | 6    |
| 2.1.2. Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı .....                      | 6    |
| 2.1.3. Reaktif Azot Türleri (RAT) .....                                      | 7    |
| 2.1.3.1. Nitrikoksit radikali .....                                          | 7    |
| 2.1.3.2. Peroksinitrit .....                                                 | 7    |
| 2.1.4. Serbest Radikallerin Biyolojik Roller ve Biyomoleküllere Zararı ..... | 7    |
| 2.2. OKSİDATİF STRES.....                                                    | 8    |
| 2.2.1. Antioksidan Sistem .....                                              | 9    |
| 2.3. ALZHEİMER HASTALIĞI .....                                               | 9    |
| 2.3.1. Hastalığın Patolojisi .....                                           | 10   |
| 2.3.2. AH için Güncel Tedavi Stratejileri .....                              | 10   |
| 2.4. KOLİNESTERAZLAR.....                                                    | 11   |
| 2.4.1. Asetilkolinesteraz.....                                               | 12   |
| 2.4.2. Bütirilkolinesteraz .....                                             | 12   |
| 2.5. <i>Helicobacter pylori</i> .....                                        | 13   |
| 2.5.1. Genel Özellikler .....                                                | 13   |
| 2.5.2. Epidemiyoloji.....                                                    | 13   |
| 2.5.3. Patogenez .....                                                       | 14   |

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.4. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tanı Yöntemleri .....                                         | 15 |
| 2.5.5. Tedavi.....                                                                                   | 15 |
| 2.6. ÜREAZ ENZİMİ .....                                                                              | 16 |
| 2.7. GLOKOM .....                                                                                    | 16 |
| 2.7.1. Hastalığın Patolojisi .....                                                                   | 17 |
| 2.8. KARBONİK ANHİDRAZLAR.....                                                                       | 17 |
| 2.8.1. Karbonik Anhidraz II .....                                                                    | 18 |
| 2.8.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri .....                                                         | 18 |
| 2.9. ÇALIŞMADA KULLANILAN BİTKİLER.....                                                              | 19 |
| 2.9.1. <i>Hypericum perforatum</i> L.....                                                            | 19 |
| 2.9.2. <i>Achillea millefolium</i> L. subsp. <i>millefolium</i> L.....                               | 20 |
| 2.9.3. <i>Achillea setacea</i> Waldst. et Kit .....                                                  | 21 |
| 2.9.4. <i>Tanacetum macrophyllum</i> (Waldst. et Kit.) Schultz Bip. ....                             | 22 |
| 2.9.5. <i>Paeonia mascula</i> (L.) Miller subsp. <i>arietina</i> (Anders.) Cullen et Heywood...      | 23 |
| 2.9.6. <i>Plantago lanceolata</i> L.....                                                             | 24 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                                             | 25 |
| 3.1. GEREÇ.....                                                                                      | 25 |
| 3.1.1 Bitkisel Materyali.....                                                                        | 25 |
| 3.1.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler .....                                              | 25 |
| 3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....                                                                | 25 |
| 3.1.3.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini için gerekli olan çözeltiler.....                       | 25 |
| 3.1.3.2. DPPH serbest radikal giderme kapasitesi tayini için gerekli olan çözelti.....               | 26 |
| 3.1.3.3. ABTS katyon radikal giderme kapasitesi tayini için gerekli olan çözeltiler. 26              |    |
| 3.1.3.4. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini için gerekli olan çözeltiler..... | 26 |
| 3.1.3.5. CUPRAC aktivite deneyinde kullanılan çözeltiler .....                                       | 27 |
| 3.1.3.6. Karbonik anhidraz aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....                        | 27 |
| 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....                                                           | 27 |
| 3.2. YÖNTEM.....                                                                                     | 28 |
| 3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması.....                                                                 | 28 |
| 3.2.2. Fitokimyasal Ön Denemeler .....                                                               | 29 |
| 3.2.2.1. Flavon türevlerinin aranması .....                                                          | 29 |
| 3.2.2.2. Antrasen türevlerinin aranması .....                                                        | 29 |
| 3.2.2.3. Saponin aranması .....                                                                      | 29 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2.4. Tanen bileşiklerinin aranması .....                                                                                                                 | 29 |
| 3.2.2.5. Alkaloid aranması .....                                                                                                                             | 30 |
| 3.2.3. Ekstrelerin Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi.....                                                                                      | 30 |
| 3.2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri .....                                                                                                           | 31 |
| 3.2.4.1. DPPH radikali giderme aktivite tayini .....                                                                                                         | 31 |
| 3.2.4.2. ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini .....                                                                                                  | 31 |
| 3.2.4.3. Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP) .....                                                                                    | 32 |
| 3.2.4.4. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC).....                                                                              | 32 |
| 3.2.5. Antiüreaz Aktivite Tayin Yöntemi.....                                                                                                                 | 33 |
| 3.2.6. Antiasetilkolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi .....                                                                                                   | 33 |
| 3.2.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Esteraz Aktivite Tayini ve Kinetik Çalışmalar .....                                                                       | 34 |
| 3.2.8. HPLC-DAD Çalışma Şartları.....                                                                                                                        | 34 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                                                            | 37 |
| 4.1. FİTOKİMYASAL ÖN DENEME SONUÇLARI .....                                                                                                                  | 37 |
| 4.2. ANTiOKSiDAN AKTiViTE SONUÇLARI.....                                                                                                                     | 38 |
| 4.2.1. DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Tayini .....                                                                                                          | 38 |
| 4.2.2. ABTS/TEAC (Troloks Ekvivalenti Antioksidan Aktivite) Yöntemi.....                                                                                     | 42 |
| 4.2.3. Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü Tayini (FRAP).....                                                                                       | 46 |
| 4.2.4. Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi .....                                                                                        | 50 |
| 4.2.5. Ekstrelerin Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi.....                                                                                      | 54 |
| 4.3. ANTiASETiLKOLiNESTERAZ AKTiViTE.....                                                                                                                    | 58 |
| 4.4. ANTiÜREAZ AKTiViTE .....                                                                                                                                | 62 |
| 4.5. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN ESTERAZ AKTiViTESİ.....                                                                                                     | 66 |
| 4.5.1. <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i> Etanol Ekstresinin hCA II Enzimi için IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> Değerlerinin Hesaplanması..... | 70 |
| 4.6. HPLC-DAD ANALİZ SONUÇLARI.....                                                                                                                          | 72 |
| 4.6.1. <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i> Bitkisinin Etanol Ekstresinin HPLC-DAD Analiz Sonuçları.....                                            | 73 |
| 4.6.2. <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> Bitkisinin Kloroform Ekstresinin HPLC-DAD Analiz Sonuçları .....                                | 74 |
| 4.6.3. <i>Achillea setacea</i> Bitkisinin Etanol Ekstresinin HPLC-DAD Analiz Sonuçları.....                                                                  | 75 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                                                                            | 79 |
| 6. SONUÇLAR .....                                                                                                                                            | 85 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                                                              | 87 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ ..... | 97 |
|--------------------------------------|----|



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.1. Bitkiden elde edilen petrol eteri ekstrelerin $IC_{50}$ değerleri .....                                             | 39 |
| Şekil 4.2. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin $IC_{50}$ değerleri .....                                           | 40 |
| Şekil 4.3. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin $IC_{50}$ değerleri .....                                              | 41 |
| Şekil 4.4. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin ABTS değerleri .....                                             | 43 |
| Şekil 4.5. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin ABTS değerleri .....                                                | 44 |
| Şekil 4.6. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin ABTS değerleri .....                                                   | 45 |
| Şekil 4.7. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin FRAP değerleri .....                                             | 47 |
| Şekil 4.8. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin FRAP değerleri .....                                                | 48 |
| Şekil 4.9. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin FRAP değerleri .....                                                   | 49 |
| Şekil 4.10. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin CUPRAC değerleri .....                                          | 51 |
| Şekil 4.11. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin CUPRAC değerleri .....                                             | 52 |
| Şekil 4.12. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin CUPRAC değerleri .....                                                | 53 |
| Şekil 4.13. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı .....                              | 55 |
| Şekil 4.14. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı .....                                 | 56 |
| Şekil 4.15. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı .....                                    | 57 |
| Şekil 4.16. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin antiasetilkolinesteraz aktiviteleri .....                       | 59 |
| Şekil 4.17. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin antiasetilkolinesteraz aktiviteleri .....                          | 60 |
| Şekil 4.18. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin antiasetilkolinesteraz aktiviteleri .....                             | 61 |
| Şekil 4.19. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin antiüreaz aktiviteleri .....                                    | 63 |
| Şekil 4.20. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin antiüreaz aktiviteleri .....                                       | 64 |
| Şekil 4.21. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin antiüreaz aktiviteleri .....                                          | 65 |
| Şekil 4.22. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin hCA II inhibisyonu .....                                        | 67 |
| Şekil 4.23. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin hCA II inhibisyonu .....                                           | 68 |
| Şekil 4.24. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin hCA II inhibisyonu .....                                              | 69 |
| Şekil 4.25. hCA II enzimi için altı farklı substrat konsantrasyonu ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği .....               | 70 |
| Şekil 4.26. hCA II enziminin % aktivite- <i>[Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i> etanol ekstresi (mg/mL)] grafiği ..... | 71 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.27. hCA II enziminin % aktivite-[Asetazolamid (mg/mL)] grafiği ..... | 72 |
| Şekil 4.28. Tannik asit bileşiğinin spektrumu.....                           | 73 |
| Şekil 4.29. Rutin bileşiğinin spektrumu.....                                 | 74 |
| Şekil 4.30. Tannik asit bileşiğinin spektrumu.....                           | 74 |
| Şekil 4.31. 4-hidroksi benzoik asit bileşiğinin spektrumu .....              | 75 |
| Şekil 4.32. Vanilik asit bileşiğinin spektrumu .....                         | 75 |
| Şekil 4.33. Kafeik asit bileşiğinin spektrumu .....                          | 76 |
| Şekil 4.34. Rosmarinik asit bileşiğinin spektrumu .....                      | 76 |
| Şekil 4.35. Klorojenik asit bileşiğinin spektrumu.....                       | 76 |
| Şekil 4.36. Rutin bileşiğinin spektrumu.....                                 | 77 |



## ÇİZELGELER LİSTESİ

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. Bitkilerden elde edilen ekstreler ve verimleri (%) .....                                           | 28 |
| Çizelge 4.1. Bitkilerin fitokimyasal ön deneme sonuçları .....                                                  | 37 |
| Çizelge 4.2. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerin DPPH radikali süpürücü aktiviteleri .....         | 39 |
| Çizelge 4.3. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin DPPH radikali süpürücü aktiviteleri .....          | 40 |
| Çizelge 4.4. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin DPPH radikali süpürücü aktiviteleri .....             | 41 |
| Çizelge 4.5. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin ABTS katyon radikali süpürücü aktiviteleri..... | 43 |
| Çizelge 4.6. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin ABTS katyon radikali süpürücü aktiviteleri.....    | 44 |
| Çizelge 4.7. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin ABTS katyon radikali süpürücü aktiviteleri.....       | 45 |
| Çizelge 4.8. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin FRAP değerleri .....                            | 47 |
| Çizelge 4.9. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin FRAP değerleri.....                                | 48 |
| Çizelge 4.10. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin FRAP değerleri .....                                 | 49 |
| Çizelge 4.11. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin CUPRAC değerleri .                             | 51 |
| Çizelge 4.12. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin CUPRAC değerleri...                               | 52 |
| Çizelge 4.13. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin CUPRAC değerleri .....                               | 53 |
| Çizelge 4.14. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı .....             | 55 |
| Çizelge 4.15. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı .....                | 56 |
| Çizelge 4.16. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı .....                   | 57 |
| Çizelge 4.17. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin antiasetilkolinesteraz aktiviteleri .....      | 59 |
| Çizelge 4.18. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin antiasetilkolinesteraz aktiviteleri .....         | 60 |
| Çizelge 4.19. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin antiasetilkolinesteraz aktiviteleri .....            | 61 |
| Çizelge 4.20. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin antiüreaz aktiviteleri                         | 63 |
| Çizelge 4.21. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerinin antiüreaz aktiviteleri .                          | 64 |
| Çizelge 4.22. Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerinin antiüreaz aktiviteleri .....                         | 65 |

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.23. Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının hCA II inhibisyonu..                                                                                                        | 67 |
| Çizelge 4.24. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının hCA II inhibisyonu...                                                                                                          | 68 |
| Çizelge 4.25. Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının hCA II inhibisyonu .....                                                                                                          | 69 |
| Çizelge 4.26. <i>Achillea setacea</i> , <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> ve <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i> bitkilerinin içerdği fenolik bileşikler ..... | 73 |



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

|                        |                                                            |
|------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>ABTS</b>            | 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)         |
| <b>ACh</b>             | Asetilkolin                                                |
| <b>AChE</b>            | Asetilkolinesteraz                                         |
| <b>AH</b>              | Alzheimer hastalığı                                        |
| <b>CA</b>              | Karbonik anhidraz enzimi                                   |
| <b>CAI</b>             | Karbonik anhidraz inhibitörü                               |
| <b>CUPRAC</b>          | Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi          |
| <b>DPPH•</b>           | DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali               |
| <b>FCR</b>             | Folin ciocalteu fenol reaktifi                             |
| <b>FRAP</b>            | Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi |
| <b>GAE</b>             | Gallik asit eşdeğeri                                       |
| <b>GİB</b>             | Göz içi basınç                                             |
| <b>I</b>               | İnhibitör                                                  |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu      |
| <b>K<sub>i</sub></b>   | İnhibisyon sabiti                                          |
| <b>K<sub>M</sub></b>   | Michaelis-Menten sabiti                                    |
| <b>NMDA</b>            | N-metil-D-Aspartat                                         |
| <b>RNT</b>             | Reaktif azot türleri                                       |
| <b>ROT</b>             | Reaktif oksijen türleri                                    |
| <b>RST</b>             | Reaktif kükürt türleri                                     |
| <b>S</b>               | Substrat                                                   |
| <b>Troloks</b>         | 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit     |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif moleküller olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyerek ya da serbest radikallerin çoğalmasını durdurarak oksidasyonu geciktiren bileşiklerdir. Bitkiler genellikle güçlü  $H^+$  verici aktiviteye sahip yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşikler içermektedir (1-3).

Alzheimer hastalığı (AH), zihinsel işlevlerin zayıfladığı, ilerleyici bir beyin hastalığıdır (4). Kalp hastalıkları ve kanserden sonra maliyeti en yüksek hastalıklardan biridir (5). AH hastalarının beyinlerinde korteks ve hipokampüste asetilkolin aktivitesi ciddi bir şekilde düşmüştür. Bu yüzden asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri AH'nin semptomatik tedavisinde kullanılmaktadır (6).

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*); midede kolonize olabilen tek mikroorganizmadır. Bakteride bulunan üreaz enzimi alkali bir ortam oluşturmakta ve böylece bakteri ortamda yaşama şansı bulmaktadır. Tedavide kullanılan ilaçların başarısı, çeşitli yan etkiler yüzünden gölgede kalmaktadır. Bu nedenle daha etkili üreaz inhibitörlerine ihtiyaç duyulmaktadır (7,8).

Glokom hastalığı yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Aköz hümör göz içi basıncının sağlanmasında etkin rol almakta ve aköz hümörün salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi bulunmaktadır (9,10). Karbonik anhidraz enziminin inhibe edilmesiyle aköz hümörün salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncı düşürüleceğinden, karbonik anhidraz inhibitörleri glokom hastalığının tedavisinde etkili olarak kullanılmaktadır (11).

Bitkiler her zaman halk ilacı olarak ve yeni ilaçların keşfinde kullanılmıştır. Ülkemizde halk arasında sıklıkla tedavi amacı ile de kullanılan bitkiler yeni ilaç keşiflerinde oldukça önem arz etmektedir. Bitkilerin etkinliği kanıtlanmış birçok metaboliti bulunmaktadır ve etkinliği kanıtlanan bu moleküller çoğu zaman toksisite göstermemektedir. Tıbbi bitkilerin tedavi edici etkilerine karşı ilgi her geçen gün artmaktadır (12,13).

*Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) Avrupa'da ve ülkemizde antiflojistik, bronşiyal enflamasyonlara ve ürogenital sistem rahatsızlıklarına karşı, yara, yanık ve ülser tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkiden elde edilen yağ haricen antiseptik ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır. Bitki fenolik asitler, flavonoidler, naftodiantronlar ve floroglusinoller olmak üzere biyolojik aktiviteye sahip birçok bileşen içermektedir (14-17).

*Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium* L. (Asteraceae) halk arasında iştah açıcı, yara iyileştirici, idrar söktürücü ve gaz giderici olarak kullanılmaktadır. Klinik öncesi çalışmalar bitkinin antienflamatuvar, antiülser, hepatoprotektif ve anksiyolitik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir. Bitkide bulunan majör bileşenler fenolik asitler, tanenler, flavonoidler, uçucu yağ, seskiterpen laktonlar olarak bildirilmiştir (15,18).

*Achillea setacea* Waldst. et Kit (Asteraceae) bitkisinin toprak üstü kısımları dahilen infüzyon ve dekoksiyon halinde emenagog ve mide kuvvetlendirici olarak kullanılmaktadır (18). Bitkinin uçucu yağının majör bileşenleri ökaliptol ve sabinen olarak belirlenmiştir (19).

*Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *arietina* (Anders.) Cullen et Heywood (Paeoniaceae) bitkisinin geleneksel Çin Tıbbı'nda antikoagulant, antienflamatuvar, analjezik ve sedatif etkisinden dolayı kullanıldığı bildirilmektedir (20). Yapılan fitokimyasal araştırmalarda bu cinste bulunan türlerden paeonol glukozitleri, triterpenler, monoterpenler, monoterpen glukozitleri, asetofenonlar, flavonoidler ve tanen bileşikleri izole edilmiştir (21). Bu cinse ait bazı türlerin kök ve tohumlarından elde edilen ekstraktların güçlü antikolinesteraz aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (22).

*Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) halk arasında toprak üstü kısımları iltihap giderici, mikrop öldürücü, astıma karşı ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır. *Plantago lanceolata* L., laksatif ve diüretik etkili iridoitler (katalpol, akubin, asperulosit) ve antienflamatuvar etkili flavonoidler (apigenin 7-O-glukosid, skutelarein) içermektedir (23,24). Bitki aynı zamanda ülser tedavisinde de kullanılmaktadır (25,26).

*Tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Schultz Bip. (Asteraceae) halk arasında kansere karşı kullanılmaktadır. Ayrıca iltihap giderici etkisi, enfeksiyonlara karşı etkili olması ve ülser tedavisinde yardımcı olması nedenleriyle halk tarafından kullanılmaktadır. Bitkinin ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterdiği literatürde vurgulanmıştır (27).

Bitkiler çok eski zamanlardan beri tedavi amacıyla kullanılmıştır. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı ilaçların %39,1'i doğal kökenlidir (28). Bu kapsamda halk arasında yaygın olarak kullanılan bazı tıbbi bitkilerinden farklı çözücüler kullanılarak temin edilen ekstralarının bazı biyoaktiviteleri belirlenecektir. Bu amaç kapsamında ana hedeflerimiz; altı farklı bitkiden elde edilen on sekiz farklı ekstrenin (i) antioksidan, (ii) antikolinesteraz, (iii) antiüreaz, (iv) karbonik anhidraz II enzimi üzerine gösterdiği esteraz aktivitesi gibi biyolojik aktivitelerin belirlenmesi ve (v) etkili ekstraların içeriklerinin aydınlatılmasıdır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif moleküller olarak tanımlanmaktadır. Bu eşleşmemiş elektron(lar) genellikle serbest radikallere önemli ölçüde reaktivite vermektedir. Serbest radikaller genellikle kararsızdır ve kökeni oksijen (Reaktif Oksijen Türleri: ROT), azot (Reaktif Azot Türleri: RNT) ve kükürtten (Reaktif Kükürt Türleri: RST) gelmektedir. ROT ve RNT'ye örnek olarak süperoksit, hidroksil, peroksil, alkoksil, hidroperoksil ve lipit peroksil radikalleri, nitrik oksit ve azot dioksit molekülleri verilebilir. RST, ROT ve tiyoller arasındaki reaksiyon sonucu kolayca oluşur. Oksijen ve azotsuz radikallerden türeyen hidrojen peroksit, hipokloröz asit, hipobromöz asit ve peroksinitrit gibi radikal olmayan reaktif türler de vardır (1,29,30).

ROT ve RNT (radikal ve radikal olmayan türler), normal fizyolojik ve patolojik durumlar altında hayvan ve insan hücrelerinde oluşabilir. ROT kaynaklı oksidasyon hücresel hasar ve ölümün ana nedeni olarak görünmektedir ve ayrıca kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. O<sub>2</sub>'nin redüksiyonu, oldukça reaktif süperoksit radikalının oluşmasına neden olmaktadır (1,29,30).

#### 2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

##### 2.1.1.1. Süperoksit radikali

Oksijenden türetilen radikaller canlı sistemlerde üretilen en önemli radikal sınıfıdır. Moleküler oksijen (dioksijen) benzersiz bir elektronik konfigürasyona sahiptir ve kendisi bir radikaldir. Dioksijene bir elektronun eklenmesi süperoksit anyon radikalini oluşturmaktadır (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Metabolik proses veya oksijen aktivasyonu ile ortaya çıkan süperoksit anyonu birincil ROS olarak kabul edilmektedir. Bu molekülün diğer moleküller ile etkileşime girerek oluşturduğu ROT ise ikincil ROT olarak adlandırılmaktadır.

Süperoksit üretimi, çoğunlukla mitokondri içinde gerçekleşmektedir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, memeli hücresindeki ATP'nin ana kaynağıdır

ve bu nedenle yaşam için şarttır. Enerji iletimi sırasında, az miktarda elektron vaktinden önce oksijene sızarak süperoksit oluşmasına neden olmaktadır. Submitokondriyal parçacıklar üzerinde yapılan ölçümler, taşıma zincirindeki tüm elektronların maksimum %1-3'ünün oksijenin suya indirgenmesini sağlamak yerine süperoksit oluşumuna neden olduğunu göstermiştir (29,31).

#### **2.1.1.2. HO<sup>•</sup> radikali**

Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>), hidroksit iyonunun nötr şeklidir. Hidroksil radikali yüksek reaktiviteye sahiptir. Bu özellik hidroksil radikalini *in-vivo* yarı ömrü (yaklaşık 10<sup>-9</sup> s) çok kısa olan tehlikeli bir radikal yapmaktadır. Lipit peroksidasyonu ile hücre zarlarına ve lipoproteinlere zarar vermektedir (29,31).

#### **2.1.1.3. Hidrojen peroksit**

Birçok bir ya da iki elektron redüksiyon reaksiyonunun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği bildirilmiştir. Bunların başlıcaları NADPH oksidaz, mitokondriyal solunum zinciri ve bazı oksidazlar olarak gösterilebilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, üretildiği bölgeden hedef bölgeye redoks sinyali taşıyan bir sinyal molekülü olarak işlev görmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalaz ve glutatyon peroksidaz ile enzimatik olarak suya indirgenmektedir (31,32).

#### **2.1.1.4. Singlet oksijen**

Oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu normal dönüş yönünün tersinde olan başka bir yörüngeye geçmesi ile süperoksit radikalinin nitrik asitle reaksiyonu ya da hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu ile oluşabilmektedir (33). Singlet oksijen, proteinler, lipitler, DNA ve RNA gibi hücresel makromoleküller ile hızlı bir şekilde reaksiyona girmektedir ve bunun sonucunda organik peroksitler ve sülfoksitler gibi başka reaktif maddelerin oluşmasına neden olmaktadır (34).

#### **2.1.2. Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı**

Serbest radikaller, hücre içi veya hücre dışı kaynaklı olabilir. Çoğunlukla elektron taşıma zincirinin (ETC) varlığından dolayı mitokondri ROT üretiminin gerçekleştiği ana bölgedir. Ayrıca, bazı oksidazlar, siklooksijenaz, lipoksijenazlar, dehidrojenazlar ve peroksidazlar gibi enzimlerin aktivitesi de serbest radikallerin

üretilmesine neden olabilmektedir. Sitokrom P450 metabolizması, lizozomlar, peroksizomlar ve enflamatuvar hücre aktivasyonu, ROT'un diğer endojen kaynaklarıdır. Hücre dışı serbest radikal kaynakları ise iyonize radyasyon, sigara, bazı kirleticiler, böcek ilaçları ve vücuda nüfuz edip reaktif türlere ayrışabilen ve daha sonra hedef dokulara oksidatif hasar verebilecek bazı ilaçlardır. Ayrıca demir, bakır, krom, kurşun, civa, nikel ve vanadyum gibi metaller ROT üretebilmektedir (1).

### **2.1.3. Reaktif Azot Türleri (RAT)**

#### **2.1.3.1. Nitrikoksit radikali**

NO• eşleştirilmemiş elektron içeren radikal bir moleküldür. NO• biyolojik dokularda arginini sitriline metabolize eden spesifik nitrik oksit sentazlar tarafından üretilmektedir. Nitrik oksit, birçok fizyolojik olayda sinyal molekülü olarak görev yapan önemli bir radikaldir. Aşırı RAT üretimi hücrede nitrosatif strese neden olur. Nitrosatif stres, proteinlerin yapısını değiştirerek normal fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilmektedir (29).

#### **2.1.3.2. Peroksinitrit**

Bağışıklık sistemi hücreleri, enflamatuvar proses sırasında tetiklenen oksidatif ortamda hem süperoksit anyonu hem de nitrik oksit üretmektedir. Bu koşullar altında, nitrik oksit ve süperoksit anyonu reaksiyona girerek daha oksidatif bir molekül olan peroksinitrit anyonunu üretebilmektedir. Peroksinitrit (ONOO-) güçlü bir oksidatif ajandır, DNA fragmantasyonu ve lipid oksidasyonuna neden olabilmektedir (29).

### **2.1.4. Serbest Radikallerin Biyolojik Roller ve Biyomoleküllere Zararı**

Düşük veya orta seviyelerdeki ROT ve RNT, biyolojik olarak önemlidir. Bunlar sinyal ve düzenleyici moleküller olarak işlev görmektedir. Örneğin, nitrik oksit, nöronlar tarafından üretilen önemli bir nörotransmitterdir. Fizyolojik fonksiyonlarının bir parçası olarak ROT molekülleri enfeksiyona karşı savunmada rol oynamaktadır. Fagositler aktive edildiklerinde istilacı bakterileri öldürmek için ROT üretilmektedir (1).

Fizyolojik fonksiyonlarının bir parçası olarak yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres, vücudumuzda

proteinler, enzimler, amino asitler, lipitler, karbonhidratlar ve DNA da dahil olmak üzere her tür biyomolekölün zarar görmesine neden olabilecek zararlı bir süreçtir. Proteinlerin ve kükürt içeren enzimlerin zarar görmesi, denatürasyon, inaktivasyon ve çapraz bağlanma ile sonuçlanabilmektedir. Aminoasitlerin de oksidasyona uğrayabildiği belirtilmiştir. Karbonhidratlarda oksidatif hasar, hormonal ve nörotransmitter yanıtlar, interlökin aktivitesi ve prostaglandin oluşumu gibi hücresele reseptör fonksiyonlarının değişmesine neden olabilmektedir. ROS, özellikle OH<sup>•</sup>, DNA'nın açılması, DNA-protein çapraz bağlanması, purinlerin oksidasyonu gibi modifikasyonlara neden olabilmektedir. Bu da DNA'da karsinogenik mutasyonlara sebep olabilmektedir. Membran lipitlerindeki doymamış bağlar da serbest radikal hasarına karşı hassastır. Olası lipit peroksidasyonu membran akışkanlığı, membran geçirgenliği ve membrandaki taşımanın bozulmasına, hatta hücre ölümüne neden olmaktadır (1,35).

## 2.2. OKSİDATİF STRES

Serbest radikal üretimi, çok sayıda fizyolojik reaksiyon sonucu görülen normal bir süreçtir. Her organizma normal işleyişini sürdürebilmek için bu moleküllerin aşırı üretimine karşı koymak zorundadır. Radikaller, reaktif türleri stabil bileşiklere çeviren antioksidanlar ve enzimler tarafından temizlenebilmektedir. Ancak, bazı durumlarda enzimler ve antioksidanlar, aşırı üretilen serbest radikalleri temizlemekte yeterli olmamaktadırlar. Bu durum reaktif moleküllerin üretimi ve bunların ortadan kaldırılması arasında bir dengesizliğe yol açmaktadır. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum, birçok fizyolojik süreçte sorunlara neden olmaktadır. Oksidatif stres iki kategoride sınıflandırılabilir: akut ve kronik. Akut oksidatif stres, reaktif moleküllerin geçici olarak çoğalmasıyla ilişkilidir ve reaktif moleküller kendiliğinden normal seviyelere dönmektedir. Bu durum, geçici hastalıklardan veya ilaçlardan kaynaklanabilir ve insan sağlığında önemli değişikliklere neden olmaz. Kronik oksidatif stres daha zararlıdır. Bu tip, hücrelerin artan reaktif oksijen türlerini nötralize etmede zorlanmasıyla ilişkilidir. Bu durum hücre bileşenlerinin ve dengesinin değişmesine neden olabilmektedir. Kronik oksidatif stres, AH, kalp hastalığı, astım,

otoimmün ve gastrointestinal hastalıklar gibi yaygın dejeneratif hastalıklardan sorumludur (2,35).

### 2.2.1. Antioksidan Sistem

İnsanlar oksidanların zararlı etkilerini engelleyen iki savunma türüne sahiptir. İnternal türe süperoksit dismutaz, katalaz veya glutatyon gibi maddelere dayanan doğal mekanizmalar örnek verilirken, eksternal türe dışarıdan besinlerle alınan maddeler örnek verilebilmektedir. Doğal maddeler üzerinde uzun süredir devam eden çalışmalar, antioksidan aktiviteye sahip çok sayıda bileşik ortaya koymuştur (2). Bitki hücreleri  $O_2$  ürettikleri için yüksek seviyede oksijene maruz kalırlar. Bu nedenle bitkiler oluşan oksijen toksisitesiyle mücadele etmek için antioksidan maddelerce zengindir (36).

Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyerek ya da serbest radikallerin çoğalmasını durdurarak oksidasyonu geciktiren bileşiklerdir. Bitkiler genellikle güçlü  $H^+$  verici aktiviteye sahip yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşikler içerir. Antioksidan bileşikler, standardize edilmiş kültürlerden ya da yabani bitkilerden elde edilebilmektedir. Doğal antioksidan kaynağı olarak bitki ekstraktları ve bileşenleri, kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Fenolik asitler, fenolik diterpenler, flavonoidler, uçucu yağlar, karotenoidler, antosiyanidinler gibi bileşen grupları, bitkilerdeki ana antioksidan madde gruplarıdır (3).

KontROLSÜZ ROT üretimi sıklıkla hücrel makromoleküllerin ve diğer küçük antioksidan moleküllerin zarar görmesine neden olmaktadır. Serbest radikalleri etkisiz hale getirmede etkili olan birçok bileşen vardır. Antioksidanlar, aktif türlerin üretimini baskılayarak, hidroperoksitleri azaltarak, metal iyonlarını sekestre ederek ve serbest radikalleri temizleyip zincir reaksiyonu sonlandırarak etki göstermektedir. Bazı antioksidanlar, diğer antioksidanların biyosentezini de indüklemektedir (31).

## 2.3. ALZHEİMER HASTALIĞI

Alzheimer Hastalığı (AH) nörodejeneratif bir hastalıktır ve dünya çapında yaşlılarda en sık görülen demans türüdür. Günümüzde, tahmini 46,8 milyon kişi AH veya benzeri bir demans türünden şikâyetçidir. Yaşlanan nüfus ve artan yaşam

süresinden dolayı 2050 yılına kadar prevalansın dört kat artması beklenmektedir (37). AH, gerçek bir tedavisi olmadığı için ciddi bir sağlık sorunudur. Demansın yanı sıra AH, konuşma bozukluğu, zayıf koordinasyon ve eksekütif fonksiyonlarda gerileme ile karakterizedir (38,39).

### 2.3.1. Hastalığın Patolojisi

Yapılan araştırmalar sonucunda AH'nin patogenezinin altında yatan bazı moleküler mekanizmalar açıklanmıştır. AH'nin ana patolojik karakteristikleri, amiloit beta ( $A\beta$ ) plakları, hiperfosforile olmuş tau protein agregatları içeren nörofibriler, nöroenflamasyon ve nörodejenerasyondur.  $A\beta$  peptitlerinin yaşlılık sonucu hücre dışı birikimi, AH'nin klasik nöropatolojik işaretidir.

Normal hücrelerde, tau proteini, aksonal mikrotüpleri stabilize eden ve hücre içi trafikten sorumlu nöronal mikrotübüle bağlı bir proteindir. Tau, fosforile edildiğinde mikrotübüllerden ayrışmaktadır. AH'de tau anormal derecede hiperfosforile olmaktadır. Hiperfosforile edilmiş tau, mikrotübül ağını kararsız hale getirmektedir. Böylece hücre-içi iskeleti çökmeye, işlev kaybına ve nöronal ölüme neden olmaktadır (39).  $A\beta$  ve tau patolojileri birbiriyle tamamen alakasız değildir.  $A\beta$ , tau agregasyonunu hızlandırabilmektedir (40,41).  $A\beta$  oligomerleri, hiperfosforile tau ve nöroenflamasyon sinaptik kayıplara, nöronal hasara ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenden dolayı beyin atrofisi AH'de normal yaşlanma ile karşılaştırıldığında çok daha hızlı gelişmektedir (37).

Oksidatif hasar birçok nörokimyasal hastalığın etiyolojisinde güçlü bir neden olarak gösterilmiştir. Bu durum aynı şekilde AH'nin önemli bir nedenidir. Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ile bunların temizleme mekanizmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. AH ile en alakalı ROT; süperoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'tir. AH ile ilişkili birincil RNT ise nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ )'dir (37).

### 2.3.2. AH için Güncel Tedavi Stratejileri

AH için var olan farmakolojik tedaviler, etiyolojik mekanizmaları hedeflemekten ziyade semptomları hafifleterek etki etmektedir. FDA onaylı ilaçlar arasında AChE inhibitörleri ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri

bulunmaktadır. AH hastalarında bilişsel işlev kaybı, beyindeki kolinerjik nörotransmisyonun azalması ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğundan, kolinerjik girdinin yeniden dengelenmesi, AH hastalarında belleği ve bilişi arttırmaktadır. Kolinerjik aktarıma, nörotransmitter asetilkolin (ACh), iyonotropik nikotinik ve metabotropik muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla aracılık etmektedir. AChE inhibitörleri, ACh'nin bozulmasını sınırlandırarak kolinerjik iletimi artırabilmektedir. AH için FDA onaylı ilk ilaç ve bir AChE inhibitörü olan takrin (Cognex™) 1993 yılında onaylanmıştır. Ancak 2012 yılında hepatotoksitesisi nedeniyle piyasadan çekilmiştir. En sık reçete edilen AChE inhibitörleri, sırasıyla 1996, 2000 ve 2001'de onaylanan donepezil (Aricept™), rivastigmin (Exelon™) ve galantamindir (Reminyl™). Donepezil, AH'nin tüm aşamalarının tedavisi için onaylanan tek AChE inhibitörüdür (38,39).

FDA onaylı ilaçların ikinci sınıfı NMDA reseptörlerini bloke ederek etki göstermektedir. NMDA reseptörü, glutamat reseptörleri ailesinin bir üyesidir. Hafızada ve öğrenmede çok önemli bir rolü vardır (38). AH'de, hasarlı hücrelerden salınan aşırı glutamat, NMDA reseptör aktivasyonu yoluyla büyük miktarda kalsiyumun nöronlara akmasına neden olmaktadır. Bu, toksisite ile sonuçlanmakta ve sonrasında nöronal ölüme yol açmaktadır. NMDA reseptörlerini bloke eden nöroprotektif bir ajan olan Memantine (Namenda™), 2003'te orta ila şiddetli AH tedavisi için onaylanmıştır. Memantin tek başına veya donepezil gibi diğer AChE inhibitörleriyle birlikte kullanılabilir (39). 2009'da kaprilik trigliserit, hafif ila orta şiddette AH için FDA tarafından tıbbi bir gıda olarak onaylanmıştır. Kaprilik trigliserit, glikoz kullanma yeteneğini kaybetmiş beyin hücreleri için alternatif bir enerji kaynağı olmaktadır (42).

## 2.4. KOLİNESTERAZLAR

Kolinesterazlar, nörotransmitter asetilkolinin kolin ve asetik aside hidrolizini katalizlemektedir. Bu, bir kolinerjik nöronun aktivasyondan sonra istirahat durumuna dönmesini sağlamak için gerekli bir reaksiyondur. Merkezi sinir sisteminde iki tip kolinesteraz enzimi bulunmaktadır: (i) asetilkolinesteraz ve (ii) bütirilkolinesteraz (BChE). AChE ve BChE, farklı genler tarafından kodlanmalarına rağmen %65 amino

asit dizisi homolojisi göstermektedir. Bu enzimler aynı zamanda benzer moleküler formlara ve aktif merkez yapılarına sahiptirler. AChE ve BChE, substrat spesifiteleri, fazla substrattaki davranışları ve inhibitörlere karşı duyarlılıkları ile birbirlerinden farklıdır. Kolinesterazlar bilinen en hızlı hidrolitik enzimler arasındadır.

AChE, ACh'ye karşı daha fazla afiniteye sahiptir ve BChE'den daha hızlı hidrolize eder. Fakat bütirilkolin (BCh) üzerinde daha az aktiftir. BChE tercihen BCh üzerinde etki etmesinin yanı sıra ACh'yi hidrolize etmektedir. Fazla miktarda substrat AChE'yi inhibe ederken, BChE fazla substratta substrat aktivasyonu sergilemektedir. ChE'lerin bu iki formu, farklı beyin bölgelerindeki aktivite, enzim kinetiği ve aktivitesi açısından da farklılık göstermektedir (43,44).

#### **2.4.1. Asetilkolinesteraz**

AChE, temel olarak nöromusküler kavşaklarda ve kolinerjik beyin sinapslarında bulunan bir serin hidrolazdır. Başlıca biyolojik rolü, nörotransmitter ACh'nin asetat ve koline hızlı hidrolizi ile kolinerjik sinapslardaki impuls iletiminin sonlandırılmasıdır (43).

AChE elipsoit şekle sahip büyük bir glikoproteindir. Kompleks  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanması görülmektedir. AChE, derinliği yaklaşık 20 Å olan derin bir geçit içermektedir. Bu geçidin altında esteratik bölge, oksianyon deliği, anyonik alt bölge ve açıl cep olmak üzere 4 ana alt bölge bulunmaktadır. ACh ilk olarak periferik bölge olarak bilinen dış kısma bağlansa da hidroliz bu alt bölgede gerçekleşmektedir (45,46).

Kolin asetiltransferaz (ChAT) bulunan kolinerjik nöronlar, perikaryon, proksimal dendrit ve aksonda zengin AChE enzim aktivitesi sergilemektedir (47).

#### **2.4.2. Bütirilkolinesteraz**

BChE, kolinerjik enzim AChE ile yapısal ve biyokimyasal olarak benzer bir serin hidrolazdır. BChE, benzersiz enzimatik özelliklere sahiptir ve sinir sistemi içinde yaygın şekilde dağılmıştır. BChE, bütirilkolin, süksinilkolin ve asetilkolin dahil olmak üzere kolin esterlerinin hidrolizini katalize etmektedir. Aynı AChE gibi katalitik aktivite için gerekli olan serin aminoasit kalıntısına sahiptir.

BChE, bütirilkolinin yanı sıra asetilkolini de hidroliz etmektedir. Ayrıca kokain, asetilsalisilik asit ve eroin gibi diğer esterlerin hidrolizini katalize ettiği gösterilmiştir (42). Aynı zamanda, plazma kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak da bilinen BChE esas olarak karaciğerde bulunmaktadır. AChE'den farklı olarak, BChE bütirilkolini asetilkolinden daha hızlı hidrolize etmektedir (43). BChE, merkezi sinir sisteminde AChE'den daha düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ve çok daha sınırlı bir nöronal dağılıma sahip olduğu düşünülmektedir. İnsan beyin korteksindeki AChE-zengin nöronların sayısı, BChE-zengin nöronların sayısından 100 kat daha fazladır (47).

Önceden BChE'nin spesifik bir fonksiyonunun olmadığı düşünülmekteydi. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda BChE'nin AChE ile birlikte kolinerjik sistemin bir parçası olduğu ve aynı şekilde AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda da rolü olabileceği anlaşılmıştır (42). Sağlıklı bir beyinde AChE, kolinesteraz aktivitesinin %80'ninden sorumlu iken BChE geri kalan %20'den sorumludur. Ancak ileri seviye AH'ye baktığımızda AChE aktivitesi beynin bazı bölgelerinde %55-67'ye kadar gerilerken BChE aktivitesi yükselmektedir (40).

## **2.5. *Helicobacter pylori***

### **2.5.1. Genel Özellikler**

*H. pylori*, S şeklinde veya kavisli Gram negatif bir bakteridir. Hareketliliği sağlayan 2-6 flagella bulunmaktadır. Bu flagellalar ritmik gastrik kasılmalara karşı bakterinin ve mide mukozasına nüfuz etmesinde önemlidir. 2,4-4,0 µm uzunluğunda ve 0,5-1,0 µm genişliğindedir. *H. pylori*, alkali bir ortam oluşturarak organizmanın asidik midede hayatta kalmasını sağlayan üreaz enzimini sentezlemektedir. *H. pylori*, farklı hastalıklarla ilişkilendirilen, vakuol yapıcı sitotoksin (*vacA*) dahil olmak üzere birçok virülans faktörü üretmektedir (48).

### **2.5.2. Epidemiyoloji**

*H. pylori* prevalansı coğrafi bölgelere göre büyük değişiklikler göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde, nüfusun %80'inden fazlası *H. pylori* pozitif iken, sanayileşmiş ülkelerde *H. pylori* prevalansı genellikle %40'ın altında kalmaktadır ve

çocuklar ile ergenlerde yetişkinlere ve yaşlılara göre oldukça düşüktür. *H. pylori* prevalansı, sosyoekonomik durumla doğrudan ilişkilidir. Özellikle çocukluk dönemindeki yaşam koşulları prevalansı yakından etkilemektedir. Batı ülkelerinde bakterinin prevalansı, gelişmekte olan ülkelere gelen birinci ve ikinci kuşak göçmenler arasında daha yüksek olmakta iken, gelişmekte olan ülkelere *H. pylori* enfeksiyon prevalansı nispeten sabit kalmaktadır. Bunun nedeninin gelişmekte olan ülkelerdeki yetersiz hijyen koşullarının olduğu düşünülmektedir (49). Prevalans, Latin Amerika ülkelerinde %75-83, Japonya'da %39,6 ve ABD'de %17,1 olarak saptanmıştır (5).

### 2.5.3. Patogenez

*H. pylori*, birincil olarak mide antrumunda kolonize olmaktadır. Daha çok mukus tabakasının altında gastrik epitel üzerinde gözlenmektedir ve nadiren intrasellüler ortamda bulunabilmektedir. *H. pylori* mideye girdikten sonra bünyesinde bulunan üreaz enzimi sayesinde, gastrik mukozanın yüzeyindeki üreyi, amonyak ve bikarbonata parçalamaktadır. Açığa çıkan amonyak sayesinde pH yükselmekte ve bakteri, midenin asidik ortamından korunmaktadır. Bu amonyak gastrik mukozadaki epitel hücreleri için toksiktir ve mukus sekresyonu gibi fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır. Daha sonra bakteri flagellası sayesinde midenin epitel hücrelerine doğru hareket etmektedir. Burada bakteriyel adezinler ve mide epitel hücrelerindeki reseptörler etkileşime geçmekte ve böylece kolonizasyon sağlanmış olmaktadır. Son olarak, *H. pylori* çeşitli efektör proteinler/toksinler salgılar ve bu durum midede doku hasarına neden olmaktadır. Duyarlı kişilerde kronik aktif gastrit, duodenal ve gastrik ülser, MALT lenfoma ve gastrik kanser gelişme ihtimali vardır (50,51).

*H. pylori*'de bulunan genlerden, *vacA* ve *cagA* genleri önemlidir. *VacA* geni, bakterinin majör toksini olan *vacA*'yı (vakuol yapıcı sitotoksin) kodlamaktadır. *VacA* ökaryotik hücrelerde endozomal/lizozomal fonksiyonların bozulmasına, vakuolizasyona, T hücre proliferasyonunun ve IL-2 sekresyonunun inhibisyonuna ve apoptoza neden olmaktadır. Duodenal ülser ve gastrik kanser oluşumunda önemli bir virülans faktörüdür. *CagA* geni ise *cagA* proteinini (A-cytotoxin-associated gene product A) kodlamaktadır. *CagA* pozitif bir suşla oluşan enfeksiyonda enflamasyonun daha şiddetli olduğu bildirilmektedir (51).

#### 2.5.4. *Helicobacter pylori*'nin Tanı Yöntemleri

*H. pylori*'nin tespiti için çeşitli testler geliştirilmiştir. Mevcut testler invazif ve invazif olmayan olarak ikiye ayrılmaktadır. Mideden alınan örneklerin incelendiği histoloji, kültür veya diğer yöntemler invaziv; kan, nefes, dışkı, idrar veya tükürük gibi örneklerde antikor, bakteri antijenleri veya üreaz aktivitesinin tespiti temelli olanlar ise invaziv olmayan testlerdir (49).

#### 2.5.5. Tedavi

Günümüzde halen %100 başarı oranı gösteren bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Bakterinin mukus tabakasının altında çoğalması ve mukozaya invaze olmaması antibiyotiklerin etkisini azaltmaktadır. Tek antibiyotik kullanılarak uygulanan tedaviler başarısızdır. Bu yüzden farklı kombinasyonlar tedavi için kullanılmaktadır. *H. pylori* eradikasyonu için birçok ilacın kombine olarak kullanıldığı farklı tedavi yöntemleri mevcuttur. Standart üçlü tedavi ile (proton pompa inhibitörü (PPI) 2x1 + amoksisilin/metronidazol 2x1 + klaritromisin 2x1) önceleri %95'in üzerinde eradikasyona ulaşılırken bu oran günümüzde antibiyotik direnci sebebiyle %50-79 oranlarına gerilemiştir. Metronidazol ve klaritromisine olan direncinin yüksek olduğu bölgelerde standart üçlü tedavi ilk seçenek olarak tavsiye edilmemektedir. Bu durumda bizmut + PPI + iki antibiyotik (metronidazol +tetrasiklin) ya da PPI + üç antibiyotikten (metronidazol, klaritromisin, amoksisilin) oluşan dördütlü tedavi tavsiye edilmiştir (52,53).

*H. pylori* enfeksiyonunun tedavisi, dünya çapında artan antibiyotik direncinin bir sonucu olarak daha az etkili hale gelmektedir. Bu durum alternatif tedavi yaklaşımlarının faydalı olacağını göstermektedir. Önceki çalışmalar (51,52) üreaz negatif bir *H. pylori* mutantının gnotobiyotik (sadece bilinen bakteri suşları bulunan) domuz yavrularında gastrik epitel hücrelerinde kolonileşemediğini göstermiştir. Ayrıca standart üçlü terapiye nikel içermeyen bir diyetin eklenmesi, *H. pylori* üreaz aktivitesinin azalmasından dolayı bakterinin eradikasyon oranını önemli ölçüde arttırmaktadır (53). Sonuç olarak, üreaz aktivitesinin inhibisyonu, bakterinin midede kolonileşme kabiliyetini azaltmakta ve dolayısıyla *H. pylori* enfeksiyonunun önlenmesi veya yok edilmesinde önemli bir süreç olarak göze çarpmaktadır (50).

## 2.6. ÜREAZ ENZİMİ

Üreaz, ürenin amonyak ve karbondioksit hidrolizini katalize eden bir metaloenzimdir (54). Enzim bitkiler, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilmekte, ancak hayvanlar tarafından üretilmemektedir. Reaksiyonun hızını, ürenin normal parçalanma hızına göre en az  $10^{14}$  kat hızlandırmaktadır. Üreazlar, aktif bölgelerinde metal(ler) içeren amidohidrolaz ve fosforriesteraz üst ailelerinin üyesidir. İlk kez 1926'da James B. Sumner tarafından fasulye (*Canavalia ensiformis*) tohumlarından izole edilmiştir (52,55).

Üreazın *H. pylori* kaynaklı patolojilerin ana nedeni olduğu bilinmektedir. Üreaz enzimi bakterinin midenin düşük pH'ında hayatta kalmasına olanak sağlamakta ve bu sebeple gastrik ve peptik ülser patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (56).

Bakteri, mantar ve bitkilerden üreaz enzimi izole edilmiştir. Kuaterner yapılarında farklılık olmasına rağmen bu enzimlerde aynı tür katlanma bulunmakta ve üç katalitik bölgeden oluşan trimerik yapı görülmektedir. Birçok bakteriyel üreaz (*Klebsiella aerogenes* ve *Bacillus pasteurii* bakterilerinden elde edilen üreaz örnek verilebilir) (ÜreABC)<sub>3</sub> yapısını oluşturan üç farklı alt üniteye sahiptir. *H. pylori* üreazı ise 2 alt ünitelerden oluşmaktadır. Bu alt ünitelerden küçük olanı, diğer bakterilerde bulunan üreazın üreA ve üreB ünitelerinin füzyonuna eşdeğerdir. *Canavalia ensiformis*'den elde edilen bitkisel üreazda ise tek tip alt ünite bulunmaktadır. Bu alt ünite, bakteriyel üreazlarda görülen farklı alt ünitelerin füzyonu gibidir. *K. aerogenes* bakterisinde görülen üreaz enzimi gibi (ÜreABC)<sub>3</sub> trimerine benzer bir trimer oluşturmaktadır. Enzimin aktif bölgesinde Ni iyonları bulunmaktadır ve bu iyonlar enzimin katalitik aktivitesi için gereklidir. Aktif bölgede Ni iyonları dışında bir karbamillenmiş lizin, dört histidin ve bir aspartat kalıntısı bulunmaktadır (57,58).

## 2.7. GLOKOM

Kalıcı görme fonksiyon kaybına yol açan glokom (göz tansiyonu), geniş bir klinik tablo ve etiyoloji gösteren ve optik sinirin hasar görmesiyle ortaya çıkan bir göz hastalığıdır. Glokom, kataraktan sonra küresel olarak körlüğün ikinci önde gelen nedenidir. 2010 yılı tahminlerine göre 8 milyondan fazla glokom kaynaklı körlüğün

dünya çapında görüldüğü tahmin edilmektedir. Glokom prevalansının nüfus artışı ve nüfusun yaşlanmasıyla artacağı tahmin edilmekle birlikte, 2020 yılına bu hastalıktan etkilenen insan sayısının 80 milyona çıkması beklenmektedir (59).

### 2.7.1. Hastalığın Patolojisi

Birkaç farklı tipte glokom bilinmektedir ve bunlar yüksek göz içi basıncı (GİB) ile karakterizedir. Göz içinde bulunan sıvı kanallarının tamamen veya kısmen tıkanması, göz içi basıncın artmasına neden olmaktadır. Gelişen basınç artışı optik sinirlere ve retina geri dönüşümsüz zarar vererek körlüğe sebebiyet verebilmektedir. Anormal göz içi basıncının kaynağı, gözün ön kamera açısında, kornea ile iris arasında yer alan dokusunun yanlış çalışmasıyla ilgilidir. Aköz hümör sıvısı GİB'in dengesini sağlayan ana unsurdur (60-63) ve hCA II aköz hümör oluşumuna katılmaktadır. hCA II'nin inhibe edilmesi ile göz içi salgılanan sıvının yarı yarıya azaldığı ve bu şekilde göz içi basıncın kontrol edildiği bildirilmiştir (64).

## 2.8. KARBONİK ANHİDRAZLAR

Karbonik anhidrazlar (CA) tüm canlılarda bulunan ve aktif bölgelerinde  $Zn^{+2}$  içeren metaloenzim ailesini oluşturmaktadır. CA'lar özellikle bikarbonat ve proton üretmek için karbondioksit ve suyun dönüşümünü katalize etmekten sorumludur. Ayrıca bu enzimler solunum, karbondioksit/bikarbonatın metabolize doku ve akciğerler arasında taşınmasında, pH ve karbondioksit homeostazında, elektrolit salgılanmasında, biyosentetik reaksiyonlarda ve diğer birçok fizyolojik veya patolojik süreçte önemli rol oynarlar (65,66).

Karbondioksit, bikarbonat ve protonlar bütün yaşam formlarının hayat döngüsündeki birçok önemli süreçte yer alan gerekli moleküller/iyonlardır. Bu nedenle karbonik anhidrazlar yaşamın 3 büyük aleminde 8 gen ailesi ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  ve  $\iota$ ) tarafından kodlanan ve çoğu organizmanın farklı doku ve hücre bölümlerinde yüksek miktarda bulunan enzimlerdir (67,68). Memelilerde karbonik anhidrazların beş sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), beş membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV), iki mitokondriyal (CA VA, CA VB), bir tane salgı (CA VI) formunda ve üç tane katalitik olmayan formda olmak üzere toplam 16

izoenzimi bulunmaktadır (69). İnsanlarda bulunan CA'lar  $\alpha$  gen ailesi tarafından ifade edilir ve toplam 15 izoenzim bulunmaktadır (70).

### 2.8.1. Karbonik Anhidraz II

CA izoenzimlerinin fizyolojik fonksiyonlarının tartışılmasında en yaygın olarak atıfta bulunulan izoenzim çeşidi CA II'dir. Bu izoenzim diğer izoenzimlerden daha fazla dokuda lokalize olan yüksek aktiviteli ve en yüksek turnover sayısına sahip formdur (71). Dönüşümsüz körlüğe neden olabilecek yüksek GİB ile gözlemlenen glokom hastalığında aköz hümör salgılanma sürecinde CA II'nin uyarıcı etkisi bulunmaktadır (72). hCA II, eritrositlerde hCA I ile birlikte bulunmaktadır. hCA II, göz, böbrek, merkezi sinir sistemi ve iç kulakta en yaygın olarak dağıtılan izoformdur ve klinik olarak kullanılan diüretikler, antiglokom ilaçlar ve antikonvülsanlar için bir ilaç hedefidir (73).

### 2.8.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz (CA), gözde aköz müköz üretiminde anahtar bir enzimdir. Dolayısıyla siliyer süreçlerdeki aktivitesinin inhibisyonu, azalmış aköz hümöral sekresyona neden olmaktadır ve bu sekresyon GİB'ı azaltmaktadır (74). 1995 yılında Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi, artmış göz içi basıncının tedavisinde topikal etkili karbonik anhidraz inhibitörü (CAI) olan dorzolamidi onaylamıştır (75). CAI'ler, kedi ve köpeklerde neredeyse tüm glokom tiplerini tedavi etmek için kullanılabilir (76). CA inhibitörlerinden biri olan asetazolamid, akut dağ hastalığını (AMS) önlemek ve iyileştirmek için etkin bir ilaç olarak kabul edilmiştir (77). Anemik, enfeksiyon veya zayıf pıhtılaşma gibi belirtilerde CAI'leri üzerine hastaların gözlemlenmesi ve sorgulanması tedavi süresince tercih edilir (78). CAI'ler, idiyopatik intrakranyal hipertansiyon gibi bazı nörolojik bozuklukların tedavisinde de kullanılmaktadır (66). Ayrıca son zamanlarda yapılan araştırmalar yeni bir etki mekanizması ile antienfektif faktörlerin tasarımı için CA'ların önemini vurgulamıştır (79).

Karbonik anhidraz inhibitörleri, CA aktivitesini baskılayan kimyasal maddelerdir ve farmasötik bir sınıftır (80). Birçok hastalığın tedavisinde ve

önlemesinde CAI'lerin kullanılmasının nedeni, CA'nın birçok hücre, doku ve organlarda geniş dağılımına ve önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olmasıdır (81).

CA'ların katalitik aktivitelerinin aktivasyonu ve inhibisyonu klinik açıdan birçok önemli hastalığın tedavisi açısından önemlidir (69,82,83). Klinik açıdan geliştirilen teröpatik yaklaşımlar belirli CA'ları hedef almaktadır. CA II, IV ve XII antiglokom ajanları, CA VA ve VB antiobezite ajanları, CA IX ve XII antitümör ajanlar için biyolojik hedeflerdir (73). CA I ve II izoenzim inhibitörleri epilepsi ve glokom ilaçlarının tasarımında kullanılmaktadır. Bu nedenle teröpatik ajan olarak yeni CA inhibitörleri geliştirmeye gereksinim duyulmaktadır (84,85). Birçok grup iyonlar (86), tiyoüre türevleri (87), urasil türevleri (88,89), bromofenoller (90), pirazol ve kalkonlar (91,92) ve sülfonamidler (82,93,94) gibi molekülleri/bileşikleri karbonik anhidrazlar inhibitörü olarak kullanmışlardır. Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen metabolitler benzer amaçlı kullanılan sentetik inhibitörlere önemli bir alternatif olarak CAI olarak kullanılmaktadır (95).

## 2.9. ÇALIŞMADA KULLANILAN BİTKİLER

### 2.9.1. *Hypericum perforatum* L.

Gövde 10-110 cm ve diktir. Dallar ile birlikte yükselici, çok yıllık ve otsudur. Yapraklar eliptik-dikdörtgen ya da doğrusal olabilir. 5-35 mm, dar oval ya da mızrak şeklinde bazen oblanseolat, sesil ve her daim yarı saydam noktalıdır. Işık altında bakıldığında yağ bezeleri parlak noktacıklar halinde görülmektedir. Halk arasında binbirdelikotu olarak adlandırılmasının nedeni budur. Sepaller ve petaller beş parçalıdır. Petaller sarı renklidir. Kenarları siyah renkli glandlar ile çevrilidir. Stamenler çok sayıdadır ve demetler halinde bulunmaktadır. Ovaryumda 3-5 lokus görülür, 2-çok ovüllüdür (15,96,97).

**Yöresel adları:** Binbirdelik otu, sarı kantaron, çay çiçeği, çay otu, kangranotu, kanotu, kantiron, kantaron çiçeği, kılıçotu, koramaz, koyunkıran, püren, sarı çiçek, sarıot, yaraotu, ülserotu (98).

**Yöresel kullanılışı:** Bitkinin toprak üstü kısımları oral yolla öksürük kesici, mide ağrısı, iştah açıcı, ishal kesici, romatizma, kurt düşürücü, basur, ülser, soğuk

algınlığı, kan dolaşımı hastalıkları gibi çeşitli hastalıklarda geleneksel kullanımı mevcuttur (99). Bitkinin çiçekli dallarının zeytinyağında bekletilerek harici kullanımda yara iyileştirici etkisi vardır (100).

#### **Etki ve kullanılış:**

1. Hafif ve orta şiddetli anksiyete ve depresif bozuklukta kullanılır. Antidepresan etkisi vardır (101,102).
2. Etanol ekstresi ve uçucu yağının antimikrobiyal ve antifungal etkisi vardır (17,103).
3. Harici olarak kullanıldığında yara iyileştirici etki gösterir (104).
4. Oral olarak kullanıldığında antienflamatuvar etkisi bulunmaktadır (105).
5. Antikonvulsan etkisi vardır (106).

**Kimyasal içeriği:** Floroglusinoller (hiperforin, adhiperforin), naftodiantron (hiperisin psödohiperisin, izohiperisin), flavonoidler (hiperosit, rutin, kersetin, kersitrin), biflavonlar (biapigenin, amentoflavon), uçucu yağlar (karyofilen,  $\alpha$ - pinen, limonen, seskiterpenler), aminoasitler, fenilpropanlar (17,107,108).

**Yayılışı:** İstanbul, Ardahan, Hakkâri, Bartın, Amasya, Ankara, Antalya, Aydın, Balıkesir, Çanakkale, Erzincan, Erzurum, Giresun, Hatay, Isparta, İçel, Kocaeli, Manisa, Kahramanmaraş, Muğla, Nevşehir, Samsun, Bayburt, Karaman (109).

#### **2.9.2. *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium* L.**

Gövde 30-60 cm uzunlukta, yapraklar; alternan bazen ise opozit dizilişli, nadiren stipüllü olabilir. Yaprak kenarları düz/tam kenarlı, dişli, loblu, dilimlidir. Çiçeklerde kapitulum çiçek durumu içindeki çiçekler sapsızdır, braktelerden oluşan bir involukrum ile çevrelenmiştir. Reseptakulum tüylerle kaplı ya da çıplak olabilir. Çiçekler, hermafrodit, tek eşeyli ya da sterilidir. Kalikte pappus olarak da bilinen tüyler, kıllar, pullar, kılçıklar şeklinde ovaryumun üstünde yerleşmiştir ya da hiç yoktur. Korolla 3-5 petalli, gamopetal, tubular, nadiren yok. Stamenler 5 adet, epipetalus ve singenezik. Ovaryum epigynous, tek ovüllü, anatrop ovül. Meyve akendir (15,110).

**Yöresel adları:** Civanperçemi, akbaşı, barsamotu, binbiryaprakotu, kandil çiçeği.

**Yöresel kullanılışı:** Tonik, iltahap giderici, terletici, idrar söktürücü ve iştah açıcı etkilerinden dolayı halk arasında kullanılır. Ayrıca kanama, zatürre, romatizmal ağrı ve yaraların iyileşmesinde kullanılmıştır (111-114).

**Etki ve kullanılışı:**

1. Yara iyileştirici etkisinden dolayı haricen kullanılır (115).
2. Bitkide bulunan flavonoidler antispazmodik etki gösterir (114).
3. İçerdiği flavonoidlerden dolayı antienflamatuvar etki gösterir (115,116).
4. Uçucu yağının antimikrobiyal etkisi vardır (117,118).

**Kimyasal içeriği:** Uçucu yağ (1,8-sineol, borneol, bornil asetat, sabinen azulen,  $\alpha$ -pinen, kamazulen, izovalerik asit, kâfur, limonen, karyofillen, mentol, öjenol, sabinen, salisilik asit), flavonoidler (apigenin, luteolin, artemetin, kersetin, rutin, katisin, luteolin), tanenler, aminoasitler (histidin, alanin), yağ asitleri, fenolik asitler (119,120).

**Yayılışı:** Bolu, İstanbul, Kars, Hakkâri, Siirt, Karabük, Kastamonu, Ağrı, Bilecik, Erzurum, Gümüşhane, Rize, Tunceli, Yozgat (109).

**2.9.3. *Achillea setacea* Waldst. et Kit**

Bitki ince rizomludur, rizomlar sürünücü, dallanmış olarak bulunmaktadır. Gövde 10-80 cm, dik veya yükselici, tek veya birkaç tane, düz veya nadiren eğri, dallanmamış veya bazen yukarı doğru hafifçe dallanmış, silindirik, boyuna çizgili, ipeksi tüylü-yünsüdür. Yapraklar homomorfik, silindirik, lineer-lanseolat, taban yaprakları 6-16 x 0,4-2(-3) cm, (3 cm'ye kadar petiol ile birlikte), gövde yaprakları ise 1,5-6 x 0,3-1 cm, sapsızdır. 2-3 pinnatisekt segmentlerin hepsi aynı şekilli, setamsı, çok sayıda, raşis 0,4-0,8 mm, dişsiz, uç kısımdaki segmentler 0,5-1,5 x 0,1-0,3(-0,5) mm, akuminat, kıkırdağımsı, ipeksi tüylüdür. Çiçek durumu sapı 0,5-3(-5) mm. Kapitulum ise 30-150 ya da daha fazla, korimbus 2,5-9 cm genişliğindedir. İnvolukrum oblongdan lineer-oblonga kadar, 3-4,5 x 1,5-2,5(-3) mm. Fillariler 3-4 sıralı, akuttan subakuta kadar, dar şeffaf kenarlı, bazen kahverengimsi uçlu, pubescent; dıştakiler oblongdan ovat-lanseolata kadar, 1,5-2 x 0,5-1 mm; içtekiler oblongdan

lanseolata kadar, 3-4 x 1 mm. Palea lanseolat, 3-3,5 x 0,75-1 mm, zarsı, akut, uç kısmı piloz. Dilsî çiçekler 4-6 adettir. Beyaz renkli, 2,5-3 x 2 mm, lamina obtrapeziform, 1-1,2(-1,5) x 1-2 mm, uç kısmı hafifçe 3 lobludur; tüpsü çiçekler ise yaklaşık 10-20 adettir, sarı renkli, 2,5 x 0,5 mm, ovaryum 2 mm. Aken oblong-oblanseolat, 1,4-1,8 x 0,5 mm, lineat, kahverengimsidir (121).

**Yöresel adları:** Ayvadana, ayvadani, mayasılotu.

**Yöresel kullanılışı:** Bitkinin kurutulmuş çiçekleri dâhilen çay olarak hazırlanmaktadır. İshalde, yaraların tedavisinde ve karın ağrısına karşı kullanımı mevcuttur (122).

**Etki ve kullanılışı:**

1. Bitkiden elde edilen uçucu yağın antioksidan etkisi bulunmaktadır (122).
2. Uçucu yağın antimikrobiyal etkisi vardır (123).
3. Bitkideki seskiterpen laktonların antienflamatuvar etkisi vardır (124).

**Kimyasal içeriği:** Uçucu yağ (Nerolidol,  $\beta$ -kadinen (122),  $\alpha$ -tuyen,  $\alpha$ -pinen, 1,8-sineol, kâfur, borneol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, karyofillen oksit) (123).

**Yayılışı:** Bolu, İstanbul, Bitlis, Afyonkarahisar, Amasya, Ankara, Burdur, Erzurum, Gümüşhane, Isparta, İzmir, Kırklareli, Kırşehir (109).

#### **2.9.4. *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Schultz Bip.**

60-100 cm boyunda, çok yıllık, otsu bir türdür. Yapraklar 15-20 cm, iki derin tüysü, dış kontürü yumurtamsı ya da eliptik, kaba testere dişli, her iki yüzü salgılı tüylü ve havlı; yanal dilimler mızraksı, 5-6 çift ve en çok 7 x 2 cm boyutundadır. Çiçek kurulu yalancı şemsiye, terminal, çok sayıda tepecik formu çiçekli; involukrum 4-6 mm genişlikte; filariler mızraksı ya da ters mızraksı, 2,5-4 x 0.75-1.25 mm, havlı, kenarlar kahverengi, ince ve kuru zarlı; dilsî çiçekçikler sıklıkla 8, beyaz, 2-3 x 2,5 mm; dilsî çiçekçikler 2 mm boydadır. Meyveler sert kabuklu, kahverengimsi, 1,5 cm, 4-5 çıkıntılı; taççık düzensiz olarak dişli ve 0,3 mm yüksekliktedir (96).

**Yöresel adı:** Koca pireotu.

**Yöresel kullanılışı:** Bitki çay olarak nöbet ve krizlere karşı halk arasında kullanılır (125).

**Etki ve kullanılışı:**

1. Bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen matanol ekstresinin antibakteriyel ve antifungal etkisi bulunmaktadır (126).
2. Bitkiden elde edilen kloroform ekstresinin ve uçucu yağın antikoagülan ve antifibrinolitik etkisi vardır (127).

**Kimyasal içeriği:** Flavanoitler (öpatilin, hispidulin, apigenin, kersitrin, izokersitrin), fenolik asitler (klorojenik asit, kafeik asit, rosmarinik asit), fitosteroller ( $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kampesterol, ergosterol) (126).

**Yayılışı:** Artvin, Rize, Trabzon (109).

**2.9.5. *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *arietina* (Anders.) Cullen et Heywood**

*Paeonia*, kışın kuruyabilen ya da yeşil kalabilen gövdesi ile çok yıllık bir bitkidir. Kökleri yumrulu ya da etlidir. Yaprakları biternat ya da daha fazla parçalı olabilir. Beyaz ya da kırmızı renkli çiçekler 7-14 cm uzunluğundadır. Stamenleri çok sayıda ve merkezidir, karpeller sayıları 2-5 arasında değişebilir ve tüylü veya tüysüz olup etli bir disk üzerinde bulunurlar. Bitkinin meyvesi, tohumlarının 2 sıra halinde ve yatay olarak dizildiği bir grup folikülden oluşmaktadır (128).

**Yöresel adları:** Bocur, eşekgülü, gülora şakayık ve yer şakayığı (129).

**Yöresel kullanılışı:** Halk arasında bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan çay aç karnına içilir ve kan şekerini düzenlemek için kullanılır (130).

**Etki ve kullanılışı:**

1. Bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol ekstresinin analjezik ve antienflamatuvar etkisi vardır (131,132).
2. Bitkinin köklerinin antikoagülan etkisi vardır (133).
3. Bitkinin köklerinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır (134,135).

**Kimyasal içeriği:** Paeonol glukozitleri, triterpenler, monoterpen ve monoterpen glukozitleri, asetofenonlar, flavonoidler ve tanen bileşikleri (136).

**Yayılışı:** Bitlis, Amasya, Balıkesir, Elazığ, Gümüşhane, Trabzon, Tunceli, Yozgat, Bayburt (109).

#### **2.9.6. *Plantago lanceolata* L.**

Rozet formunda çok yıllık otsu bir bitkidir. Çiçekli saplar tüylü, ipeksi ve yapraksızdır. Çiçekler 4 mm uzunluğundadır, kaliks yeşil, korolla kahverengidir. Çiçekler 4 loblu, kahverengi orta damarlı ve uzun beyaz stamenlidir. Her çiçek en az iki tohum üretebilir. Dip yapraklar mızrakı, yana doğru yayılmış ya da dik vaziyettedir, neredeyse dişli, 3-5 kadar belirgin paralel damarlı, dar ve kısa saplıdır. (137).

**Yöresel adları:** Yılandili, Yılan otu.

**Yöresel kullanılışı:** Halk arasında haricen akne, abse ve yara tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca dâhilen idrar yolu enfeksiyonları, diyabet, kanser, soğuk algınlığı ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilmektedir (24,25,138).

#### **Etki ve kullanılışı:**

1. Yara iyileştiricidir ve haricen deri hastalıklarında kullanılır (139).
2. Tümörler üzerinde sitotoksik etkisi vardır (140).
3. Antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiviral etki gösterir (24,138).

**Kimyasal içeriği:** İridoidler (katalpol, akubin, asperulosit) ve flavonoidler (apigenin 7-O-glukozit, skutellarin) (23,24).

**Yayılışı:** Adana, İstanbul, Iğdır, Kars, Hakkâri, Şırnak, Ağrı, Amasya, Ankara, Antalya, Balıkesir, Bingöl, Burdur, Çanakkale, Edirne, Elazığ, Eskişehir, Giresun, Hatay, Kocaeli, Konya, Kütahya, Kahramanmaraş, Muğla, Nevşehir, Ordu, Sakarya, Trabzon (109).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1 Bitkisel Materyali

*Achillea setacea* Waldst. et Kit. (MARE 18076), *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium* L. (MARE 18077), *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Schultz Bip. (MARE 18078), *Hypericum perforatum* L. (MARE 18083) bitkileri Dr. Öğr. Üyesi İsmail Şenkardeş; *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *arietina* (Anders.) Cullen et Heywood (MARE 18080), ve *Plantago lanceolata* L. (MARE 18032) bitkileri ise Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Doğan tarafından teşhis edilmiştir. Teşhis edilen numuneler Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

Folin Ciocalteu fenol reaktifi (FCR), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), troloks, 2,4,6-tris (2-pridil)-s-triazin (TPTZ), ABTS[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)],  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , gallik asit, sodyum karbonat, üreaz, asetilkolinesteraz, paranitrofenil asetat, trizma base, insan karbonik anhidraz II Sigma'dan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya); petrol eteri, kloroform, etil alkol, metanol, Merck KGaA'dan (Darmstadt, Germany) satın alındı. Kullanılan tüm kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktadır.

##### 3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanması

###### 3.1.3.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini için gerekli olan çözeltiler

%2'lik sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) çözeltisi: 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tartılıp az miktarda distile su ile çözülmüştür. Sonra çözelti 100 mL'lik balon jojeye aktarılıp yeterli miktarda distile su ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi satın alınmıştır.

### **3.1.3.2. DPPH serbest radikal giderme kapasitesi tayini için gerekli olan çözelti**

0,1 mM DPPH çözeltisi: 0,0099 g DPPH tartılıp metanolde çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözelti 250 mL'lik balon jojeye aktarılarak metanol ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

### **3.1.3.3. ABTS katyon radikal giderme kapasitesi tayini için gerekli olan çözeltiler**

2,45 mM potasyum peroksodisülfat ( $K_2S_2O_8$ ) çözeltisi: 0,0662 g potasyum peroksodisülfat tartılıp distile su ilavesi ile çözünmesi sağlandıktan sonra çözelti 100 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

7 mM  $ABTS^{++}$  stok çözeltisi: 0,3841 g 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu tartılıp distile su ilavesi ile çözünmesi sağlandıktan sonra çözelti 100 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### **3.1.3.4. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini için gerekli olan çözeltiler**

10 mM 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) çözeltisi: 0,3120 g TPTZ tartılıp 100 mL 40 mM HCl içerisinde 50°C'de su banyosunda çözülmesi sağlanmıştır.

40 mM HCl çözeltisi: 820  $\mu$ L der. HCl (%37'lik) içinde bir miktar su bulunan 250 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Daha sonra hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

300 mM asetat tamponu (pH 3,6) çözeltisi: 3,1 g  $NaCH_3COO \cdot 3H_2O$  tartılıp 600 mL distile su ile çözülmüştür. Çözeltinin üzerine glasiyel asetik asit eklenmiştir ve pH 3,6 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra 1 L'lik balon jojeye aktarılarak distile su ile hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

20 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  çözeltisi: 1,35 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  tartılıp distile suda çözüldükten sonra 250 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

### 3.1.3.5. CUPRAC aktivite deneyinde kullanılan çözeltiler

$7.5 \times 10^{-3}$  M neokuprain çözeltisi: 0,156 g neokuprain tartılıp etanolde çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 100 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim etanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  çözeltisi: 7,71 g  $\text{NH}_4\text{Ac}$  tartılıp distile su ile çözülmüştür. Çözelti 100 mL'lik balon jojeye aktarılıp hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

$10^{-2}$  M  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,171 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılıp distile su yardımıyla çözülmesi sağlanmıştır. Çözelti 100 mL'lik balon jojeye aktarılarak distile su ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### 3.1.3.6. Karbonik anhidraz aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler

50 mM, pH 7,4 Tris- $\text{SO}_4$  tamponu: 6,055 g Tris 950 mL saf suda çözüldükten sonra pH 7,4'e 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile ayarlanıp çözeltinin hacmi saf suyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

Karbonik anhidraz (CA) çözeltisi: 1 mg karbonik anhidraz tartılıp önceden hazırlanan 1 mL Tris- $\text{SO}_4$  tamponunda (50 mM, pH 7,4) çözülmüştür. Çözelti stoğu 1 mg/mL olarak ayarlanmıştır.

### 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma kapsamında; döner buharlaştırıcı (Model: Heidolph Hei-VAP Precision, Heidolph, Almanya), ultraviyole-görünür bölge spektrofometrisi (UV-Vis) (i) antioksidan ve antiüreaz çalışmalarında (Model: UV 1800, Shimadzu, Japonya), (ii) esteraz aktivite çalışmalarında (Model: V730, JASCO, Tokyo, Japonya), otomatik pipetler (Model: Research plus serisi, Eppendorf, Hamburg, Almanya), analitik terazi (Denver Instrument Co., Colorado, ABD), pH-metre (Model: HI2002-02-edge, HANNA Instrument, ABD), Rondo (Model: RBT1250, Renas, Türkiye), İnkübatör (Model: EN 055/120, Nüve, Türkiye) kullanılmıştır.

### 3.2. YÖNTEM

#### 3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması

Bitkiler, sekonder metabolitlerin enzimlerin etkisiyle değişikliğe uğramaması amacıyla enzim aktivasyonunu durdurmak için oda şartlarında kurutulmuştur. Kurutulan bitkilerin toprak üstü kısımları toz edilerek Soxhlet cihazıyla sürekli ekstraksiyon ile sırasıyla petrol eteri, kloroform ve etanol ekstraktları elde edilmiştir. Tüketme sonunda filtre kâğıdından süzülen ekstraktlar düşük basınç altında 45°C su banyosu kullanılarak evaporatörde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Elde edilen ekstraktlar aktivite deneylerinde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır. Elde edilen ekstraktların miktarı ve yüzde verimleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Bitkilerden elde edilen ekstraktlar ve verimleri (%)

| Bitki adı                                             | Ekstre adı   | Miktarı (g) | Verimi (%) |
|-------------------------------------------------------|--------------|-------------|------------|
| <i>Achillea setacea</i>                               | Petrol eteri | 1,003 g     | %2,508     |
|                                                       | Kloroform    | 1,120 g     | %2,800     |
|                                                       | Etanol       | 3,896 g     | %9,740     |
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | Petrol eteri | 0,502 g     | %1,255     |
|                                                       | Kloroform    | 0,754 g     | %1,885     |
|                                                       | Etanol       | 1,677 g     | %4,192     |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i> ,                       | Petrol eteri | 0,995 g     | %2,488     |
|                                                       | Kloroform    | 0,808 g     | %2,020     |
|                                                       | Etanol       | 1,635 g     | %4,088     |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | Petrol eteri | 0,507 g     | %1,268     |
|                                                       | Kloroform    | 0,433 g     | %1,083     |
|                                                       | Etanol       | 4,846 g     | %12,115    |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | Petrol eteri | 0,378 g     | %0,945     |
|                                                       | Kloroform    | 0,309 g     | %0,7725    |
|                                                       | Etanol       | 1,862 g     | %4,655     |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | Petrol eteri | 1,822 g     | %4,555     |
|                                                       | Kloroform    | 0,621 g     | %1,553     |
|                                                       | Etanol       | 9,012 g     | %22,53     |

### 3.2.2. Fitokimyasal Ön Denemeler

Toz edilmiş bitki örneklerinden 5'er g tartılarak üzerine 100 mL sıcak su konulmuş ve bu karışımlar 30 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Soğuması beklendikten sonra süzölmüş ve hazırlanan infüzyonlarda flavon, antrasen, saponin ve tanen türevleri aranmıştır. Ayrıca özel tüketme yöntemi ile alkaloit aranmıştır.

#### 3.2.2.1. Flavon türevlerinin aranması

İnfüzyonlardan 5'er mL alınmış ve 5 mL Shibata Belirteci (derişik hidroklorik asit, su ve etanolün eşit hacimde karıştırılması ile elde edilmiştir) ilave edilmiştir. Magnezyum talaşı eklenmesi ile kırmızı, turuncu ya da mor rengin oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

#### 3.2.2.2. Antrasen türevlerinin aranması

İnfüzyonlardan 10'ar mL alınıp derişik sülfürik asitten 5 damla ilave edilmiştir. Karışımlar 15 dakika sıcak su banyosunda bekletilip glikozitlerin hidroliz olması sağlanmıştır. Karışımlar soğuduktan sonra 5 mL toluen ile çalkalanmış ve toluenli tabakalar başka bir tüpe aktarılmıştır. Üzerlerine 3 mL %10'luk amonyak çözeltisi ilave edilip kırmızı rengin oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

#### 3.2.2.3. Saponin aranması

İnfüzyonlardan 10'ar mL alınıp deney tüplerine aktarılmıştır. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra yatay tutularak 30 saniye boyunca kuvvetle çalkalanmış ve 15 dakika boyunca dinlenmeye bırakılmıştır. 15 dakikanın sonunda tüplerde en az 1 cm yüksekliğinde kalıcı köpük oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

#### 3.2.2.4. Tanen bileşiklerinin aranması

İnfüzyonlardan 5'er mL alınmış ve 2 mL tuzlu jelatin çözeltisi (sodyum klorür ile doyurulmuş %1'lik jelatin çözeltisi) eklenmiştir. Krem renkli çökeleğin oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

Gallik ve kateşik tanenin ayrılması: İnfüzyonlardan 5'er mL alınmış ve %5'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltisinden 3 damla eklenmiştir. Esmer zeytin yeşili (kateşik tanen) ya da mavi siyah (gallik tanen) renk oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

### 3.2.2.5. Alkaloit aranması

Toz edilmiş bitkilerden 1'er g alınmış ve 10 mL %3'lük  $H_2SO_4$  çözeltisi ile bir süre ısıtılarak tüketilmiştir. Karışımlar soğuyunca süzölmüştür. Bu süzöntöler 5 mL %10'luk amonyak çözeltisi ilavesi ile alkalilendirilmiş ve ayırma hunisinde 10 mL eterle tüketilmiştir. Eterli çözeltiler su banyosunda yoğunlaştırılmıştır. Bakiyeler 10 mL %3'lük  $H_2SO_4$  ile çözölmüştür. Bu asitli çözeltilerde alkaloit teşhisi yapılmıştır:

Bouchardat belirteci (iyot 2,5 g+potasyum iyodür 5 g+su 100 mL) ile esmer kırmızı çökelek.

Dragendorff belirteci (bizmut karbonat 5 g+hidroklorik asit 10 mL+potasyum iyodür 25 g+su ile 100 mL'ye tamamlanır) ile turuncu-kırmızı çökelek.

Mayer belirteci (civa (II) klorür 1,36 g+potasyom iyodür 25 g+su 100 mL) ile süt rengi çökelek.

### 3.2.3. Ekstrelerin Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

Bitkilerden elde edilen ekstrelerden 5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan stok çözeltilerden etanol ile seyreltme yapılarak 2 ve 3 mg/mL konsantrasyonunda ekstreler elde edilmiştir. Hazırlanan bu ekstrelerden 0,1 mL tüplere alınmış ve üzerine 4,5 mL distile su ilave edilmiştir. 0,1 mL Folin-Ciocalteu ayıracı (1/3 oranında distile su ile seyreltilmiş) ve 0,3 mL %2'lik sodyum karbonat çözeltisi de eklenerek oda koşullarında 2 saat bekletilmiştir. Bekletme sonunda meydana gelen mavi rengin absorbansı referansa karşı 760 nm'de ölçölmüştür. 0,05-0,4 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit çözeltilerine Folin-Ciocalteu ayıracı ile toplam fenolik madde tayini uygulanmıştır. Ölçölen absorbanslara karşı konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve doğru denklemi elde edilmiştir [(Absorbans = 35,06 gallik asit (mg)+0,1214),  $R^2=0,9987$ ]. Elde edilen bu doğru denkleminde, örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/mg ekstre) eşdeğeri şeklinde hesaplanmıştır. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alınmıştır (141).

### 3.2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

#### 3.2.4.1. DPPH radikali giderme aktivite tayini

5 mg/mL stok çözeltiden 3 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlarında ekstreler hazırlanmıştır. Bu ekstrelerden 10'ar µL alınarak mikropalakaya konulmuş ve üzerine 240 µL 0,1 mM DPPH çözeltisi eklenmiştir. Mikropalaka oda koşullarında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Absorbansları 517 nm'de mikropalaka okuyucu kullanılarak referansa karşı ölçülmüştür. 10 µL metanol kullanılarak kontrol aynı şartlarda hazırlanmıştır. Kontrolün absorbansı günlük ölçülmüştür. Deney üç kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. % DPPH radikali giderme kapasitesi aşağıdaki formül üzerinden hesaplanmıştır:

$$\% \text{ DPPH radikali giderme kapasitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 ]$$

$A_0$  : Kontrol çözeltisinin absorbansı

$A_1$  : Bitki ekstreleri ve standart çözeltilerin absorbansı

Daha sonrasında  $IC_{50}$  değeri (Başlangıç DPPH' derişiminde %50 azalmaya neden olan ekstre ve standart madde konsantrasyonu  $IC_{50}$  olarak tanımlanır) hesaplanmıştır. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar  $IC_{50} = \text{mg/mL}$  olarak verilmiştir (142).

#### 3.2.4.2. ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini

ABTS katyon radikali, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiozin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu ( $ABTS^{2-}$ )'nun peroksodisülfatla oksidasyonu ile oluşmaktadır. 7 mM ABTS amonyum tuzu suda çözüldükten sonra 2,45 mM potasyum peroksodisülfatla reaksiyona sokularak hazırlanan  $ABTS^{++}$  stok çözeltisi oda sıcaklığında koyu mavi bir renk meydana gelmesini sağlamak için 12-16 saat bekletilmiştir. Taze hazırlanan bu  $ABTS^{++}$  stok çözeltisi, 734 nm'de absorbansı  $0,70 \pm 0,02$  olacak şekilde distile su ile seyreltilmiş ve deneyde bu seyreltilmiş çözelti kullanılmıştır. 0,5-5 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden 40 µL alınmış ve 3960 µL  $ABTS^{++}$  çalışma çözeltisi ilave edilmiştir. Renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm'de distile suya karşı 6. dakikada ölçülmüştür. Örnek ve standart madde yerine 40

$\mu\text{L}$  distile su kullanılarak aynı şartlarda kontrol hazırlanmıştır. Kontrolün absorbansı günlük ölçülmüştür. % ABTS katyon radikalini giderici aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ABTS katyon radikalini giderici aktivite} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$$

$A_0$ : Kontrol reaksiyonunun absorbansı

$A_1$ : Bitki ekstraktları ve standart çözeltilerin absorbansı

0,2-1 mM konsantrasyonlarda hazırlanan troloks çözeltilerine ABTS radikal süpürücü tayini uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar mM troloks/mg ekstre şeklinde hesaplanmıştır. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alınmıştır (143).

#### **3.2.4.3. Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)**

FRAP belirteci, 25 mL 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 2,5 mL TPTZ çözeltisi (10 mM TPTZ'nin 40 mM HCl'deki çözeltisi) ve 2,5 mL 20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'nin karıştırılması ile hazırlanmıştır. Bu karışım  $37^\circ\text{C}$  de 30 dakika bekletilmiştir. Mikroplakaya ekstraktlardan 10  $\mu\text{L}$  koyulmuş ve üzerine FRAP belirtecinden 190  $\mu\text{L}$  ilave edilmiştir. Referans, ekstre yerine distile su konularak hazırlanmıştır. Referansa karşı absorbans artışı 4. dakikada 593 nm'de ölçülmüştür. Ekstrelerin 593 nm'deki absorbans değerleri,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ile hazırlanan kalibrasyon grafiğine ait değerlerle karşılaştırılmak suretiyle, FRAP değeri mM  $\text{FeSO}_4$ /mg ekstre olarak ifade edilmiştir (144).

#### **3.2.4.4. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)**

60  $\mu\text{L}$   $\text{Cu(II)} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \cdot 10^{-2}$  M), 60  $\mu\text{L}$  neocuprain ( $7,3 \cdot 10^{-3}$  M), 60  $\mu\text{L}$  (1 M)  $\text{NH}_4\text{Ac}$  karıştırılmış ve sonrasında 60  $\mu\text{L}$  ekstre ve 10  $\mu\text{L}$  distile su karışımına ilave edilmiştir. Daha sonra karışım vortekslenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra karışımın absorbansı 450 nm'de referansa karşı mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Ekstrelerin CUPRAC değerleri mM trolox/mg ekstre olarak verilmiştir (145).

### 3.2.5. Antiüreaz Aktivite Tayin Yöntemi

5 mg/mL olarak hazırlanan stok çözeltiler seyreltilerek 0,5 mg/mL konsantrasyonunda çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerinden 100 µL alınmış ve üzerine 500 µL üreaz enzimi koyulmuştur. Karışım inkübatörde 37°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bu karışımın üzerine 1100 µL üre koyulmuş ve tekrar inkübatörde 37°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiştir. Karışımın üzerine sırasıyla R1 (%1 fenol, %0,005 sodyum nitroprusid) ve R2 (%0,5 NaOH, %0,1 sodyum hipoklorit) reaktifleri konulmuş ve karışım 2 saat inkübatörde 37°C'de tutulmuştur. Daha sonra 635 nm'de referansa karşı karışımın absorbansı ölçülmüştür (146).

Üreaz enzim inhibisyon yüzdesi (%) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Enzim inhibisyon} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub>: Kontrol çözeltisinin absorbansı

A<sub>1</sub>: Bitki ekstraktları ve standart çözeltilerin absorbansı

### 3.2.6. Antiasetilkolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi

Ekstrelerin asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür. Aktivite ölçümü sarı renkli 5,5- ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile yapılmıştır. Asetilkolinesteraz enzimi ve substrat olarak asetil tiyokolin iyodür kullanılmıştır. Kontrol olarak etanol, standart olarak galantamin kullanılmıştır.

Plakaya 40 µL 0,1 M fosfat tampon çözeltisi (pH=8), 20 µL 0,5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış ekstrakt ve 20 µL AChE enzim çözeltisi koyulmuştur. Bu karışım 10 dakika boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL DTNB reaktifi ve 20 µL AcI (substrat) eklenmiştir. Aynı işlem galantamin için de uygulanmıştır. Substratın (AcI) hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyon vermesi nedeni ile oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu miktarı 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Antiasetilkolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon hesaplanmıştır. Bunun için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (146).

$$\%I = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

### 3.2.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Esteraz Aktivite Tayini ve Kinetik Çalışmalar

CA enzimi üzerinde inhibitörlerin etkisini araştırmak için esteraz aktivite tayini kullanılmıştır. Bu metot, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması temeline dayanmaktadır. Karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorbands veren p-nitrofenolat veya p-nitrofenol’a hidrolize eder ( $\epsilon_{348}=5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (147).

Tayin işlemlerinde şu yol izlenmiştir: 300  $\mu\text{L}$  tampon, 200  $\mu\text{L}$  substrat, 60  $\mu\text{L}$  su ve 40  $\mu\text{L}$  enzim kuvartz küvetlere konulduktan 3 dakika sonraki 25°C’de 348 nm’de absorbandsı okunmuştur. Spektrofotometre daha önce enzim yerine tampon konularak karışımın 3 dakika sonraki absorbandsı ile sıfıra ayarlanmıştır. Böylece 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitrofenilasetatın absorbsiyonu için düzeltme yapılmıştır. İnhibitörlü çalışmalarda ise azaltılan suyun miktarı kadar inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapılmıştır.

Deneyde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi günlük olarak hazırlanmıştır. 27,2 mg p-nitrofenilasetat, 1 mL aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL distile suya azar azar ilave edilmiştir. Substratın sınırlı çözünürlüğünden dolayı bu çözelti 3 mM’dir ve daha derişğini hazırlamak mümkün değildir. Asetonun tercih edilme sebebi ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe etmesidir.

Temin edilen hCA II enziminin  $\text{IC}_{50}$  değerlerini belirlemek için farklı inhibitör (bitki ekstraktı) konsantrasyonları kullanılmış ve aktivite ölçümleri optimum koşullarda yapılmıştır. Lineweaver-Burk grafiğı elde edilen verilerden çizilmiş ve  $K_M$  değerleri bu grafikten hesaplanmıştır (148).

### 3.2.8. HPLC-DAD Çalışma Şartları

Güçlü biyolojik aktivite gösteren bitkilerin içerdiği fenolik bileşiklerin analiz edilmesinde yüksek basınçlı/performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve fotodiyot dizisi detektörlerini (PDA/DAD) içeren sistem kullanılmıştır (Agilent 1260 Infinity CA, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD). Bu sistemde bileşiklerin ayrımı Waters Nova-Pak C18 kolon (4  $\mu\text{m}$ ; 3,9x150 mm) kullanılarak yapılmıştır.

HPLC-DAD sisteminde kullanılan çalışma koşulları aşağıda belirtilmiştir. Mobil faz (A) su ve % 0,1'lik trifloroasetik asitten; mobil faz (B) ise asetonitril ve %0,1'lik trifloroasetik asitten oluşmaktadır. Gradient programı olarak aşağıdaki sistem takip edilmiştir: 0 dk %5 B; 1 dk %5 B; 20 dk %30 B; 25 dk %60 B; 28 dk %60 B; 33 dk %95 B; 35 dk %95 B; 40 dk %5 B. Sisteme numune 20 µL enjekte edilmiş ve akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlenmiştir (149). Elde edilen ekstratlar metanol/su (2:1) çözeltisinde çözülmüş ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edilmiştir.





## 4. BULGULAR

### 4.1. FİTOKİMYASAL ÖN DENEME SONUÇLARI

*Achillea setacea*, *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*, *Tanacetum macrophyllum*, *Paeonia mascula* subsp. *arietina*, *Plantago lanceolata* ve *Hypericum perforatum* bitkilerine ait fitokimyasal ön deneme sonuçları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Bitkilerin fitokimyasal ön deneme sonuçları

| Etken madde grubu  |               | H.P. | A.M.M. | A.S. | P.M.A. | T.M. | P.L. |
|--------------------|---------------|------|--------|------|--------|------|------|
| Alkaloit           | Bouchardat    | -    | -      | -    | -      | -    | -    |
|                    | Dragendorff   | -    | -      | -    | -      | -    | -    |
|                    | Mayer         | -    | -      | -    | -      | -    | -    |
| Antrasen türevleri |               | -    | -      | -    | -      | -    | -    |
| Flavon türevleri   |               | +    | +      | +    | +      | +    | +    |
| Saponin            |               | +    | -      | -    | +      | -    | -    |
| Tanen              | Gallik Tanen  | -    | -      | -    | +      | -    | -    |
|                    | Kateşik Tanen | +    | +      | +    | -      | +    | +    |

H.P.: *Hypericum perforatum*

A.M.M: *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*

A.S.: *Achillea setacea*

P.M.A: *Paeonia mascula* subsp. *arietina*

T.M: *Tanacetum macrophyllum*

P.L.: *Plantago lanceolata*

Bitkilerin fitokimyasal ön değerlendirme sonuçlarında, bütün bitkilerin flavon ve tanen bileşiklerini içerdikleri fakat alkaloit ve antrasen türevi bileşikler içermedikleri tespit edilmiştir. Bitkiler arasında sadece *Hypericum perforatum* ve *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkilerinde saponin varlığı saptanmıştır.

## 4.2. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI

### 4.2.1. DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Tayini

Bitkilerden elde edilen farklı ekstrelerin serbest radikal süpürücü aktiviteleri DPPH yöntemi ile tayin edilmiştir. Ekstrelerin ve standart maddelerin antioksidan aktiviteleri  $IC_{50}$  değerleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Petrol eteri ekstrelerinin radikal süpürücü aktiviteleri çizelge 4.2’de, kloroform ekstreleri çizelge 4.3 ve etanol ekstreleri ise çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

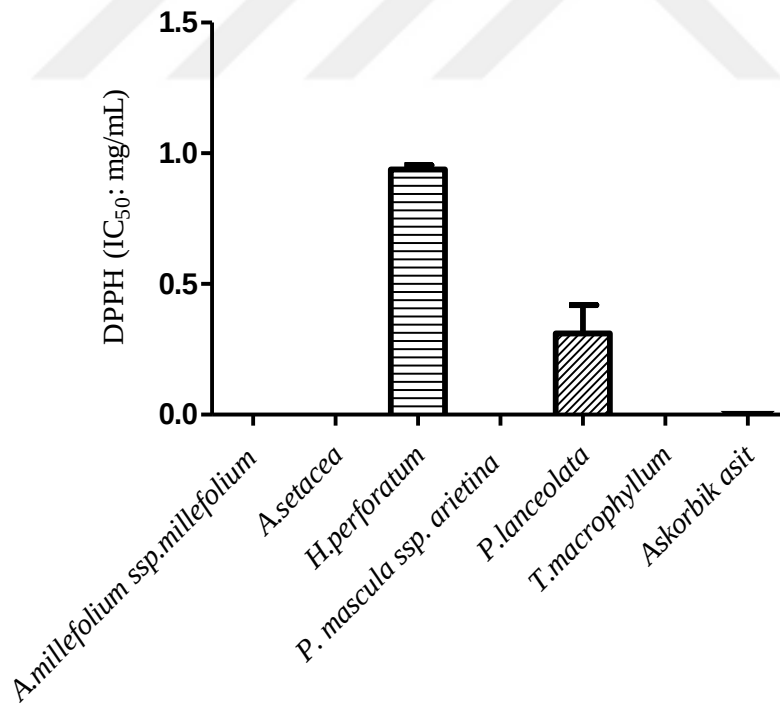
Petrol eteri ekstreleri kendi aralarında kıyaslandığında en güçlü etki *Plantago lanceolata* ( $IC_{50}$ :  $0,310 \pm 0,153$  mg/mL) bitkisinde görülmüştür. *Hypericum perforatum* düşük aktivite gösterirken, diğer bitkilerin petrol eteri ekstrelerinde serbest radikal süpürücü aktivite gözlenmemiştir. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstreleri kendi içlerinde karşılaştırıldığında en güçlü aktiviteyi gösteren bitki yine *Plantago lanceolata* ( $IC_{50}$ :  $0,156 \pm 0,001$  mg/mL) olmuştur. Etanol ekstrelerine bakıldığında ise en yüksek aktiviteyi *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,000$  mg/mL) ve *Tanacetum macrophyllum* ( $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,000$  mg/mL) bitkileri göstermiştir. Petrol eteri ve kloroform ekstrelerinden farklı olarak *Plantago lanceolata* bitkisinden elde edilen etanol ekstresi ( $IC_{50}$ :  $0,113 \pm 0,008$  mg/mL) en zayıf aktivite gösteren etanol ekstresi olarak tespit edilmiştir. Bitkilerden elde edilen bütün ekstreler kıyaslandığında etanol ekstrelerinin petrol eteri ve kloroform ekstrelerinden daha güçlü DPPH radikal süpürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,000$  mg/mL) ve *Tanacetum macrophyllum* ( $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,000$  mg/mL) bitkilerinden hazırlanan etanol ekstrelerinin diğer bitkilerden daha yüksek DPPH radikali süpürücü aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bitkilerden hazırlanan farklı ekstrelerin DPPH radikal süpürücü potansiyelleri standart olarak kullanılan askorbik asit ile karşılaştırılmış ve bütün ekstrelerin askorbik asitten ( $IC_{50}$ :  $0,0028 \pm 0,0004$  mg/mL) daha düşük radikal süpürücü potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstrelerin DPPH radikali süpürücü aktiviteleri

| Ekstre                                                | IC <sub>50</sub> mg/mL |
|-------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | -                      |
| <i>Achillea setacea</i>                               | -                      |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,938±0,024            |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | -                      |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 0,310±0,153            |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | -                      |
| Askorbik asit*                                        | 0,0028±0,0004          |

-: aktivite göstermemiştir.

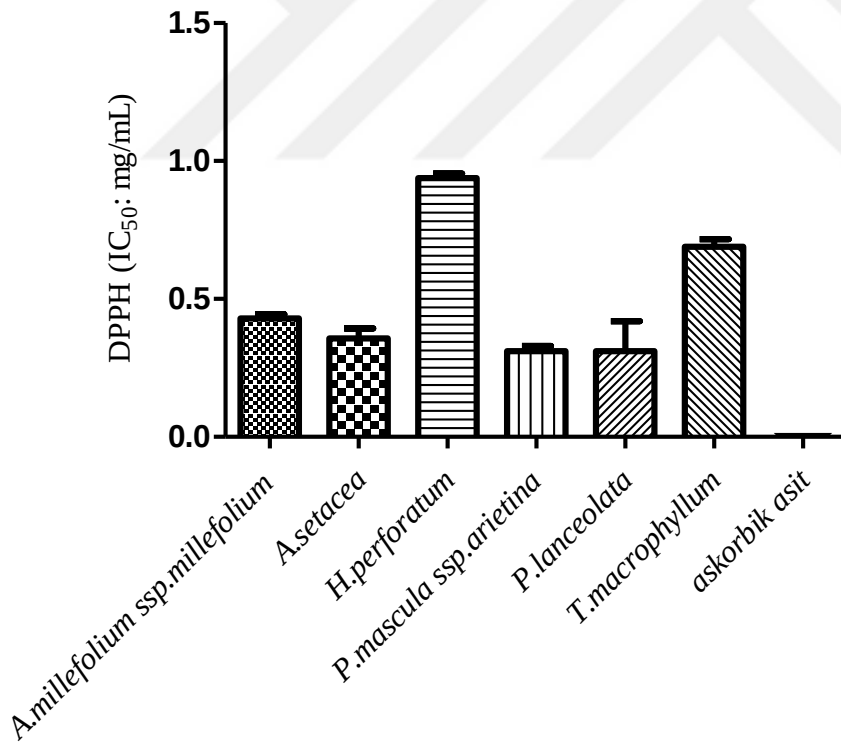
\*: standart

**Şekil 4.1.** Bitkiden elde edilen petrol eteri ekstrelerin IC<sub>50</sub> değerleri

**Çizelge 4.3.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının DPPH radikali süpürücü aktiviteleri

| Ekstre                                                | IC <sub>50</sub> mg/mL |
|-------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 0,429±0,021            |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 0,357±0,051            |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,938±0,024            |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 0,311±0,026            |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 0,156±0,001            |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 0,690±0,038            |
| Askorbik asit*                                        | 0,0028±0,0004          |

\*: standart

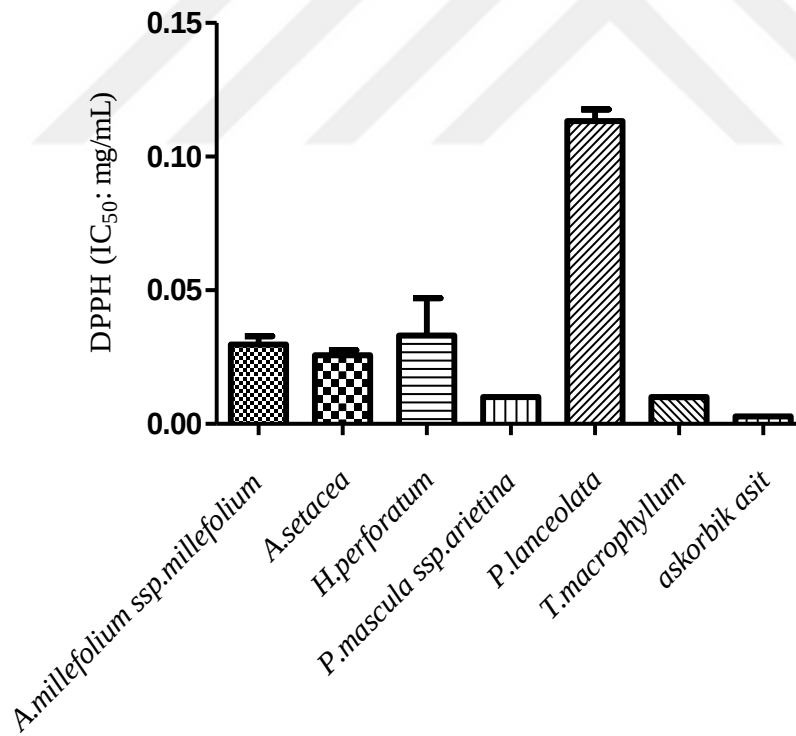


**Şekil 4.2.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının IC<sub>50</sub> değerleri

**Çizelge 4.4.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının DPPH radikali süpürücü aktiviteleri

| Ekstre                                                | IC <sub>50</sub> mg/mL |
|-------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 0,030±0,005            |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 0,026±0,003            |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,033±0,020            |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 0,010±0,0001           |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 0,113±0,008            |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 0,010±0,0001           |
| Askorbik asit*                                        | 0,0028±0,0004          |

\*: standart

**Şekil 4.3.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının IC<sub>50</sub> değerleri

#### 4.2.2. ABTS/TEAC (Troloks Ekvivalenti Antioksidan Aktivite) Yöntemi

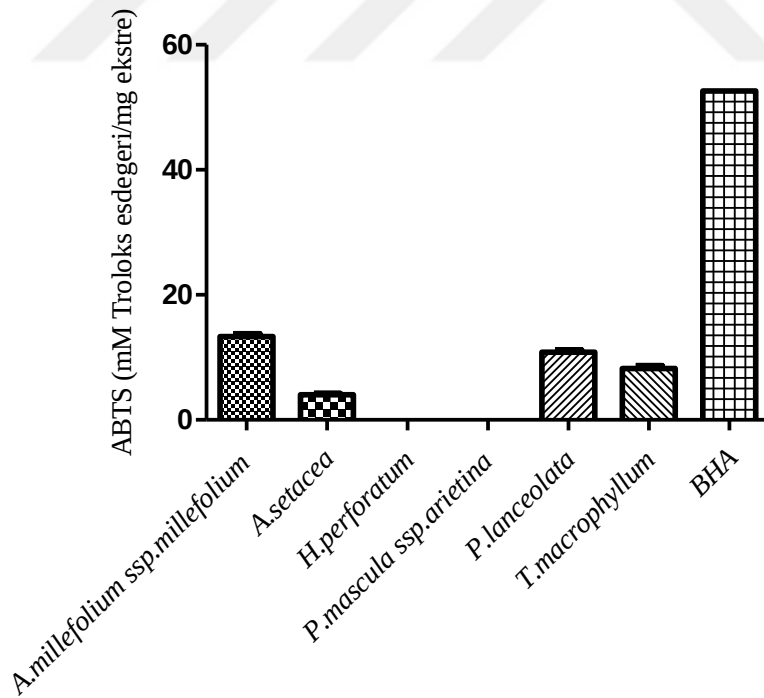
Yapılan çalışmalar sonucu petrol eteri ekstrelerinden elde edilen sonuçlar kendi aralarında kıyaslandığında en güçlü aktiviteyi *A. millefolium* subsp. *millefolium* ekstresi ( $13,348 \pm 0,766$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) göstermiştir. *Hypericum perforatum* ve *Paeonia mascula* subsp. *arietina* türlerinden elde edilen petrol eteri ekstrelerinin ABTS radikal süpürücü aktivitelerinin olmadığı saptanmıştır. Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerine bakıldığında ise *Tanacetum macrophyllum* ( $21,620 \pm 1,041$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) bitkisinden elde edilen ekstrenin en güçlü ABTS radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Etanol ekstreleri kendi içinde karşılaştırıldığında en güçlü radikal süpürücü etki *P. mascula* subsp. *arietina* ( $52,843 \pm 0,0001$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) ve *Hypericum perforatum* ( $52,376 \pm 0,501$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) ekstrelerinde tespit edilmiştir. Bu çalışmada, bitkilerden elde edilen bütün ekstrelerin troloks ekvivalenti antioksidan aktiviteleri kıyaslandığında en güçlü etkinin *P. mascula* subsp. *arietina* bitkisine ait etanol ekstresinde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu yöntemde bütün ekstrelerin ABTS radikal süpürücü aktiviteleri standart olarak kullanılan bütilhidroksi anisol (BHA) bileşiği ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *P. mascula* subsp. *arietina* bitkisinden elde edilen etanol ekstresinin, BHA ( $52,63 \pm 0,01$  mM Troloks eşdeğeri/mg) bileşiğinden yüksek; *Hypericum perforatum* bitkisinin ise BHA bileşiğine yakın ABTS radikal süpürücü aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının ABTS katyon radikali süpürücü aktiviteleri

| Ekstre                                                | mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 13,348±0,766                  |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 4,021±0,312                   |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | -                             |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | -                             |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 10,820±0,626                  |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 8,243±0,723                   |
| BHA*                                                  | 52,63±0,01                    |

-: aktivite göstermemiştir.

\*: standart

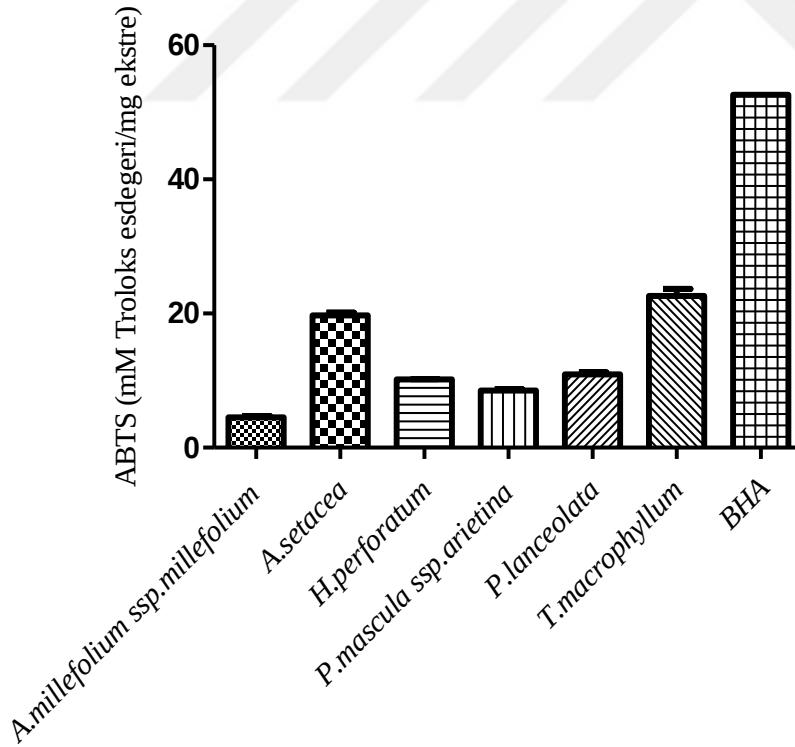


**Şekil 4.4.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının ABTS değerleri

**Çizelge 4.6.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının ABTS katyon radikali süpürücü aktiviteleri

| Ekstre                                                | mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 4,536±0,321                   |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 19,706±0,625                  |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 10,182±0,085                  |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 8,513±0,312                   |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 10,918±0,501                  |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 21,620±1,041                  |
| BHA*                                                  | 52,63±0,01                    |

\*: standart

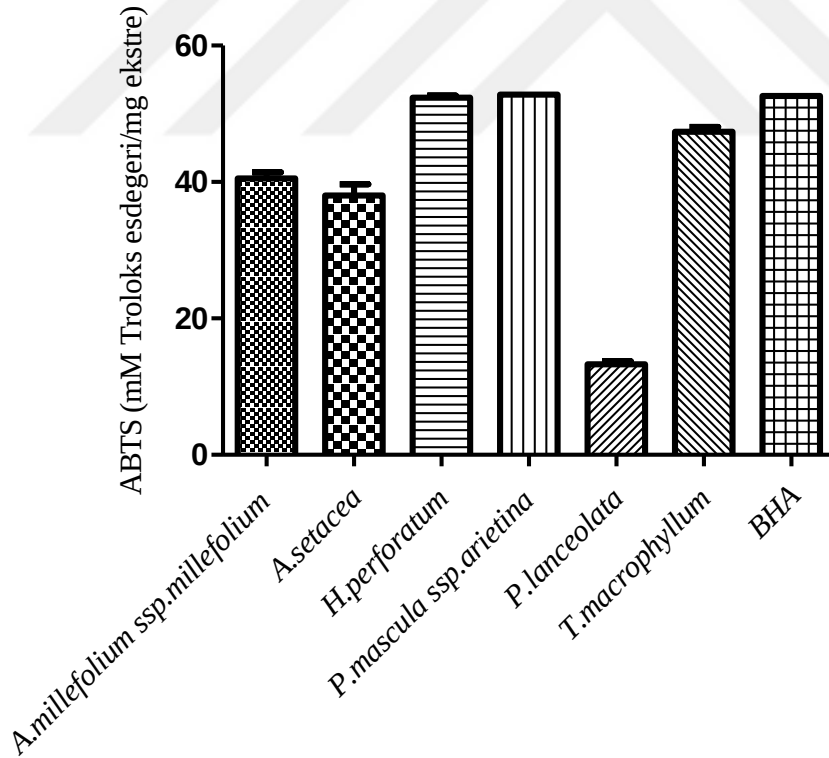


**Şekil 4.5.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının ABTS değerleri

**Çizelge 4.7.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının ABTS katyon radikali süpürücü aktiviteleri

| Ekstre                                                | mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 40,508±1,302                  |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 38,005±2,343                  |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 52,376±0,501                  |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 52,843±0,0001                 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 13,250±0,794                  |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 47,393±1,217                  |
| BHA*                                                  | 52,63±0,01                    |

\*: standart



**Şekil 4.6.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının ABTS değerleri

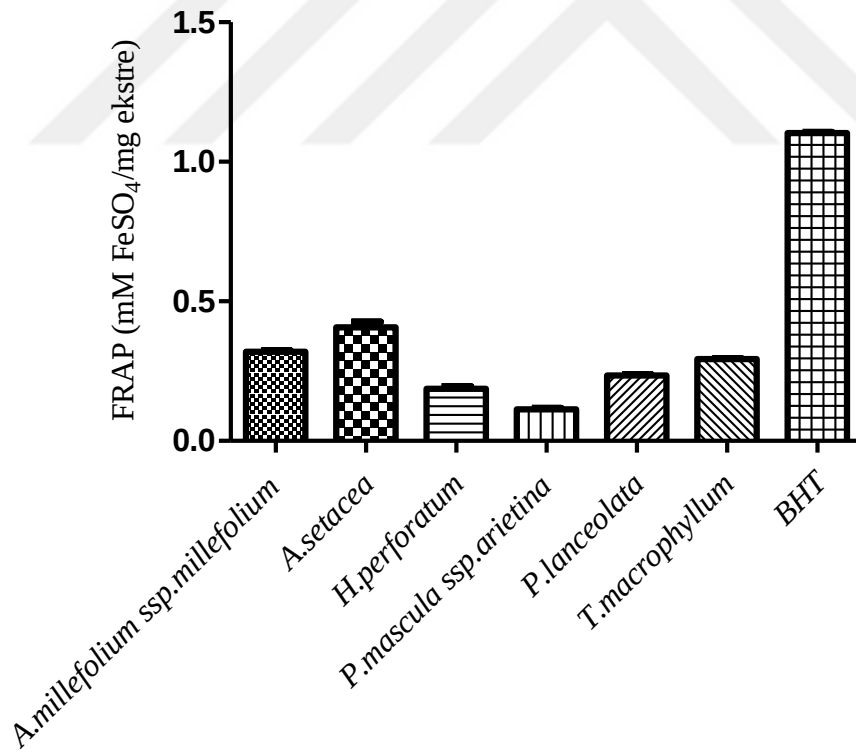
#### 4.2.3.Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü Tayini (FRAP)

Yapılan bu çalışmada bitkilerden elde edilen farklı ekstrelerin Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Petrol eteri ekstreleri kendi aralarında kıyaslandığında en güçlü etki *Achillea setacea* ( $0,407 \pm 0,034$  mM FeSO<sub>4</sub>/mg ekstre) bitkisinden elde edilen ekstrede görülmüştür. Kloroform ekstrelerine bakıldığında ise en yüksek demir (III) iyonu indirgeme gücüne *Tanacetum macrophyllum* ( $0,733 \pm 0,035$  mM FeSO<sub>4</sub>/mg ekstre) bitkisinde rastlanılmıştır. Etanol ekstreleri kendi aralarında karşılaştırıldığında *Tanacetum macrophyllum* ( $0,458 \pm 0,029$  mM FeSO<sub>4</sub>/mg ekstre) bitkisinden elde edilen ekstrenin en güçlü etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Bütün ekstrelerin demir (III) iyonu indirgeme gücü karşılaştırıldığında en güçlü indirgemenin *Tanacetum macrophyllum* bitkisinden elde edilen kloroform ve etanol ekstrelerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Bütün ekstrelerin Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü standart olarak kullanılan bütilhidroksi toluen (BHT) ( $1,10 \pm 0,001$  mM FeSO<sub>4</sub>/mg) bileşiğinden daha düşük indirgeme potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır.

**Çizelge 4.8.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının FRAP değerleri

| Ekstre                                                | mM FeSO <sub>4</sub> /mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 0,320±0,009                     |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 0,407±0,034                     |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,187±0,016                     |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 0,114±0,007                     |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 0,235±0,005                     |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 0,293±0,006                     |
| BHT*                                                  | 1,10±0,001                      |

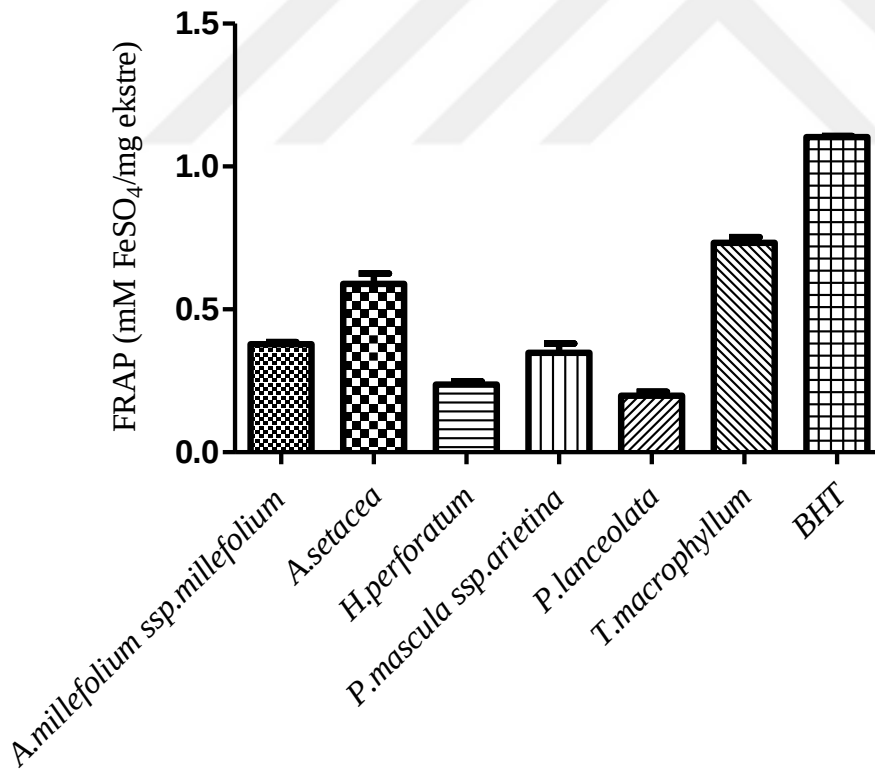
\*: standart

**Şekil 4.7.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının FRAP değerleri

**Çizelge 4.9.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrlerinin FRAP değerleri

| Ekstre                                                | mM FeSO <sub>4</sub> /mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 0,378±0,013                     |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 0,590±0,063                     |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,237±0,018                     |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 0,348±0,058                     |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 0,199±0,023                     |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 0,733±0,035                     |
| BHT*                                                  | 1,10±0,001                      |

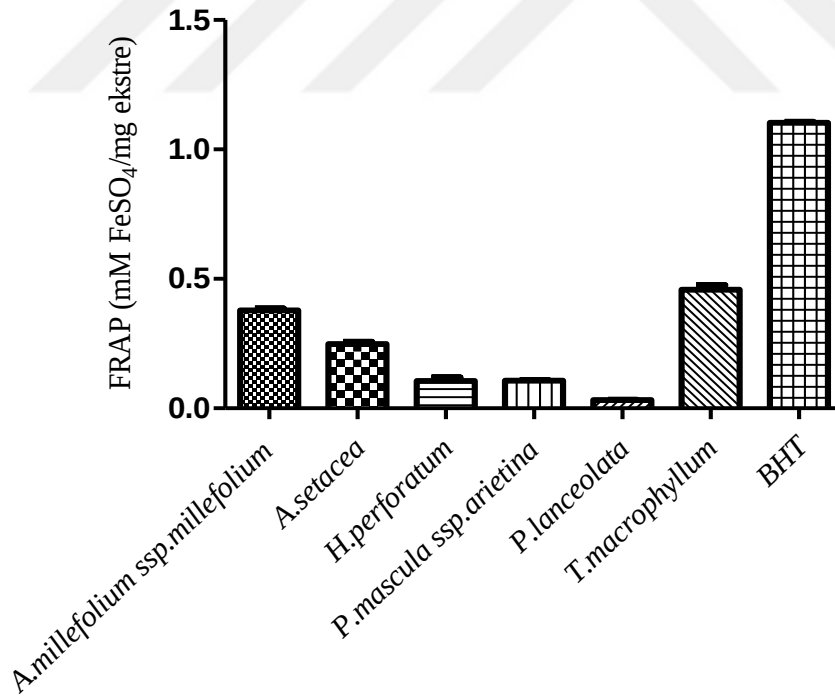
\*: standart

**Şekil 4.8.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrlerinin FRAP değerleri

**Çizelge 4.10.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrlerinin FRAP değerleri

| Ekstre                                                | mM FeSO <sub>4</sub> /mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 0,378±0,013                     |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 0,249±0,014                     |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,106±0,023                     |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 0,107±0,005                     |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 0,032±0,003                     |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 0,458±0,029                     |
| BHT*                                                  | 1,10±0,001                      |

\*: standart

**Şekil 4.9.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrlerinin FRAP değerleri

#### 4.2.4. Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi

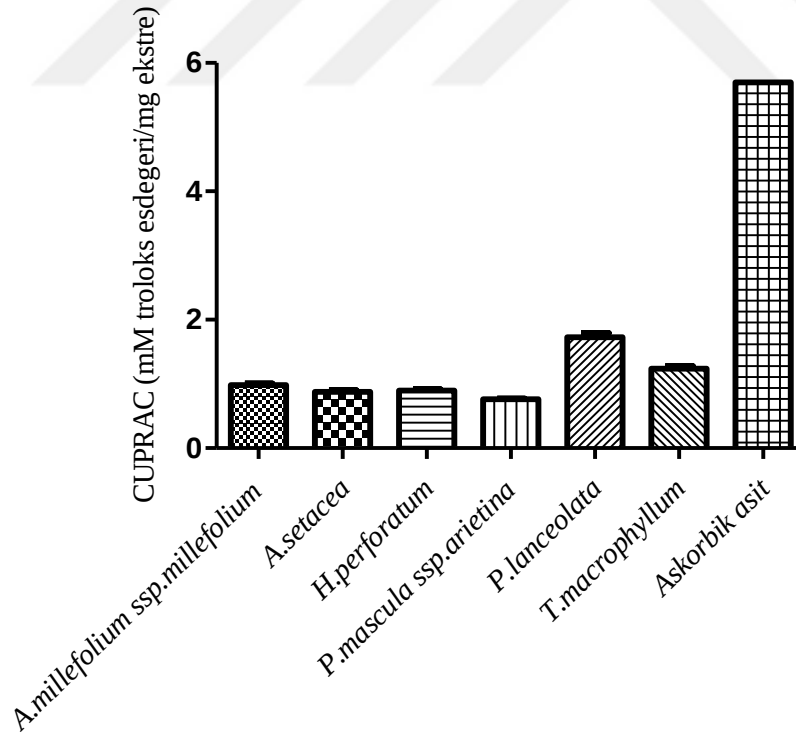
Farklı bitkiden hazırlanan farklı ekstrelerin bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi CUPRAC yöntemi ile ölçülmüştür. Bitkilerin petrol eteri ekstreleri kıyaslandığında en güçlü etki *Plantago lanceolata* ( $1,728 \pm 0,108$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) bitkisinde görülmüştür. Kloroform ekstreleri kendi aralarında kıyaslandığında en güçlü bakır (II) iyonu indirgeyici aktivite *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $1,943 \pm 0,040$  mM troloks eşdeğeri/mg ekstre) bitkisinde tespit edilmiştir. Etanol ekstrelerinin bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri karşılaştırıldığında ise *Achillea setacea* ( $5,502 \pm 0,072$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) ve *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $5,265 \pm 0,083$  mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre) bitkilerinin en yüksek bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bitkilerden elde edilen tüm ekstrelerin bakır (II) iyonu indirgeyici kapasiteleri kıyaslandığında en güçlü etki sırasıyla *Achillea setacea* ve *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkilerinden elde edilen etanol ekstrelerinde tespit edilmiştir. Bütün ekstrelerin bakır (II) iyonu indirgeyici kapasitelerileri standart olarak kullanılan askorbik asit ile kıyaslandığında, *Achillea setacea* ve *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkilerinden elde edilen etanol ekstrelerinin askorbik asite ( $5,70 \pm 0,02$  mM Troloks eşdeğeri/mg) yakın bakır (II) iyonu indirgeyici kapasiteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.11.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının CUPRAC değeri

| Ekstre                                                | mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 0,982±0,042                   |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 0,880±0,044                   |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,899±0,033                   |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 0,761±0,017                   |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 1,728±0,108                   |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 1,237±0,066                   |
| Askorbik asit*                                        | 5,70±0,02                     |

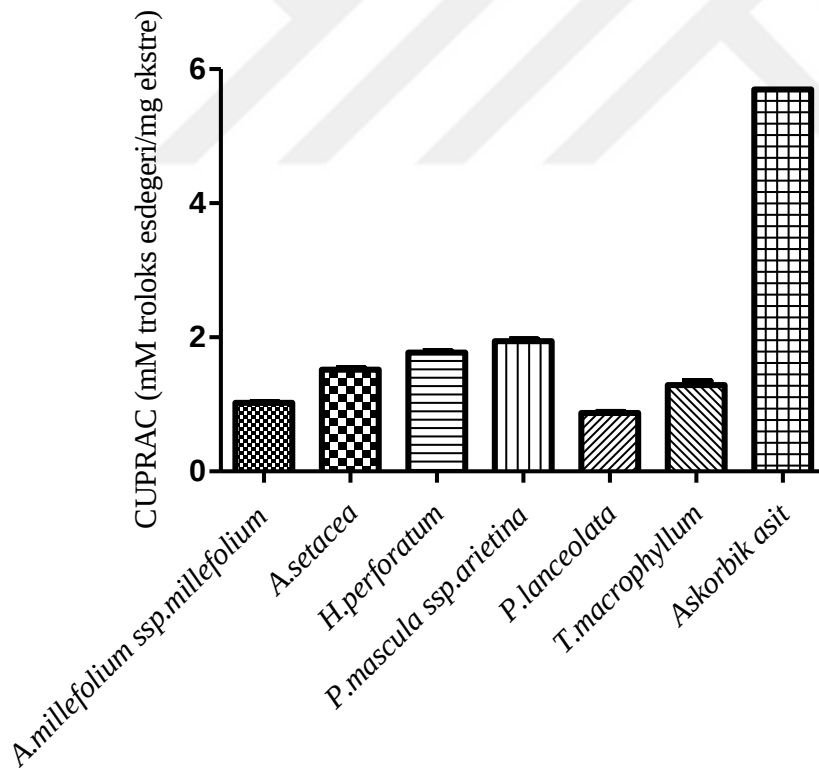
\*: standart

**Şekil 4.10.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının CUPRAC değeri

**Çizelge 4.12.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının CUPRAC değeri

| Ekstre                                                | mM Troloks eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 0,982±0,042                   |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 1,518±0,037                   |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 1,771±0,035                   |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 1,943±0,040                   |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 0,873±0,025                   |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 1,290±0,099                   |
| Askorbik asit*                                        | 5,70±0,02                     |

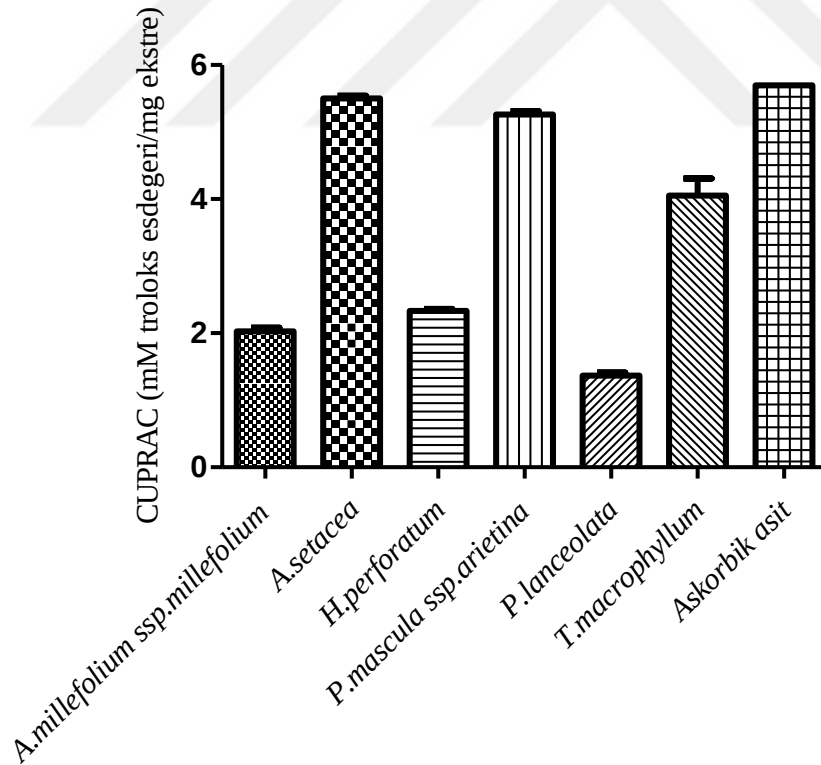
\*: standart

**Şekil 4.11.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının CUPRAC değeri

**Çizelge 4.13.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrlerinin CUPRAC değeri

| Ekstre                                                | mM troloks eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 2,027±0,099                   |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 5,502±0,072                   |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 2,333±0,051                   |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 5,265±0,083                   |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 1,366±0,081                   |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 4,053±0,436                   |
| Askorbik asit*                                        | 5,70±0,02                     |

\*: standart

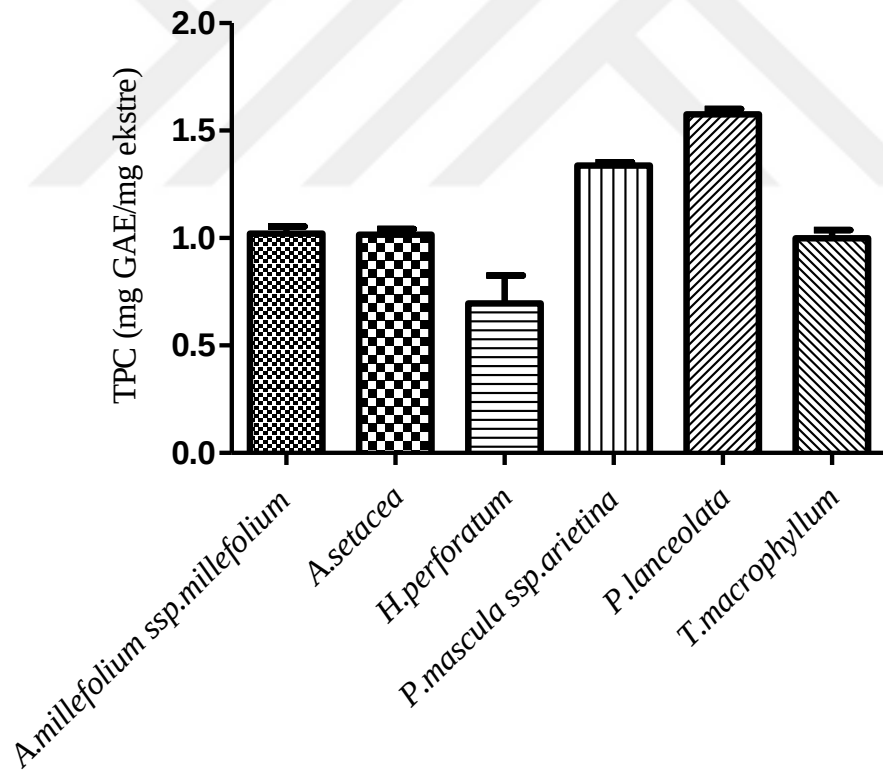
**Şekil 4.12.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrlerinin CUPRAC değeri

#### 4.2.5. Ekstrelerin Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

Bitkilerden elde edilen farklı ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı FCR yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Petrol eteri ekstreleri kendi aralarında kıyaslandığında en yüksek fenolik madde miktarı *Plantago lanceolata* ( $1,576 \pm 0,044$  mg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre) bitkisinde görülmüştür. Kloroform ekstreleri kendi içlerinde incelendiğinde *Achillea setacea* ( $1,823 \pm 0,076$  mg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre) bitkisinin toplam fenolik madde miktarının en fazla olduğu belirlenmiştir. Bitkilerden elde edilen etanol ekstreleri kıyaslandığında ise en yüksek değer *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $6,676 \pm 0,187$  mg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre) bitkisine ait etanol ekstresinde tespit edilmiştir.

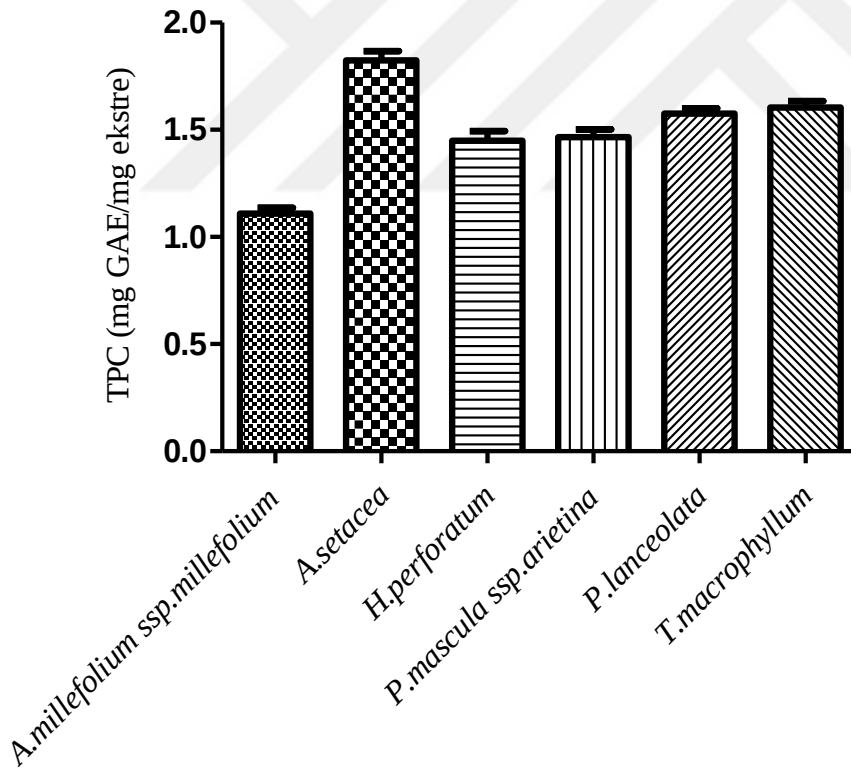
**Çizelge 4.14.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstraktların içerdiği fenolik madde miktarı

| Ekstre                                                | mg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 1,021±0,059                       |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 1,015±0,048                       |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 0,696±0,184                       |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 1,338±0,025                       |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 1,576±0,044                       |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 0,999±0,069                       |

**Şekil 4.13.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstraktların içerdiği fenolik madde miktarı

**Çizelge 4.15.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı  
Ekstre mg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre

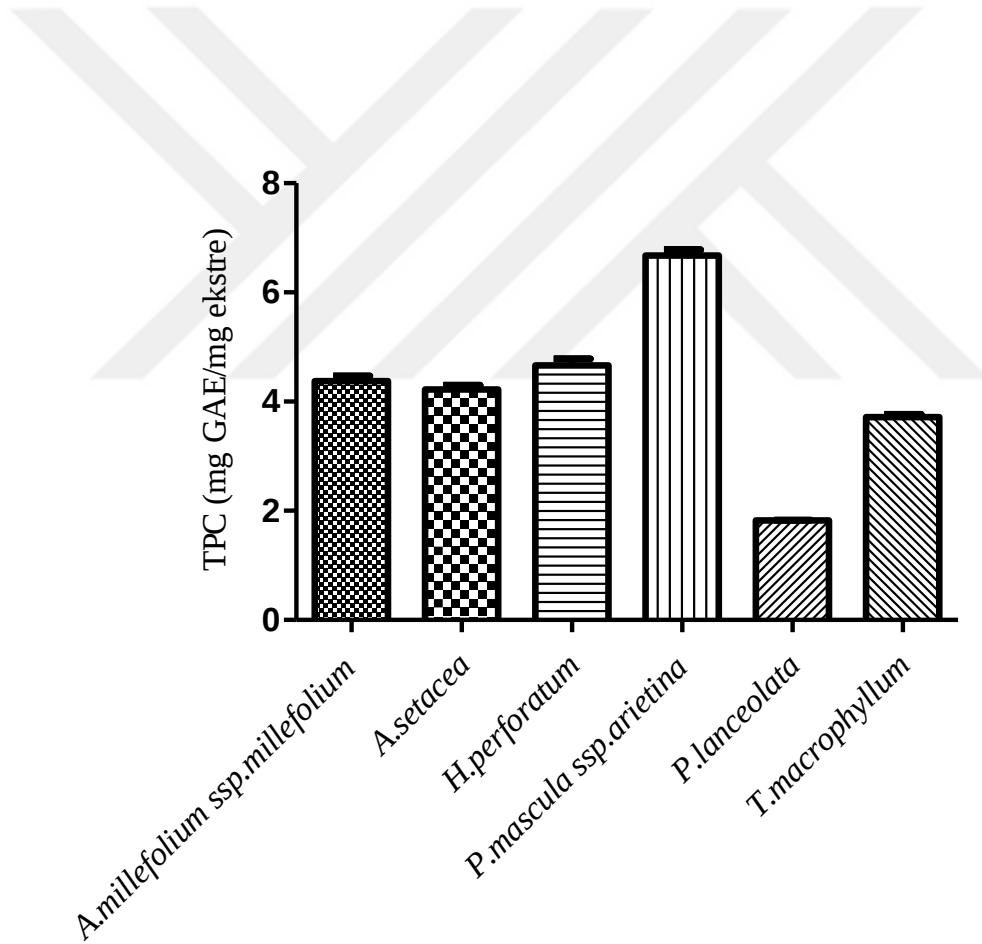
|                                                       |             |
|-------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 1,110±0,044 |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 1,823±0,076 |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 1,449±0,079 |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 1,465±0,063 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 1,576±0,044 |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 1,604±0,054 |



**Şekil 4.14.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı

**Çizelge 4.16.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı

| Ekstre                                                | mg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 4,376±0,165                       |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 4,226±0,130                       |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 4,663±0,208                       |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 6,676±0,187                       |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 1,823±0,014                       |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 3,716±0,089                       |

**Şekil 4.15.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrelerin içerdiği fenolik madde miktarı

### 4.3. ANTİASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTE

Bitkilerden hazırlanan 500 µg/mL konsantrasyondaki farklı ekstralarının ve standart olarak kullanılan galantamin bileşiğinin asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyonları karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Petrol eteri ekstraları kendi aralarında kıyaslandığında en yüksek enzim inhibisyonu *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* (%75,149±4,606) ve *Hypericum perforatum* (%74,671±2,512) bitkilerinde tespit edilmiştir. *Tanacetum macrophyllum* bitkisinden elde edilen petrol eteri ekstresinin ise asetilkolinesteraz enzimi üzerinde inhibisyon etkisine sahip olmadığı saptanmıştır. Bitkilerin kloroform ekstraları kendi içinde kıyaslandığında ise en güçlü antiasetilkolinesteraz aktivite yine *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* (%82,819±2,747) bitkisinde görülmüştür. *Tanacetum macrophyllum* (%63,070±3,882) ve *Plantago lanceolata* (%62,991±5,603) bitkilerine ait kloroform ekstralarının de orta seviyede inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.

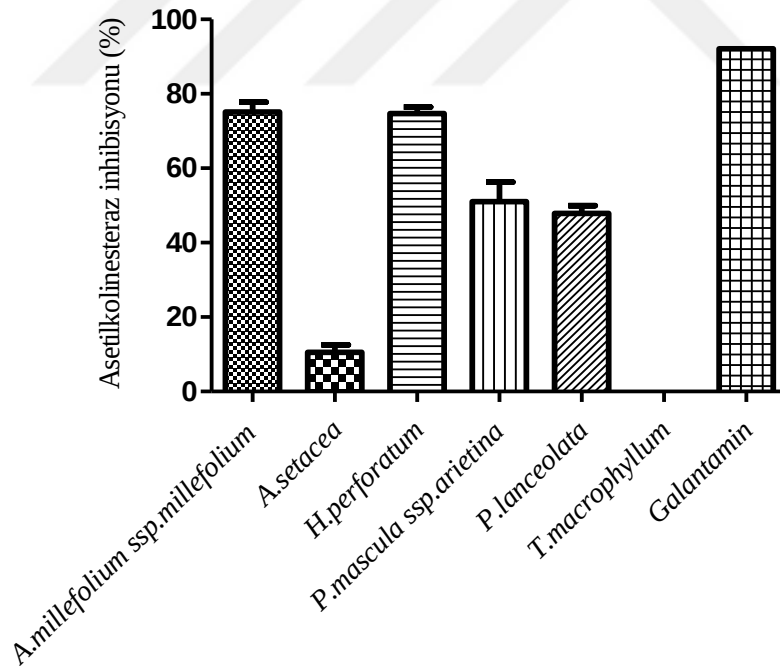
Etanol ekstraları kıyaslandığında en güçlü inhibisyonu gösteren bitkinin *Plantago lanceolata* (%81,699±0,767) bitkisi olduğu belirlenmiştir. Bu değeri *Hypericum perforatum* (%79,934±1,768), *Paeonia mascula* subsp. *arietina* (%78,129±2,675) ve *Tanacetum macrophyllum* (%74,605±4,526 ) bitkilerinin yakın inhibisyon değerleri ile takip ettiği görülmüştür. Petrol eteri ve kloroform ekstralarının aksine *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* (%29,781±5,004) bitkisinden hazırlanan etanol ekstresinin bütün etanol ekstraları içerisinde en zayıf antiasetilkolinesteraz aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Bitkilerden elde edilen bütün ekstraların asetilkolinesteraz enzim inhibisyon yüzdeleri standart olarak kullanılan galantamin bileşiği ile karşılaştırıldığında, bütün ekstraların galantamin (%92,120±1,300) bileşiğinden daha düşük enzim inhibisyon potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır. Bütün veriler değerlendirildiğinde, *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* bitkisinden elde edilen kloroform (%82,819±2,747) ekstresinin diğer bütün ekstralardan daha yüksek enzim inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.17.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının antiasetilkinesteraz aktiviteleri

| Ekstre (500 µg/mL)                                    | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 75,149±4,606 |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 8,772±2,791  |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 74,671±2,512 |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 51,053±7,443 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 47,899±3,628 |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | -            |
| Galantamin*                                           | 92,120±1,300 |

-: aktivite göstermemiştir.

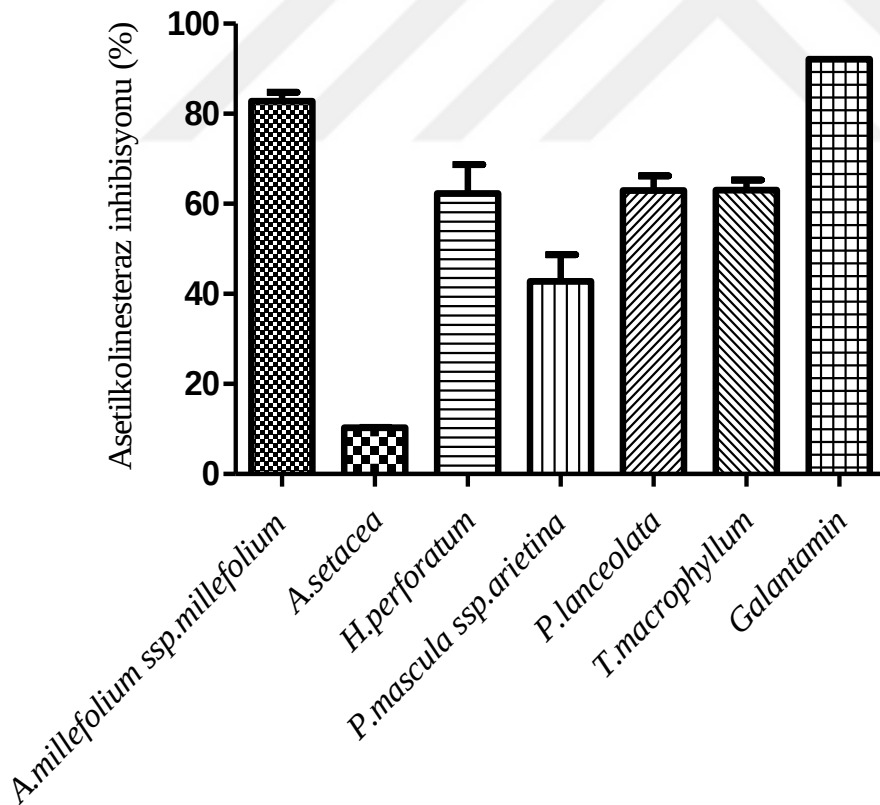
\*: standart

**Şekil 4.16.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının antiasetilkinesteraz aktiviteleri

**Çizelge 4.18.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının antiasetilkolinesteraz aktiviteleri

| Ekstre (500 µg/mL)                                    | % İnhibisyon |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 82,819±2,747 |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 10,263±0,186 |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 62,303±9,025 |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 42,763±8,374 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 62,991±5,603 |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 63,070±3,882 |
| Galantamin*                                           | 92,120±1,300 |

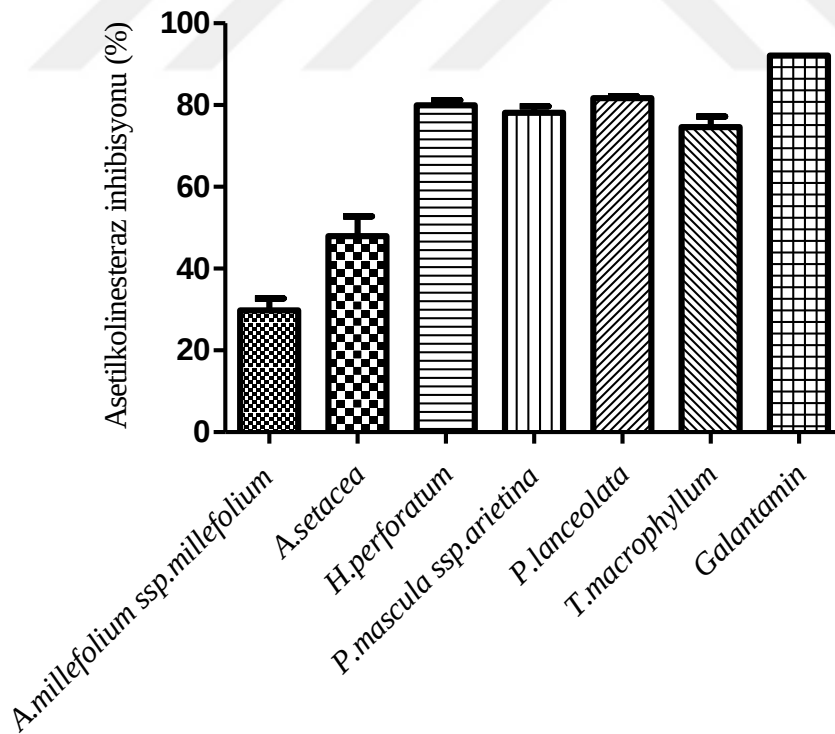
\*: standart

**Şekil 4.17.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının antiasetilkolinesteraz aktiviteleri

**Çizelge 4.19.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının antiasetilkinesteraz aktiviteleri

| Ekstre (500 µg/mL)                                    | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 29,781±5,004 |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 47,961±6,792 |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 79,934±1,768 |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 78,129±2,675 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 81,699±0,767 |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 74,605±4,526 |
| Galantamin*                                           | 92,120±1,300 |

\*: standart

**Şekil 4.18.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının antiasetilkinesteraz aktiviteleri

#### 4.4. ANTIÜREAZ AKTİVİTE

Bitkilerden elde edilen farklı ekstrelerin ve standart olarak kullanılan tiyoüre bileşiğinin 6,25 µg/mL konsantrasyondaki antiüreaz aktiviteleri indofenol yöntemi ile incelenmiştir. Farklı bitkilerden hazırlanan petrol eteri ekstreleri kendi aralarında kıyaslandığında antiüreaz aktivite *Plantago lanceolata* (%5,157±4,693) bitkisinde düşük seviyede görülmüş ve diğer bitkilerin petrol eteri ekstrelerinin antiüreaz aktivite göstermediği saptanmıştır. Elde edilen kloroform ekstreleri kendi içlerinde karşılaştırıldığında en yüksek aktivite *Achillea setacea* (%13,341±0,856) bitkisinde görülmüştür. *Plantago lanceolata* (%2,825±0,0001) ve *Hypericum perforatum* (%1,831±0,431) bitkilerinden elde edilen kloroform ekstrelerinin düşük inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Diğer bitkilerin kloroform ekstrelerinin üreaz enzim inhibisyon potansiyeline sahip olmadığı saptanmıştır. Etanol ekstreleri kıyaslandığında ise en güçlü inhibisyon *Achillea setacea* (%13,475±3,710) bitkisinde görülmüştür. *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* (%5,397±4,731) ve *Plantago lanceolata* (%4,103±0,222) bitkilerinden elde edilen etanol ekstrelerinde düşük antiüreaz etki görülürken diğer bitkilerin ekstrelerinde inhibisyon tespit edilmemiştir.

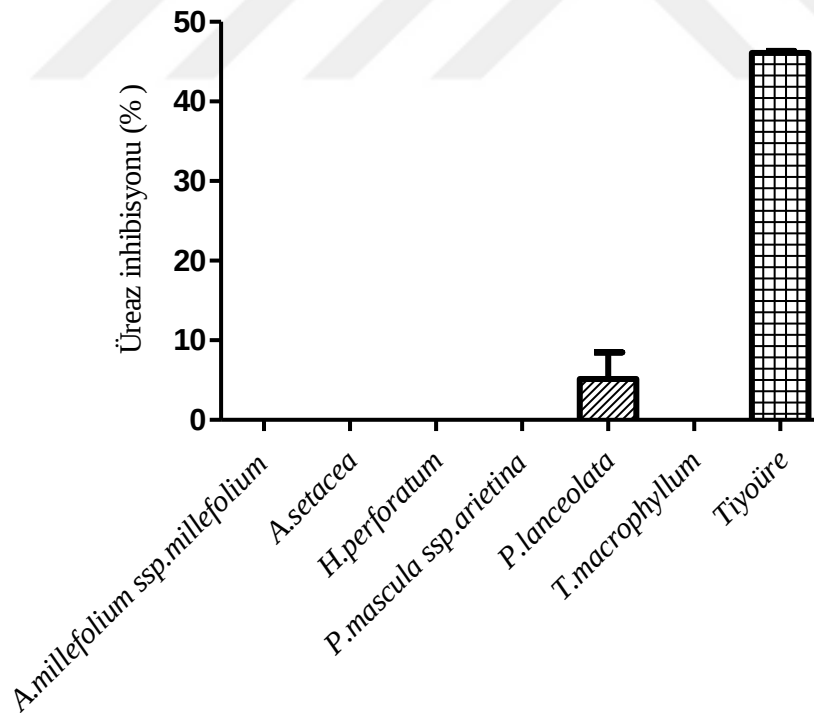
Bütün ekstreler kıyaslandığında en güçlü üreaz inhibisyonu *Achillea setacea* bitkisinin etanol (%13,475±3,710) ve kloroform (%13,341±0,856) ekstresinde olduğu saptanmıştır. Bütün ekstrelerin üreaz enzim inhibisyon yüzdeleri standart olarak kullanılan tiyoüre (%46,094±0,419) bileşiğinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.20.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının antiüreaz aktiviteleri

| Ekstre (6,25 µg/mL)                                   | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | -            |
| <i>Achillea setacea</i>                               | -            |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | -            |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | -            |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 5,157±4,693  |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | -            |
| Tiyoüre*                                              | 46,094±0,419 |

:- aktivite göstermemiştir.

\*: standart

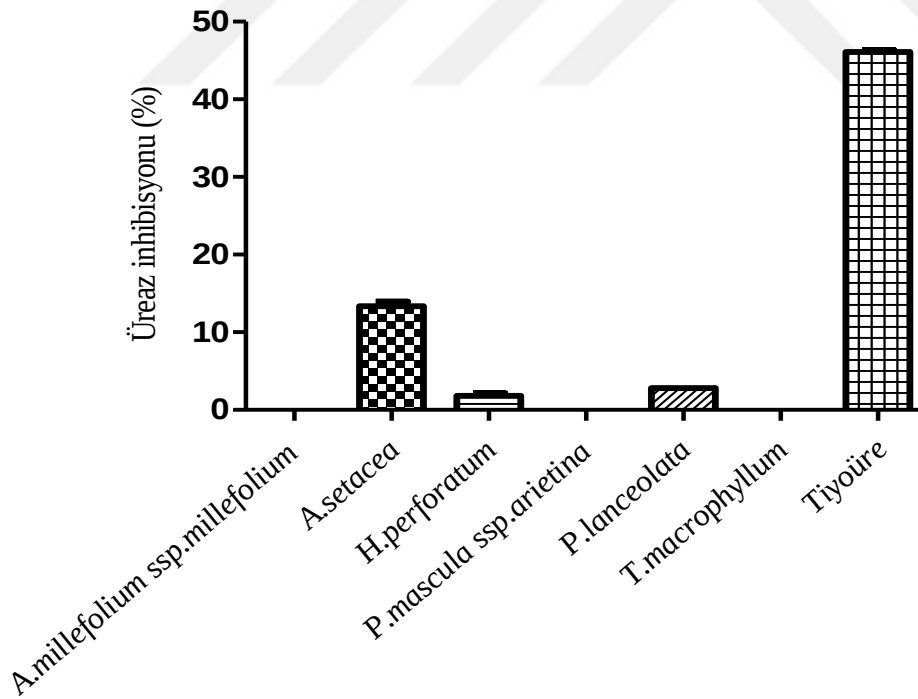
**Şekil 4.19.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının antiüreaz aktiviteleri

**Çizelge 4.21.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının antiüreaz aktiviteleri

| Ekstre (6,25 µg/mL)                                   | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | -            |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 13,341±0,856 |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 1,831±0,431  |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | -            |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 2,825±0,0001 |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | -            |
| Tiyoüre*                                              | 46,094±0,419 |

:- aktivite göstermemiştir.

\*: standart

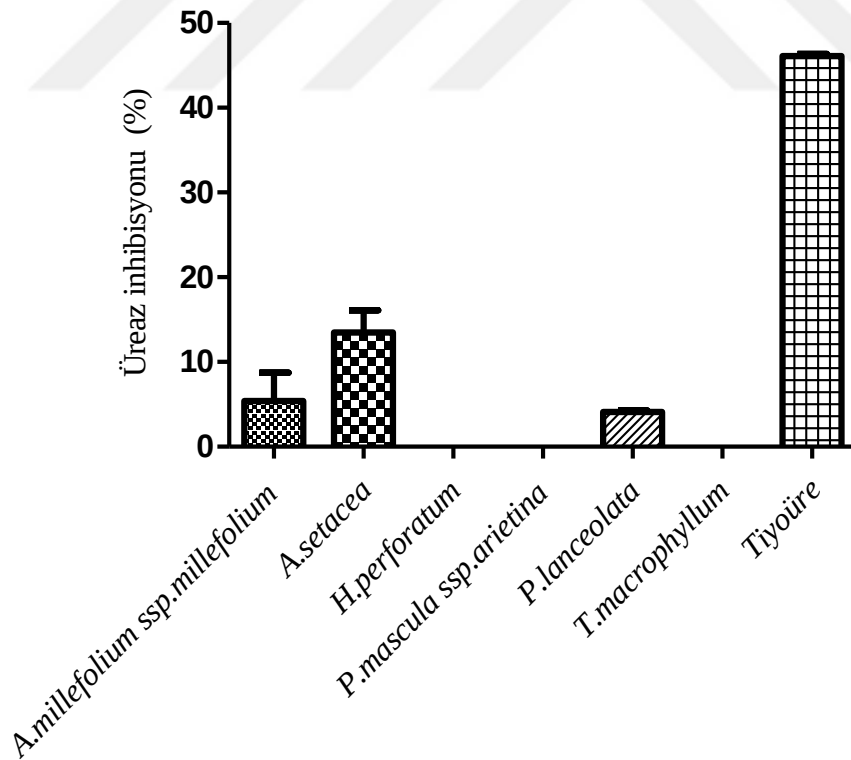
**Şekil 4.20.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının antiüreaz aktiviteleri

**Çizelge 4.22.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının antiüreaz aktiviteleri

| Ekstre (6,25 µg/mL)                                   | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 5,397±4,731  |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 13,475±3,710 |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | -            |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | -            |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 4,103±0,222  |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | -            |
| Tiyoüre*                                              | 46,094±0,419 |

-: aktivite göstermemiştir.

\*: standart

**Şekil 4.21.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstralarının antiüreaz aktiviteleri

#### 4.5. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN ESTERAZ AKTİVİTESİ

Bitkilerden hazırlanan farklı ekstrelerinin hCA II enzimi üzerine esterase aktiviteleri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Petrol eteri ekstraktları kendi aralarında kıyaslandığında en yüksek yüzde inhibisyon *Plantago lanceolata* ( $72,764 \pm 3,726$ ) bitkisinde tespit edilmiştir. Sonrasında en güçlü etki *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $71,138 \pm 3,520$ ) bitkisinde görülmüştür.

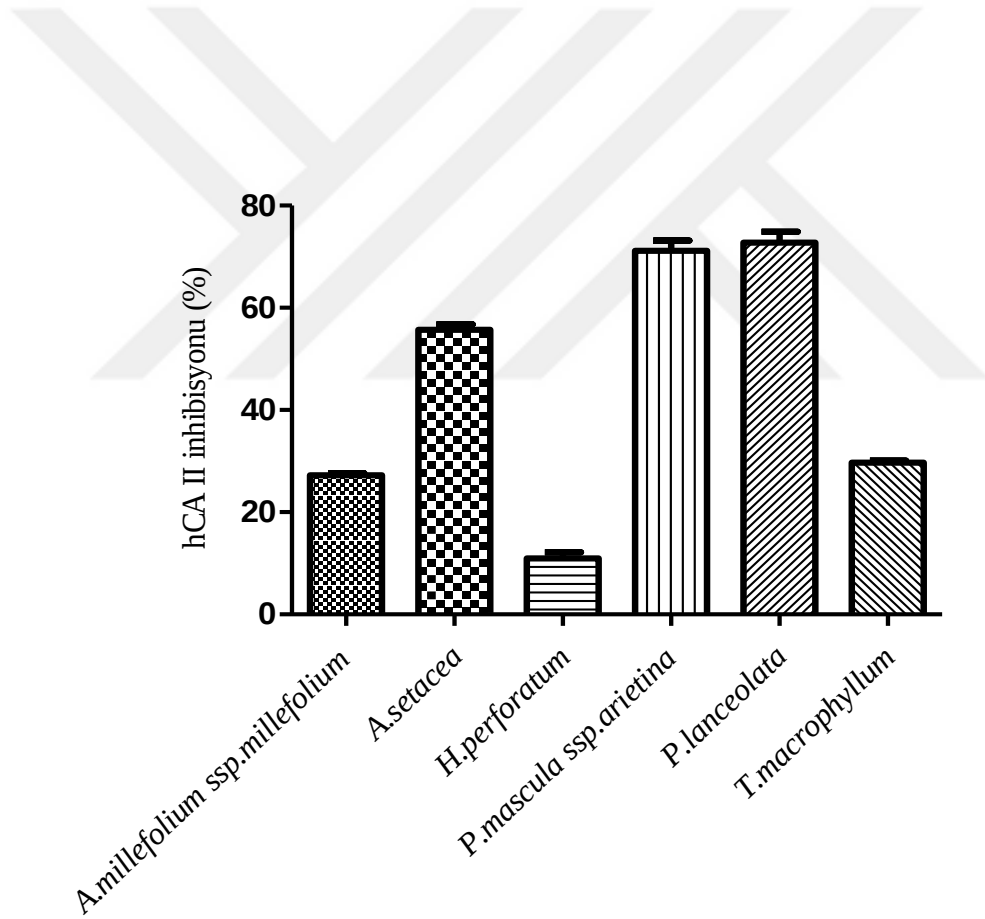
Bitkilerin kloroform ekstraktları kendi içinde kıyaslandığında ise en güçlü esterase aktivite *Achillea setacea* ( $54,472 \pm 0,704$ ) bitkisinde görülmüştür. *Tanacetum macrophyllum* ( $22,358 \pm 1,863$ ) bitkisine ait kloroform ekstresinde orta seviyede inhibisyon tespit edilmiştir.

Etanol ekstraktları kıyaslandığında en güçlü yüzde inhibisyon gösteren bitkinin *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $91,057 \pm 0,704$ ) bitkisi olduğu belirlenmiştir. *Hypericum perforatum* ( $25,203 \pm 1,863$ ) bitkisinden elde edilen etanol ekstresi en iyi inhibisyon gösteren ikinci etanol ekstresi olmuştur. Diğer bitkilerin etanol ekstraktlarının hCA II enzimi üzerine genel itibarıyla önemli bir inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir.

İnsan CA II enzimi için standart etken madde olarak kullanılan asetazolamidin hCA II enzimi üzerindeki esterase aktivite çalışmalarında  $IC_{50}$  değeri  $8,549 \text{ ng/mL}$  olarak tespit edildiğinden bitki ekstraktlarının yüzde inhibisyon çalışmaları enzim kontrolüne göre belirlenmiştir. Bitkilerden elde edilen bütün ekstraktlar kıyaslandığında en güçlü inhibitör etkisini *Paeonia mascula* subsp. *arietina* ( $91,057 \pm 0,704$ ) bitkisinden elde edilen etanol ekstresinin gösterdiği tespit edilmiştir.

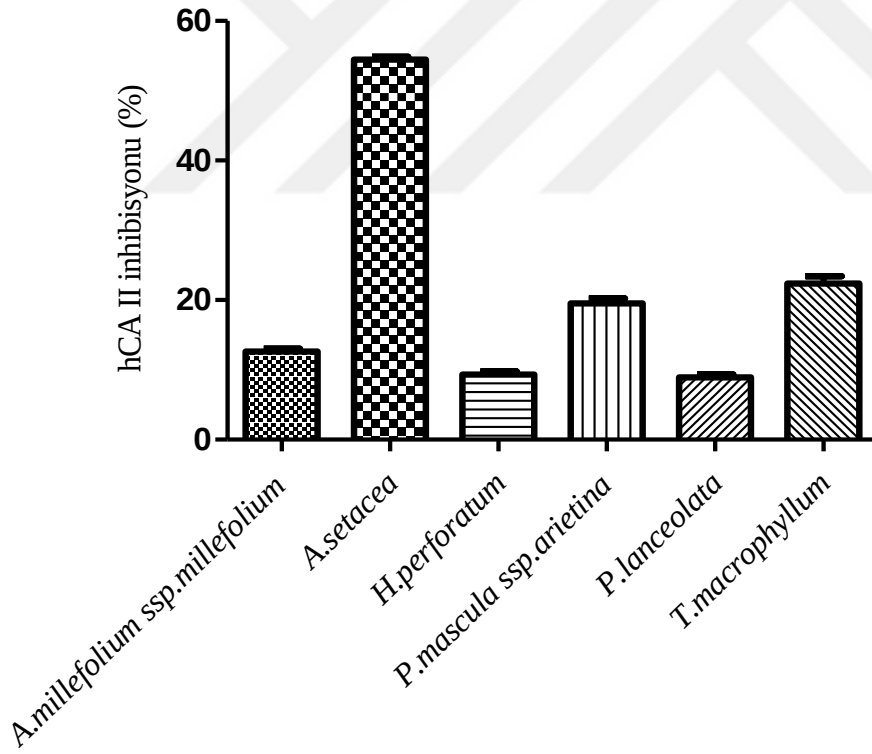
**Çizelge 4.23.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının hCA II inhibisyonu

| Ekstre (33,33 µg/mL)                                  | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 27,236±0,704 |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 55,691±1,863 |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 10,976±2,112 |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 71,138±3,520 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 72,764±3,726 |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 29,675±0,704 |

**Şekil 4.22.** Bitkilerden elde edilen petrol eteri ekstralarının hCA II inhibisyonu

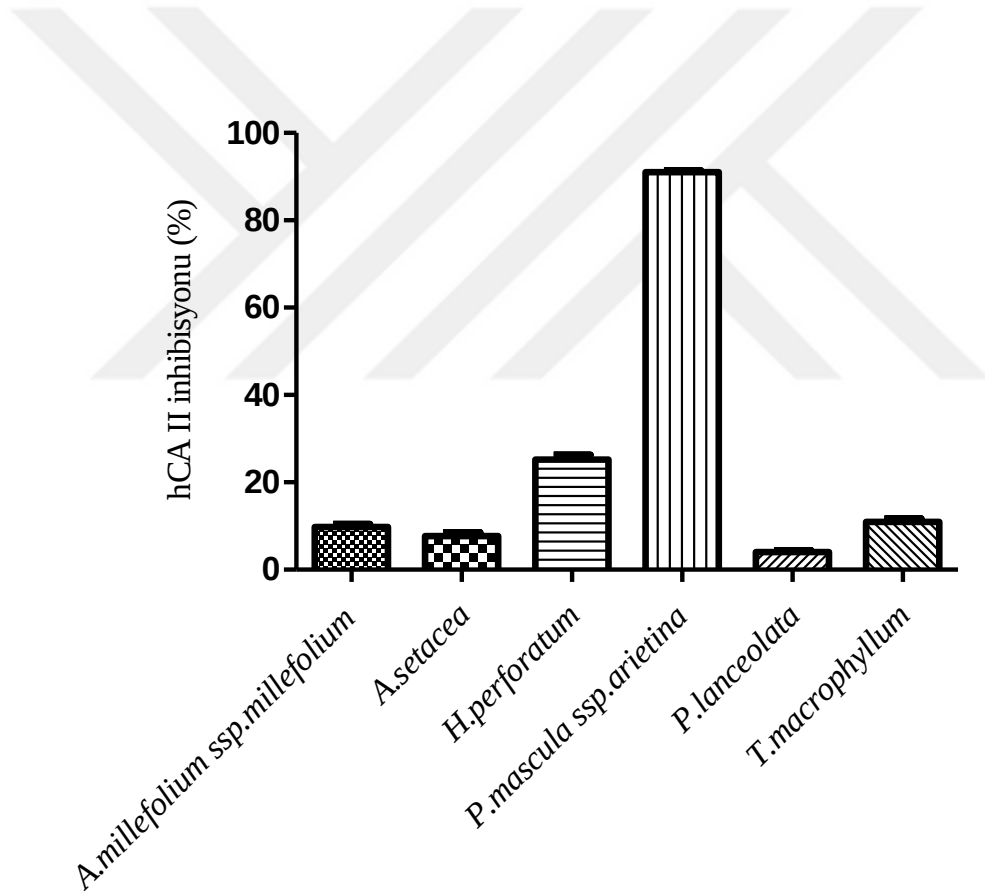
**Çizelge 4.24.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının hCA II inhibisyonu

| Ekstre (33,33 µg/mL)                                  | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 12,602±0,704 |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 54,472±0,704 |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 9,350±0,704  |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 19,512±1,220 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 8,943±0,704  |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 22,358±1,863 |

**Şekil 4.23.** Bitkilerden elde edilen kloroform ekstralarının hCA II inhibisyonu

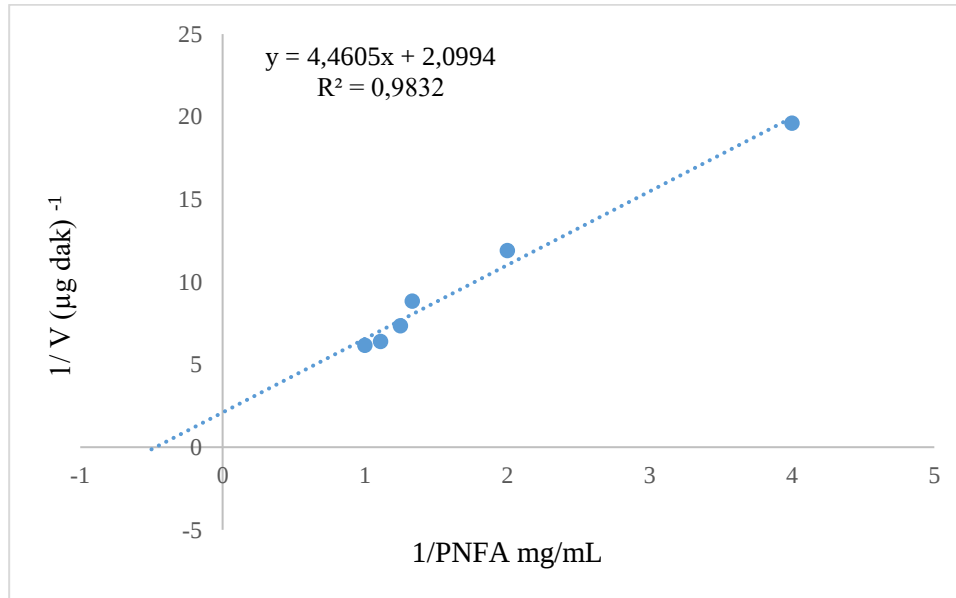
**Çizelge 4.25.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrlerinin hCA II inhibisyonu

| Ekstre (33,33 µg/mL)                                  | %İnhibisyon  |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | 9,756±1,220  |
| <i>Achillea setacea</i>                               | 7,724±1,408  |
| <i>Hypericum perforatum</i>                           | 25,203±1,863 |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | 91,057±0,704 |
| <i>Plantago lanceolata</i>                            | 4,065±0,704  |
| <i>Tanacetum macrophyllum</i>                         | 10,976±1,220 |

**Şekil 4.24.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstrlerinin hCA II inhibisyonu

#### 4.5.1. *Paeonia mascula* subsp. *arietina* Etanol Ekstresinin hCA II Enzimi için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> Değerlerinin Hesaplanması

Esteraz aktivitesi çalışmalarında kullanılan substratın (p-nitrofenilasetat-PNFA) hCA II enzimi üzerindeki K<sub>M</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla altı farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümü yapılmıştır. Elde edilen verilerden Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve bu grafikten K<sub>M</sub> değeri hesaplanmıştır (Şekil 4.25). Enzim tepkime hızının maksimuma ulaştığı noktada enzimin yarısına bağlı substrat yoğunluğu sabiti (K<sub>M</sub>) 2,1246 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

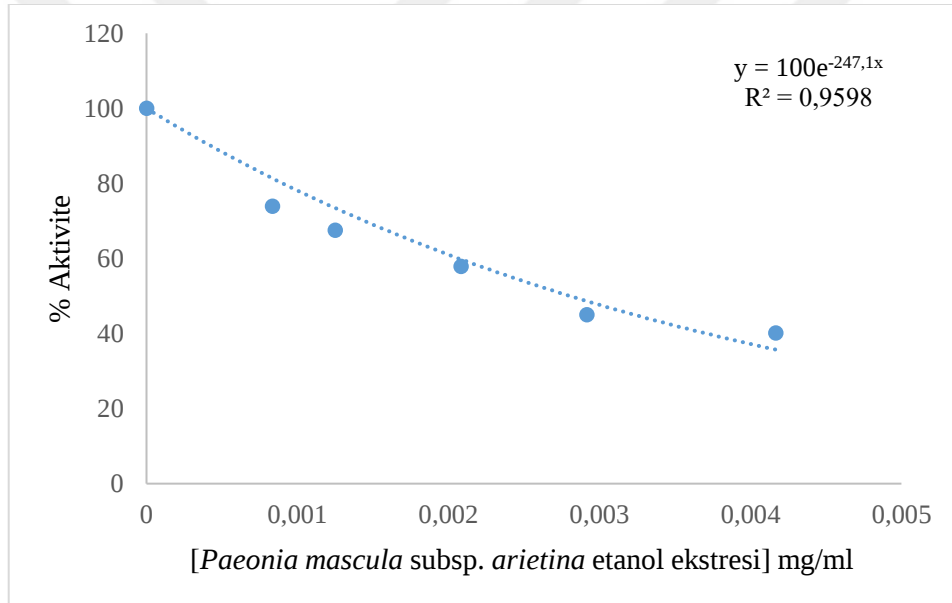


Şekil 4.25. hCA II enzimi için altı farklı substrat konsantrasyonu ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

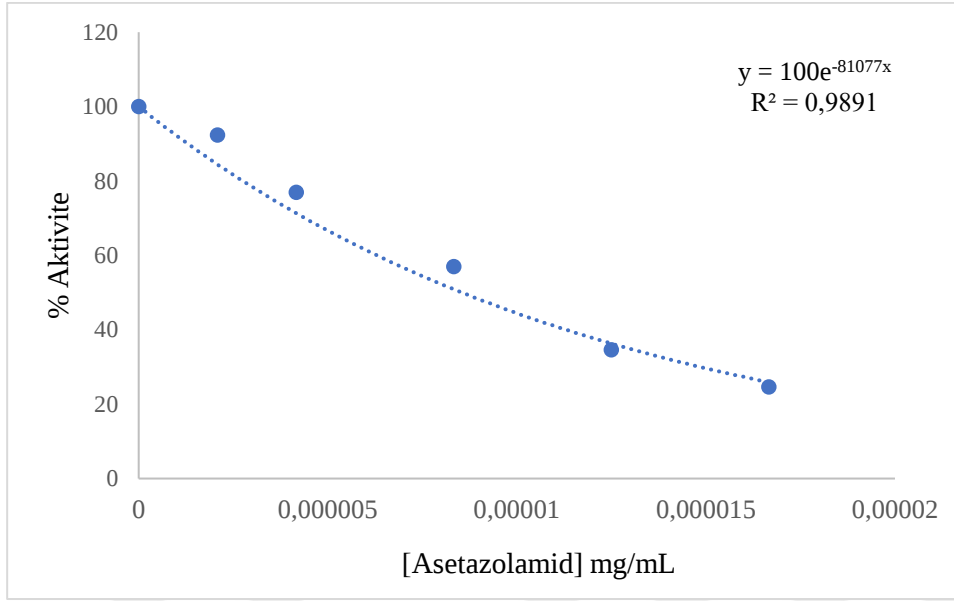
Enzim üzerine yapılan yüzde inhibisyon çalışmalarında en etkin inhibisyon değerine sahip *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkisinin etanol ekstresi üzerine yapılan inhibitörsüz ve beş farklı inhibitör (ekstre) konsantrasyonlu IC<sub>50</sub> değerleri %Aktivite-[*Paeonia mascula* subsp. *arietina* etanol ekstresi (mg/mL)] grafiği çizilerek belirlenmiştir (Şekil 4.26). Elde edilen IC<sub>50</sub> değeri (0,0028 mg/mL) ve K<sub>M</sub> değeri ile Cheng-Prusoff eşitliği kullanılarak hCA II enziminin inhibitör olarak kullanılan ekstreye olan ilgisi belirlenmiştir. *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkisinin etanol

ekstresinin hCA II enzimi üzerindeki inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) 0,0019 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Asetazolamidin (AZA) hCA II enzimi üzerindeki inhibisyon profilini belirlemek amacıyla inhibitörsüz ve beş farklı inhibitör (AZA) konsantrasyonlu  $IC_{50}$  değerleri %Aktivite-[Asetazolamid (mg/mL)] grafiği çizilerek belirlenmiştir (Şekil 4.27). Elde edilen  $IC_{50}$  değeri (8,549 ng/mL) ve  $K_M$  değeri ile Cheng–Prusoff eşitliği kullanılarak hCA II enziminin inhibitör olarak kullanılan AZA'ya olan ilgili belirlenmiştir. AZA'nın hCA II enzimi üzerindeki inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) 5,813 ng/mL olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.26.** hCA II enziminin % aktivite-[*Paeonia mascula* subsp. *arietina* etanol ekstresi (mg/mL)] grafiği



Şekil 4.27. hCA II enziminin % aktivite-[Asetazolamid (mg/mL)] grafiği

#### 4.6. HPLC-DAD ANALİZ SONUÇLARI

Çalışma sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkisinin etanol ekstresinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve hCA II enzimini güçlü inhibe ettiği saptanmıştır. *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* bitkisinin kloroform ekstresinin diğer ekstratlar arasında en güçlü antikolinesteraz aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca *Achillea setacea* bitkisinin etanol ekstresinin diğer ekstratlerden daha yüksek antiürez aktivite sahip olduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayı bu çalışmada bitkilerin içerdiği bileşiklerin bu aktivitelerden olası etkisi olduğu düşünülerek bu ekstratların içerdiği majör fenolik bileşikler HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Analiz sonucu belirlenen bileşikler Çizelge 4.26'da verilmiştir.

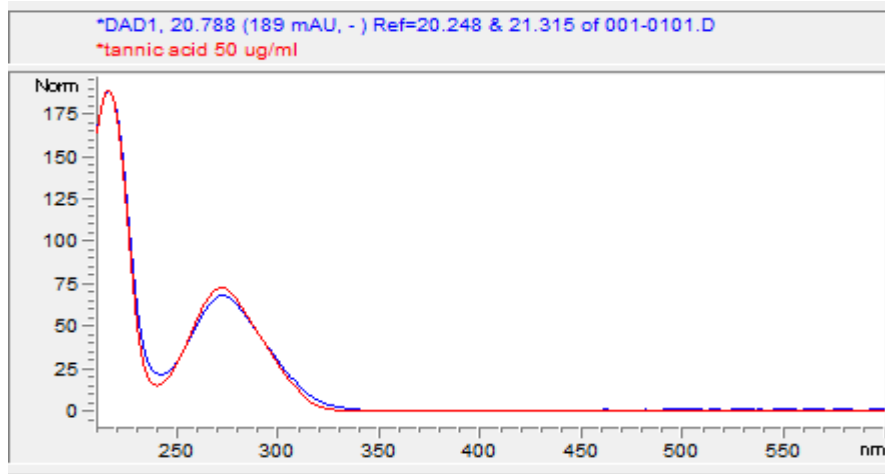
Bitkilerden elde edilen farklı ekstratların kromatogramları ve bu kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması aşağıdaki şekillerde verilmiştir. Analiz sonucu belirlenen bileşikler Çizelge 4.26'da verilmiştir.

**Çizelge 4.26.** *Achillea setacea*, *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* ve *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkilerinin içerdği fenolik bileşikler

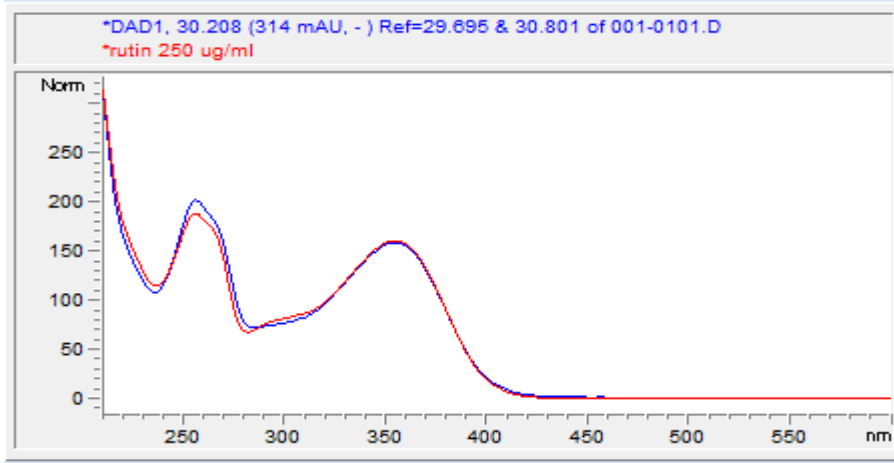
| Bitki                                                 | Ekstre    | İçerdiği Fenolik Bileşikler                          |
|-------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------|
| <i>Achillea setacea</i>                               | Etanol    | Kafeik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit, rutin |
| <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> | Kloroform | Tannik asit, 4-hidroksi benzoik asit, vanilik asit   |
| <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>         | Etanol    | Tannik asit, rutin                                   |

#### 4.6.1. *Paeonia mascula* subsp. *arietina* Bitkisinin Etanol Ekstresinin HPLC-DAD Analiz Sonuçları

Bitkinin etanol ekstresi metanol/su (2:1) çözeltisinde çözülmüştür ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC-DAD sistemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar standart maddelerin spektrumları ile karşılaştırıldığında, etanol ekstresinin tannik asit ve rutin bileşiklerini içerdği tespit edilmiştir. Bitkiden analiz edilen bileşiklerin ve standartların üst üste çakıştırılmış pikleri Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



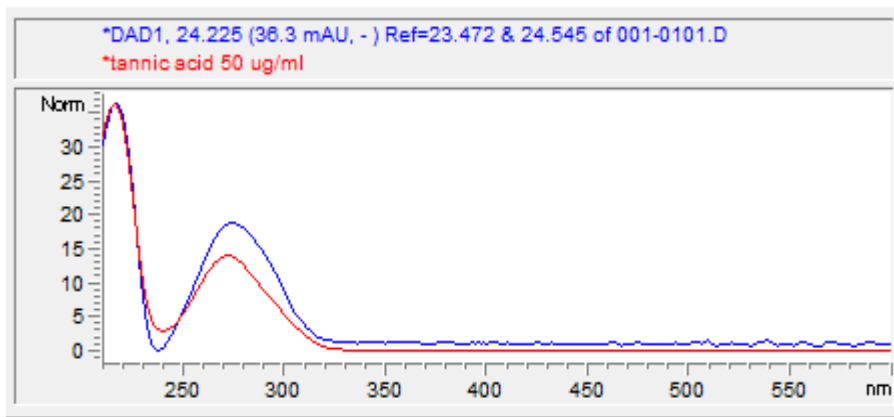
**Şekil 4.28.** Tannik asit bileşiğinin spektrumu



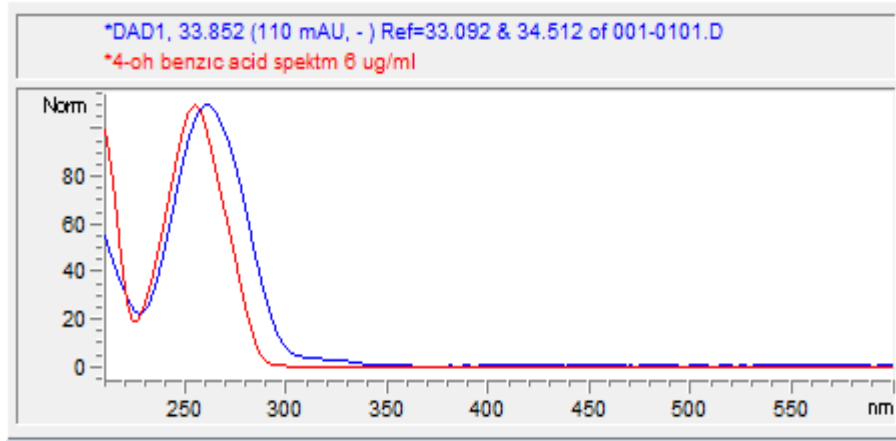
Şekil 4.29. Rutin bileşiğinin spektrumu

#### 4.6.2. *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Bitkisinin Kloroform Ekstresinin HPLC-DAD Analiz Sonuçları

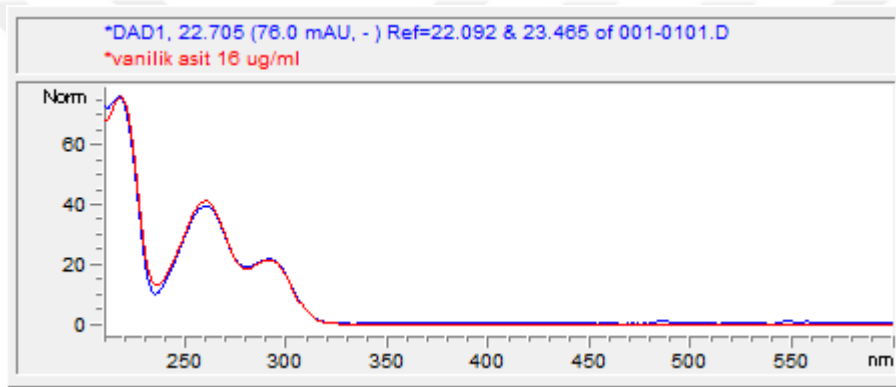
Bitkinin kloroform ekstresi metanol/su (2:1) çözeltisinde çözülmüştür ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC-DAD sistemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar standart maddelerin spektrumları ile karşılaştırıldığında, kloroform ekstresinin tannik asit, 4-hidroksi benzoik asit ve vanilik asit bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir. Bitkiden analiz edilen bileşiklerin ve standartların üst üste çakıştırılmış pikleri Şekil 4.30, Şekil 4.31 ve Şekil 4.32'de gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Tannik asit bileşiğinin spektrumu



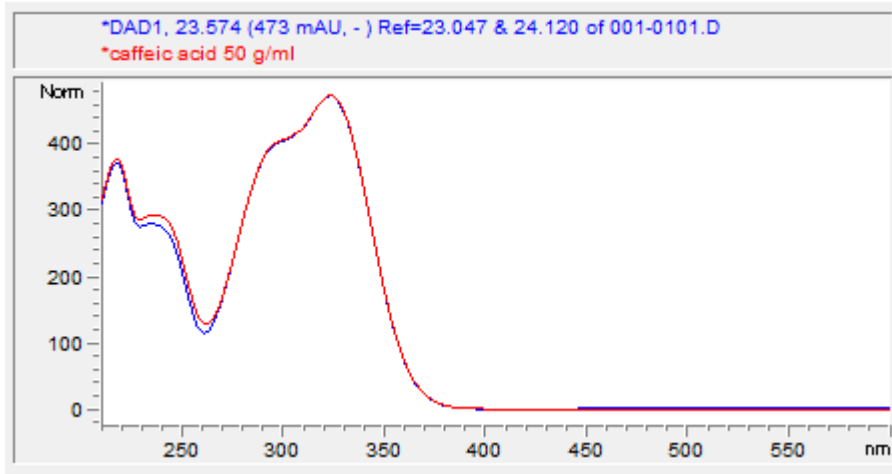
Şekil 4.31. 4-hidroksi benzoik asit bileşiğinin spektrumu



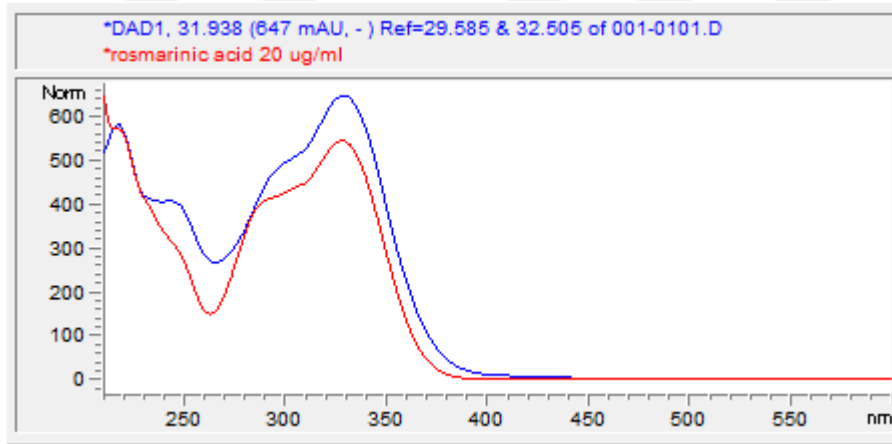
Şekil 4.32. Vanilik asit bileşiğinin spektrumu

#### 4.6.3. *Achillea setacea* Bitkisinin Etanol Ekstresinin HPLC-DAD Analiz Sonuçları

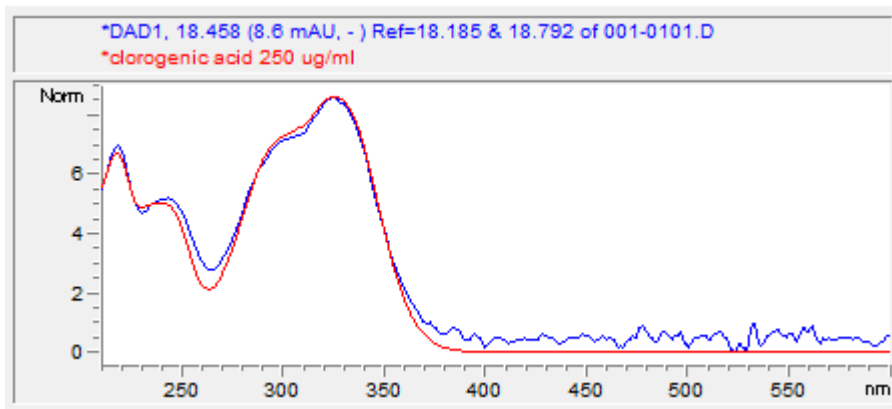
Bitkinin etanol ekstresi metanol/su (2:1) çözeltisinde çözülmüştür ve 1,0/0,45  $\mu\text{m}$ 'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC-DAD sistemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar standart maddelerin spektrumları ile karşılaştırıldığında, etanol ekstresinin kafeik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve rutin bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir. Bitkiden analiz edilen bileşiklerin ve standartların üst üste çakıştırılmış pikleri Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



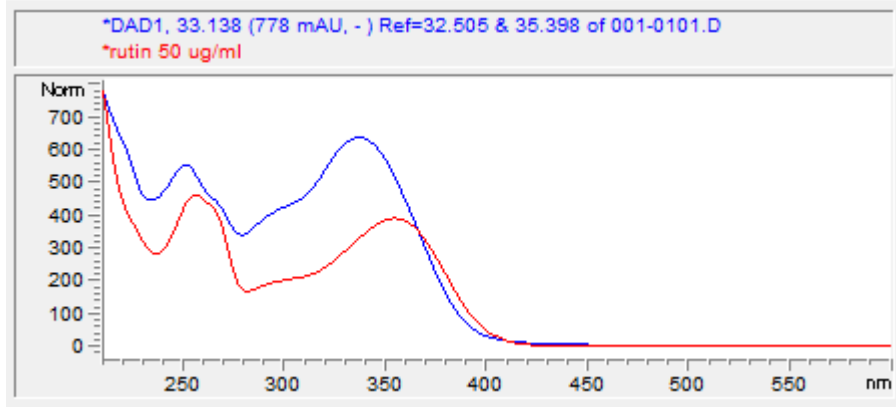
Şekil 4.33. Kafeik asit bileşiğinin spektrumu



Şekil 4.34. Rosmarinik asit bileşiğinin spektrumu



Şekil 4.35. Klorojenik asit bileşiğinin spektrumu



Şekil 4.36. Rutin bileşiğinin spektrumu



## 5. TARTIŞMA

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda çalıştığımız *Achillea setacea* Waldst. et Kit., *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium* L., *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Schultz Bip., *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *arietina* (Anders.) Cullen et Heywood, *Plantago lanceolata* L. ve *Hypericum perforatum* L. bitkileri ile yapılmış hCA II enzimi aktivitesini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Aynı şekilde *Hypericum perforatum* L. ve *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Schultz Bip. bitkileri dışında diğer bitkiler üzerine yapılmış antiasetilkolinesteraz çalışması görülmemiştir. Literatür araştırması sonucu çalıştığımız bitkiler üzerinde yapılmış az sayıda antioksidan çalışmasına rastlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada *Hypericum perforatum* L. bitkisinin çiçeklerinden elde edilen etanol ekstresinin antioksidan aktivitesi ve bu ekstrenin fenolik içeriği HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre etanol ekstresinin (EC<sub>50</sub>: 21 dwb/mL) güçlü antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (150). *Hypericum perforatum* L. üzerine yapılan başka bir çalışmada ise bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin antioksidan aktivitesi DPPH (%77,6±0,5 inhibisyon), ABTS (%81,2±0,4 inhibisyon), FRAP (32,4±0,5mM TE/g d.w.) yöntemleri ile incelenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde metanol ekstresinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (151). Bir başka çalışmada *Hypericum perforatum* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon yolu ile elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının asetiasetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz aktivitesi tayin edilmiştir ve antioksidan aktiviteleri DPPH ve FRAP yöntemleri ile incelenmiştir. Metanol ekstresi en güçlü asetilkolinesteraz inhibisyonu (%49,54±4,44) gösterirken bütirilkolinesteraz için en güçlü inhibisyon etil asetat ekstresinde gözlenmiştir (%50,79±3,07). Bitkiden elde edilen metanol ekstresi DPPH (%89,80±0,18) ve FRAP (%50,79±3,07) yöntemlerinde en güçlü antioksidan etki göstermiştir (152). Başka bir çalışmada *Hypericum perforatum* L. bitkisinden elde edilen metanol:su (50:50) ekstresi 10 mg/mL olarak test edildiğinde üreaz enzimi üzerinde yaklaşık %70 inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (153). *Hypericum perforatum* bitkisi üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda, bu bitkinin hiperosit,

rutin, kersetin, izokersetin, amentoflavon, biapigenin, kafeik asit, klorojenik asit ve p-kumaroilkinik asit bileşikleri içerdiği tespit edilmiştir (154).

Yaptığımız çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak *Hypericum perforatum* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından petrol eteri, kloroform ve etanol ekstraktları Soxhlet cihazı ile sürekli ekstraksiyon yapılarak elde edilmiştir. Antioksidan aktivitesi DPPH, FRAP ve ABTS yöntemlerine ek olarak CUPRAC yöntemi ile incelenmiştir. Literatür araştırması sonucu bitkinin sadece metanol ekstresi üzerine yapılmış antikolinesteraz ve antiüreaz çalışmaları bulunduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada farklı olarak bitkiye ait petrol eteri, kloroform ve etanol ekstraktlarının antikolinesteraz ve antiüreaz aktivitesi tayin edilmiştir. Literatüre paralel olarak bitkiden hazırlanan etanol ekstresinin diğer ekstraktlardan daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (150). Bitki üzerinde yapılan literatür taramalarında bitkinin flavonoid ve fenolik asitlerden içerdiği saptanmıştır (154). Bu çalışmada da bitkinin güçlü antioksidan aktivite göstermesi bu durumun içerdiği bu bileşiklerden olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan literatür araştırması sonucu *Hypericum perforatum* L. bitkisinin hCA II enzimi ile olan ilişkisine dair bir çalışma görülmemiş olup, elde edilen ekstraktların hCA II enzimini inhibe etme potansiyeli ilk kez bu çalışma kapsamında incelenmiştir.

*Achillea millefolium* L. bitkisi üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde bu türün antioksidan, antiüreaz, antikolinesteraz aktivitelerini inceleyen birçok çalışma görülmüştür. Tez kapsamında çalışılan bitkilerden olan *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* L. türü üzerinde ise sadece antioksidan ve antimikrobiyal etkilerini araştıran çalışmalara rastlanılmıştır. Yapılan bir çalışmada bitkinin maserasyon yöntemi ile elde edilen metanol ekstresinin DPPH radikali süpürücü etkisi ( $IC_{50}$ :  $45,60 \pm 1,30$   $\mu\text{g/mL}$ ) test edilmiştir (118). Bu çalışmadan farklı olarak Soxhlet cihazı ile sürekli ekstraksiyon ile elde edilen petrol eteri, kloroform ve etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH, FRAP, CUPRAC ve ABTS yöntemleriyle incelenmiştir. Çalışma sonucu etanol ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi  $IC_{50}$ :  $0,033 \pm 0,020$   $\text{mg/mL}$  olarak tespit edilmiştir. Bu değeri diğer çalışma ile karşılaştırdığımızda Soxhlet cihazı ile sürekli ekstraksiyon ile elde edilen etanol ekstresinin maserasyon yöntemi ile elde edilen metanol ekstresinden güçlü olduğu görülmüştür. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda *Achillea millefolium* subsp.

*millefolium* L. üzerine yapılmış antikolinesteraz, antiüreaz ve esteraz aktivitesini inceleyen bir çalışma bulunmamıştır. Bitkiye ait bu aktiviteler ilk kez test edilmiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında bitkiye ait kloroform ekstresinin içeriği HPLC-DAD sistemi ile analiz edilmiştir ve bitkinin tannik asit, 4-hidroksi benzoik asit ve vanilik asit bileşiklerini içerdiği saptanmıştır. Yapılan literatür taramalarında, *A. millefolium* bitkisinin sulu etanol ekstresinin klorojenik asit, visenin-2, luteolin-7-*O*-glukozit, rutin, apigenin-7-*O*-glukozit, luteolin, apigenin, p-kumarik asit, hiperozit, isokersitrin, kersitrin, kersetin ve patuletin bileşiklerini içerdiği HPLC ile analiz edilmiştir (155,156). Bu çalışmada kullanılan bitkilerden olan *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* bitkisinin topraküstü kısımlarından luteolin, apigenin 7-*O*- $\beta$ -D-glukozit, luteolin 7-*O*- $\beta$ -D-glukozit, 6-OH-luteolin 7-*O*- $\beta$ -D-glukozit, akillifolin, dihidropartenolit, dihidroreynosin ve vanilik asit bileşikleri izole edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da literatür bilgilere paralel olarak *A. millefolium* subsp. *millefolium* bitkisinden elde edilen kloroform ekstresinin vanilik asit, tannik asit ve 4-hidroksi benzoik asit içerdiği tespit edilmiştir (157,158). Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin güçlü biyolojik aktivite (antioksidan, antienflamatuvar vb.) gösterdiği bilinmektedir (159). Literatür bilgisi kapsamında bitkinin güçlü biyolojik aktivite göstermesi içerdiği fenolik asitlerden kaynaklandığını düşündürmüştür.

Yapılan bir çalışmada *Achillea setacea* bitkisinin çiçek, yaprak ve köklerinden ayrı ayrı maserasyon yöntemi ile hazırlanan metanol ekstreleri HPLC ile analiz edilmiş, DPPH ve ABTS yöntemleri ile antioksidan aktivitesi tayin edilmiştir. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde en güçlü DPPH radikali süpürücü etki ( $IC_{50}$ :  $0,470 \pm 0,002$  mg/mL) bitkinin yapraklarından elde edilen metanol ekstresinde gözlenmiştir. ABTS yöntemiyle ( $IC_{50}$ :  $0,143 \pm 0,005$  mg/mL) elde edilen antioksidan aktivitelere bakıldığında ise en iyi etki bitkinin köklerinden elde edilen metanol ekstresinde gözlemlenmiştir (121). Bu çalışma kapsamında diğer çalışmadan farklı olarak bitkinin toprak üstü kısımları kullanılmış, çiçekler ve yapraklar ayrılmamıştır. Antioksidan aktivitesi incelenirken DPPH ve ABTS yöntemlerine ek olarak FRAP ve CUPRAC yöntemleri de kullanılmıştır. Çalışmada etanol ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi  $IC_{50}$ :  $0,026 \pm 0,003$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen bu değere sahip ekstrenin yapılan diğer çalışmada bitkinin yapraklarından elde edilen metanol ekstresinden daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu görülmüştür. Bitkinin

antiasetilkolinesteraz, antiüreaz etkisi ve hCA II enzimi ile olan ilişkisi ilk defa incelenmiştir. Bitkiye ait etanol ekstresinin içeriği HPLC-DAD sistemi ile analiz edilmiş ve kafeik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve rutin bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *A. setacea* bitkisinin klorojenik asit, kafeik asit, rutin, kersetin, luteolin ve apigenin bileşiklerini içerdiği HPLC ile analiz edilmiştir (160). Başka bir çalışmada *A. setacea* bitkisinin toprak üstü kısımlarından 14-deoksilaktusin, rupikolin A ve rupikolin B bileşikleri izole edilmiştir (161). Yapılan başka bir çalışmada visenin-2, isoşaftosit, şaftosit, viteksin, orientin, isoorientin, rutin, luteolin-7-O-glukozit, apigenin-7-O-glukozit, apigenin ve luteolin-4'-O-glukozit ve klorojenik asit bileşiklerini içerdiği analiz edilmiştir (162). Bu çalışmada da literatür taramalarına paralel olarak *A. setacea* bitkisinin etanol ekstresinin kafeik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve rutin bileşiklerini içerdiği HPLC ile analiz edilmiştir. Fenolik bileşiklerin güçlü biyolojik aktivite özelliğine sahip oldukları bilgisi göz önüne alındığında, *A. setacea* bitkisinin güçlü biyolojik aktiviteye sahip olması içerdiği hem flavonoit hem de fenolik asitlerinden kaynaklandığını düşündürmüştür.

*Paeonia* cinsine ait bazı türlerin güçlü antioksidan ve antikolinesteraz aktivite gösterdiği literatür bilgilerinde kayıtlıdır, fakat bu çalışmada kullanılacak olan *Paeonia mascula* subsp. *arietina* üzerinde yapılan literatür araştırmasında bu türe ait herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasına rastlanmamıştır. Bitkinin antioksidan, antiasetilkolinesteraz, antiüreaz etkisi ve hCA II enzimi ile olan ilişkisi ilk defa bu çalışma kapsamında incelenmiştir. Bitkiye ait etanol ekstresinin içeriği HPLC-DAD sistemi ile analiz edilmiştir. Bitkinin tannik asit ve rutin bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir. *Paeonia* cinsinin kimyasal içeriği üzerinde yapılan literatür taramasında, bu cinse ait olan *P. arietina* ve *P. kesrounansis* bitkilerinin metanol ekstresinde kersetin-3,7-di-O-glukozit, kempferol-3,7-di-O-glukozit, kersetin-heksozit, kersetin-glukosil-ramnozit, kersetin-galloil-heksozit, kempferol-3-O-glukozit-7-O-ramnozit ve rutin bileşiklerinin varlığının HPLC-DAD analizi ile belirlendiği görülmüştür (163). Yapılan bu çalışmada da literatüre paralel olarak *Paeonia mascula* subsp. *arietina* bitkisinin etanol ekstresinin tannik asit ve rutin bileşikleri içerdiği saptanmıştır.

Kersitin, rutin, kateşin, epikateşin, apigenin, silymarin, fenol, kateşol, rezorsinol ve dört tip saponin türevinin insan CA II izoenzimi üzerindeki inhibitör etkilerinin tespit edilmesi üzerine yapılan bir çalışmada rutin (K<sub>i</sub> : 0,83 µM) referans

olarak kullanılan asetazolamide ( $K_i$ : 0,37  $\mu$ M) yakın bir inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada rutin ve bulunduğu serideki moleküllerin insan CA II enzimi üzerindeki biyoaktivitelerinde, moleküllerin aromatik iskelelerinde bulunan farklı fonksiyonel grupların bu etkiye neden olduğu işaret edilmektedir (164). Tannik asit, hidroksil gruplarında bir veya daha fazla galloil rezidüleri ile türetilmiş bir merkezi glikoz molekülünden oluşmaktadır. Tannik asitin hidrofobik çekirdek ve hidrofilik kabuğa sahip polifenolik doğası molekülün gösterdiği antioksidan etkiye neden olan özelliğidir. Tannik asit birçok bitkide bulunmakla birlikte sahip olduğu antioksidan özelliğinin yanı sıra molekülün antimutajenik ve antikarsinojenik etkileri literatürde mevcuttur (165). Bazı standart fenolik maddeler ve arı ürünlerinin insan CA I ve II izoenzimleri üzerindeki inhibitör etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada insan CA II enzimini en iyi inhibe eden fenolik maddenin tannik asit olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada standart olarak kullanılan asetazolamidin  $IC_{50}$  değeri  $0,004 \pm 0,001$   $\mu$ g/mL olarak tespit edilirken, tannik asitin  $IC_{50}$  değeri  $0,009 \pm 0,001$   $\mu$ g/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmada insan CA II izoenzimini en etkili inhibe eden moleküller incelendiğinde sıralama şu şekilde elde edilmiştir: tannik asit > kersitin > gallik asit = krisin = kateşin = protokatekuik asit (166). İnsan CA II izoenzimi üzerine kimyasal ve doğal birçok maddenin biyoaktivitesinin incelendiği bir çalışmada maddelerin izoenzim üzerindeki yüzde inhibisyon ve  $IC_{50}$  değerleri elde edilmiştir. Çalışmada sülfonamid temelli olmayan moleküllerden biri olan tannik asitin insan CA II izoenzimi üzerine gösterdiği güçlü inhibitör etkiye vurgu yapılmıştır (167). hCA II enzimi üzerine en etkili inhibe edici özellik gösteren *Paeonia mascula* subsp. *arietina* etanol ekstresinde bulunan tannik asit içeriği, ekstrenin gösterdiği inhibisyon derecesi açısından literatürü destekleyici özellik göstermektedir.

*Plantago lanceolata* L. bitkisi ile yapılan bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından maserasyon yöntemi ile hazırlanan metanol:su (4:1) ekstresinin antioksidan etkisi DPPH ( $IC_{50}$ :  $4,20 \pm 0,19$   $\mu$ g/mL) ve FRAP ( $109,80 \pm 6,57$  mg AAE/g of kuru ağırlık) yöntemleri ile incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre *Plantago lanceolata* L. bitkisinden elde edilen bu ekstrenin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca *Plantago lanceolata* L. bitkisinin içerdiği bileşikler LC-MS/MS ile incelenmiştir. Majör bileşenler p-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, gallik asit, klorojenik asit, apigenin, luteolin ve luteolin-7-O-glukozit

olarak belirlenmiştir (23). Yapılan başka bir çalışmada ise bitkinin toprak üstü kısımları kullanılarak Soxhlet cihazı ile sürekli ekstraksiyon ile metanol ekstresi hazırlanmış ve DPPH yöntemi ( $IC_{50}$ :  $30,86 \pm 4,66 \mu\text{g/mL}$ ) ile antioksidan kapasitesi tayin edilmiştir ve ekstrenin gösterdiği güçlü antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır (168). Bu çalışmada yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak Soxhlet cihazı ile sürekli ekstraksiyon ile 3 farklı ekstre elde edilmiştir. Etanol ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi  $IC_{50}$ :  $0,113 \pm 0,008 \text{ mg/mL}$  olarak belirlenmiş olup Gálvez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elde edilen metanol ekstresinin gösterdiği aktiviteden ( $IC_{50}$ :  $30,86 \pm 4,66 \mu\text{g/mL}$ ) düşük olduğu görülmüştür (168). Yapılan çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada bitkinin antioksidan etkisi CUPRAC ve ABTS yöntemleri ile de incelenmiştir. Bitkinin içerdiği flavonoid ve fenolik asitlerin bitkinin biyolojik aktivitesinde önemli rol aldığı düşünülmüştür. Literatür çalışmaları sonucu *Plantago lanceolata* L. üzerine yapılmış asetilkolinesteraz, üreaz ve hCA II enzimleri ile ilgili çalışma görülmemiştir.

*Tanacetum macrophyllum* bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından maserasyon ile elde edilen etanol ekstresinin DPPH ( $IC_{50}$ :  $32,70 \pm 2,80 \mu\text{g/mL}$ ), ABTS ( $IC_{50}$ :  $37,20 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$ ) ve FRAP ( $361 \pm 24 \text{ TEAC mg TE/g}$ ) yöntemleri ile antioksidan etkisi değerlendirilmiş ve antikolinesteraz aktivitesi ( $IC_{50}$ :  $0,57 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ ) ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda etanol ekstresinin antioksidan etki gösterdiği görülmüştür. Ayrıca ekstrenin düşük seviyede asetilkolinesteraz inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (136). Yapılan çalışmada farklı olarak petrol eteri, kloroform ve etanol ekstreleri Soxhlet cihazı ile sürekli ekstraksiyon ile kullanılarak elde edilmiştir. Etanol ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi  $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,0001 \text{ mg/mL}$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuç Venditti ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile karşılaştırıldığında Soxhlet cihazı ile sürekli ekstraksiyon ( $IC_{50}$ :  $0,010 \pm 0,0001 \text{ mg/mL}$ ) ile elde edilen ekstrenin maserasyon ( $IC_{50}$ :  $32,70 \pm 2,80 \mu\text{g/mL}$ ) ile elde edilen ekstreden daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür (141). *T. macrophyllum* bitkisinin içerdiği flavonoid (öpatilin, hispidulin, apigenin, kersitrin, izokersitrin) ve fenolik asit (klorojenik asit, kafeik asit, rosmarinik asit) bileşiklerinin biyolojik aktivitesinde etkili olduğu düşünülmüştür. (126). Bitkinin antiüreaz aktivitesi ve hCA II enzimi ile olan ilişkisi ilk defa incelenmiştir.

## 6. SONUÇLAR

Bitkiler çok eski tarihlerden itibaren halk arasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bitkiler Anadolu coğrafyasında yaygın bir şekilde dağılım göstermekte ve çoğu zaman halk tarafından tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Tez kapsamında seçilen bazı bitkilerin biyolojik aktivitelerini tespiti etmek ana hedeflerimizden biriydi. Artan ve yaşlanan dünya nüfusu ile birlikte görülme sıklığında artış yaşanan AH'nin tedavisi amacıyla önerilen hipotezlerden birisi olan ve kolinerjik sürecin inhibe edilmesini temel alan süreçler tez çalışması kapsamında uygulanmıştır. *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* bitkisinin kloroform ekstresinin içeriği incelendiğinde; tannik asit, 4-hidroksi benzoik asit ve vanilik asit gibi fenolik bileşikler ihtiva ettiği tespit edilmiştir. Kloroform ekstresinin içerdiği bu fenolik bileşiklerin bitkinin güçlü antiasetilkolinesteraz aktivite göstermesinde etkili olduğunu düşündürmüştür.

*H. pylori* eradikasyonunu önemli ölçüde azaltmak için bakterinin sahip olduğu üreaz enziminin inhibe edilerek, bakterinin midede kolonileşme kabiliyetinin azatılması amacıyla halk arasında yaygın bir şekilde kullanılan tıbbi bitki ekstraktlarının antiüreaz aktiviteleri belirlenmiştir. En etkili inhibisyon *Achillea setacea* bitkisinden elde edilen etanol ekstresinde görülmüştür. Elde edilen ekstre sonuçlarının standart madde olarak kullanılan tiyoüre kadar etkili sonuç vermediği tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerin önemli oranda antiüreaz aktiviteye sahip oldukları göz önüne alındığında, *A. setacea* bitkisinin bu potansiyeli içerdiği kafeik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve rutin bileşiklerden kaynaklandığını düşündürmüştür (169).

Glokom hastalığında görülen artan göz içi basınca neden olan aköz hümör oluşumuna katılan ve bu süreçte aktivitesi artan hCA II enziminin aktivitesinin azaltılması, hastalığın tedavi sürecinde istenilen iyileşmeyi sağlaması nedeniyle ilaç geliştirme çalışmalarında hCA II enzime yönelik tasarlanacak etken moleküller önemlidir. Elde edilen veriler ile *Paeonia mascula* subsp. *arietina* etanol ekstresinin diğer ekstrele göre hCA II enzimini daha iyi inhibe ettiği gözlenmiştir. HPLC-DAD analizi sonucunda ekstre içeriğinde tannik asit ve rutin gibi fenolik bileşikler tespit edilmiştir. hCA II enziminin fenolik bileşikler ile etkili bir şekilde etkileşime ve

inhibisyona girdiği düşünöldüğönde bu moleköller ile yapılacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sunulan tez çalışması bitki çeşitliliği ve üstönde çalışma yapılan biyoaktivite çalışmaları açısından zengin bir çalışma olup alanda önemli bir boşluğu doldurması muhtemeldir. Sunulan çalışma ekstrelerin sahip olduğu biyoaktivite özellikleri kapsamında olup ilerleyen dönemde ekstre içeriklerinde yer alan majör bileşiklerin izole edilip ilgili etken madde ile biyoaktivite çalışmalarının daha ileri noktaya getirilmesiyle halk sağlığı açısından daha etkin bir kazanım sağlanabileceği tahmin edilmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Amir Aslani, B., Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci*, 146, 163-173.
2. Wojtunik-Kulesza, K.A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomed Pharmacother*, 78, 39-49.
3. Fierascu, R.C., Ortan, A., Fierascu, I.C., Fierascu, I. (2018). *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review. *Curr Opin Food Sci*, 24, 1-8.
4. Tosun, E. (2014). Büt-2-endoik asit bis-(benzil-fenil-amit) türevi bileşiklerin sentezi, asetilkolinesteraz ve butilkolinesteraz enzimlerine karşı aktivitelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
5. Senol, F.Z. (2009). Türkiye'de yetişen bazı *Salvia* türlerinin asetilkolinesteraz inhibitör etkisi üzerinde araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
6. Giacobini, E. (2003). Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 28(3-4), 515-522.
7. Demiray, E., Yılmaz, Ö. (2007). *Helicobacter pylori* infeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 37(2), 112-117.
8. Şimşek, İ., Biniciler, Ö.B. (2011). *Helicobacter pylori*. *İç Hastalıkları Dergisi*, 18, 13-26.
9. Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran, C.T. (2004). Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 19(3), 199-229.
10. Epstein, D.L., Grant, W.M. (1977). Carbonic anhydrase inhibitor side effects. Serum chemical analysis. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill.: 1960)*, 95(8), 1378-1382.
11. Maren, T.H. (1967). Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev*, 47(4), 595-781.
12. Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., Oh, B.H. (2001). Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol*, 8(6), 505-509.
13. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelstein, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K. (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, 325(16), 1127-1131.
14. Birt, D. F., Widrlechner, M. P., Hammer, K. D., Hillwig, M. L., Wei, J., Kraus, G. A., Murphy, P. A., McCoy, J., Wurtele, E. S., Neighbors, J. D., Wiemer, D. F., Maury, W. J., Price, J. P. (2009). *Hypericum* in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. *Pharm Biol*, 47(8), 774-782.
15. Baytop, T. (1999). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. (2nd ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
16. Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoort, J., Gerothanassis, I.P. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*, 68(3), 383-393.
17. Saddiqe, Z., Naeem, I., Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*, 131(3), 511-521.
18. Altundag, E., Ozturk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc Behav Sci*, 19, 756-777.

19. Ünlü, M., Daferera, D., Dönmez, E., Polissiou, M., Tepe, B., Sökmen, A. (2002). Compositions and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *J Ethnopharmacol*, 83(1-2), 117-121.
20. Orhan, I., Demirci, B., Omar, I., Siddiqui, H., Kaya, E., Choudhary, M.I., Ecevit-Genç, G., Ozhatay, N., Sener, B., Başer, K.H. (2010). Essential oil compositions and antioxidant properties of the roots of twelve Anatolian *Paeonia* taxa with special reference to chromosome counts. *Pharm Biol*, 48(1), 10-16.
21. Zhao, Y., Wang, B.E., Zhang, S.W., Yang, S.M., Wang, H., Ren, A.M., Yi, E.T. (2015). Isolation of antifungal compound from *Paeonia suffruticosa* and its antifungal mechanism. *Chin J Integr Med*, 21(3), 211-216.
22. Sevim, D., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Orhan, I.E., Kaya, E., Kartal, M., Sener, B. (2013). Discovery of potent *in vitro* neuroprotective effect of the seed extracts from seven *Paeonia* L. (peony) taxa and their fatty acid composition. *Ind Crops Prod*, 49, 240-246.
23. Beara, I. N., Lesjak, M. M., Orčić, D. Z., Simin, N. Đ., Četojević-Simin, D. D., Božin, B. N., Mimica-Dukić, N. M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT- Food Sci Technol*, 47(1), 64-70.
24. Fons, F., Gargadennec, A., Gueiffier, A., Roussel, J.L., Andary, C. (1998). Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata*. *Phytochemistry*, 49(3), 697-702.
25. Samuelsen, A.B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol*, 71(1-2), 1-21.
26. Melese, E., Asres, K., Asad, M., Engidawork, E. (2011). Evaluation of the antipeptic ulcer activity of the leaf extract of *Plantago lanceolata* L. in rodents. *Phytother Res*, 25(8), 1174-1180.
27. Savcı, A., Alan, Y., Koçpınar, E.F., Kurşat, M., Topdemir, S., Karataş, M., Çakmak, B. (2019). *Tanacetum kotschyi* (Boiss.) Grierson ve *Tanacetum tomentellum* (Boiss.) Grierson ekstraktlarının fenolik madde içeriği ve biyolojik aktiviteleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 14, 112-126.
28. Srivastava, A.K. (2018). Significance of medicinal plants in human life. In: A. Tewari., S. Tiwari. (Eds), *Synthesis of Medicinal Agents from Plants*, Elsevier, pp. 1-24.
29. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84.
30. Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
31. Rao, P.S., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 1(4), 2-7.
32. Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol*, 11, 613-619.
33. Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
34. Glaeser, J., Nuss, A.M., Berghoff, B.A., Klug, G. (2011). Singlet oxygen stress in microorganisms. *Adv Microb Physiol*, 58, 141-173.
35. Machlin, L.J., Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
36. Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med*, 46(5), 531-542.

37. Kolaj, I., Imindu-Liyanage, S., Weaver, D.F. (2018). Phenylpropanoids and Alzheimer's disease: a potential therapeutic platform. *Neurochem Int*, 120, 99-111.
38. Omar, S.H., Scott, C.J., Hamlin, A.S., Obied, H.K. (2017). The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, 47, 1-20.
39. Ng, Y.P., Or, T.C., Ip, N.Y. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 89, 260-270.
40. Greig, N.H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H.W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D.K., Lahiri, D.K. (2001). A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin*, 17(3), 159-165.
41. Stancu, I.C., Vasconcelos, B., Terwel, D., Dewachter, I. (2014). Models of  $\beta$ -amyloid induced Tau-pathology: the long and "folded" road to understand the mechanism. *Mol Neurodegener*, 9, 51.
42. Geula, C., Darvesh, S. (2004). Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs of today (Barc)*, 40(8), 711-721.
43. Colović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, 11(3), 315-335.
44. Bhadra, S., Dalai, M.K., Chanda, J., Mukherjee, P.K. (2015). Evaluation of bioactive compounds as acetylcholinesterase inhibitors from medicinal plants. In: P.K. Mukherjee. (Ed), *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, Amsterdam: Elsevier, pp. 273-306.
45. Howes, M.-J.R., Houghton, P.J. (2009). Acetylcholinesterase inhibitors of natural origin. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences (Special Issue 1)*, 67-86.
46. Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155(3), 219-229.
47. Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G., Lockridge, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, 110(4), 627-639.
48. Brown, L.M. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*, 22(2), 283-297.
49. Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 19(3), 449-490.
50. Cheng-Yen, K., Bor-Shyang, S., Jiunn-Jong, W. (2016). *Helicobacter pylori* infection: an overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*, 39(6), 14-23.
51. Usta, Y., Özen, H. (2007). *Helicobacter pylori* enfeksiyonu. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 50, 136-145.
52. Başyigit, S., Kefeli, A., Sapmaz, F., Doğan, Ö., Yeniova, A.Ö. (2016). Birinci basamak *Helicobacter pylori* eradikasyon tedavisinde levofloksasin içeren hibrid tedavi protokolünün etkinlik ve güvenilirliğinin değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 15(3), 97-101.
53. Uzunismail, H. (2001). *Helicobacter pylori* ve Eradikasyon. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu, 11-12 Ocak 2001, İstanbul.
54. Dixon, N.E., Hinds, J.A., Fihelly, A.K., Gazzola, C., Winzor, D.J., Blakeley, R.L., Zerner, B. (1980). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). IV. The molecular size and the mechanism of inhibition by hydroxamic acids. Spectrophotometric titration of enzymes with reversible inhibitors. *Can J Biochem*, 58(12), 1323-1334.
55. Kappaun, K., Piovesan, A.R., Carlini, C.R., Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: historical aspects, catalytic and non-catalytic properties - A review. *J Adv Res*, 13, 3-17.

56. Kafarski, P., Talma, M. (2018). Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *J Adv Res*, 13, 101-112.
57. Follmer, C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69(1), 18-28.
58. Carter, E.L., Flugga, N., Boer, J.L., Mulrooney, S.B., Hausinger, R.P. (2009). Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*, 1(3), 207-221.
59. Cook, C. Foster, P. (2012). Epidemiology of glaucoma: what's new? *Can J Ophthalmol*, 47(3), 223-226.
60. Quigley, H.A. (2011). Glaucoma. *Lancet*, 377, 1367-1377.
61. Quigley, H.A., Broman, A.T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*, 90, 151-156.
62. Mincione, F., Menabuoni, L., Supuran, C.T. (2004). Clinical applications of the carbonic anhydrase inhibitors in ophthalmology. In: C.T. Supuran., A. Scozzafava., J. Conway. (Eds.), *Carbonic Anhydrase - Its Inhibitors and Activators*. Boca Raton: CRC Press, pp. 243-254.
63. Carta, F., Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2012). Novel therapies for glaucoma: A patent review 2007-2011. *Expert Opin Ther Pat*, 22, 79-88.
64. Kılıç, D. (2017). İnsan karbonik anhidraz II (hCA II) enziminin klonlanması, *E. coli*'de ekspresyonu, karakterizasyonu, yönlendirilmiş mutagenез ile mutant hCA II genlerinin eldesi ve mutant proteinlerin inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye.
65. Kumar, S., Ceruso, M., Tuccinardi, T., Supuran, C.T., Sharma, P.K. (2016). Pyrazolylbenzo[d]imidazoles as new potent and selective inhibitors of carbonic anhydrase isoform CA IX and XII. *Bioorg Med Chem*, 24(13), 2907-2913.
66. Topal, F., Gülçin, İ., Dastan, A., Güney, M. (2017). Novel eugenol derivatives: potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. *Int J Biol*, 94, 845-851.
67. Supuran, C.T. (2016). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(3), 345-360.
68. Güler, O.O., Supuran, C.T., Capasso, C. (2020). Carbonic anhydrase IX as a novel candidate in liquid biopsy, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 35(1), 255-260.
69. Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*, 7(2), 168-181.
70. Le Darz, A., Mingot, A., Bouazza, F., Castelli, U., Karam, O., Tanc, M., Supuran, C.T. (2015). Fluorinated pyrrolidines and piperidines incorporating tertiary benzenesulfonamide moieties are selective carbonic anhydrase II inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30, 737-745.
71. Dodgson, S.J. (1991). The carbonic anhydrases. In: S.J. Dodgson., R.E. Tashian., G. Gros., N.D. Carter. (Eds.), *The Carbonic Anhydrases*. Boston MA: Springer, pp. 3-14.
72. Çelik, T. (2018). Bazı doğal maddelerin insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerindeki inhibitör etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağrı, Türkiye.
73. Gül, H.İ., Mete, E., Taslimi, P., Gülçin, I., Supuran, C.T. (2017) Synthesis, carbonic anhydrase I and II inhibition studies of the 1,3,5-trisubstituted-pyrazolines, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 189-192.
74. Hollò, G. (2015). Carbonic anhydrase inhibitors. In: T.M. Shaarawy., M.B. Sherwood., R.A. Hitchings., J.G. Crowston. *Glaucoma* (Second Edition), Elsevier, pp. 559-565.

75. Pfeiffer, N. (1997). Dorzolamide: development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Surv Ophthalmol*, 42(2), 137-151.
76. Maślanka, T.A. (2015). Review of the pharmacology of carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of glaucoma in dogs and cats. *Vet J*, 203(3), 278-284.
77. Xiao, Z., Duan, R., Cui, W., Zhang, Y., Zhang, S., Chen, F., Zhang, Y., Liu, J., Zhang, D., Meng, Y., Wang, L., Wang, H. (2011). Synthesis and evaluation of new carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 19(10), 3221-3228.
78. Mogk, L.G., Cyrilin, M.N. (1988). Blood dyscrasias and carbonic anhydrase inhibitors. *Ophthalmology*, 95(6), 768-771.
79. Altıntop, M.D., Sever, B., Özdemir, A., Küçükoğlu, K., Önem, H., Nadaroğlu, H., Kaplancıklı, Z.A. (2017). Potential inhibitors of human carbonic anhydrase isozymes I and II: design, synthesis and docking studies of new 1,3,4-thiadiazole derivatives. *Bioorg Med Chem*, 25(13), 3547-3554.
80. Bayrak, Ç., Taslimi, P., Gülçin, İ., Menzek, A. (2017). The first synthesis of 4-phenylbutenone derivative bromophenols including natural products and their inhibition profiles for carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Bioorg Chem*, 72, 359-366.
81. Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, 23(2), 146-189.
82. Arslan, T., Çelik, G., Çelik, H., Şentürk, M., Yaylı, N., Ekinci, D. (2016). Synthesis and biological evaluation of novel bischalcone derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *Arch Pharm*, 349(9), 741-748.
83. Vullo, D., Del-Prete, S., Fisher, G.M., Andrews, K.T., Poulsen, S.A., Capasso, C., Supuran, C.T. (2015). Sulfonamide inhibition studies of the n-class carbonic anhydrase from the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem*, 23(3), 526-531.
84. Şentürk, M., Alıcı, H.A., Beydemir, S., Küfrelioğlu, Ö.İ. (2012). *In vitro* and *in vivo* effects of some benzodiazepine drugs on human and rabbit erythrocyte carbonic anhydrase enzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 27, 680-684.
85. De Simone, G., Supuran, C.T. (2012). (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J Inorg Biochem*, 111, 117-129.
86. Orhan, F., Şentürk, M., Supuran, C.T. (2016). Interaction of anions with a newly characterized alpha carbonic anhydrase from *Halomonas* sp. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(6), 1119-1123.
87. Korkmaz, N., Obaidi, O.A., Şentürk, M., Astley, D., Ekinci, D., Supuran, C.T. (2015). Synthesis and biological activity of novel thiourea derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30(1), 75-80.
88. Güney, M., Çavdar, H., Şentürk, M., Ekinci, D. (2015). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel uracil derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 25(16), 3261-3263.
89. Türkoğlu, E.A., Şentürk, M., Supuran, C.T., Ekinci, D. (2017). Carbonic anhydrase inhibitory properties of some uracil derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 74-77.
90. Balaydın, H.T., Şentürk, M., Göksu, S., Menzek, A. (2012). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel bromophenols and their derivatives including natural products: vidalol B. *Eur J Med Chem*, 54, 423-428.
91. Gencer, N., Bilen, C., Demir, D., Atahan, A., Ceylan, M., Küçükislamoğlu, M. (2013). *In vitro* inhibitor effect of some chalcones on erythrocyte carbonic anhydrase I and II. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 41(6), 384-388.
92. Ekinci, D., Al-Rashida, M., Abbas, G., Şentürk, M., Supuran, C.T. (2012). Chromone containing sulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 27(5), 744-747.

93. Demirdağ, R., Çomaklı, V., Şentürk, M., Ekinici, D., Küfrevioğlu, O.I., Supuran, C.T. (2013). Purification and characterization of carbonic anhydrase from sheep kidney and effects of sulfanamides on enzyme activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 21(6), 1522-1525.
94. Yaseen, R., Ekinici, D., Şentürk, M., Hameed, A.D., Ovais, S., Rathore, P., Samim, M., Javed, K., Supuran, C.T. (2016). Pyridazinone substituted benzenesulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 26(4), 1337-1341.
95. Aydın, T., Yurtvermez, B., Şentürk, M., Kazaz, C., Çakır, A. (2019). Inhibitory effects of metabolites isolated from *Artemisia dracunculus* L. against the human carbonic anhydrase I (hCA I) and II (hCA II). *Rec Nat Prod*, 13(3), 216-225.
96. Davis, P.H. (1975). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands II*, Edinburg: Edinburg University Press.
97. Robson, N.K.B. (1966). *Hypericum* L. In: P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Supplement), Edinburg: Edinburg University Press.
98. Tuzlacı, E. (2006). *Türkiye Bitkileri Sözlüğü*. İstanbul: Alfa Yayınları.
99. Çubukçu, B., Meriçli, A.H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütlüpnar, N., Meriçli, F. (2002). *Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.
100. Zeybek, U., Haksel, M. (2011). *Türkiye’de ve Dünyada Önemli Tıbbi Bitkiler ve Kullanımları*. İstanbul: Argefar ve Helvacızade Sağlık Yayınları.
101. Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (2001). St John’s wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol*, 53(5), 583-600.
102. Rodríguez-Landa, J.F., Contreras, C.M. (2003). A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine*, 10(8), 688-699.
103. Süntar, I., Oyardı, O., Akkol, E. K., Özçelik, B. (2015). Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. *Pharm Biol*, 54(6), 1065-1070.
104. Raso, G.M., Pacilio, M., Di Carlo, G., Esposito, E., Pinto, L., Meli, R. (2002). In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *J Pharm Pharmacol*, 54(10), 1379-1383.
105. Hosseinzadeh, H., Karimi, G.R., Rakhshanizadeh, M. (2005). Anticonvulsant effect of *Hypericum perforatum*: role of nitric oxide. *J Ethnopharmacol*, 98(1-2), 207-208.
106. Öz, Ö. (2011). *Hypericum perforatum* (St. John’s wort)’un burkitt lenfoma hücre dizilerinde (daudi ve namalwa) sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri, Uzmanlık Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
107. European Scientific Cooperative on Phytotherapy (2003). *ESCOP Monographs*. UK: ESCOP.
108. Bayram, E., Sonmez, Ç., Ekren, S., Tatar, Ö., Gürel, A., Hayta, S. ve ark. (2013). *Achillea Millefolium* L. grubuna ait türlerde verim, uçucu yağ ve chamazulene içeriğinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50, 87-96.
109. Tübvives. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. <http://www.tubives.com/> Erişim tarihi: 18.11.2019.
110. Kılıç, K.A. (2019). *Achillea millefolium* L. bitkisinin Avrupa Farmakopesi 7.0’a uygunluk açısından incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
111. Saaidnia, S., Gohari, A., Mokhber-Dezfuli, N., Kiuchi, F. (2011). A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(3), 173-186.

112. Chandler, R.F., Hooper, S.N., Harvey, M.J. (1982). Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. *Econ Bot*, 36(2), 203-223.
113. Applequist, W.L., Moerman, D.E. (2011). Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A neglected Panacea? A review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research. *Econ Bot*, 65(2), 209-225.
114. Benedek, B., Kopp, B. (2007). *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: recent findings confirm the traditional use. *Wien Med Wschr*, 157(13-14), 312-314.
115. Benedek, B., Rothwangl-Wiltschnigg, K., Rozema, E., Gjoncaj, N., Reznicek, G., Jurenitsch, J., Kopp, B., Glasl, S. (2008). Yarrow (*Achillea millefolium* L.): pharmaceutical quality of commercial samples. *Die Pharmazie*, 63(1), 23-26.
116. Benedek, B., Kopp, B., Melzig, M. F. (2007). *Achillea millefolium* L. s.l. Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? *J Ethnopharmacol*, 113(2), 312-317.
117. Rohloff, J., Skagen, E.B., Steen, A.H., Iverse, T.H. (2000). Production of yarrow (*Achillea Millefolium* L.) in Norway: essential oil content and quality. *J Agric Food Chem*, 48, 6205-6209.
118. Candan, F., Ünlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*, 87(2-3), 215-220.
119. Nemeth, E., Bernath, J. (2008). Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.). *Curr Pharm Des*, 14, 3151-3167.
120. Chandler, R.F., Hooper, S.N., Harvey, M.J. (1982). Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. *Econ Bot*, 36(2), 203-223.
121. Şabanoğlu, S. (2016). Türkiye’de yetişen bazı *Achillea* L. türleri üzerinde farmakognozik araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
122. Rezaei, F., Jamei, R., Heidari, R., Maleki, R. (2016). Chemical composition and antioxidant activity of oil from wild *Achillea setacea* and *A. vermicularis*. *Int J Food Prop*, 20(7), 1522-1531.
123. Karamenderes, C., Karabay, N., Zeybek, U. (2003). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Achillea setacea* Waldst&Kit. collected from different localities of Turkey. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 32(2), 113-120.
124. Zitterl-Eglseer, K., Jurenitsch, J., Korhammer, S., Haslinger, E., Sosa, S., Loggia, R., et al. (1991). Entzündungshemmende Sesquiterpenlactone von *Achillea setacea*. *Planta Medica*, 57(05), 444-446.
125. Redzić, S.S. (2007). The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. *Coll antropol*, 31(3), 869-890.
126. Bianca, I., Nescu, Tuchilu, C., Corciov, A., Lungu, C., Mihai, C., Gheldiu, A., Vlase, L. (2018). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of *Tanacetum vulgare*, *Tanacetum corymbosum* and *Tanacetum macrophyllum* extracts. *Farmacia*, 66(2), 282-288.
127. Kumar, V., Tyagi, D. (2013). Chemical composition and biological activities of essential oils of genus *Tanacetum*-A review. *J Pharmacogn Phytochem*, 2, 121-129.
128. Stern, F.C. (1946). *Paeonia* L., In: P.H. Davis., J. Cullen., M.J.E. Coode. (Eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Island*. Edinburg: Edinburgh University Press.
129. Mammadova, V. (2018). *Paeonia mascula* (L.) Mill. subsp. *mascula* ve *Paeonia Tenuifolia* L. bitkilerinin antibakteriyel aktivitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye.
130. Ünlu, S., (2010). Türkiye’nin *Paeonia* L. türleri üzerinde farmasötik botanik araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

131. Miyazawa, M., Maruyama, H., Kameoka, H. (1984). Essential oil constituents of “*Paeoniae Radix*” *Paeonia lactiflora* Pall. (*Paeonia albiflora* Pall.). *Agric Biol Chem*, 48, 2847-2849.
132. Brihi, N. (2018). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Paeonia mascula* extract. *J Pharm Pharmacogn Res*, 6(2), 81-88.
133. Lin, H.C., Ding, H.Y., Ko, F.N., Teng, C.M., Wu, Y.C. (1999). Aggregation inhibitory activity of minor acetophenones from *Paeonia* species. *Planta Med*, 65, 595-599.
134. Zhu, Y.P. (1998). *Chinese Materia Medica*. Amsterdam: Overseas Publishers Association.
135. Papandreou, V., Magiatis, P., Chinou, I., Kalpoutzakis, E., Skaltsounis, A.L., Tsarbopoulos, A. (2002). Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek *Paeonia* taxa. *J Ethnopharmacol*, 81(1), 101-104.
136. Yong, Z., Bao-en, W., Shu-wen, Z., Shu-min, Y., Hong, W. (2015). Isolation of antifungal compound from *Paeonia suffruticosa* and its antifungal mechanism, *Chin J Integr Med*, 21(3), 211-216.
137. Sagar, G.R., Harper, J.L. (1964). *Plantago Major L.*, *P. Media L.* and *P. Lanceolata L.* *J Ecol*, 52(1), 189-221.
138. Harput, U.S., Genc, Y., Saracoglu, I. (2012). Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1554-1559.
139. Oloumi, M.M., Vosough, D., Derakhshanfar, A., Nematollahi, M.H. (2011). The healing potential of *Plantago lanceolata* ointment on collagenase-induced tendinitis in Burros (*Equus asinus*). *J Equine Vet Sci*, 31(8), 470-474.
140. Venditti, M. (2003). Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*, 88(2-3), 125-130.
141. Taşkın T. (2011). Çakırlı (Bursa-Orhangazi) yöresinde yenebilen bazı yabani bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
142. Wei, F., Jinglou, C., Yaling, C., Yongfang, L., Liming, C., Lei, P., Zhou, D., Liang, X., Ruan, J. (2010). Antioxidant, free radical scavenging, antiinflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching. *J Ethnopharmacol*, 130, 521-528.
143. Taşkın, T., Bitiş, L. (2016). *In vitro* antioxidant activity of eight wild edible plants in Bursa Province of Turkey. *Farmacia*, 64(5), 706-711.
144. Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-76.
145. Taşkın, T., Doğan, M., Yılmaz, B.N., Şenkardeş, I. (2020). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, enzyme inhibition, anti-proliferative and calcium oxalate anti-crystallization activities of *Micromeria fruticosa* spp. brachycalyx and *Rhus coriaria*. *Biocatal Agric Biotechnol*, 101670.
146. Taşkın, T., Doğan, M., Cam, M.E., Şahin, T., Şenkardeş, I. (2020). *In vitro* anti-urease, antioxidant, anticholinesterase, cytotoxic and *in vivo* anti-inflammatory potential of *Satureja cuneifolia* Ten. *Not Sci Biol*, 12(2), 222-232.
147. Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T. (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *J Biol Chem*, 242(18), 4221-4229.
148. Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*, 56, 658-666.

149. Halpine, S.M. (1996). An improved dye and lake pigment analysis method for high performance liquid chromatography and diode-array detector. *Stud Conserv*, 41(2), 76-94.
150. Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O. Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem*, 90, 157-167.
151. Zheleva-Dimitrova, D., Nedialkov, P., Kitanov, G. (2010). Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. *Pharmacogn Mag*, 6(22), 74-78.
152. Altun, M.L., Yılmaz, B.S., Orhan, I.E., Çitoğlu, G.S. (2013). Assessment of cholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant effects of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Ind Crops Prod*, 43, 87-92.
153. Modolo, L.V., de Souza, A.X., Horta, L.P., Araujo, D.P., de Fátima, Â. (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *J Adv Res*, 6(1), 35-44.
154. Doležal, R., Houdková, I., Kalász, H., Andráš, R., Novák, M., Maltsevskaya, N.V., Žďárová Karasová, J. (2019). Determination of hypericin in *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using classical C18 and pentafluorophenyl stationary phases: contribution of Pi-Pi interactions to high-performance liquid chromatography (HPLC). *Anal Lett*, 1-25.
155. Benetis, R., Radušienė, J., Jakštas, V., Janulis, V., Malinauskas, F. (2008). Development of an RP-HPLC method for the analysis of phenolic compounds in *Achillea millefolium* L. *J Liq Chrom Relat Tech*, 31(4), 596-610.
156. Benedec, D., Popica, I.A., Onigaa, I., Hanganua, D., Dumab, M., Dumitrescu, R.S., Bischinc, C., Vlasea, L. (2015). Comparative HPLC-MS analysis of phenolics from *Achillea distans* and *Achillea millefolium* and their bioactivity. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, 60(4), 257-266.
157. Sevindik, H.G., Güvenalp, Z., Karadayı, M., Güllüce, M., Demirezer, L.Ö. (2016). Antimutagenic potentials of flavonoids from *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium*. *Planta Med*, 82(S 01), P527.
158. Ulubelen, A., Öksüz, S., Schuster, A. (1990). A sesquiterpene lactone from *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. *Phytochemistry*, 29(12), 3948-3949.
159. Gutiérrez-Grijalva, E.P., Picos-Salas, M.A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M.S., Vazquez-Olivo, G., Heredia, J.B. (2017). Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants (Basel, Switzerland)*, 7(1), 2.
160. Şabanoglu, S., Gökbulut, A., Altun, M.L. (2019). Characterization of phenolic compounds, total phenolic content and antioxidant activity of three *Achillea* species. *J Res Pharm*, 23(3), 567-576.
161. Zitterl-Eglseer, K., Jurenitsch, J., Korhammer, S., Haslinger, E., Sosa, S., Della Loggia, R., Kubelka, W., Franz, C. (1991). Entzündungshemmende sesquiterpenlactone von *Achillea setacea*. Sesquiterpenlactones of *Achillea setacea* with antiphlogistic activity. *Planta Med*, 57(5), 444-446.
162. Marchart, E., Kopp, B. (2003). Capillary electrophoretic separation and quantification of flavone-O- and C-glycosides in *Achillea setacea* W. et K. *J Chromatogr B*, 792(2), 363-368.
163. Sut, S., Zengin, G., Dall'Acqua, S., Gazdová, M., Šmejkal, K., Bulut, G., Mahomoodally, M.F. (2019). *Paeonia arietina* and *Paeonia kesrounensis* bioactive constituents: NMR, LC-DAD-MS fingerprinting and *in vitro* assays. *J Pharmaceut Biomed*, 165, 1-11.
164. Koz, Ö., Ekinçi, D., Perrone, A., Piacente, S., Alankuş-Çalışkan, Ö., Bedir, E., Supuran, C.T. (2013). Analysis of saponins and phenolic compounds as inhibitors of  $\alpha$ -carbonic anhydrase isoenzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 28(2), 412-417.
165. Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem*, 3, 43-53.

166. Aygul, I., Yaylaci-Karahalil, F., Supuran, C.T. (2016). Investigation of the inhibitory properties of some phenolic standards and bee products against human carbonic anhydrase I and II. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(54), 119-124.
167. Iyer, R., Barrese, A.A., Parakh, S., Parker, C.N., Tripp, B.C. (2006). Inhibition profiling of human carbonic anhydrase II by high-throughput screening of structurally diverse, biologically active compounds. *J Biomol Screen*, 11(7), 782-791.
168. Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J., Ayuso, M.J. (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *J Agric Food Chem*, 53(6), 1927-1933.
169. Hassan, S.T., Žemlička, M. (2016). Plant-derived urease inhibitors as alternative chemotherapeutic agents. *Arch Pharm*, 349(7), 507-522.





