



***ADENIUM OBESUM VE TAMARIX ARABICA*
EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN
KAPASİTELERİ İLE α -AMİLAZ, α -GLUKOZİDAZ,
hCA I-II VE AChE ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**2023
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA TOKSİKOLOJİSİ**

Afnan Ali ALSHEPY

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

**ADENIUM OBESUM VE TAMARIX ARABICA EKSTRAKTLARININ
ANTIÖKSİDAN KAPASİTELERİ İLE α -AMİLAZ, α -GLUKOZİDAZ, hCA I-
II VE AChE ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Afnan Ali ALSHEPY

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

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK
Eylül 2023**

Afnan Ali ALSHEPY tarafından hazırlanan “*ADENIUM OBESUM* VE *TAMARIX ARABICA* EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ İLE α -AMİLAZ, α -GLUKOZİDAZ, hCA I-II VE AChE ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Müslüm KUZU

.....

Tez Danışmanı, Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 05/09/2023

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Müslüm KUZU (KBÜ)

.....

Üye : Doç. Dr. Şevki ADEM (ÇAKÜ)

.....

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

Doç. Dr. Zeynep ÖZCAN

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü



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

Afnan Ali ALSHEPY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**ADENIUM OBESUM VE TAMARIX ARABICA EKSTRAKTLARININ
ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ İLE α -AMİLAZ, α -GLUKOZİDAZ, hCA I-
II VE AChE ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Afnan Ali ALSHEPY

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Müslüm KUZU

Eylül 2023, 103 sayfa

Şifalı bitkiler, eski çağlardan beri çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde ve toplumun gelişmesinde hayati bir rol oynamıştır. Şifalı bitkiler, tedavi edilebilir ve tedavi edilemeyen hastalıkların tedavisinde kullanılacak yeni ilaçlar için en güvenli kaynaklardan biridir. Dünya çapında mevcut reçeteli ilaçların yaklaşık %25'i doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Bu tez çalışmasında, Yemen'de yetişen ve tedavi amaçlı da kullanılabilen Adenium obesum ve Tamarix arabica bitkilerinin antioksidan aktiviteleri, enzim inhibisyon etkileri ve fenolik bileşik içerikleri üzerine kapsamlı in vitro olarak bir inceleme yapılmıştır. Bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri, FRAP, CUPRAC, ABTS ve DPPH gibi farklı yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bu aktiviteler, bitki ekstraktlarının serbest radikalleri giderme kapasitelerini gösterir.

Özellikle TAE ve TAK ekstraktlarının yüksek antioksidan aktiviteleri vurgulanmıştır. Ayrıca bitki ekstraktlarının α -amilaz, α -glukozilaz, hCA I, hCA II ve asetilkolinesteraz enzimleri üzerine aktivasyon ve inhibisyon etkileri de incelendi. *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinin ekstraktları, α -amilaz, α -glukozidaz, karbonik anhidraz I ve II, asetilkolin esteraz gibi enzimlere etkilerini göstermiştir. Bu, bitki ekstraktlarının potansiyel terapötik kullanımları üzerindeki etkilerini değerlendirmeye yönelik önemli bir adımdır. Son olarak bitkilerin metanol ekstarktlarının bazı fenolik miktarları ise LC-MS/MS kromatografisi ile belirlendi. TANİK asit, Ellagik asit ve Miquelianin gibi fenolik bileşiklerin belirlenmiş olması, bitkinin biyolojik aktivitelerinden sorumlu olabilecek önemli bileşiklerin tanımlanmasını sağlar. Bu tez, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinin farklı ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin karşılaştırmalı bir çalışmasını bildiren ilk çalışmadır. Çalışmamız, geleneksel bitkisel tedavi yöntemlerinin modern bilimsel yöntemlerle birleştirilmesi açısından önemli bir örnek sunmaktadır. Bu, bitkilerin biyolojik aktivitelerini daha iyi anlamamıza ve potansiyel tıbbi uygulamalarını değerlendirmemize yardımcı olabilir. Çalışmamız, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinin potansiyel tıbbi uygulamalarını değerlendirmek için önemli bilgiler sağlar. Özellikle antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri, bu bitkilerin metabolik bozukluklar, inflamasyon ve anti-kanser terapileri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinin bu çalışma kapsamında incelenen biyolojik aktiviteleri, doğal kaynaklardan elde edilen potansiyel terapötik ajanlar olarak daha fazla araştırmayı hak ediyor.

Anahtar Sözcükler : *Adenium obesum*, *Tamarix arabica*, α -amilaz, α -glukozidaz, Karbonik anhidraz, Asetilkolinesteraz, Antioksidan.

Bilim Kodu : 10105.07

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

**DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITIES OF EXTRACTS
OF *ADENIUM OBESUM* AND *TAMARIX ARABICA* AND THEIR EFFECTS
ON THE ACTIVITIES OF α -AMYLASE, α -GLUCOSIDASE, hCA I-II AND
AChE ENZYMES**

Afnan Ali ALSHEPY

**Karabük University
Institute of Graduate Programs
Department of Food Toxicology**

Thesis Advisor:

Prof. Dr. Müslüm KUZU

September 2023, 103 pages

Medicinal plants have played a vital role in the treatment of various human diseases and the development of society since ancient times. Medicinal plants are one of the safest sources for new drugs to be used in the treatment of treatable and incurable diseases. Approximately 25% of prescription drugs available worldwide are derived from natural sources. In this thesis study, a comprehensive in vitro examination was conducted on the antioxidant activities, enzyme inhibition effects and phenolic compound contents of *Adenium obesum* and *Tamarix arabica* plants, which grow in Yemen and can be used for therapeutic purposes. Antioxidant activities of plant extracts were evaluated by different methods such as FRAP, CUPRAC, ABTS and DPPH. These activities indicate the free radical scavenging capacity of plant extracts. Especially the high antioxidant activities of TAE and TAK extracts were emphasized.

In addition, the activation and inhibition effects of plant extracts on α -amylase, α -glycosylase, hCA I, hCA II and acetylcholinesterase enzymes were also examined. Extracts of *Adenium obesum* and *Tamarix arabica* plants have shown their effects on enzymes such as α -amylase, α -glucosidase, carbonic anhydrase I and II, and acetylcholine esterase. This is an important step towards evaluating the effects of plant extracts on their potential therapeutic use. Finally, some phenolic amounts of the methanol extracts of the plants were determined by LC-MS/MS chromatography. Determination of phenolic compounds such as TANIIC acid, Ellagic acid and Miquelianin enables the identification of important compounds that may be responsible for the biological activities of the plant. This thesis is the first to report a comparative study of the biological activities of different extracts of *Adenium obesum* and *Tamarix arabica* plants. Our study provides an important example of combining traditional herbal treatment methods with modern scientific methods. This may help us better understand the biological activities of plants and evaluate their potential medicinal applications. Our study provides important information to evaluate the potential medicinal applications of *Adenium obesum* and *Tamarix arabica* plants. In particular, their antioxidant and enzyme inhibition activities suggest that these plants may play a potential role in the treatment of various diseases such as metabolic disorders, inflammation and anti-cancer therapies. In conclusion, the biological activities of *Adenium obesum* and *Tamarix arabica* plants examined in this study deserve further investigation as potential therapeutic agents obtained from natural sources.

Key Word : *Adenium obesum*, *Tamarix arabica*, α -amylase, α -glucosidase, Carbonic anhydrase, Acetylcholinesterase, Antioxidant.

Science Code : 10105.07

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren tez danışmanım ve çok değerli hocam Prof. Dr. Müslüm KUZU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kinetik çalışma deneylerinin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Ayşe Nihan AÇIKKAPI KİSPET'e teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan bitkilerin temin edilmesini sağlayan İbb Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Esmail AL-MOSANİF'e teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili aileme manevi hiçbir yardımı esirgmeden yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamda bana KBÜBAP-22-YL-043 nolu proje ile finansal destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	6
TIBBİ BİTKİLER	6
2.1. ADENİUM OBESUM	7
2.2. TAMARİX ARABİCA	9
BÖLÜM 3	12
ANTİOKSİDANLAR	12
3.1. AC TESTİNİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERİ.....	14
3.1.1. DPPH Radikal Yakalama Yöntemi	14
3.1.2. ABTS Radikal Yakalama Yöntemi.....	15
3.1.3. FRAP Metodu (Demir İndirgeyici Antioksidan Gücü)	16
3.1.4. CUPRAC Metodu (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi).....	16
BÖLÜM 4	18
ENZİMLER VE ENZİM İNHİBİTÖRLERİ	18
4.1. ENZİMLER.....	18
4.1.1. α -Amilaz	18

	<u>Sayfa</u>
4.1.2. α -Glukozidaz	19
4.1.3. Karbonik Anhidraz	20
4.1.4. Asetilkolinestraz	20
4.2. ENZİM İNHİBİTÖRLERİ	21
4.2.1. α -Amilaz İnhibitörleri.....	21
4.2.2. Alfa Glukozidaz İnhibitörleri	22
4.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	23
4.2.4. Asetilkolinestraz İnhibitörleri.....	23
 BÖLÜM 5	 25
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	25
5.1. MATERYAL	25
5.1.1. Bitki Materyali	25
5.1.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması.....	25
5.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
5.1.4. Kullanılan Cihaz ve Aletler	30
5.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	30
5.1.5.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	31
5.1.5.2. FRAP İndirgeme Metodu ile İlgili Çözeltiler	31
5.1.5.3. CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	31
5.1.5.4. DPPH Radikalini İndirgeme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler	32
5.1.5.5. ABTS ^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	32
5.1.5.6. α -Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler ...	32
5.1.5.7. α -Glukozidaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler.....	33
5.1.5.8. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler.....	33
5.1.5.9. Asetilkolinestraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	33
5.2. YÖNTEMLER	34
5.2.1. Bitkilerin Ekstraksiyon Aşaması.....	34
5.2.2. Folin Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini	35
5.2.3. Toplam Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemleri	36

5.2.3.1. FRAP İndirgeme Kapasitesi Yöntemi	36
5.2.3.2. CUPRAC İndirgeme Kapasitesi Yöntemi	37
5.2.3.3. DPPH• Radikalini Süpürücü Etki Tayin Yöntemi.....	38
5.2.3.4. ABTS• ⁺ Radikali Giderme Aktivitesi Yöntemi	39
5.2.4. Ekstraktların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi ...	39
5.2.4.1. α -Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi	39
5.2.4.2. α -Glukozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	40
5.2.4.3. CA Aktivitesinin Belirlenmesi.....	41
5.2.4.4. AChE İnhibisyonun Belirlenmesi	42
5.2.5. Fenolik İçeriğin LC-MS/MS ile Belirlenmesi	43
BÖLÜM 6	46
DENEYSEL SONUÇLAR	46
6.1. TOTAL FENOLİK BİLEŞİK MİKTARI TAYİNİ SONUÇLARI.....	46
6.2. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN TAYİN SONUÇLARI.....	48
6.2.1. Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Sonuçları	48
6.2.2. Cu ²⁺ İyonu İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) Sonuçları	50
6.2.3. Serbest Radikal Giderme Etkisinin (DPPH•) Sonuçları.....	53
6.2.4. Katyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS• ⁺) Sonuçları	57
6.3. ENZİM AKTİVİTE ÖLÇÜM SONUÇLARI	58
6.3.1. α -Amilaz Aktivi Ölçüm Sonuçları.....	58
6.3.2. α -Glukozidaz Aktivite Ölçüm Sonuçları	63
6.3.3. CA Aktivite Ölçüm Sonuçları	68
6.3.4. AChE Aktivite Ölçüm Sonuçları	79
6.4. LC-MS/MS KROMATOĞRAFİSİ İLE ELDE EDİLEN SONUÇLARI	84
6.4.1. Yöntem Doğrulama Çalışmaları	84
6.4.2. 53 Fitokimyasalın LC–MS/MS Tespiti	85
BÖLÜM 7	88
TARTIŞMA	88
BÖLÜM 8	94
SONUÇLAR	94

	<u>Sayfa</u>
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	103



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Yemen haritası.	6
Şekil 2.2. Adenium obesum.	8
Şekil 2.3. Tamarix arabica.	9
Şekil 5.1. Kurutma sırasında <i>Adenium obesum</i> bitkisinin parçaları.	26
Şekil 5.2. Kullanılan çözücülerde bitkilerin ekstreleri.	34
Şekil 5.3. Ekstrelerin Rotary Evaporatörde Yoğunlaştırılması	35
Şekil 6.1. Gallik asit standart eğrisi.	46
Şekil 6.2. Toplam fenolik madde miktarı (TFMM).	47
Şekil 6.3. Fe ²⁺ Standart Eğrisi.	49
Şekil 6.4. Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Sonuçları.	50
Şekil 6.5. AO ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).	51
Şekil 6.6. TA ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).	51
Şekil 6.7. AO ve TA ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).	52
Şekil 6.8. TAE ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.	53
Şekil 6.9. TAM ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.	53
Şekil 6.10. TAK ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.	54
Şekil 6.11. TAK ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.	54
Şekil 6.12. AOE ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.	54
Şekil 6.13. AOM ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.	55
Şekil 6.14. AOK ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.	55
Şekil 6.15. AOK ekstraktlerinin DPPH radikalini indirgeme gücü.	55
Şekil 6.16. Serbest Radikal Giderme Etkisinin (DPPH•) Sonuçları.	56
Şekil 6.17. Trolox Standart Eğrisi.	57
Şekil 6.18. Katyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS• ⁺) Sonuçları.	58
Şekil 6.19. α-Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	59

Şekil 6.20. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	59
Şekil 6.21. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	60
Şekil 6.22. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	60
Şekil 6.23. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	61
Şekil 6.24. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	61
Şekil 6.25. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	62
Şekil 6.26. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	62
Şekil 6. 27. Ekstraların α -Amilaz enzim aktivasyonu değerleri.	63
Şekil 6.28. α -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	64
Şekil 6.29. α -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAM ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	64
Şekil 6.30. α -Glukozidaz enzimi üzerine TAK ekstreleri için aktivite (%) grafiği. ..	65
Şekil 6.31. α -Glukozidaz enzimi üzerine TAP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.....	65
Şekil 6.32. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOE ekstreleri için aktivite (%) grafiği. ..	66
Şekil 6.33. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOM ekstreleri için aktivite (%) grafiği. .	66
Şekil 6.34. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOK ekstreleri için aktivite (%) grafiği...	67
Şekil 6.35. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOP ekstreleri için aktivite (%) grafiği. ..	67
Şekil 6.36. α -Glukozidaz İnhibisyon Sonuçları.	68
Şekil 6.37. AOE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	69
Şekil 6.38. AOM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	70
Şekil 6.39. AOK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	70
Şekil 6.40. AOP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	71
Şekil 6.41. TAE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	71

Şekil 6.42. TAM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	72
Şekil 6.43. TAK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	72
Şekil 6.44. TAP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.	73
Şekil 6.45. hCA I enzim inhibisyonu sonuçları.	74
Şekil 6.46. AOE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	75
Şekil 6.47. AOM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	75
Şekil 6.48. AOK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	76
Şekil 6.49. AOP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	76
Şekil 6.50. TAE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	77
Şekil 6.51. TAM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	77
Şekil 6.52. TAK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	78
Şekil 6.53. TAP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.	78
Şekil 6.54. hCA II enzim inhibisyonu sonuçları.	79
Şekil 6.55. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	80
Şekil 6.56. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOM ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	80
Şekil 6.57. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOK ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	81
Şekil 6.58. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOP ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	81
Şekil 6.59. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	82
Şekil 6.60. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAM ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	82
Şekil 6.61. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAK ekstreleri için aktivite (%) grafiği.	83

Sayfa

Şekil 6.62. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAP ekstreleri için aktivite (%) grafiği.....	83
Şekil 6.63. AChE enzim inhibisyonu sonuçları.	84
Şekil 6.64. Standart fenolik bileşiklerin TIC (Toplam İyon Kromatogramı) kromatogramı.....	85
Şekil 6.65. <i>Tamarix arabica</i> ekstraktının geliştirilmiş LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilen TIC (Toplam İyon Kromatogramı) kromatogramı.....	86
Şekil 7.1. <i>Tamarix</i> spp.'nin en önemli fitokimyasallarının yapısı. a: quercetin, b: tamarixetin, c: kaempferol, d: isorhamnetin, e: ellagik asit, f: siringik asit, g: gallik asit.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. <i>Adenium obesum</i> türünün sistematigi	7
Çizelge 2.2. <i>Tamarix arabica</i> türünün sistematigi.....	10
Çizelge 3.1. Antioksidan kapasitenin spektrofotometrik yöntemleri.....	13
Çizelge 5.1. Bitki Ekstraktlarının kısaltılmış kodları.....	26
Çizelge 5.2. Kullanılan kimyasallara ait formüller ve moleköl ağırlıkları.	27
Çizelge 5.3. Kullanılan temel alet ve cihazlar.	30
Çizelge 5.4. Bitki ekstrelerinin elde edilen madde miktarı.....	35
Çizelge 5.5. α -Amilaz aktivite ölçümünde çözeltilerin katılma miktarı ve sırası....	40
Çizelge 5.6. α - Glukozidaz aktivite ölçümünde çözeltilerin katılma miktarı ve sırası.....	41
Çizelge 5.7. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesinde kullanılan maddeler	42
Çizelge 5.8. AChE Enzimi Aktivite Tayini İçin Kullanılan Reaktifler.	43
Çizelge 6.1. Toplam fenolik madde miktarı (TFMM).	47
Çizelge 6.2. Ekstraktlerin FRAP değerleri.	49
Çizelge 6.3. AO ve TA ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC)*.	52
Çizelge 6.4. Ekstrelerin %DPPH gidermesini değerleri.	56
Çizelge 6.5. Ekstraktlerin Trolox eşdeğeri.	57
Çizelge 6.6. Ekstrelerin α -Amilaz enzim aktivasyonu değerleri.	63
Çizelge 6.7. Ekstrelerin α -Glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları.....	68
Çizelge 6.8. Ekstrelerin hCA I enzim inhibisyonu sonuçları.....	73
Çizelge 6.9. Ekstrelerin hCa II enzim inhibisyonu sonuçları.	79
Çizelge 6.10. Ekstrelerin AChE enzim inhibisyonu sonuçları.....	84
Çizelge 6.11. <i>Tamarix arabica</i> 'nın metanol ekstraktındaki fitokimyasalların LC-MS/MS (mg/g ekstrakt) ile kantitatif taranması.	86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

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

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	: ABTS katyon radikali
AC	: Antioksidan kapasitesi
AC ₅₀	: %50 aktivite eden konsantrasyon
AChE	: Asetilkolinesteraz
AChI	: Asetilkolinyodür
AD	: Alzheimer hastalığı
BchE	: Butilkolinesteraz
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CA	: Karbonik anhidraz enzimi

ChE	: Kolinesteraz
CUPRAC	: Bakır Azaltıcı Antioksidan Kapasitesi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH•	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DTNB	: 5,5-Ditiyobis-2-Nitrobenzoik Asit
E.C.	: Enzim Kodu
EDTA	: etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin-Ciocalteau Reaktifi
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FRAP	: Ferrik Azaltıcı Antioksidan Gücü
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HAT	: Hidrojen atomu transferi
hCA I	: İnsan Karbonik Anhidraz I İzoenzimi
hCA II	: İnsan Karbonik Anhidraz II İzoenzimi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Mevcut konsantrasyonu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
PNG	: p-nitrofenil- α -D-glukopiranoz
PPHG	: postprandiyal hiperglisemi
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SET	: Tek elektron transferi
T2D	: Tip 2 diyabet
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
TFMM	: Toplam fenolik madde miktarı
Tris	: Trihidroksimetil Aminometan
Troloks	: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UV	: Ultraviyole

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bitkiler insanoğlunun barınma, giyinme, beslenme ve ilaç başta olmak üzere birçok ihtiyacını karşılamıştır. Bitkiler, sofistike geleneksel tıp sistemlerinin temelini oluşturmuştur. Bu tıp sistemleri, günümüzde hala kullanımda olan bazı önemli ilaçların ortaya çıkmasına neden olmuştur [1]. 1960'ların sonunda DSÖ'de sömürgecilikten kurtulma ve pan-Afrikanizm siyasi zemininde ortaya çıkan geleneksel tıp, sonraki on yıllarda teşvik edilmeye devam etti ve en son küresel Geleneksel Tıp Stratejisi (2014 - 2023) ile sonuçlandı [2]. Dünyada insanların büyük çoğunluğu, günlük sağlık ihtiyaçları için hala geleneksel *materia medica*'larına (tıbbi bitkiler ve diğer malzemeler) güveniyor [1]. Son yıllarda modern tıpta gözlemlenen büyük ilerlemelere rağmen, bitkiler hala sağlık hizmetine önemli katkılar sağlamaktadır.

Tıbbi bitkiler tabiri tedavide kullanılan çeşitli bitki türlerini kapsar ve bu bitkilerden bazılarının tıbbi etkinlikleri vardır. Bu tıbbi bitkiler, ilaç geliştirme ve sentezinde kullanılabilecek zengin bir içerik kaynağı olarak kabul edilir. Ayrıca bu bitkiler tüm dünyada insan kültürlerinin gelişmesinde kritik bir rol oynamaktadır [3]. Bitkilerden elde edilen ilaçlar kolayca bulunur, daha ucuz, güvenli ve etkilidir ve nadiren yan etkileri vardır. Tüm tıbbi reçetelerin dörtte birinin bitkilerden elde edilen maddelere veya bitkilerden elde edilen sentetik analoglara dayalı formülasyonlar olduğu da bir gerçektir. Antikanser ilaçları, antimikrobiyal ilaçlar, antihepatotoksik bileşikler gibi terapötik olarak etkili yeni ilaçlar için, binlerce yıldır tıbbi kullanım için seçilen bitkiler en belirgin seçimi oluşturmaktadır. Tıbbi bitkiler insan vücudu üzerinde kesin fizyolojik etki sağlayan bazı organik bileşikler içerirler ve bu biyoaktif maddelere tanenler, alkaloidler, terpenoidler, steroidler ve flavonoidler örnek olarak verilebilir [4]. Ayrıca şifalı bitkiler tipik olarak, sağlığı iyileştirmek için ayrı ayrı veya sinerji içinde hareket edebilen farklı kimyasal bileşiklerin karışımlarını içerir. Örneğin, tek bir bitki, sindirimi uyaran maddeler, şişliği ve ağrıyı azaltan iltihap önleyici bileşikler,

antioksidan ve venotonik olarak işlev görebilen fenolik bileşikler, doğal antibiyotik ve idrar söktürücü görevi gören antibakteriyel ve mantar önleyici tanenler içerebilir [1].

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, dünya nüfusunun %80'i, özellikle de gelişmekte olan ülkelerdekiler, sağlık hizmetleri için bitki türevli ilaçlara güveniyor. Sıklıkla alıntılanan bu rakamlar çerçevesinde önemli bir belirsizlik olmasına rağmen, tıbbi bitkilerin hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde çok sayıda insanın geçiminde ve refahında önemli bir rol oynadığına şüphe yoktur [5]. Bu nedenle şifalı bitkiler umut verici bir geleceğe sahiptir. Dünyada yaklaşık yarım milyon bitki vardır ve bunların çoğu henüz tıbbi aktiviteleri açısından incelenmemiştir ve tıbbi aktiviteleri mevcut veya gelecekteki araştırmalarda tedavi için belirleyici olabilir. Geleneksel kültürlerdeki bitkisel ilaçlara ilişkin derin bilginin yüzyıllar boyunca deneme yanılma yoluyla gelişmesi ve en önemli tedavilerin dikkatli bir şekilde bir nesilden diğerine sözlü olarak aktarılması muhtemeldir [1].

Yemen, büyük bitki çeşitliliği nedeniyle hem koruyucu hem de tedavi edici tıp için botanik ilaçlar hakkında uzun ve ünlü bir farkındalık ve bilgi geçmişine sahiptir. Endemik ve yarı endemik bitkiler açısından zengindir ve sayılarının 457'si olmak üzere 608 olduğu tahmin edilmektedir. Endemik (Sokotra'da 307) yani başka yerde bulunmayan bitkilerin yaklaşık %16'sını oluşturur. Bu nedenle Yemen'de birinci basamakta geleneksel tıbbın kullanımı yaygındır. Ancak Yemen doğal kaynaklarından sadece birkaç türün biyolojik aktiviteleri bilimsel olarak araştırılmıştır [6]. Bu çalışmada Yemen'in kuzeyindeki iki bölgeden iki şifalı bitki (*Adenium obesum* ve *Tamarix arabica*) halk ilaçları olarak tıbbi değerlerinden dolayı seçilmiştir.

Adenium obesum, yabani çiçekli bir tıbbi bitkidir. Yaygın olarak çöl gülü olarak bilinen *Adenium obesum*, *Apocynaceae* familyasına aittir ve tüm Afrika'da bulunur ve Asya'da yetiştirilir. Kalın gövdeli, oldukça etli yapraklı ve süs bitkisi olarak kullanılan bir kserofittir. Cins adını Yemen'in eski adı olan ve günümüzde ülkenin başkenti olan Aden'den alırken, *obesum* terimi gövdenin taban kısımlarında şişmesini ifade eder [7]. Bu bitkinin tüm kısımları (lateks dahil) geleneksel ilaçlarda cilt topakları, yaralar, kulak ağrısı, rinit, gonore ve bulaşıcı hastalıkların tedavisi için kullanılır. Aynı

zamanda zehirli bir bitkidir ve bu nedenle böcek ilacı olarak kullanılır. Bu tür, antibakteriyel, antiviral, antikanser, akarisidal, yumuşakça öldürücü, tripanosidal, psisidal ve antioksidan aktiviteleri içeren geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sergiler [8, 9].

Tamarix arabica, Bunge (1852) tarafından, Yemen'de bulunan "Arabistan Tihama'nın yerlisi"nda Botha tarafından yapılan bir toplulukta tanımlanmıştır [10]. *Tamaricaece* ailesine aittir ve toprak erozyonunu önlemek ve kum tepelerini stabilize etmek için yetiştirilir. *Tamarix arabica* tıbbi bir bitki olarak incelenmiş ve fosfor, kalsiyum, mineraller, florür, polifenoller, flavonoidler, fenolik bileşikler, glikozitler, terpenler, steroller ve alkaloidler gibi biyoaktif bileşikleri içerdiği bulunmuştur [11].

Enzimler ve enzim inhibitörleri tıpta ilaç olarak kullanılmaktadır. Enzim inhibisyonu, farmasötik araştırmalarda önemli bir alandır ve bu alanda yapılan çalışmalar çeşitli hastalıklarda kullanılan ilaçların çeşitliliğine yol açmaktadır [12]. α -amilaz inhibitörleri, bitkilerde mevcuttur ve bitkiler tarafından avcı hayvanlara karşı savunmalarını güçlendirmek için üretildikleri düşünülmektedir. Enzimatik inhibitor aktivitesi olan bitki bileşenleri, polifenolik bileşikler ve glikoproteinleri içermektedir. Örneğin, ahududu ve çilekte bulunan antosiyaninler ve ellagitaninlerin α -glukozidaz ve α -amilaz aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Buna ek olarak yeşil ve siyah çaylarda bulunan teafavin ve kateşinlerin bir *in vitro* modelde nişasta sindirimini geciktirmelerinin yanı sıra, α -amilaz ve α -glukozidaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca baklagil bitkileri, sindirimi yavaşlatan ve sonunda kan şekeri ve insuline tepkileri değiştiren değişik miktarda α -amilaz inhibitörleri içerirler. Bu etkiler şeker hastaları için yararlı olup, günümüzde α -amilaz inhibitörlerini içeren antidiabetik ürünleri geliştirmek için çok fazla miktarda araştırma yapılmaktadır [13].

α -glukozidaz inhibitörleri, bu bağırsak enzimlerini rekabetçi ve geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Glukoamilaz, sukraz, maltaz, izomaltaz, laktaz bilinen önemli α -glukozidaz enzimlerdir. α -glukozidaz inhibitörleri karbonhidratların sindirimini yavaşlatır ve glukoz Emilimini geciktirir ancak bu gecikme malabsorbsiyona neden olmaz. α -glukozidaz enzim inhibitörleri karbonhidrat Emilimini geciktirmeleri

yanısıra, gastrointestinal hormonal aksta da değişiklikler yapabilirler ve bu, kan şekeri seviyelerinde daha küçük ve daha yavaş bir artışa neden olur. α -glukozidaz enzim inhibitörleri akarboz, vogliboz ve miglitoldur. Akarboz, nitrojen kapsayan bir pseudosakkaridtir. Vogliboz, valiomin türevidir. Miglitol ise deoksinojirimisin türevidir. Akarboz ve voglimos mikrobiyal kaynaklıdır. Miglitol ise sentetiktir. Bu grubun en fazla kullanılanı ve ülkemizde de bulunanı akarbozdur. Akarboz, hem glukozamilaz hemde sukraz inhibitörüdür. Nişasta, sukroz ve maltozun emilimini de geciktirir ve ortamda bulunan glukoz ve diğer disakkaridlerin emilimi üzerinde etkili değildir. Ayrıca, laktoz intoleransı olan hastalarda akarboz kullanımı bir sorun yaratmaz çünkü ilacın laktaz üzerinde etkisi yoktur [14].

Karbonik anhidrazlar (CA'lar), ilaç-hedef enzimler olarak bilinirler. Enzim inhibitörleri, yeni terapötik ajanların keşfedilmesi ve protein-ilac etkileşimlerinin moleküler düzeyde ayrıntılı olarak anlaşılması için önemli bileşiklerdir. Karbonik anhidraz veya karbonat dehidrataz (EC 4.2.1.1), karbon dioksitin bikarbonata dönüşümünü hızla katalize eden ve çinko içeren enzimdir. Bu reaksiyon, solunum, pH ve CO₂ homeostazı, çeşitli doku ve organlarda elektrolit sekresyonu, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, biyosentetik reaksiyonlar (glükoneogenez, lipid ve üre sentezi gibi) ve fotosentez gibi birçok temel fizyolojik ve patofizyolojik süreç için gereklidir. CA I ve CA II, eritrositlerde sitozolde yüksek konsantrasyonlarda bulunan iki ana CA izoenzimidir. Çeşitli enzimler üzerinde inhibisyon ve aktivasyon çalışmaları, enzim kataliz mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni ilaçların belirlenmesi açısından önemlidir. CA'ların inhibitörleri ve aktivatörleri birçok hastalıkta terapötik uygulamalarda kullanılmıştır. Örneğin, CA I ve CA II inhibitörleri, glokom ve epilepsi tedavisinde veya diüretik ilaçlar olarak kullanılır. Örneğin glokom tedavisinde asetazolamid ve brinzolamid, epilepsi tedavisinde topiramet, diüretik olarak asetazolamid ve methazolamid kullanılmaktadır [15].

Asetilkolinesteraz (AChE), nöromüsküler kavşaktaki sinaptik yarıktaki ve merkezi sinir sistemindeki (CNS) kolinerjik sinapslarda ACh'nin parçalanmasından sorumlu olan enzimdir. AChE ilk olarak ACh tarafından asetillenir ve bununla birlikte kolin salınır. Daha sonra bir su molekülü, asetik asit salınımıyla birlikte serbest enzimi yeniden

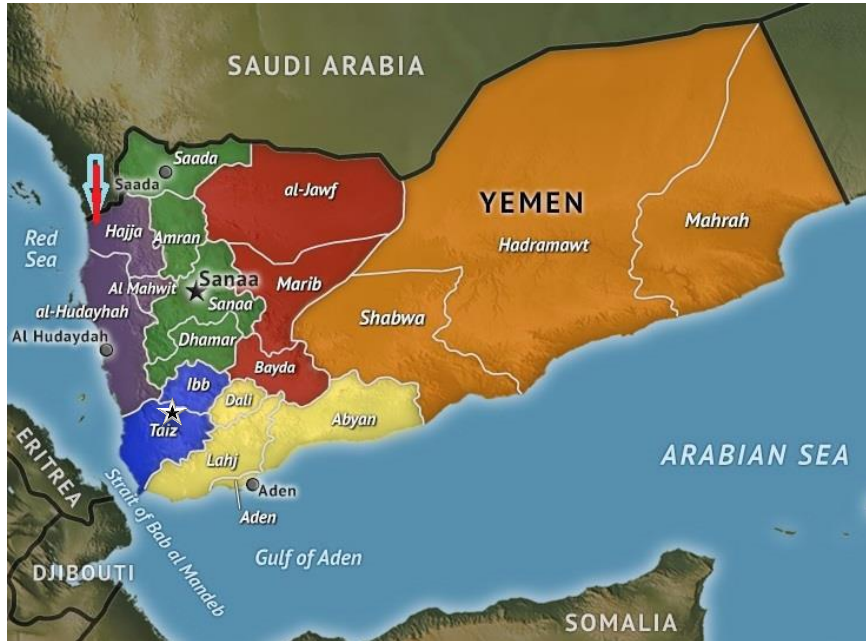
retilir. Sinir sistemindeki belirgin rolü nedeniyle AChE, sentetik organofosforlu (OP) sinir ajanları ve insektisitlerden ilk nesil anti-Alzheimer ilaçlarına kadar çeşitli güçlü doğal ve sentetik bileşiklerin hedefidir. İkincisi, kolinerjik hipotez açısından hastalıkla ilişkili bilişsel eksiklikleri iyileştirme potansiyeline sahip oldukları için geliştirilmiştir [16].



BÖLÜM 2

TIBBİ BİTKİLER

Yemen, Arap Yarımadası'nın güneybatısında yer alan küçük bir ülkedir (Şekil 2.1). Dağlar, çöl, geçit benzeri vadiler ve kıyı kayalıkları dahil olmak üzere çeşitli manzaralara sahip bir ülkedir. Yemen'in kıyı ovaları, doğu platosu ve çölleri, iklimsel faktörlerle birleştiğinde ona bitki örtüsü açısından zengin kılan çeşitli bir topografya verir. Anakara Yemen'deki yaşam alanlarının çeşitliliği ve Sokotra takımadalarının endemizmi, Yemen florasına büyük bir çeşitlilik sağlamaktadır. Şu anda Yemen'de yaklaşık 2.930 bitki türü bulunmaktadır. Bunların 699'u endemiktir. Yirminci yüzyılın ortalarında Batı tıp sisteminin tanıtılmasına rağmen, geleneksel bitkisel ilaçlar Yemen'in birçok yerinde hala önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, birçok Yemen geleneksel şifalı bitkisinin farmakolojik aktiviteleri araştırılmamıştır [17]. Bu çalışmada, Yemen'de yetişen ve geleneksel tıbbi kullanımları için kullanılan *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkileri seçilmiştir.



Şekil 2.1. Yemen haritası.

2.1. ADENİUM OBESUM

Adenium obesum, halk arasında çöl gülü olarak bilinen ve yerel olarak Adnah olarak adlandırılan, *Apocynaceae dogbane* familyasına ait etli bir kapalı tohumlu bitkidir [18]. Bitkinin *Nerium obesum* Forssk., *A. arabicum* Balf.f., *A. tricholepis* Chior gibi birçok eş anlamlısı ve bölgede kullanılan farklı lehçelere dayalı olarak Ombo gaduud, Obbe, Karya ve Locombol gibi birden fazla yöresel adı vardır [19]. *Adenium obesum*'un sistematik konumu Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *Adenium obesum* türünün sistematigi [8].

Krallık	Plantae
Alt Krallık	Tracheobionta
Süperbölüm	Spermatophyta
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Asteridae
Emir	Gentianales
Aile	Apocynaceae
Cins	<i>Adenium</i> Roem. & Schult.
Tür	<i>Adenium obesum</i> (Forssk.)

Apocynaceae dogbane ailesi, yaklaşık 5100 bitki, çalı, ağaç ve odunsu sarmaşık türü içerir. Tıbbi kullanımları nedeniyle en önemli bitki ailelerinden biri olarak kabul edilir. Bu familyaya ait bitkiler halk hekimliğinde sıtma, diyabet ve paraziter hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Bazı *Apocynaceae* bitkilerinin özleri ve saflaştırılmış bileşikleri, farklı türdeki kanser hücrelerine, virüslere, bakterilere ve tarım zararlılarına karşı biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu aileye ait bitkilerin kardiyak glikozitler, terpenler, flavonoidler ve karbonhidratlar içerdiği bildirilmiştir [9].

Bu familyadaki bitkiler kayalık ve kumlu topraklarda iyi yetişir. *Adenium* cinsine ait bitkiler, çoğunlukla kuru çalılık arazide veya ormanlık alanlarda ve 2100 m rakıma kadar ağaçlıklı otlaklarda bulunur. Günümüzde bu familyaya ait bazı türler biyolojik ve tıbbi önemlerinden dolayı Sahra Afrikası, Sudan, Kenya, Senegal ve Svaziland'da

ticari olarak yetiştirilmektedir. *A. obesum* da dahil olmak üzere bazı nadir türler yabancı bitki olarak Umman, Suudi Arabistan, Yemen ve Sokotra gibi Arap Yarımadası'nda mevcuttur [20]. Hindistan, Filipinler ve Tayland gibi onlarca yıldır nemli, tropik ülkelerde yetiştirilen popüler süs bitkilerinden biridir ve çeşitler arasında geniş çiçek rengi yelpazesi ve güzel heykelsi olması nedeniyle süs pazarında büyük önem taşır [8].



Şekil 2.2. *Adenium obesum*.

Bu çekici etli çalı veya küçük ağaç, yumrulu bir gövdeye, grimsi bir kabuğa ve çarpıcı pembe yıldız biçimli çiçeklere sahiptir (Şekil 2.2). Bitki aynı zamanda heykelsi bir görünümle iyi dallanmaya ve yüksek düzeyde çiçek rengi farklılaşmasıyla coşkulu çiçeklenmeye sahiptir [18]. Genel olarak, tüm bitki bir şemsiye şekline sahiptir. Bitki, dört metre yüksekliğe kadar büyüdüğü için küçük bir ağaç olarak kabul edilir. Bu bitkinin bazı türlerinin etli bir ana kökü ve çapı bir metreye ulaşan tabanında şişmiş bir gövdesi vardır. Kabuğu soluk grimsi yeşil, gri, kahverengi, pürüzsüz, yapışkan, şeffaf veya beyaz latekslidir. Normalde dalları etli, spiral dizilişlidir. Yapraklar dalların ucunda toplanır, pürüzsüz ve parlak yeşildir. Yapraklar yaklaşık 2–4,5 inç uzunluğunda ve 1–3 inç genişliğindedir. Bitki, özellikle serin bir ortamda, kışın yaprakların çoğunu kaybetme eğilimindedir. Bitkinin çiçekleri yıldız şeklindedir. Çiçek, kırmızı ve pembe renkli beş yapraktan oluşur, çiçeklerin kokusu yoktur. Çiçekler tüm yıl boyunca, özellikle tüm bitkinin çiçeklerle kaplı olduğu yaz aylarında açar. Çiçek özellikleri yağış, sıcaklık vb. çevre koşullarına bağlı olarak çeşitlilik gösterir [20, 21].

A. obesum, büyüme düzenleyicisi çok yavaş olduğu için uzun ömürlü bitki olarak adlandırılır. Bitki, kompakt bir büyüme alışkanlığına, sulu köklere ve kurak yerlerde hayatta kalabilmesi için su ve besin rezervlerini depolamak için gerekli bir organ görevi gören gösterişli koçanlara sahip kalın bir gövde yapısına sahiptir [22].

A. obesum, alkaloidler, steroidler, saponinler, glikozitler, toksik kardiyak glikozitler (cardenolides), antrakinonlar, tanenler, flavonoidler ve karbonhidrat gibi çeşitli kimyasal bileşikler içerir. Ayrıca antibakteriyel, antiviral, antikanserojenik, akarisidal, tripanosidal ve antioksidan aktiviteleri içeren geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptir [18, 19, 21].

Bitki, dünyanın birçok ülkesinde şifalı bitki olarak kullanıldığı için geleneksel tıpta önemlidir. Bu bitkinin farklı kısımları, Ortadoğu bölgesinde cilt hastalıkları, yaralar, kas ağrıları ve eklem ağrıları gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Köklerden ve kabuklardan elde edilen ham özler, çeşitli cilt hastalıklarını tedavi etmek ve bitleri yok etmede faydalı bir losyon hazırlamak için kullanılır. Kabuk ayrıca düşük yapıcı olarak kullanılırken, lateks çürük dişleri ve septik yaraları tedavi etmek için bir ilaç olarak kullanılır. Somali'de ise burun damlası olarak kullanımı mevcuttur. Nijeryalılar bitkinin tamamını antispazmodik, anti-tripanosomatid ve anti-leishmania ilacı olarak kullanmaktadır [20].

2.2. TAMARİX ARABİCA



Şekil 2.3. *Tamarix arabica*.

Tamarix arabica (T. arabica), Arap yöresinde yaygın olarak Tamarisk veya Athal olarak bilinen *Tamaricaceae* türüne aittir Çizelge 2.2.

Çizelge 2.2. *Tamarix arabica* türünün sistematigi [10].

Botanical name / Botanik adı	<i>Tamarix arabica</i> Bung.
Family / Aile	Tamaricaceae
Local name / Yerel adı	Ethl
Life form / Yaşam formu	Shumb / tree - Shumb / ağaç
Parts used / Kullanılan parçalar	Leaves / Yapraklar
Extract yield (%) / Ekstrakt verimi (%)	1,54
Collection code / Koleksiyon kodu	D E Q 10 S
Collection site / Toplama alanı	Hamad town / Hamad kasabası
Popular uses / Popüler kullanımlar	Astringent, antidiarrheic, diuretic / sıkılaştırıcı, antidiarrheik, idrar söktürücü
Habitat	Salt marshes / Tuz bataklıkları

Tamaricaceae, küçük çalı benzeri veya küçük ağaçlardan oluşan bir ailedir. Bu aile özellikle ılıman ve subtropikal bölgelerde yaygındır. *Tamaricaceae*'nin 4 cinsi ve yaklaşık 100 türü vardır. Genellikle kıyılarda, tuzlu bataklıklarda, kum tepelerinde, ayrıca nehir yataklarında, nehir kenarlarında ve çok tuzlu topraklarda yetişir [23].

Tamaricaceae familyasından “Tamariks” ve “tuzlu sedir” ortak adlarıyla bilinen *Tamarix* cinsi, dünyanın hemen her yerinde yetişen 60'tan fazla halofit bitki türünden oluşmaktadır. Bu bitkiler, tuz bezlerinden salgılanan, üzeri tuzla kaplı iğnemsî yapraklarla karakterize edilirler. *Tamarix* türleri, sıcak ve kuru iklimlerde büyümeleriyle tanınırlar; ancak ılıman iklimlerde de bulunurlar. *Tamarix* türleri, kum tepelerini düzeltmek için kuru iklimlerde yetiştirilmektedir; diğer türlerin büyümesini engelleyen istilacı bitkiler gibi davrandıkları için nemli iklimlerde büyümeleri istenmez [24, 25].

Bitki, dünyada "Asl", "Tarfā", "Gaz" ve "İlgın", meyveleri "Gazmāzaj" veya "Azbeh" olarak bilinmektedir. Bitkinin kuru bir yapıya sahip olduğu bilinmekte ve iç organlar üzerinde buruk ve temizleyici etkileri acı tadına atfedilmektedir. Sirke veya şarapla

birlikte alınan karaciğer ve dalak için bir tonik olarak kullanılır. *Tamarix* ağacından yapılmış bir kaptaki su içmenin dalak hastalığı olan hastalara fayda sağladığına inanılmaktadır. *Tamarix* hem deri hem de gastrointestinal ülserler için bir antiülser ajan olarak ve hemoroid ve gastrointestinal kanamalar gibi farklı kanama türleri için kaynatma veya infüzyon şeklinde bir antihemorajik olarak kullanılmıştır. Sallanan ve iltihaplı dişler için de faydalı olduğu düşünülmüştür [24].

Tamarix spp. geleneksel olarak gastrointestinal bozukluklar, yaralar, diyabet ve diş problemleri için kullanılır. Fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler bu bitkilerin temel fitokimyasallarını oluşturur. Klinik öncesi farmakolojik değerlendirmeler, *Tamarix spp.* için çeşitli biyolojik aktiviteler göstermiştir. Antidiyabetik, hepatoprotektif, yara iyileştirici ve antiinflamatuvar etkileri bilinmekle birlikte bu bitkilerin sağlık yararlarını destekleyecek hiçbir klinik kanıt henüz sunulmamıştır [24].

Tamarix spp.'nin potansiyel sağlık yararlarına rağmen, bitki modern tıpta henüz yeterince bilinmemektedir.

BÖLÜM 3

ANTIOKSİDANLAR

İnsan vücudunda üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) ateroskleroz, koroner kalp hastalıkları, yaşlanma ve kanser gibi birçok dejeneratif hastalıkla ilişkili oksidatif hasara neden olabileceğine dair çok sayıda kanıt vardır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve nitrik oksit radikali gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin lipidler, proteinler, enzimler, DNA ve RNA gibi biyolojik moleküllere saldırarak hücre veya doku hasarına yol açtığı iyi bilinmektedir [26].

Araştırmacılar reaktif oksijen türlerinin rolünü ve bunların inme, kardiyovasküler hastalık, astım, artrit, retinal hasar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, nörodejenerasyon, diyabet ve dermatit dahil olmak üzere yaşa bağlı birçok hastalık türüyle ilişkisini araştıran önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Günlük diyetten sağlanan gıdalardaki antioksidan bileşenler, reaktif oksijen türlerini söndürebilir, hücrelerdeki kendini savunma mekanizmaları için enzim sistemlerinin işlevsel performansına yardımcı olabilir ve böylece birçok insan hastalığı riskini azaltabilir [27].

Bir antioksidan, "oksitlenebilir substratla kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunduğu, o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde" olarak tanımlanabilir [28]. Gıda biliminde, oksitlenebilir bir substratla kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunduğu gıdalardaki bir madde, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi reaktif türlerin olumsuz etkilerini veya insandaki fizyolojik fonksiyonları önemli ölçüde azaltan veya önleyen bir madde olarak tanımlanmaktadır [29].

Antioksidanlar, gıda ürünlerinde oksidatif bozulmaya karşı ve vücutta oksidatif stres aracılı patolojik süreçlere karşı önemli bir koruyucu rol oynamaktadır. Doğal ve güçlü antioksidanlar, gıda koruyucuları ve nutrasötikler/ilaçlar için talep görmektedir. Doğal

olarak oluşan antioksidan kaynaklarının etkili bir şekilde araştırılması ve yeni antioksidan bileşiklerin tasarımı, güvenilir antioksidan aktivite değerlendirme yöntemleri gerektirir. Antioksidanların radikal yakalama kapasitesini, indirgeme gücünü ve diğer spesifik özelliklerini moleküler veya hücresel düzeyde ölçmek için bir dizi kimyasal analiz, gıda ve biyolojik model sistemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler, antioksidan mekanizma, substrat tipi, oksidasyon başlatıcı, sonuç ifadesi ve işlem kolaylığı açısından farklılık gösterir [30]. Antioksidanların etkinliğini ve bunların meyveler, sebzeler ve kan plazması veya diğer dokulardaki tahmin edilen biyolojik aktivitelerini belirlemek için birçok *in vitro* yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler, değerlendirilen antioksidanların etki mekanizmaları temelinde kategorize edilir. Hidrojen atomu transferi (HAT), tek elektron transferi (SET) ve hem HAT hem de SET mekanizmaları dahil olmak üzere üç farklı mekanizma söz konusudur [27]. Antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için farklı analitik yöntemler, spektrofotometrik, elektrokimyasal deneyler ve kromatografik olmak üzere üç ayrı kategoriye ayrılır [29].

Bu alışmada, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini (AC) değerlendirmek için 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal süpürme analizi, 2,2'- azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS•⁺) süpürme analizi, ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve kuprik iyon azaltıcı antioksidan kapasitesi (CUPRAC) gibi spektrofotometrik yöntemleri kullanılmıştır (izelge 3.1).

Çizelge 3.1. Antioksidan kapasitenin spektrofotometrik yöntemleri.

Antioksidan kapasite yöntemi	Yöntemin ilkesi
DPPH	Organik bir radikal ile antioksidan reaksiyon.
ABTS	Bir organik katyon radikali ile antioksidan reaksiyon.
FRAP	Bir Fe (III) kompleksi ile antioksidan reaksiyon.
CUPRAC	Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi ile antioksidan reaksiyon.

3.1. AC TESTİNİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERİ

3.1.1. DPPH Radikal Yakalama Yöntemi

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal yakalama yöntemi, bir bileşiğin, bir ekstraktın veya diğer biyolojik kaynakların antioksidan potansiyelini değerlendirmek için ilk yaklaşımı sunar. Bu en basit yöntemdir, burada prospektif bileşik veya ekstrakt DPPH solüsyonu ile karıştırılır ve belirli bir süre sonra absorbans kaydedilir [31]. DPPH, nitrojen köprüsünün bir atomunda eşleşmemiş değerlik elektronuna sahip kararlı bir serbest radikaldir. DPPH radikalının temizlenmesi, popüler DPPH antioksidan tahlilinin temelidir [32].

DPPH radikali, yüksek kararlılığı, deneysel uygulanabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle doğal olarak oluşan radikallere kıyasla antioksidanların radikal yakalama potansiyelini ölçmek için pratik/analitik kullanım için uygun bir reaktiftir [33]. DPPH alkol çözeltisi, 517 nm'de bir absorpsiyon zirvesi ile koyu mor renktedir; bu, reaktif sistemdeki radikal temizleyicinin varlığıyla ve DPPH'deki nitrojenin tek elektronu eşlendiğinde kaybolur. Radikal temizleyicinin reaktif hızı ve yeteneği, DPPH'nin yok olma hızına ve tepe değerine bağlıdır [34].

DPPH testi, biyoaktif moleküllerin hidrojen atomu transferi (HAT) veya tek elektron transferi (SET) yeteneğinin değerlendirilmesi için rutin olarak kullanılır ve uygulaması gıda, ilaç ve kozmetik alanları kapsar (34). Bu testi, DPPH radikal noktasının molekülden bir hidrojen (H) atomunu kabul etmesi prensibine dayanmaktadır, yani antioksidan, DPPH radikal noktasının DPPH₂'ye indirgenmesiyle sonuçlanır, mor renk sarıya döner ve buna eşlik eden 517 nm'de absorbans azalır. Renk değişimi spektrofotometrik olarak izlenir ve antioksidan özellikler için parametrelerin belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntem, Blois (1958) tarafından, H atomunun sistein molekülünden DPPH radikal noktası kabul etme yeteneğinin gösterilmesi ile ilk kez kavramsallaştırıldı [36]. Bu test, etanol, sulu aseton, metanol, sulu alkol ve benzen dahil olmak üzere birkaç farklı çözücü sisteminde buğday tanesi ve kepeği, sebzeler,

konjuge linoleik asitler, otlar, yenilebilir tohum yağları ve unların antioksidan özelliklerini araştırmak için başarıyla kullanılmıştır [31].

3.1.2. ABTS Radikal Yakalama Yöntemi

ABTS, oksidanlar tarafından yoğun renkli olan radikal katyonu $ABTS^{\bullet+}$ ye oksitlenir ve antioksidan kapasite, test bileşiklerinin doğrudan ABTS radikali ile reaksiyona girerek rengi azaltma yeteneği olarak ölçülür. $ABTS^{\bullet+}$, hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikler için geçerlidir. $ABTS^{\bullet+}$ radikalleri, DPPH radikallerinden daha reaktiftir ve DPPH radikali ile HAT içeren reaksiyonların aksine, $ABTS^{\bullet+}$ radikalleri ile reaksiyonlar hem HAT hem de SET'i içerir. ABTS radikal katyonunun üretilmesi, saf maddelerin, sulu karışımların ve içeceklerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmek için uygulanan spektrofotometrik yöntemlerden birinin temelini oluşturur. Tahlil için daha uygun bir format, varsayılan antioksidanlarla reaksiyondan önce radikalın doğrudan kararlı bir formda üretildiği bir renk giderme tekniğidir. $ABTS^{\bullet+}$, sulu ortamda (414, 734 ve 815 nm) ve etanolik ortamda (414, 730 ve 873) absorpsiyon maksimumlarına sahiptir [36].

Bu spektrofotometrik analiz, tarama ve rutin tespitler için teknik olarak basittir. Genel olarak $ABTS^{\bullet+}$, ABTS'nin $K_2S_2O_8$ ile oksidasyonu sonucu üretilmiştir. Bu tahlil, 734 nm'de absorpsiyon gösteren karakteristik bir uzun dalga boyu absorpsiyon spektrumuna sahip olan $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonunun absorbansının inhibisyonuna dayanmaktadır [37].

$ABTS^{\bullet+}$, gıda bileşenlerindeki antioksidanlarla hızlı bir şekilde, tipik olarak 30 dakika içinde reaksiyona girer. Geniş bir pH aralığında ve pH'ın antioksidan mekanizmalar üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılabilir. Ayrıca $ABTS^{\bullet+}$ hem sulu hem de organik çözücülerde çözünür ve iyonik kuvvetten etkilenmez. Bu nedenle, ekstraktların ve vücut sıvılarının hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasitelerini belirlemek için çoklu ortamlarda kullanılabilir [36].

3.1.3. FRAP Metodu (Demir İndirgeyici Antioksidan Gücü)

FRAP testi, bir test numunesindeki indirgeyici (elektron veren) antioksidanların birleşik (toplam) antioksidan aktivitesini ölçmek için nispeten basit, hızlı ve ucuz bir doğrudan yöntemdir. Test, reaksiyon olarak Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} iyonlarına indirgenmesini kullanır ve buna bir renk değişimi eşlik eder [38].

FRAP reaktifi orijinal olarak Benzie ve Strain tarafından, eklenen ferrik iyonu demir iyonuna indirgeme kabiliyeti ile kan plazmasının "antioksidan gücünü" ölçmek için tasarlandı. Bu ilk çalışmada Benzie ve Strain, plazmanın ferrik indirgeme yeteneğini belirtmek için FRAP kısaltmasını kullandılar. Benzie ve Strain daha sonra diğer biyolojik sıvıların toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için FRAP reaktifini kullandıktan sonra kısaltmanın anlamını ferrik indirgeme/antioksidan güç olarak değiştirdiler. Benzie ve Strain tarafından sunulan FRAP testinin üç versiyonu vardır. Versiyon 1, FRAP reaktifinin seyreltici olarak su eklendiği 37°C'de gerçekleştirilen otomatik bir testtir. Versiyon 2, seyreltici olarak su ilave edilmeden 37°C'de gerçekleştirilen manuel bir deneydir. Versiyon 3, seyreltici olarak su eklenmeden oda sıcaklığında gerçekleştirilen daha yavaş bir manuel testtir. Sürüm 1, analitik laboratuvarlarda yaygın olarak bulunmayan bir cihaz olan otomatik bir Cobas Fara santrifüj analizörü gerektirir. Çalışanların çoğu, FRAP testinin 2. versiyonunu veya su eklenmiş bir varyantını kullanmıştır [39].

3.1.4. CUPRAC Metodu (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi)

CUPRAC yöntemi, fenolik asitler, hidroksisinnamik asitler, flavonoidler, karotenoidler, antosiyaninler ve ayrıca tiyoller, sentetik antioksidanlar, C ve E vitaminleri dahil olmak üzere çok çeşitli polifenoller için yararlı olan basit ve çok yönlü bir antioksidan kapasite testidir. 2004 yılında Özyürek ve arkadaşları tarafından "kuprik iyon azaltıcı antioksidan kapasite" olarak adlandırılan ve kısaltılmışı CUPRAC yöntemidir [40].

Kromojenik redoks reaktifi kolayca erişilebilir, kararlı, seçicidir ve biyolojik olarak önemli her türlü antioksidana (örneğin, askorbik asit, bir tokoferol, β -karoten, indirgenmiş GSH, ürik asit ve bilirubin) ve her tür gıdaya yanıt verebilir. İlgili redoks reaksiyonu nispeten hızlıdır (çünkü bakır neokuproin bir dış küre elektron transfer maddesidir) ve elde edilen renk makul bir süre boyunca kararlıdır. CUPRAC testi için kullanılan kromojenik redoks reaktifi, bis (neokuproin) bakır (II) şelatıdır. Bu reaktif pH 7'de kullanışlıdır ve indirgeyici polifenollerle redoks reaksiyonu sonucu oluşan Cu(I)-şelatın absorbanı 450 nm'de ölçülür [41].



BÖLÜM 4

ENZİMLER VE ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

4.1. ENZİMLER

Enzimler büyük çoğunluğu protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Kendileri herhangi bir genel değişikliğe uğramadan canlı hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonların oranını artırırlar [42]. Vücuttaki tüm metabolik süreçleri hızlandırırlar ve belirli bir görevi yerine getirirler. Enzimler, reaksiyon oranlarını herhangi bir normal kimyasal reaksiyondan 100 milyon ila 10 milyar kat daha hızlı artırabilirler. Rekombinant teknoloji ve protein mühendisliğindeki gelişmeler nedeniyle enzimler, farklı endüstriyel ve terapötik amaçlarla yaygın olarak kullanılan önemli moleküller haline gelmiştir [43].

4.1.1. α -Amilaz

α -amilaz (EC 3.2.1.1, α -1,4-glukan-4 glukanohidrolaz) yüksek hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından salgılanır. Bir metaloenzimdir, yani görevini yerine getirebilmesi için gerekli olan bir kofaktör olarak kalsiyum metali kullanır. Sıcaklık ve diğer koşullar enzim aktivitesini oldukça etkiler. α -Amilaz optimum olarak pH 7,0'da etki eder. Substrata bağlanmasına yardımcı olan ve aktivitesini oldukça spesifik kılan üç boyutlu bir yapıya sahiptir. α -Amilazın substratı nişastadır. α -Amilaz, 512 amino asit (57,6 kDa moleküler ağırlık) içeren tek bir oligosakarit zincirinden oluşur [44].

α -Amilaz, maltoz, maltotrioz ve α -sınırlı dekstrinler üretmek için polisakkaritlerdeki dahili α -1,4 glikozidik bağlarının hidrolizini katalize eden bir endoenzimdir. Üstün özelliklerinden dolayı α -amilaz, polisakkaritlerin hidrolizi için mevcut amilazlar arasında en yaygın kullanılanıdır. Glikozit hidrolaz ailesi 13'ün endo-etkili α -amilazı

yaygın olarak kullanılan bir biyokatalizördür ve nişasta işleme, deterjan, tekstil, kâğıt ve ilaç endüstrileri gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalara sahiptir. Bunların dışında ilaç dağıtımı için polimerik malzeme, biyoremediasyon ajanı, biyodemülsifiye edici ve biyofilm inhibitörü gibi bazı yeni uygulamalara sahiptir. α -Amilaz aktivitesini değerlendirmek için farklı teknikler ve substratlar kullanan çeşitli yöntemler vardır; bunlar arasında spektroskopik yöntemler, kolaylık ve maliyet etkinliği nedeniyle yaygın olarak uygulanabilirlik bulmuştur. Reaksiyon prensibine bağlı olarak bu analizler dört gruba ayrılır: indirgeyici şeker, enzimatik, kromojenik ve amiloklastik yöntemler. Çok sayıda yöntemin varlığına rağmen, α -amilaz aktivitesini değerlendirmek için genel bir yöntem yoktur. Her yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları olduğu gösterilmiştir. Mevcut yöntemlerin daha doğru, güvenilir ve kolay hale getirilmesi için birçok iyileştirme yapılmıştır [45, 46].

4.1.2. α -Glukozidaz

Glukozidazlar, oligosakkaritlerdeki veya glikokonjugatlardaki glikozid bağların bölünmesini katalize eden enzimlerdir. Şeker molekülündeki hidroksil gruplarının sayısına, konumuna veya konfigürasyonuna bağlı olarak çeşitli glukozidazlar glikozidik bağların bölünmesine özeldir. Glukozidazların aktivitesi, (i) metabolik olarak emilebilen ve organizma tarafından kullanılabilen monosakkarit birimleri sağlamak üzere diyet polisakkaritlerinin parçalanması, (ii) lizozomal glikokonjugat katabolizması ve glikoprotein işlenmesi ve (iii) glikoproteinler veya glikolipitler içindeki oligosakkarit birimlerinin biyosentezi gibi çeşitli biyokimyasal işlemler için elzemdir [47].

α -Glukozidaz (EC 3.2.1.20) oligosakkaritlerin ve disakkaritlerin glikoza dönüştürülmesinde anahtar rol oynar ve üretilen monosakkaritler ince bağırsak tarafından emilerek kan şekeri seviyelerinde artışa neden olur. Bu nedenle α -glukozidaz, tip 2 diyabet (T2D)'nin önlenmesinde ve tedavisinde ana hedef enzim olarak kabul edilmiştir [48].

4.1.3. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (CA; karbonat hidro-liyaz, EC 4.2.1.1), karbondioksitin tersinir hidrasyonunu katalize eden çinko içeren bir enzimdir. Karbonik anhidraz bakterilerde, alt ve üst bitkilerde, omurgasızlarda ve omurgalılarda bulunan en yaygın enzimler arasındadır. Her yerde bulunan bu enzimin birincil fizyolojik fonksiyonunun, ayrıntıları hala belirsiz olmasına rağmen, CO₂'nin geri dönüşümlü hidrasyonunun katalizinde yattığı düşünülmektedir. Bu nedenle, mevcut mikro ortamına bağlı olarak, mevcut CO₂, H⁺, HCO₃⁻ ve H₂CO₃ konsantrasyonlarının ve dolayısıyla gaz değişimi, asit-baz dengesi, sekresyon, kireçlenme ve fotosentez gibi süreçlerin potansiyel bir düzenleyicisidir [49].

Enzim, glokom tedavisine yönelik asetazolamid, metazolamid ve diklorfenamid gibi ilaçların hedefidir. Alfa, beta ve gama olarak adlandırılan, evrimsel olarak ilgisiz üç CA ailesi vardır. Hayvanlar aleminde bilinen tüm CA'lar alfa tipindedir. Farklı doku dağılımlarına ve hücre içi konumlara sahip yedi memeli CA izozimi vardır. İnsan CA I ve II, sığır CA III ve fare CA V'nin kristal yapıları belirlenmiştir. Hepsi aynı üçüncül yapıya sahiptir ve baskın ikincil yapı elemanı olarak merkezi 10-şeritli beta-tabaka bulunur. Çinko iyonu koni şeklindeki bir boşlukta bulunur ve üç histidil kalıntısı ve bir çözücü molekülle koordine edilir [50].

4.1.4. Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (E, C, 3. 1.1, 7), özellikle kas ve sinir organları gibi uyarılabilir dokularda yaygın olarak dağılmış bir enzimdir ancak aynı zamanda eritrositler ve yılan zehirinde de bulunur. Enzimin postsinaptik bölgelerdeki işlevi uyarılabilir dokularda asetilkolinin hidrolitik inaktivasyonu yoluyla sinaptik iletimin sona ermesi olarak kabul edilir. Enzimin uyarılabilir dokuların sinir uçlarında ve eritrositteki fonksiyonel rolü henüz belirlenmemiştir. Geçtiğimiz dönemlerde asetilkolin eteraz (AChE)'nin, özellikle de moleküler boyutlarının anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedildi. Karakterizasyonu, alt yapıları ve immünolojik özellikleri ortaya konmuştur. Bu

ilerlemeler AChE enzimlerin çeşitli dokulardan afinite kromatografi tekniğinin uygulanmasıyla başarılı bir şekilde saflaştırılmasından kaynaklanmaktadır [51].

Asetilkolinesteraz (ACHE), asetilkolini (ACh) hidrolize ederek ve dolayısıyla etkisini sonlandırarak kolinerjik iletimde yerleşik bir rol oynar. Nöronal AChE, beynin çeşitli bölgelerinden salgılanabilirken, saflaştırılmış AChE, belirli membran iletkenliklerini etkileme, uyarıcı amino asit iletimini artırma ve peptidleri hidrolize etme yetenekleri de dahil olmak üzere, nöron fonksiyonunu etkileyebilen çeşitli özelliklere (kolinesteraz aktivitesine ek olarak) sahiptir. AChE kaybı ve bunun klasik olmayan etkileri, AChE içeren nöronların yaygın kaybının olduğu Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda beyin fonksiyonu üzerinde derin bir etkiye sahiptir [52].

4.2. ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

4.2.1. α -Amilaz İnhibitörleri

Enzim inhibitörlerinin bazıları, enzimin aktif merkezini çeşitli lokal bölgelerde doğrudan bloke ederek etki gösterir. Hayvanlarda alfa amilaz inhibitörleri, alfa amilazın nişastayı basit şekere dönüştürme hızını yavaşlatarak yemekten sonra oluşabilecek yüksek glikoz seviyelerini azaltır. Bu, düşük insülin seviyelerinin hücre dışı glikozun kandan hızlı bir şekilde temizlenmesini önlediği diyabetik kişilerde önemlidir. Bu nedenle şeker hastaları, glikoz seviyelerini kontrol altında tutabilmek için düşük alfa amilaz seviyelerine sahip olma eğilimindedir. Bitkiler ayrıca alfa amilaz inhibitörlerini böceklerden korunmak için bir savunma mekanizması olarak kullanır. Bu inhibitörler böceklerin bağırsaklarındaki alfa amilazların ve proteinazların sindirim etkisini değiştirir ve onların normal beslenme davranışlarını engeller. Bu nedenle alfa amilaz inhibitörlerinin kan şekeri seviyelerinin kontrol edilmesinde ve mahsulün korunmasında potansiyel rolleri vardır [53]. α -amilaz inhibitörleri, diyabetik hastalarda postprandiyal hiperglisemi (PPHG)'nin tedavisinde önemli bir rol oynar. Bu α -amilaz inhibitörleri, α -amilaz enziminin etkisini inhibe ederek nişasta hidrolizinde bir azalmaya yol açar; bu da diyabetik hastalarda glisemik indeks kontrolü üzerinde faydalı etkiler gösterir [54].

Amilaz inhibitör aktiviteleri birçok durumda, sabit miktarda α -amilazın belirli bir oranını inhibe edecek inhibitör miktarına dayalı olarak birimler halinde ifade edilmiştir. Ölçülen inhibisyon boyutunun, kullanılan inhibitör miktarıyla elde edilebilecek maksimum miktarı temsil edip etmediği veya bu inhibitör miktarıyla elde edilebilecek maksimumdan daha az olup olmadığı genellikle açıklığa kavuşturulmamıştır. İkinci durumda, inhibitör reaktivitesi, amilaz inhibitör etkileşiminin stokiyometrisini yansıtmak yerine, amilaz inhibisyonu hızı açısından ölçülmektedir [55]. α -amilaz inhibitörünün konsantrasyonlarını bulma prosedürü, çözünür nişasta üzerindeki enzim etkisi için bir inhibitörün varlığında/yokluğunda iyot boyama gücünden veya indirgeme ürünleri belirlenen bir alkalın reaktifin kullanılmasından kaynaklanan α -amilaz aktivitesinin derecesine bağlıdır [56].

4.2.2. Alfa Glukozidaz İnhibitörleri

Alfa-glukozidaz inhibitörleri veya bir ince bağırsak enzimi olan alfa-glukozidazın geri dönüşümlü inhibitörleri, tip 2 diyabet için bir tedavi seçeneğidir. Kompleks karbonhidrat emilimi geciktirdiği için yemek sonrası glukoz pikleri önlenir ve insülin seviyeleri düşer. Akarboz, miglitol, vogliboz ve emiglitat şu anda piyasada bulunan dört alfa-glukozidaz inhibitörüdür. Akarboz bunlardan en sık tavsiye edilenidir. Tedavi hedefleri tam olarak karşılamamakta veya diğer ilaçlara kontrendikasyonlar mevcuttur, bu nedenle çoğu ülkede sıklıkla diğer diyabet tedavileriyle birlikte kullanılmaktadır. İzole yüksek postprandiyal glukoz pikleri olan hastalar, özel etki yöntemleri nedeniyle alfa-glukozidaz inhibitörlerinden yararlanabilirler. Ayrıca alfa-glukozidaz inhibitörleri, makrovasküler hastalık için olası bir risk faktörü olan postprandiyal hiperinsülinemi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabilir. Hipertrigliseridemi üzerinde daha başka faydalı etkiler de gösterilmiştir. Alfa-glukozidaz inhibitörlerinin en yaygın yan etkileri şişkinlik, ishal ve mide ağrısıdır. Diğer hipoglisemik ilaçların aksine bu ilaçların herhangi bir olumsuz etkisi yoktur [57].

4.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

CA inhibitörleri klinik olarak diüretikler, anti-glokom ajanları ve anti-epileptikler olarak kullanılmaktadır, ancak yakın zamanda kanser, nöropatik ağrı, uyku apnesi, migren, kafa içi basıncının düşürülmesi ve serebral iskemi tedavisinde yeni uygulamalar rapor edilmiştir. CA aktivatörleri bilişsel bozukluk ve fobilerin tedavisinde faydalı olabilir [58].

Son yıllarda CA inhibitörlerinin (CAI'ler) topikal etkili antiglokom, antikonvülzanlar, antiobezite, ağrı girerici ve antitümör ajanları/tanı araçları gibi yeni uygulamaları ortaya çıktı. Bu CAI'ler, memelilerde bulunan 13 katalitik olarak aktif alfa-CA izoformunun çeşitli izozimlerini hedefler. Alfa, beta, gama, delta ve zeta familyalarına ait CA'lar filogenetik ağacın her yerindeki birçok organizmada bulunur ve bunların inhibisyonu sonuçta bazı patojenik protozoalar (*Plasmodium falciparum*), mantarlar (*Cryptococcus neoformans*) için incelenmiştir. Sülfonamid ve sülfamat CAI'lerine ek olarak kumarinler, fenoller ve fullerener gibi yeni ilginç kemotipler de inhibisyon mekanizmalarıyla birlikte yakın zamanda rapor edilmiştir. Bu enzim inhibitörleri sınıfı, ilginç farmakolojik ajanların tasarlanması ve protein-ilaç etkileşimlerinin moleküler düzeyde ayrıntılı olarak anlaşılması konusunda umut vaat etmektedir [59].

4.2.4. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

Kolinesteraz (ChE) inhibitörleri iki kategoriye ayrılabilir: asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri ve butilkolinesteraz (BChE) inhibitörleri. Bu nedenle AChE ve BChE aktivitelerinin seçici inhibisyonunun geliştirilmesi, ChE farmakokimya araştırmasının merkezi içeriğini oluşturur. Asetilkolinesteraz inhibitörleri, asetilkolin kaybını önledikleri ve hastalığın ilerlemesini yavaşlattıkları için Alzheimer hastalığının (AD) tedavisi için en umut verici terapötiklerdir. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından Alzheimer hastalığının tedavisi için onaylanan ilaçlar asetilkolinesteraz inhibitörleridir ancak yan etkilerle ilişkilidir [60].

AD tedavisi asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerinin (AChEI'ler) kullanımına dayanmaktadır. AChEI'ler, nöronal AChE enzimlerini inhibe ederek ve kolinerjik sinapslardaki ACh seviyelerini artırarak, kolinerjik kaybı kısmen önleyerek AD bilişsel semptomlarını iyileştirir. Hafif-orta dereceli AD'yi tedavi etmek ve hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek için halihazırda kullanılan ilaçlar, tamamı dönüşümlü AChE inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin ve galantamindir. AD tedavisi için onaylanan ilk AChE inhibitörü olan takrin kullanımı, hepatotoksisite de dahil olmak üzere yan etkilerin yüksek insidansı nedeniyle terk edilmiştir. Klinik yanıtta farklılıklar bildirilse de hastaların çoğunda genellikle iyi tolere edilirler [61].



BÖLÜM 5

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

5.1. MATERİYAL

5.1.1. Bitki Materyali

Araştırma için gerekli materyaller 2021 yılı temmuz ayında *Adenium obesum* bitkisi İbb ili Udayn dağından toplanmıştır ve *Tamarix arabica* bitkisi Sana'a ilinde bulunan aktardan kuru olarak alınmıştır. İbb Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Esmail AL-MOSANİF tarafından teşhis edilmiştir.

5.1.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Adenium obesum bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarından oluşan karışımlar kullanılmıştır. Bitkinin bu kısımlarını kurutmak için, küçük parçalara ayrılarak oda sıcaklığında gölgede kurutulmuştur (Şekil 5.1). Yalnızca *Tamarix arabica* bitkisi yaprakları aktardan kuru olarak alınmıştır. Ekstreleri hazırlamak için, her bir bitkiden 50 g tartılmış ve öğütücüde öğütülerek toz haline getirildi. *Adenium obesum* ve *Tamariix arabica* bitkilerden 5 g 4 ayrı erlen alınarak üzerine 50 mL çözücü eklenmiştir. Ekstreleri hazırlamak amacıyla çözücü olarak etanol, metanol, kloroform ve petrol eteri seçilmiştir (Çizelge 5.1). Maserasyon yöntemi ile elde edilen ekstratlar Whatman tipi süzgeç kâğıdından süzülerek çözücülerini rotary evaporatör ile uzaklaştırma işlemleri yapılmıştır. Hazırlanan ekstratlar kapaklı cam beherde oda sıcaklığında saklanmış ve daha sonra toplam antioksidan kapasitesi ve enzim inhibisyonlarının aktiviteleri belirlenmiştir.



Şekil 5.1. Kurutma sırasında *Adenium obesum* bitkisinin parçaları

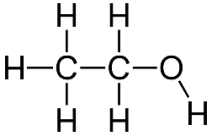
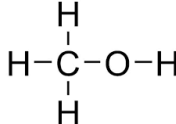
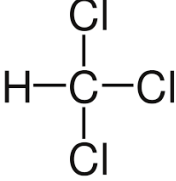
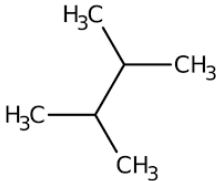
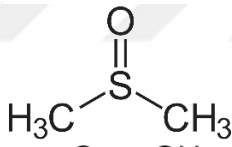
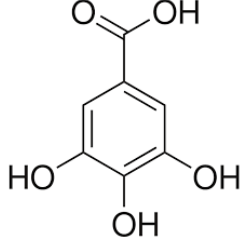
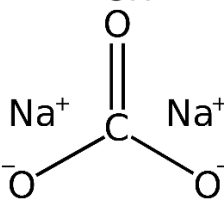
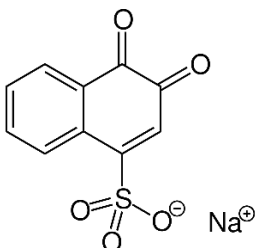
Çizelge 5.1. Bitki Ekstraktlarının kısaltılmış kodları.

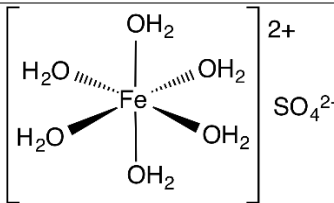
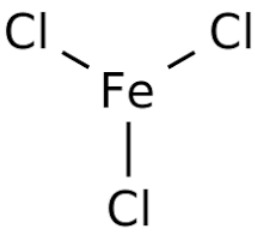
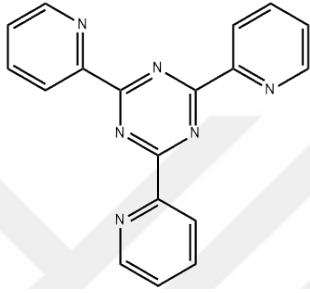
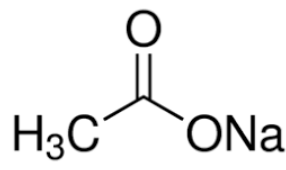
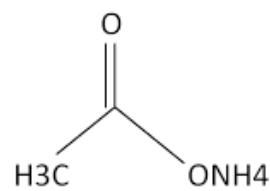
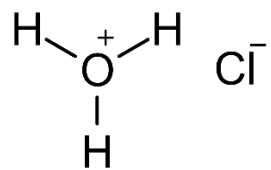
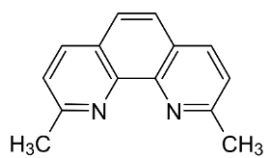
Bitki Ekstreleri	Kısaltmaları
<i>Adenium obesum</i> Etanol ekstreleri	AOE
<i>Adenium obesum</i> Metanol ekstreleri	AOM
<i>Adenium obesum</i> Kloroform ekstreleri	AOK
<i>Adenium obesum</i> Petroleteri ekstreleri	AOP
<i>Tamariix arabica</i> Etanol ekstreleri	TAE
<i>Tamariix arabica</i> Metanol ekstreleri	TAM
<i>Tamariix arabica</i> Kloroform ekstreleri	TAK
<i>Tamariix arabica</i> Petroleteri ekstreleri	TAP

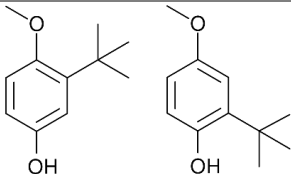
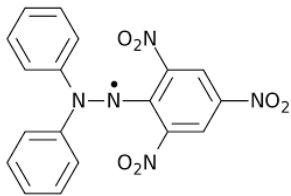
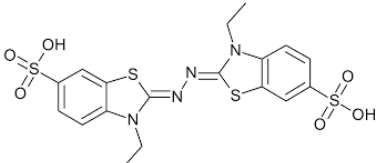
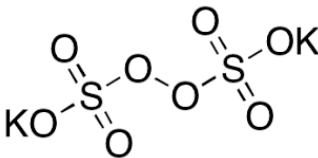
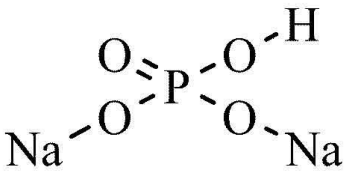
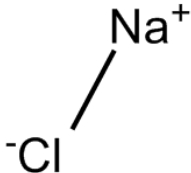
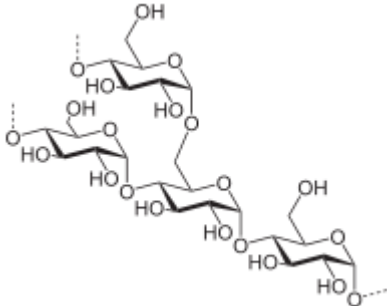
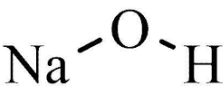
5.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

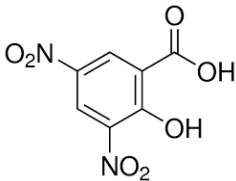
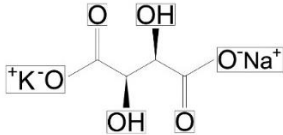
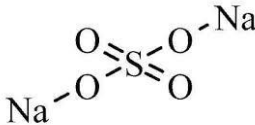
Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta ve ticari olarak temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan enzimler ise Sigma-Aldrich (USA)'dan satın alınmıştır. Kimyasallara ait formüller, molekül ağırlıkları ve temin edildikleri firmalar Çizelge 5.2 'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Kullanılan kimyasallara ait formüller ve moleköl ağırlıkları.

Kimyasal adı	Kimyasal yapısı	Formöl ve özellikleri	Temin edildikleri firmalar
Etanol		C_2H_5OH $M_A = 46.06844(232)$ g/mol	ISOLAB UN1170
Metanol		CH_3OH or CH_4O $M_A = 32.04$ g mol ⁻¹	Sigma- Aldrich UN1230
Kloroform		$CHCl_3$ $M_A = 119.37$ g·mol ⁻¹	ISOLAB UN1888
Petrol eteri		C_6H_6 $M_A = 82.20$ g/mol	ISOLAB UN1268
DMSO		C_2H_6OS $M_A = 78.13$ g·mol ⁻¹	Sigma Aldrich
Gallik asid		$C_7H_6O_5$ $M_A = 170.12$ g/mol	Sigma Aldrich G7384
Sodyum karbonat		Na_2CO_3 $M_A = 105.9888$ g/mol (anhydrous) 286.1416 g/mol (decahydrate)	Sigma Aldrich
Folin-Ciocalateu's phenol		C_6H_6O $M_A = 94.11124$	Merck 1.09001.010 0

Demir sülfat	(II)		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $M_A = 278,02 \text{ g/mol}$ (heptahidrat)	Sigma Aldrich
Demir klorür (Ferrik klorür)	(III)		FeCl_3 $M_A = 162,204 \text{ g/mol}$ (susuz) $270,295 \text{ g/mol}$ (heksahidrat)	Merck 157740
TPTZ			$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$ $M_A = 312.3 \text{ g/mol}$	Sigma Aldrich
(Na) acetate			$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ $M_A = 82.034 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Sigma Aldrich
Ammonium acetate			$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ $M_A = 77.083 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Sigma Aldrich
Hidrojen klorür (hidroklorik asit)			HCl $M_A = 36,46 \text{ gr/mol}$	Sigma Aldrich
Neocuproine			$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$ $M_A = 208.264 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Sigma Aldrich
Bakır klorür	(II)		CuCl_2 $M_A = 134.45 \text{ g/mol}$ (anhydrous) 170.48 g/mol (dihydrate)	Sigma Aldrich

Butylated hydroxyanisole (BHA)		$C_{11}H_{16}O_2$ $M_A = 180.247 \text{ g/mol}$	Sigma Aldrich
DPPH		$C_{18}H_{12}N_5O_6$ $M_A = 394.32 \text{ g/mol}$	Sigma Aldrich D9132
ABTS		$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ $M_A = 514.60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	Sigma Aldrich
Potasyum persülfat		$K_2S_2O_8$ $M_A = 270.322 \text{ g/mol}$	Sigma Aldrich
Disodyum fosfat		Na_2HPO_4 $M_A = 141.96 \text{ g/mol}$ (anhydrous) 177.99 g/mol (dihydrate) 268.07 g/mol (heptahydrate)	Sigma Aldrich
Sodyum klorür		$NaCl$ $M_A = 58.443 \text{ gr/mol}$	Sigma Aldrich
Nişasta		$C_6H_{10}O_5$ $M_A =$	Sigma Aldrich
Sodyum hidroksit		$NaOH$ $M_A = 39.9971 \text{ g/mol}$	Sigma Aldrich

3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS)		$(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_2-2-(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$ $M_A = 228.12$	Sigma Aldrich
Potasyum Sodyum Tartarat		$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ $M_A = 210.158 \text{ g/mol}$	Sigma Aldrich
Sodyum sülfat		Na_2SO_4 $M_A = 142.04 \text{ g/mol}$ (anhydrous) 322.20 g/mol (decahydrate)	Sigma Aldrich

5.1.4. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Adenium obesum ve *Tamarix arabica* bitkilerinin toz haline getirilmesi, ekstraksiyon işleminin yapılması, ekstraksiyon sonucu çözücülerin uçurulması, enzimle için kinetik çalışmalar ve antioksidan özelliklerin belirlenmesi basamaklarında kullanılan temel alet ve cihazlar Çizelge 5.3’ de belirtilmiştir.

Çizelge 5.3. Kullanılan temel alet ve cihazlar.

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

5.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

5.1.5.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini ile İlgili Çözeltiler

- 1- %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 0.20 g Na_2CO_3 tuzu erlen içerisinde 8 mL destile su ilave edilerek çözüldü ve toplam hacim destile suyla 10 mL olacak şekilde tamamlandı.
- 2- Galik asit çözeltisi (1mg/mL): 0.03 g galik asit alınıp 28 mL destile su ilave edilerek çözüldü. Toplam hacim destile su ile 30 mL'ye tamamlandı.
- 3- Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) satın alındığı şekilde kullanıldı.

5.1.5.2. FRAP İndirgeme Metodu ile İlgili Çözeltiler

- 1- 2 mM'lık $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,0068 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 12 mL destile suda çözüldü.
- 2- 20 mM'lık FeCl_3 çözeltisi: 0,054 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 10 mL destile suda çözüldü.
- 3- TPTZ çözeltisi: 0,015 g TPTZ alındı ve 5 mL HCl (40 mM) içerisinde çözüldü.
- 4- Asetat tamponu: 0,0945 g NaCH_3COO alındı ve 40 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 3,6'ya ayarlandı ve toplam hacim 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- 5- FRAP reaktifi: 10 hacim asetat tamponu, 1 hacim TPTZ ve 1 hacim 20 mM'lık $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi karıştırılarak elde edildi.

5.1.5.3. CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler

- 1- 1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponu (pH:6,5): 3,904 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 30 mL saf suda çözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 50 mL'ye destile su ile tamamlandı.
- 2- 7,5 mM'lık neokuprin çözeltisi: 0,0078 g Neokuprin alındı ve 5 mL etanolde çözüldü.
- 3- 10 mM'lık CuCl_2 çözeltisi: 0.0170 g CuCl_2 alındı ve 10 mL destile suda çözüldü.

- 4- Butylated hydroxyanisole çözeltisi: 0.014 g $C_{11}H_{16}O_2$ alındı ve 14 mL etanolde çözöldü.

5.1.5.4. DPPH Radikalini İndirgeme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler

- 1- 0.1mM'lık DPPH çözeltisi: 0,006 g DPPH alındı ve 25 mL etanolde çözöldü.

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

- 1- 0,1 M'lık fosfat tamponu (pH:7,4): 2,84 g Na_2HPO_4 alındı ve 180 mL destile suda çözöndü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.
- 2- 2 mM'lık ABTS^{•+} çözeltisi: 75 mg ABTS, 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözöünönceye kadar bir gece boyunca karıştırdı. Toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
- 3- 2,45 mM'lık potasyum persöülfat çözeltisi: 50 mg $K_2O_8S_2$ 0,1M'lık ve pH'sı 7,4 olan 40 mL fosfat tamponunda tamamen çözöünönceye kadar manyetik karıştırdıcı ile karıştırdı. Toplam hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

5.1.5.6. α -Amilaz Enziminin Aktivite Öölümünde Kullanılan Çözeltiler

- 1- 0,1 M Fosfat tamponu: pH' sı 7,0 olan 0,1 M' lık NaH_2PO_4 ve 6,7 mM' lık NaCl çözeltisi hazırlamak için 0,474 g NaH_2PO_4 ile 0,0195 g NaCl tartılarak, 100 ml' ye saf su ile tamamlandı.
- 2- %1 lik Nişasta çözeltisi: 0,1 g buğday nişastası alındı ve 0,1 M Fosfat tamponu kullanılarak toplam hacim 10 mL'ye tamamlanıp manyetik karıştırdıcı çözöünmesi sağlandı.
- 3- 2 M' lık NaOH çözeltisi: 2 g NaOH alındı ve 25 ml destile suda çözöldü.
- 4- 96 mM' lık 3,5- dinitrosalisilik asit çözeltisi: 0,547 g 3,5- dinitrosalisilik asit alındı ve 25 ml 2 M' lık NaOH çözeltisinde çözöldü.
- 5- Sodyum potasyum tartarat çözeltisi: 15 g $KNaC_4H_4O_6$ alındı 25 ml' ye saf su ile tamamlandı.

- 6- α -Amilaz enzim çözeltisi: 5 mg enzim alındı ve 10 mL destile suda çözüldü.

5.1.5.7. α -Glukozidaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

- 1- 0,1 M Fosfat tamponu: pH' sı 7,0 olan 0,1 M' lık NaH_2PO_4 ve 6,7 mM' lık NaCl çözeltisi hazırlamak için 0,474 g NaH_2PO_4 ile 0,0195 g NaCl tartıldı, 100 ml' ye saf su ile tamamlandı.
- 2- 5 mM'lık 4- β -D-glucopyranoside substrat çözeltisi: 0,0088 g ilgili substrattan tartılıp 0,1M'lık 25 mL fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

5.1.5.8. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

- 1- 0,05 M Tris- SO_4 pH:7.4 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 6.055 gram Tris 950 mL distile su ile çözülmüş ve 1 N H_2SO_4 ile çözelti pH'sı 7.4'e ayarlamıştır. Distile su ile çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.
- 2- 3 mM Substrat Çözeltisinin Hazırlanması: 27.2 mg p-nitrofenil asetat 1 mL aseton ile çözülerek hızlı bir şekilde karıştırılan 49 mL distile suya yavaş yavaş eklenerek hazırlanmıştır.

5.1.5.9. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

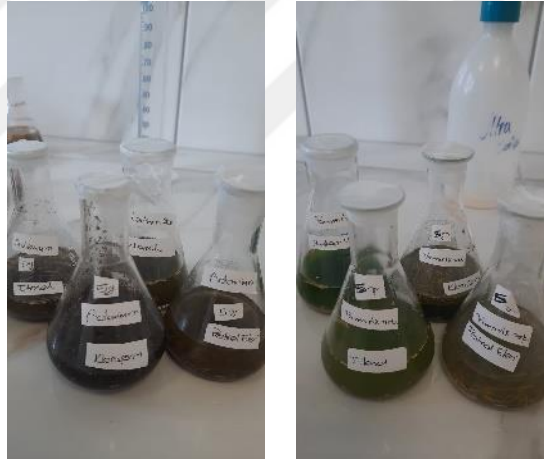
1. Tris-HCl Tamponu (0.1 M'lık, pH 8): 0.607 g Tris ile 0,0740 g EDTA tartılıp 50 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8.0'a getirilerek sonra hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Tampon 4 °C'de muhafaza edildi ve her 2-3 günde bir yenilendi.
2. Asetiltiyokolin İyodat Çözeltisinin Hazırlanması (15 mM'lık): Alüminyum folyo ile kaplanmış behere 0,0148 g Asetiltiyokolin iyodat alındı ve 5 mL distile suda çözüldü ve her gün taze olarak hazırlandı.
3. DTNB Çözeltisinin Hazırlanması (3 mM'lık): Alüminyum folyo ile kaplanmış behere 0.0001 g DTNB ile 0,0059 g sodyum sitrat tartıldı ve 5 mL destile suda çözülerek hazırlandı. Bu çözelti her gün taze olarak hazırlandı.

4. Asetilkolinesteraz Enzim Çözeltisinin Hazırlanması: Hazır olarak alınan enzimden 0.28 mg 1:1 oranında 0.28 ml tamponda çözülüp seyreltilmiştir. 0.5 mL'lik hacimler halinde ependorf tüplerine alındı ve -20 °C'de muhafaza edildi.

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1. Bitkilerin Ekstraksiyon Aşaması

Kurutulup öğütülmüş ve ekstre edilmeye hazır olan bitkileri 5 gram tartılıp 50 mL etanol, metanol, kloroform ve petroleteri ile muamele edildi (1/10 oranında) (Şekil 5.2). Hazırlanan ekstratlar kapaklı cam beherde oda sıcaklığında saklandı ve daha sonra maserasyon yöntemi ile işlem gerçekleştirildi.



Şekil 5.2. Kullanılan çözücülerde bitkilerin ekstratları.

24 saatlik bekleme sonrasında ekstratlar Whatman tipi süzgeç kâğıdından süzüldü ve bu işlemi beş gün tekrar edildi. Beşinci gün sonunda darası alınmış balonlar içerisine alınıp Rotary Evaporatör'de düşük basınçta (-1 atm) ve düşük sıcaklık (40 °C) altında çözücüler uzaklaştırıldı (Şekil 5.3). Tüm çözücülerin uzaklaştığına emin olduğunda madde miktarları tartıldı. Ekstarktlar belirli renkte, katı madde olarak elde edildi (Çizelge 5.4) ve oda sıcaklığında ağzı kapatılarak saklandı. Solventler, kuru toz elde etmek üzere uzaklaştırıldıktan sonra bu ekstraktlar DMSO içerisinde çözündürüldü ve *in vitro* analizler için kullanıldı.



Şekil 5.3. Ekstrelerin Rotary Evaporatörde Yoğunlaştırılması

Çizelge 5.4. Bitki ekstralarının elde edilen madde miktarı.

Bitki Ekstreleri	Hali
AOE	Açık yeşil
AOM	Yeşil
AOK	Açık yeşil
AOP	Sarı
TAE	Koyu yeşil
TAM	Koyu yeşil
TAK	Koyu yeşil
TAP	Yeşil

5.2.2. Folin Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini

Bitki ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Bu çalışmada, fenolik bileşik olarak gallik asit standart kullanıldı. Stok çözelti hazırlamak için 30 mg gallik asit, 30 mL saf su içinde çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiden kalibrasyon grafiği elde etmek üzere toplam hacim 1 ml olacak şekilde seyreltilerek 5 farklı konsantrasyon (20 – 40 – 60 – 80 – 100 μ l) hazırlanmış ve kullanılmıştır. Yönteme göre Analiz aşamaları; her bir numune/standart çözeltisine sırasıyla; 0,5 mL saf su ve 100 μ L 0,2 N Folin-Ciocaltaeu reaktifi eklenmiştir. Karışım vortekslenip, oda

sıcaklığında 3 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, 300 µL (%2'lik) Na₂CO₃ eklenerek tekrar vortekslenip, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her bir numune (60, 100 ve 200 µL'lik) ve standart konsantrasyonu için üç farklı konsantrasyonda paralel çalışma yapılmıştır. Ayrıca her bir numune ve standart konsantrasyonu için birer numune/standart körü yapılmıştır [numune/standart + Folin-Ciocalteu reaktifi çözücüsü (saf su)]. İnkübasyon süresi sonunda, spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Hesaplamalarda üç paralelin absorbans değerleri alınmış ve kör değerinden çıkarılmıştır. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit eşdeğer miktarı standart grafikten elde edilen aşağıdaki denklem yardımıyla bulunmuştur ve gallik asit eşdeğer (GAE) olarak mikrogram cinsinden verilmiştir.

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 760 \text{ nm})} = 0,0084 \times [\text{GAE } (\mu\text{g})]$$

Toplam fenolik madde miktarı, µg gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden ifade edilmektedir.

5.2.3. Toplam Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemleri

Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi belirlemek amacıyla; Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (FRAP) yöntemi, Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi, DPPH• radikal süpürme kapasitesi yöntemi ve ABTS^{•+} radikali giderme kapasitesi yöntemi kullanılmıştır.

5.2.3.1. FRAP İndirgeme Kapasitesi Yöntemi

Bu yöntemde standart (FeSO₄) saf su ile seyreltilerek 5 farklı konsantrasyonu (80-72-48-32-16 µM) hazırlandı. Her bitki ekstratlarından (0.1 – 0.25 – 0.5 – 1 mg) alındı. Stok çözeltiler, 300 mM asetat tampon çözeltisi (pH 3.6), 10 µM TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazin) çözeltisi ve 20 µM FeCl₃.6H₂O (demir (III) klorür heksahidrat) çözeltisi idi. Asetat tampon solüsyonunun hazırlanması için 800 µL asetik asit (CH₃COOH) içerisine 0.0945 g sodyum asetat (NaCH₃COO) ilave edildi ve ardından su ile 40 mL'ye seyreltilerek 300 µM asetat tamponu hazırlandı. 10 µM TPTZ

çözeltilisinin hazırlanması için 0.015 g TPTZ, 5 mL HCl içinde çözüldü. 20 µM FeCl₃.6H₂O solüsyonun hazırlanması için, 0.054g FeCl₃.6H₂O 10 mL suda çözündürüldü. 25 mL asetat tamponu, 2.5 mL TPTZ solüsyonu ve 2.5 mL FeCl₃.6H₂O solüsyonu karıştırılarak taze çalışma solüsyonu (FRAP solüsyonu) hazırlandı.

Yönteme göre Analiz aşamaları; örneklerden 20 µl alınarak, 250 µl FRAP çözeltisi (sodyum asetat tamponu, TPTZ ve Demir (III) Klorür (FeCl₃); 10:1:1) mikrolaka kuyucukları içerisine aktararak karıştırıldı. Sarı-turuncu renk, yoğun mavi renge dönüştü. Kör olarak su kullanıldı. Elde edilen karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süre sonunda spektrofotometrede absorbanslar kontrole karşı 593 nm dalga boyunda okundu. Hesaplamalarda absorbans değerleri alınarak kör değerinden çıkarılmış. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen FeSO₄ standart çözeltileri kullanılarak elde edilen standart eğri yardımıyla örneklerin FRAP değerleri “µmol Fe²⁺ eşdeğeri / mg örnek” olarak hesaplanmıştır.

5.2.3.2. CUPRAC İndirgeme Kapasitesi Yöntemi

CUPRAC testinde fenolik ve standart bileşiklerin Cu²⁺ iyonu indirgeme kapasitelerinin belirlenmesinde Özyürek ve arkadaşlarının belirttiği yöntem kullanılmıştır [40]. Bu yöntemde standartlar (GA, BHA ve Trolox) saf su ile seyreltilerek 3 farklı konsantrasyonu (2.5 – 5 – 10 µL) hazırlandı. Her bitki ekstraktlarından (0.1 – 0.25 – 0.5 – 1 mg) alındı. Stok çözeltiler, su içinde hazırlanan 10 mM CuCl₂.2H₂O çözeltisi, metanol içinde hazırlanan 7.5 mM neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat (NH₄CH₃CO₂) tamponu (pH=6.5) idi. Çözeltiler hazırlandıktan sonra 1 mL CuCl₂.2H₂O çözeltisi, 1 mL neokuproin çözeltisi ve 1 mL amonyum asetat tampon çözeltisi karıştırılarak taze çalışma solüsyonu (CUPRAC solüsyonu) hazırlandı.

Yönteme göre Analiz aşamaları; örneklerden 10 µl alınarak, 250 µl CUPRAC çözeltisi (CuCl₂.2H₂O çözeltisi, neokuproin çözeltisi, amonyum asetat tamponu (CH₃COONH₄); 1:1:1) mikrolaka kuyucukları içerisine aktararak karıştırılmış. Bakır (II) iyonunun indirgenmesinden kaynaklanan sarı renk gözlemlendi. Kontrol olarak 10 µL su eklendi. Kör olarak su kullanıldı. CUPRAC çözeltisi kör numune hariç tüm karışıma ilave edilerek çalkalama işlemine tabi tutuldu. Elde edilen karışım 30 dakika karanlıkta ve oda

sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede absorbanslar kontrole karşı 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Hesaplamalarda absorbans değerleri alınarak kör değerinden çıkarılmış. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen (GA, BHA ve Trolox) standart çözeltileri (2,5 – 5 – 10 µL) kullanılarak elde edilen değerler ile örneklerden elde edilen değerler karşılaştırıldı.

5.2.3.3. DPPH• Radikalini Süpürücü Etki Tayin Yöntemi

Bu yöntemde DPPH çözeltisi taze olarak hazırlandı. İlk olarak 0,006 g DPPH alındı ve saf etanolde çözüldü. Daha sonra saf etanol kullanılarak 25 mL'ye tamamlandı ve alüminyum folyo ile kapatılarak karıştırıcıda 6 saat karıştırıldı. Standart ve örnek için (0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08 mg/mL) konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktlarından ve 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µL hacminde standart trolox çözeltisinden alındı.

Yönteme göre analiz aşamaları; örneklerden 20 µl alınarak, 250 µl DPPH çözeltisi mikropłaka kuyucukları içerisine aktararak karıştırıldı. Antioksidan bileşikler tarafından mor radikalrengin soluk sarı hidrazine indirgenmesi gözlemlendi. Kontrol olarak 20 µL saf etanol eklendi. Kör olarak 270 µL saf etanol kullanıldı. DPPH çözeltisi kör numune hariç tüm karışıma ilave edilerek vortekslendi. Elde edilen karışım 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Her bir bitki ekstraktı için ekstrakt konsantrasyonlarının absorbans değerleri ölçülmüştür. 0.004 - 0.08 mg/mL konsantrasyon aralığında absorbasyonu %50'nin altına düşürenler için IC50 değerleri hesaplandı ve diğer ekstraktlar için çalışılan en yüksek konsantrasyondaki aşağıdaki formül yardımıyla % DPPH gidermesini değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH Giderme} = (\text{Abs}_{\text{örnek}} / \text{Abs}_{\text{kontrol}}) \times 100$$

5.2.3.4. ABTS^{•+} Radikali Giderme Aktivitesi Yöntemi

Bu yöntemde standart (Troloks) etanol ile seyreltilerek 6 farklı konsantrasyonu (1-2-3-4-5-6 µL) hazırlandı. Her bitki ekstratlarından (0.05 – 0.1 – 0.25 – 0.5 - 1 mg) alındı. ABTS çözeltisi taze olarak hazırlandı. 75 mg ABTS alındı ve saf suda çözöldü. Daha sonra saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı ve alüminyum folyo ile kapatılarak karıştırıcıda 2 saat karıştırıldı. 50 mg potasyum persölfat (K₂S₂O₈) 10 mL saf suda çözöldü. Radikalizasyon (ABTS^{•+} oluşumu) elde etmek için ABTS ve potasyum persölfat çözeltileri karıştırıldı (1:1 v/v) ve 6 saat karanlıkta tutuldu.

Yönteme göre Analiz aşamaları; örneklerden 20 µl alınarak, 230 µL ABTS çözeltisi mikropkaka kuyucukları içerisine aktararak karıştırıldı. ABTS^{•+} radikali indirgenmekte koyu yeşil-mavi renk renksiz dönüşümü gözlemlendi. Kontrol olarak 20 µL saf etanol eklendi. Kör olarak 250 µL saf etanol kullanıldı. ABTS çözeltisi kör numune hariç tüm karışıma ilave edilerek vortekslendi. Elde edilen karışım 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda absorbans değeri belirlenmiştir. Ayrıca troloks standart konsuntrasyonleri de hazırlanmış ve bunun da absorbansları belirlenerek aşağıdaki formöl yardımıyla ABTS'in % inhibisyonu hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{numune}} / \text{Abs}_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Numunelerin absorbans değeriğine karşılık gelen Trolox standart çözeltileri (0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 µg) kullanılarak elde edilen standart eğri yardımıyla örneklerin antioksidan kapasitesi µg Trolox eşdeğeri / mg ekstre olarak hesaplanmıştır.

5.2.4. Ekstraktların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

5.2.4.1. α-Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

α-Amilaz aktivitesi üzerine ekstraktların etkisinin belirlenmesi için, her bitki ekstrelerinden (0.005 – 0.01 – 0.025 – 0.05 – 0.1 - 0.25 – 0.5 - 1 mg içecek şekilde)

alınmıştır. Substrat çözeltisi olarak fosfat tamponunda hazırlanmış nişasta kullanılmıştır. Çizelge 5.5’da verilen miktarlarda, α -amilaz çözeltisi ve nişasta mikropkaya kuyucukları içerisinde 35 °C ’de 10 dakika inkübe edildi. Her ekstreye 3,5-dinitro salisilik asit (DNS) renk reaktifi eklenip karıştırılmış, daha sonra tüpler 85 °C’de 10 dk ısıtılmıştır. Süre sonunda ekstreler soğutulmuştur. Benzer şekilde enzim içermeyen kör çözeltisi hazırlanmıştır. Örnek ve kör absorbanları 546 nm’de okunmuştur. Her bir bitki ekstrekte için ekstrakt konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiğe geçirilmiş ve her bir bitki ekstreklerine ait AC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Bu deney, bitki ekstrelerinin α -amilaz üzerindeki aktivasyon etkilerini belirlemek ve bu aktivasyonun farklı konsantrasyonlarda nasıl değiştiğini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Çizelge 5.5. α -Amilaz aktivite ölçümünde çözeltilerin katılma miktarı ve sırası.

Kullanılan çözeltiler	Kör küveti (µL)	Kontrol küveti (µL)	Numune küveti (µL)
Nişasta	50	50	50
Enzim	-	50	50
35 °C ’de 10 dakika inkübe edildi.			
Ekstrakt	-	-	30
Dinitrosalisilik asit	100	100	100
85 °C’de 10 dk ısıtılmıştır.			
Saf su	100	50	20
Toplam hacim	250	250	250

5.2.4.2. α -Glukozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine ekstraktların etkisini belirlemek için her bitki ekstresinden (0.005 – 0.01 – 0.025 – 0.05 – 0.1 - 0.25 – 0.5 - 1 mg içerecek şekilde) alınmıştır. Substrat çözeltisi olarak PNPG (4-Nitrofenil β -D-glukuronid) kullanılmıştır. Çizelge 5.6’da verilen miktarlarda, 96 kuyucuklu mikropkaya içinde bitki ekstraktları (50 µL) üzerine fosfat tamponunda çözünen α -glukozidaz çözeltisi (30 µL) eklendi. Daha sonra üzerine 40 µL PNPG (4-Nitrofenil β -D-glukuronid) çözeltisi eklendi. Benzer şekilde enzim içermeyen kör çözeltisi hazırlanmıştır. α -Glukozidaz aktivitesi 405 nm’de spektrofotometrik olarak belirlendi. Absorban değeri 1 dakikada bir okundu ve 3 dakika sonunda birinci dakikadaki değer ile üçüncü dakikada okunan değer

arasındaki fark alındı. Yapılan bu deney 3 kez tekrarlandı. Her bir bitki ekstraktı için ekstrakt konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiğe geçirilmiş ve her bir bitki ekstresinin 0.001 - 0.2 mg/mL konsantrasyon aralığında %50 α -glukozidaz enzim inhibisyonunu hesaplanmıştır.

Çizelge 5.6. α - Glukozidaz aktivite ölçümünde çözeltilerin katılma miktarı ve sırası.

Kullanılan çözeltiler	Kör küveti (μ L)	Kontrol küveti (μ L)	Numune küveti (μ L)
Ekstrakt	-	-	50
Fosfat tamponu	100	100	100
Enzim	-	30	30
Substrat (PNPG)	40	40	40
Saf su	110	80	30
Toplam hacim	250	250	250

5.2.4.3. CA Aktivitesinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz izoenzimleri aktivite tayini esteraz aktivitesi üzerinden yapılmıştır. Çizelge 5.7’de verilen miktarlarda, 96 kuyucuklu mikrolaka içinde 125 μ L Tris-SO₄ (pH:7.4, 0.5 M), 75 μ L p-nitrofenil asetat çözeltisi, 30 μ L saf su eklenmiştir. Numune küvetine 125 μ L Tris-SO₄ (pH:7.4, 0.5 M), 75 μ L p-nitrofenil asetat çözeltisi, 20 μ L hCA enzimi, 30 μ L ekstrakt çözeltisi değişen konsantrasyonlarda eklenmiştir. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her bir dakikada 25 °C’de 348 nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri yapıldı ve 3 dakika sonundaki absorbans değeri belirlenerek farkı alındı. Her bir bitki ekstrekti için ekstrakt konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiğe geçirilmiş ve her bir bitki ekstresinin 0.0006 - 0.12 mg/mL konsantrasyon aralığında %50 hCA I – II enzim inhibisyonunu hesaplanmıştır. Bu deneyin sonuçları, bitki ekstrelerinin karbonik anhidraz izoenzimlerine karşı inhibitör aktivitesini belirlemek için kullanılmış ve inhibisyon oranları çeşitli konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir.

Çizelge 5.7. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesinde kullanılan maddeler

Kullanılan çözeltiler	Kör küveti (µL)	Kontrol küveti (µL)	Numune küveti (µL)
Tris-SO₄ tamponu	125	125	125
p-nitrofenil asetat	75	75	75
Saf su	50	30	-
hCA enzimi	-	20	20
Ekstrakt	-	-	30
Toplam hacim	250	250	250

5.2.4.4. AChE İnhibisyonun Belirlenmesi

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite tayini Ellman yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemde, substrat olarak kullanılan asetiltiyokolin iyodürün, asetilkolinesteraz enzimi ile hidrolizi sonucu açığa çıkan tiyokolinin, İnhibisyon çalışmalarında Kullanılan DTNB (5,5- ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) ile rengi sarı olan organik 5-tiyo-2 nitrobenzoata dönüşmektedir.

Çizelge 5.8’da verilen miktarlarda, 96 kuyucuklu mikrolaka içinde 125 µL DTNB, 25 µL AChI, 50 µL tampon ve 25 µL inhibitör çözeltileri ilave edildikten sonra üzerine 25 µL enzim çözeltisi ilave edildi. Örnek ve kontrol çözeltileri 37 °C sıcaklığa ayarlanmış Elisa mikrolate okuyucuda 2 dakika boyunca inkübe edildi ve 405 nm’de köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) tampon çözeltisi kullanıldı. Absorbans değeri 1 dakikada bir okunmuş ve 3 dakika sonunda ölçüm sona erdirilmiştir. Farklar alındıktan sonra absorbanslar ortalama değeri alınmıştır ve % aktivite aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Aktivite} = [(\Delta A_{405} \text{ kontrol} - \Delta A_{405} \text{ örnek}) / \Delta A_{405} \text{ kontrol}] \times 100$$

Bu denklemde belirtilen; ΔA_{405} kontrol: Kontrol çözeltisinin 405 nm’de okunan absorbans değerini, ΔA_{405} örnek: Örnek çözeltisinin 405 nm’de okunan absorbans değerini ifade etmektedir.

Her bir bitki ekstrekta için ekstrakt konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiğe geçirilmiş her bir bitki ekstresinin 0.0004 - 0.08 mg/mL konsantrasyon aralığında %50 AChE enzim inhibisyonunu hesaplanmıştır. Bu deney, bitki ekstraktlarının asetilkolinesteraz üzerindeki inhibitör aktivitesini belirlemek ve inhibitör etkilerini farklı konsantrasyonlarda değerlendirmek için yapılmıştır.

Çizelge 5.8. AChE Enzimi Aktivite Tayini İçin Kullanılan Reaktifler.

Kullanılan maddeler	Kör küveti (µL)	Kontrol küveti (µL)	Numune küveti (µL)
DTNB	125	125	125
ATChI	25	25	25
Tris HCl tampon	50	50	50
AChE enzimi	-	25	25
Ekstrakt	-	-	20
Saf su	50	25	5
Toplam hacim	250	250	250

5.2.5. Fenolik İçeriğin LC-MS/MS ile Belirlenmesi

LC-MS/MS için bitki ekstraktının hazırlanması

Metanol ekstraktından elde edilen kuru *Tamarix arabica* ekstraktına ferulik asit D3 (20 mg/L), rutin D3 (1 mg/L) ve quercetin D3 (5 mg/L) eklenmiş ve elde edilen karışım metanol kullanılarak belirli bir konsantrasyona (örneğin 1000 mg/L) seyreltilmiştir. Hazırlanan ekstrakt, LC-MS/MS analizi için kullanılmak üzere önceden 0.2 µm'lik bir şırınga filtresinden geçirilmiştir.

Standart çözeltilerin hazırlanması

Analitik yöntemi geliştirmek için 53 doğal fenolik bileşiğin ve 3 izotop etiketli fenolik bileşiğin (dahili standartlar olarak kullanılan) orijinal standartları kullanıldı. 54 standart bileşiğin (içerisinde 3 izotop etiketli dahili standart da bulunan) 1000 mg/L ana stok çözeltileri, metanol içinde çözülerek hazırlanmıştır. İstisnai olarak epikateşin ve epigallokateşin standartlarının ana stok çözeltileri 500 mg/L konsantrasyonda hazırlandı. Ayrıca prosesi kolaylaştırmak amacıyla 53 fenolik standardın orta stok

çözeltileri hazırlandı. Ferulik asit D3, rutin D3 ve quercetin D3, flavonoid olmayan bileşiklerin, flavonoid glikozitlerin ve flavonoid aglikonların miktarının belirlenmesi için sırasıyla izotop etiketli dahili standartlar olarak kullanıldı. Kalibrasyon eğrisini çizmek için 53 fenolik standart ve 3 IS'nin karışımını içeren sekiz kalibrasyon seviyesi hazırlandı. Ferulik asit D3 (20 mg/L), rutin D3 (1 mg/L) ve kersetin D3 (5 mg/L) her kalibrasyon seviyesine eklendi ve her bitki numunesi analiz edildi.

Kütle spektrometresi ve kromatograf koşulları

53 fitokimyasalın niceliksel değerlendirmesini gerçekleştirmek için bir tandem kütle spektrometresi ile birleştirilmiş bir Shimadzu-Nexera modeli ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) kullanıldı. Ters fazlı UHPLC, bir otomatik örnekleyici (SIL-30AC modeli), bir sütun fırını (CTO-10ASvp modeli), ikili pompalar (LC-30AD modeli) ve bir gaz giderici (DGU-20A3R modeli) ile donatılmıştır. 53 fitokimyasalın optimum ayrıştırılmasını sağlamak ve baskılama etkilerinin üstesinden gelmek amacıyla kromatografik koşullar optimize edildi. Agilent Poroshell 120 EC-C18 modeli (150 mm×2,1 mm, 2,7 µm) ve RP-C18 Inertsil ODS-4 (100 mm×2,1 mm, 2µm) gibi farklı kolonlar, asetonitril gibi farklı mobil fazlar (B) ve metanol, amonyum format, formik asit, amonyum asetat ve asetik asit gibi farklı mobil faz katkı maddeleri, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C gibi farklı kolon sıcaklıkları denenmiş ve optimum koşullar elde edilene kadar uygulanmıştır. Sonuç olarak kromatografik ayırma, ters fazlı Agilent Poroshell 120 EC-C18 model (150 mm×2,1 mm, 2,7 µm) analitik kolon üzerinde gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlandı. Elüsyon gradyanı, elüent A (su + 5 mM amonyum format + %0,1 formik asit) ve elüent B'den (metanol + 5 mM amonyum format + %0,1 formik asit) oluşuyordu. Aşağıdaki gradyan elüsyon profili kullanıldı: %20-100 B (0-25 dakika), %100 B (25-35 dakika), %20 B (35-45 dakika). Ayrıca solvent akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 0,5 mL/dak ve 5 µL olarak belirlendi.

Kütle spektrometrik tespiti hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modlarında çalışan bir elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı ile donatılmış bir Shimadzu LCMS-8040 model tandem kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi. LC-ESI-MS/MS

verileri LabSolutions yazılımı (Shimadzu) tarafından elde edildi ve işlendi. Fitokimyasalların miktarının belirlenmesi için MRM (çoklu reaksiyon izleme) modu kullanıldı. MRM yöntemi, belirtilen öncü fitokimyasaldan parçaya iyon geçişlerinin taranmasına dayalı olarak fitokimyasal bileşikleri seçici olarak tespit etmek ve ölçmek için optimize edilmiştir. Çarpışma enerjileri (CE), optimum fitokimyasal parçalanmayı ve istenen ürün iyonlarının maksimum iletimini oluşturmak için optimize edildi. MS çalışma koşulları şu şekilde uygulandı: kurutma gazı (N₂) akışı, 15 L/dak; nebulizasyon gazı (N₂) akışı, 3 L/dak; DL sıcaklığı, 250°C; ısı bloğu sıcaklığı, 400°C ve arayüz sıcaklığı, 350°C.

LC-MS/MS için yöntem doğrulama çalışmaları

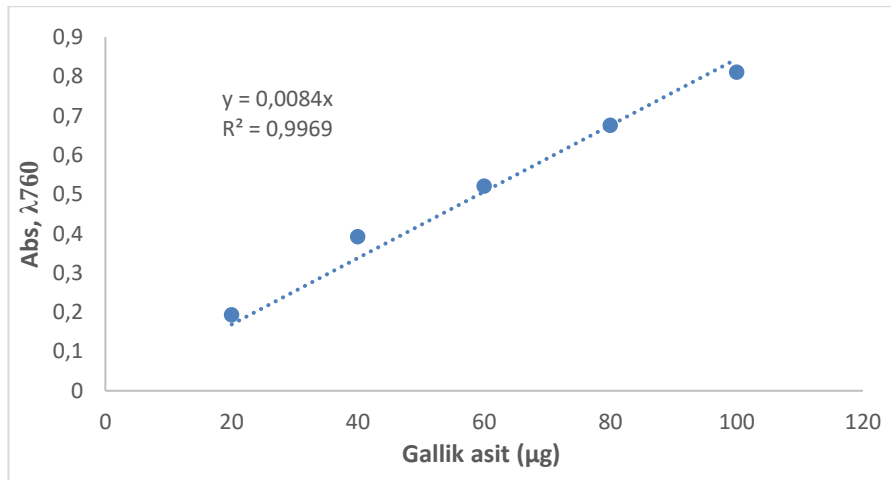
Bu çalışmada, 53 parmak izi fitokimyasalını (14 flavonoid aglikon, 1 biflavonoid, 13 flavonoid glikozit, 20 fenolik asit, 3 fenolik aldehit, Bitki türlerinde 1 stilbenoid glikozit ve 1 benzopiron). Geliştirilen analitik yöntemin performans özelliklerini belirlemek için dış ve iç standart çözeltilerden, güçlendirilmiş ve güçlendirilmemiş numunelerden yararlanılmıştır. Ayrıca numune hazırlama ve analizler sırasında matriks etkilerini ve analit kayıplarını telafi ederek sonuçların güvenilirliğini arttırmak amacıyla flavonoidler, flavonoid glikozitler ve flavonoidler için döteryumlanmış iç standartlar olarak quercetin D₃, rutin D₃ ve ferulik asit D₃ kullanıldı. Bu bağlamda analitik yöntem validasyon süreci, günler arası ve gün içi kesinlik (tekrarlanabilirlik), doğruluk (geri kazanım), doğrusallık, tespit ve nicelik sınırları (LOD/LOQ) ve bağıl standart belirsizlik (U) açısından gerçekleştirildi. Bu parametreler genellikle bir analitik yöntemin güvenilirliğini ve doğruluğunu değerlendirmek için kullanılır. Yılmaz 2020 de yaptığı çalışmada, bu doğrulama çalışmalarının sonuçlarına ilişkin detaylı bilgileri bildirilmiştir [67].

BÖLÜM 6

DENEYSEL SONUÇLAR

6.1. TOTAL FENOLİK BİLEŞİK MİKTARI TAYİNİ SONUÇLARI

Adenium obesum ve *Tamarix arabica* bitkilerinden hazırlanan ekstraktlarını toplam fenolik bileşik miktarını araştırmak için standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Öncelikle, gallik asidin farklı konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmış ve bunların absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümler kullanılarak bir standart grafik oluşturulmuştur. Standart grafik üzerinden, gallik asit konsantrasyonu ile absorbans değerleri arasında bir matematiksel ilişki bulunmuş ve bir formül elde edilmiştir. Ekstrapolasyon işlemi ile bitki ekstraktlarındaki toplam fenolik bileşik miktarı, gallik asit ekvivalenti (GAE) olarak hesaplanmıştır. Standart grafik oluşturulurken kullanılan verilere dayanarak hesaplanan bir r^2 değeri verilmiştir (r^2 : 0,9969). Bu değer, standart grafikteki veriler arasındaki uyumu gösterir. Hazırlanan standart grafik Şekil 6.1’de verilmiştir. Bu yöntem, bitki ekstraktlarının içerdikleri toplam fenolik bileşik miktarını gallik asit ekvivalanları üzerinden ölçmeye yönelik bir standardizasyon sağlar.



Şekil 6.1. Gallik asit standart eğrisi.

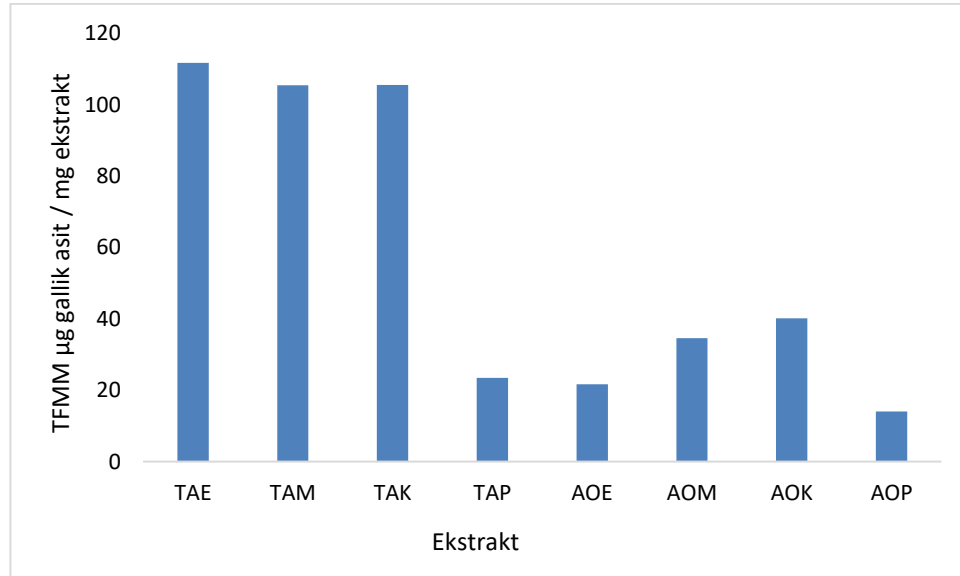
Toplam fenolik madde tayini yönteminde standart olarak kullanılan gallik asitin farklı konsantrasyonlarına karşı 760 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinden hazırlanan ekstraktlarını 1 mg’da bulunan toplam fenolik madde miktarı (TFMM) Çizelge 6.1’de verilmiştir.

Çizelge 6.1. Toplam fenolik madde miktarı (TFMM).

Ekstrakt türü	TFMM* (µg gallik asit / mg ekstrakt)
TAE	111.706349 ± 15.13279
TAM	105.357143 ± 16.07143
TAK	105.489418 ± 23.41298
TAP	23.4126984 ± 0.687322
AOE	21.6269841 ± 2.812985
AOM	34.5238095 ± 3.600703
AOK	40.0793651 ± 7.856742
AOP	13.9880952 ± 2.678576

* Ortalama ± SD

Bu değerler, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitki ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini göstermektedir (Şekil 6.2).



Şekil 6.2. Toplam fenolik madde miktarı (TFMM).

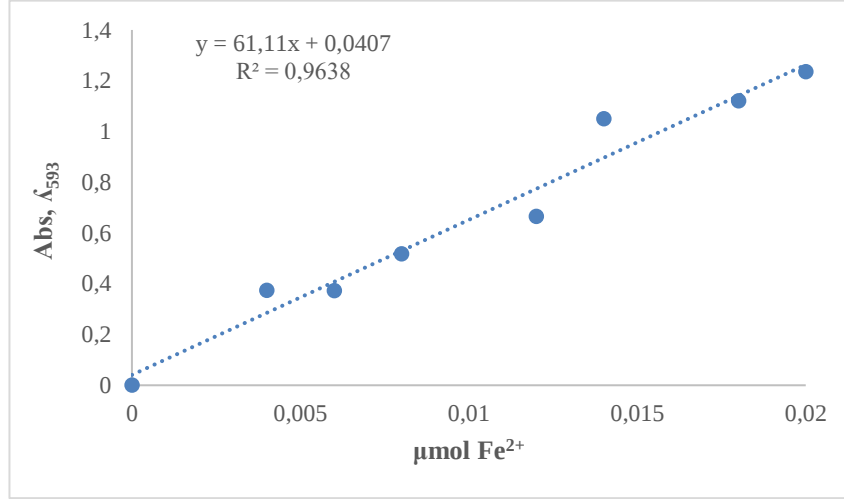
Ekstrelerin absorbans değerleri ve kalibrasyon denklemleri kullanılarak ekstraktlerdeki toplam fenol miktarları μg galik asit eşdeğeri (GAE)/mg ekstre cinsinden hesaplandıktan sonra en yüksek toplam fenolik madde miktarını TAE ($111.706349 \pm 15.13279 \mu\text{g GAE/ mg ekstre}$) ve TAK ($105.489418 \pm 23.41298 \mu\text{g GAE/ mg ekstre}$) ekstraktlerinde ölçülürken; en düşük değerlere AOP ($13.9880952 \pm 2.678576 \mu\text{g GAE/ mg ekstre}$) ve AOE ($21.6269841 \pm 2.812985 \mu\text{g GAE/ mg ekstre}$) ekstraktlerinde rastlanmıştır.

6.2. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN TAYİN SONUÇLARI

Adenium obesum ve *Tamarix arabica* bitkilerinden hazırlanan ekstraktlar antioksidan kapasiteleri analiz edilmiőtır. Analizi yapılan bitki ekstraktlar AOE, AOM, AOK, AOP, TAE, TAM, TAK ve TAP 8 farklı konsantrasyondan oluşmaktadır. Standart olarak da GA, Troloks ve BHA bileşikleri kullanılmıştır. Antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde aşağıdaki 4 farklı yöntem kullanılmıştır.

6.2.1. Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Sonuçları

FRAP analizi, antioksidan kapasiteyi ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, Fe (III) 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine (TPTZ) kompleksi, antioksidanlar varlığında renkli Fe (II) őelatinde indirgenmesi esasına dayanmakta ve sadece ferrik iyonları indirgeyebilen maddeleri ölçmektedir. Çalışmada kullanılan FRAP reaktifi taze hazırlanmıştır. FRAP zeltisi, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 2,4,6-tripiryridyl-Striazine (TPTZ), $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ FeCl₃ zeltisi ve $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ sodyum asetat tamponundan (pH 3.6) oluşur. Uygun oranda seyreltilmiş 20 μL ekstraktlar, 250 μL FRAP zeltisi ile karıştırılmış Karışım 10 dakika boyunca bekletildi. Bu süre içinde antioksidanlar, Fe (III) kompleksini Fe (II) kompleksine indirgeyerek renk değişimine neden olur. 10 dakika sonra 593 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Bu, Fe (II) kompleksinin renk deęiőimini belirlemek için kullanılır. Analiz için Fe²⁺ zeltisinin değişen konsantrasyonları kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi izilmiőtır (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. Fe^{2+} Standart Eğrisi.

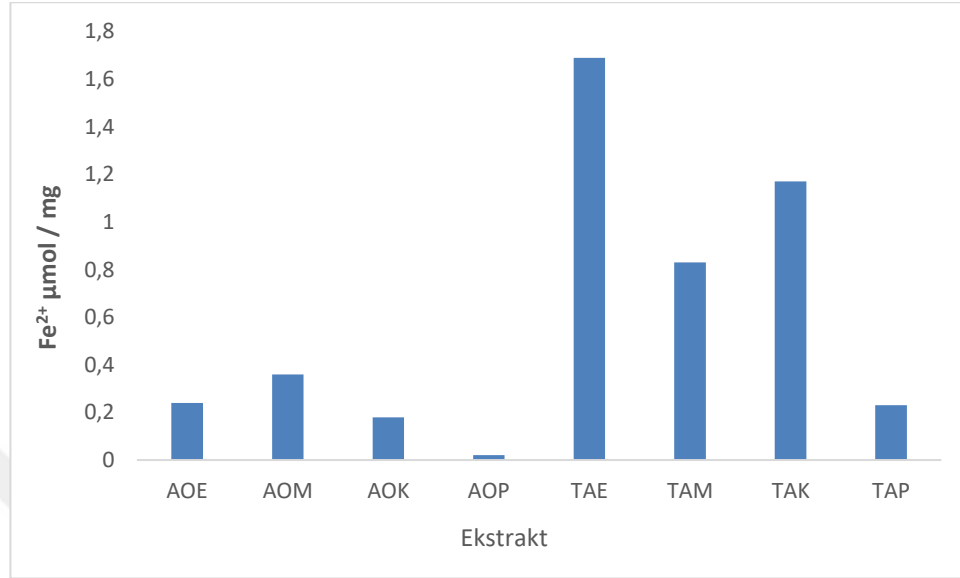
Bu eğri, absorbans değerleri ile Fe^{2+} konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi gösterir. Ölçülen absorbans değerleri, çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak antioksidan kapasiteyi ifade eden bir birimde ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eşdeğeri) dönüştürülür. Bu grafikten elde edilen formülden yararlanarak numunenin antioksidan kapasitesi Fe^{2+} eşdeğeri cinsinden hesaplanır. Elde edilen sonuç standart ile numuneyi karşılaştırma imkânı sunmaktadır.

Sonuçlar (numunelerin FRAP değerleri) aynı şartlarda test edilmiş standart Fe^{2+} eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edilmiştir ve “ $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eşdeğeri / mg örnek” olarak hesaplanmıştır (Çizelge 6.2).

Çizelge 6.2. Ekstraktlerin FRAP değerleri.

Ekstrakt	$\mu\text{mol Fe}^{2+}$ / mg ekstrakt
AOE	0.24
AOM	0.36
AOK	0.18
AOP	0.021
TAE	1.69
TAM	0.83
TAK	1.17
TAP	0.23

FRAP yönteminde absorbans değerleri ne kadar yüksekse antioksidan kapasite o kadar yüksektir (Şekil 6.4).



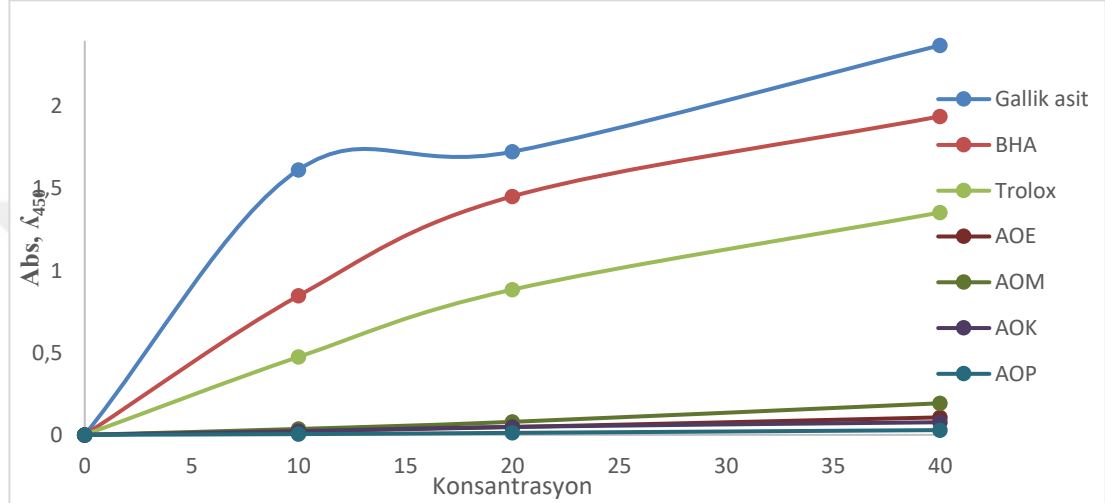
Şekil 6.4. Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Sonuçları.

Ekstrelerin absorbans değerleri ve kalibrasyon denklemi kullanılarak ekstrelerdeki antioksidan kapasitesi $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eşdeğeri / mg ekstre cinsinden hesaplandıktan sonra en yüksek antioksidan kapasite TAE (1 mg ekstrakt 1,69 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) ve TAK (1 mg ekstrakt 1,17 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) ekstrelerinde ölçülürken; en düşük değerlere AOP (1 mg ekstrakt 0,021 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) ve AOK (1 mg ekstrakt 0,18 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) ekstrelerinde rastlanmıştır.

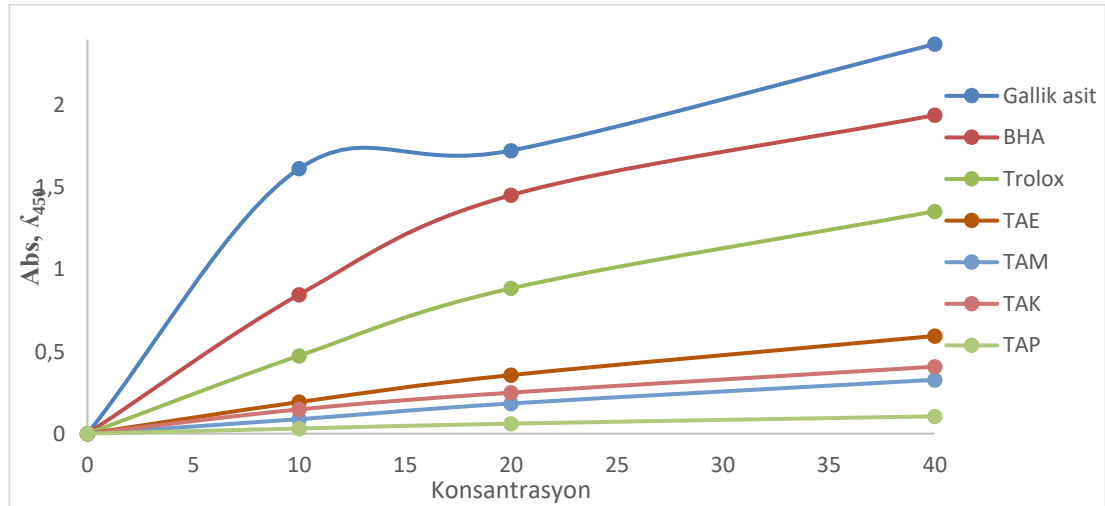
6.2.2. Cu^{2+} İyonu İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) Sonuçları

CUPRAC analizi, antioksidan bileşiklerin Cu^{2+} iyonlarını Cu^+ iyonlarına indirgeyerek belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu metot antioksidan bileşiklerin Cu^{2+} iyonlarının Cu^+ 'ya indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Neokuprin'in Cu (II) ile oluşturduğu sarı renkteki Cu (II)-neokuproin kompleksinin 450 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Bu bakır(I)-neokuproin şelatından oluşan sarı rengin şiddetine göre indirgeme kapasitesi belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan CUPRAC reaktifi taze hazırlanmıştır. CUPRAC çözeltisi, 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 1 mL neokuproin çözeltisi ve 1 mL amonyum asetat tamponundan (pH 6.5) oluşur. Uygun oranda seyreltilmiş ekstraktlar, 250 μL

CUPRAC çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bu süre içinde antioksidanlar, Cu^{2+} iyonlarını Cu^+ iyonlarına indirgeyerek renk değişimine neden olur. 30 dakika sonra 450 nm dalga boyunda absorbans değeri okundu. Ekstrelerin ve standartlara ait (GA, BHA ve Trolox) Cu^{2+} - Cu^+ eğrileri, konsantrasyon (10-20-40 $\mu\text{g/mL}$) ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbanslar kullanılarak çizilmiştir (Şekil 6.5 ve 6.6)



Şekil 6.5. AO ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).

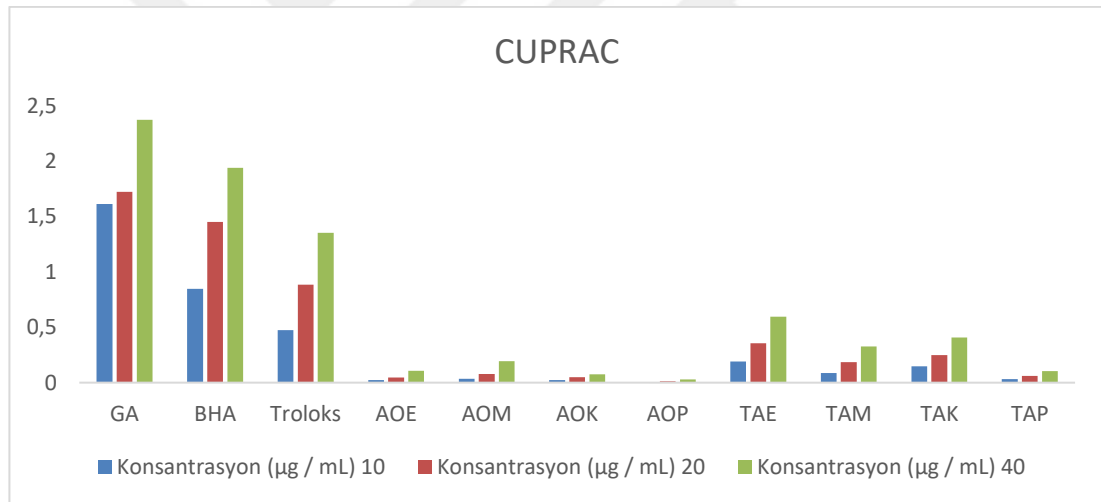


Şekil 6.6. TA ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).

Çizelge 6.3. AO ve TA ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC)*.

Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC)	Konsantrasyon ($\mu\text{g} / \text{mL}$)		
	10 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	20 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	40 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
GA	1.6142	1.7243	2.3722
BHA	0.8469	1.4525	1.9397
Troloks	0.4748	0.8846	1.3541
AOE	0.0229	0.0474	0.1064
AOM	0.0359	0.0791	0.1925
AOK	0.0229	0.0487	0.0767
AOP	0.0045	0.0121	0.0289
TAE	0.1923	0.3565	0.5947
TAM	0.0882	0.1837	0.3278
TAK	0.1477	0.2497	0.4079
TAP	0.0311	0.061	0.1053

Bu eğri, konsantrasyonlar ile absorbans değerleri arasındaki ilişkiyi gösterir. Bitki ekstraktleri için CUPRAC değerleri Çizelge 6.3'te verilmiştir.

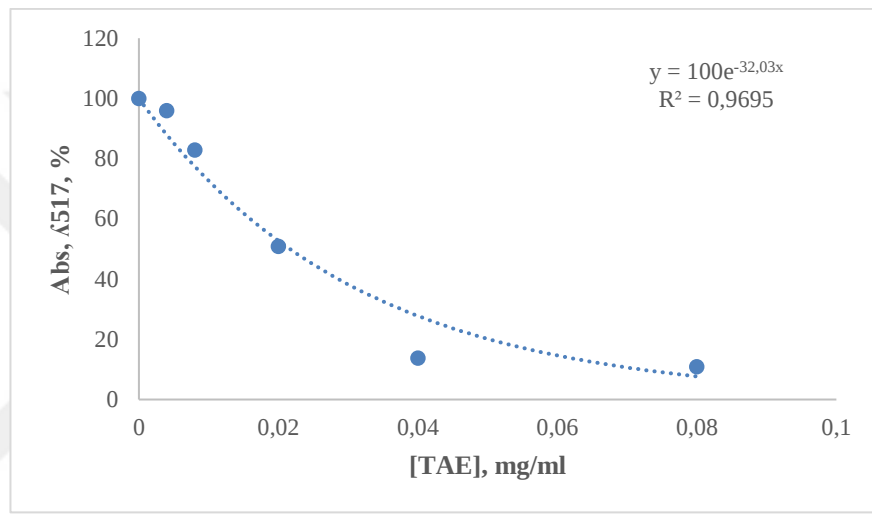


Şekil 6.7. AO ve TA ekstraktleri, GA, Troloks ve BHA'nın bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri (CUPRAC).

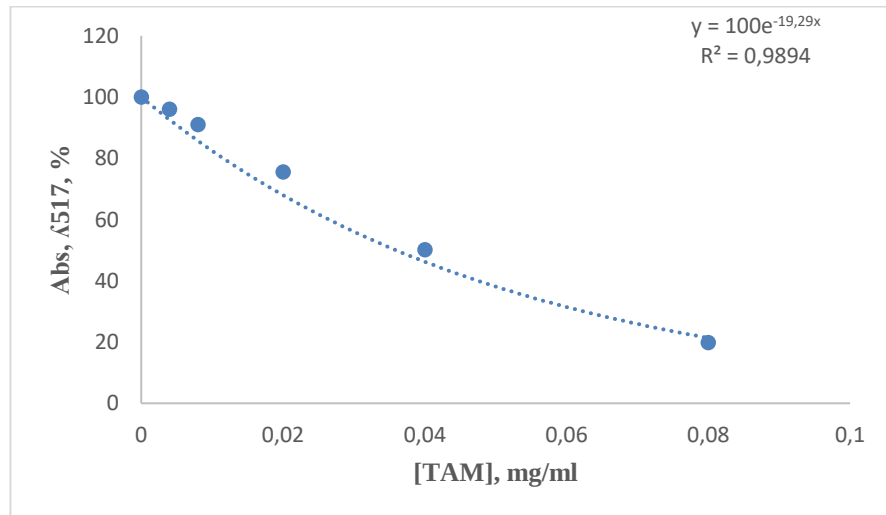
Çalışmamızda bitki ekstraktlerinin ve standart maddelerin Cu^{2+} indirgeme gücünün ekstre miktarına bağlı olarak arttığı görülmektedir (Şekil 6.7). Çalışmamızda ekstraktler ve standartların bakır iyonlarını indirgeme gücü tüm konsantrasyonlarda $\text{GA} > \text{BHA} > \text{Troloks} > \text{TAE} > \text{TAK} > \text{TAM} > \text{AOM} > \text{AOE} > \text{TAP} > \text{AOK} > \text{AOP}$ şeklinde azalmaktadır.

6.2.3. Serbest Radikal Giderme Etkisinin (DPPH•) Sonuçları

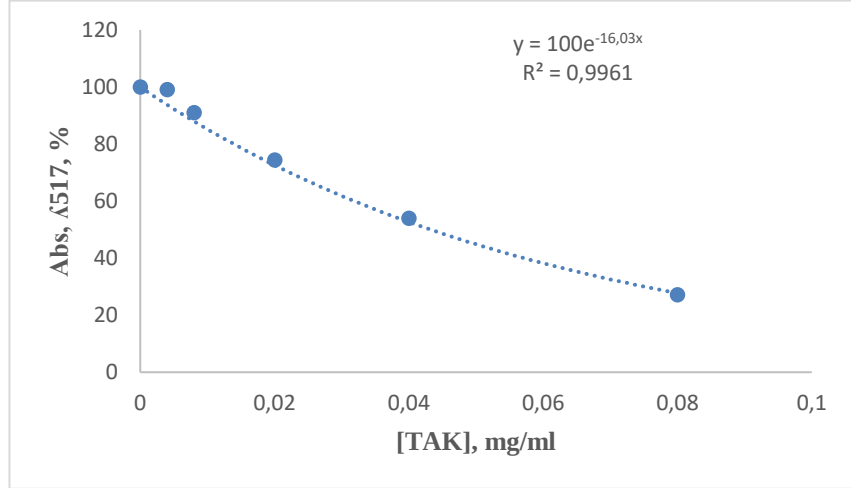
Çalışmada 6 mg/25 mL olacak şekilde DPPH• radikalinin metanolik çözeltisi hazırlanmıştır. Uygun oranda seyreltilmiş 20 µL ekstraktlar, 250 µL DPPH çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika beklenmiş ve 517 nm’de absorbans değeri okunmuştur (Sekil 6.8 – 6.15). Ekstraktlerin konsantrasyonlara karşı absorbans değerleri kullanılarak elde edilen grafik yardımıyla DPPH• giderimine ait IC₅₀ değerleri saptanmıştır (Çizelge 6.4).



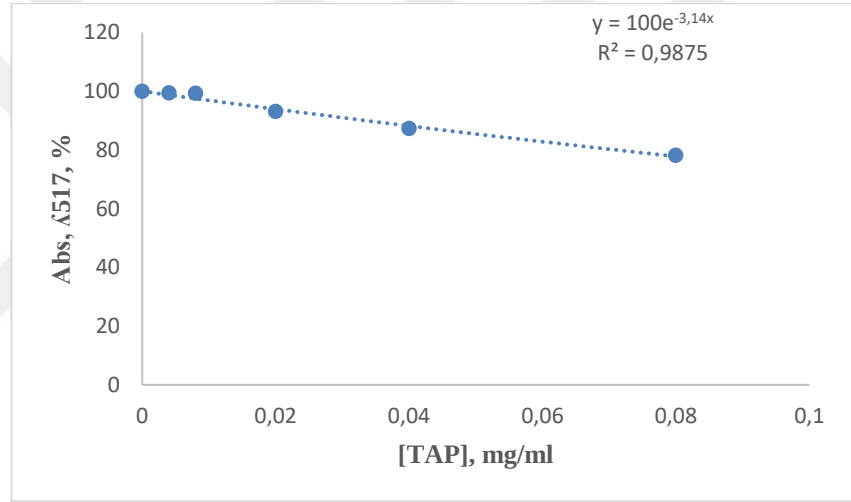
Şekil 6.8. TAE ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.



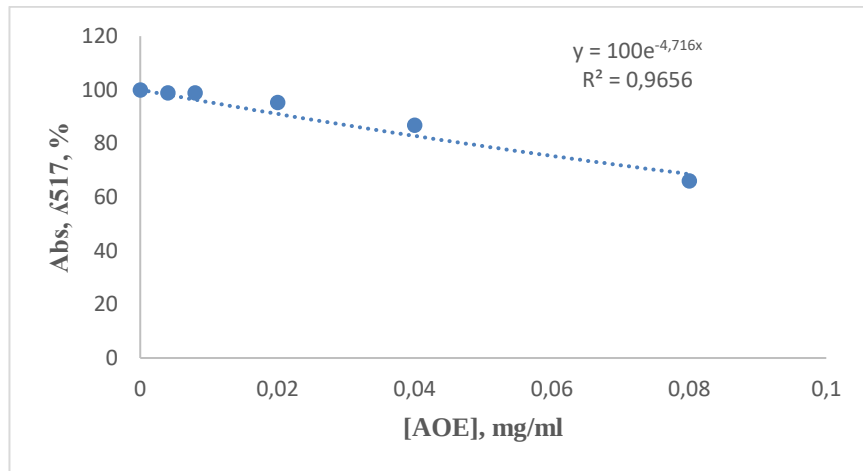
Şekil 6.9. TAM ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.



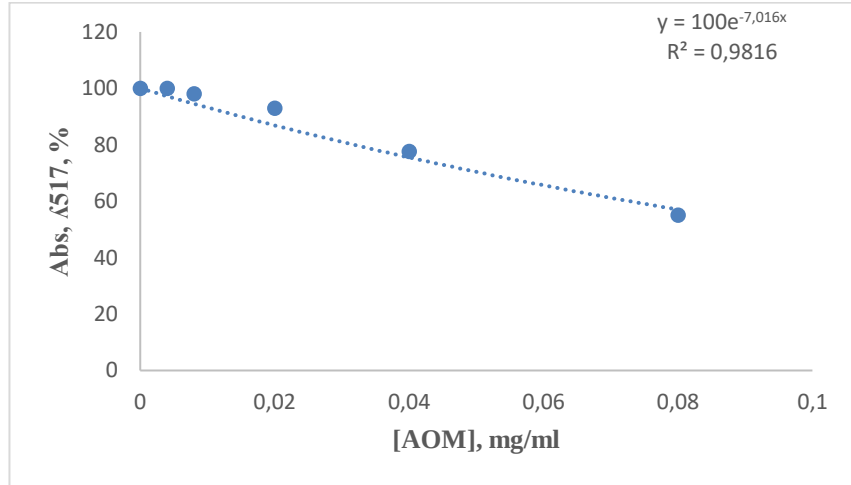
Şekil 6.10. TAK ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.



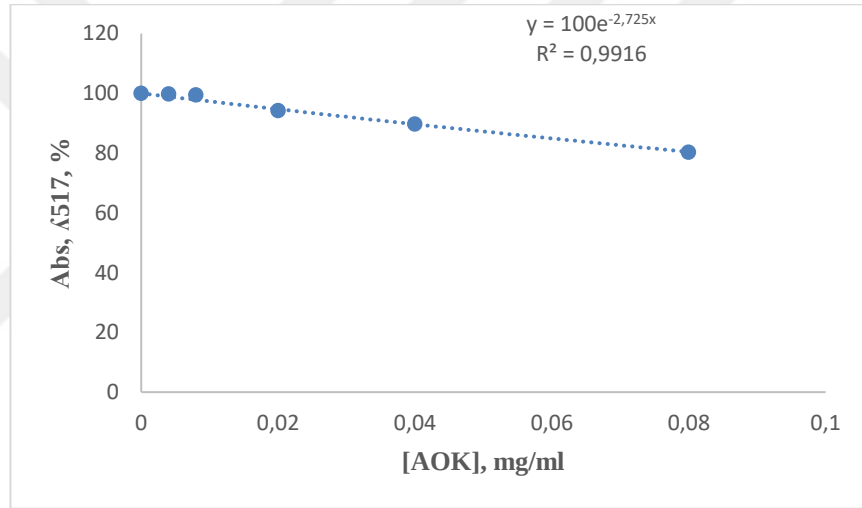
Şekil 6.11. TAK ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.



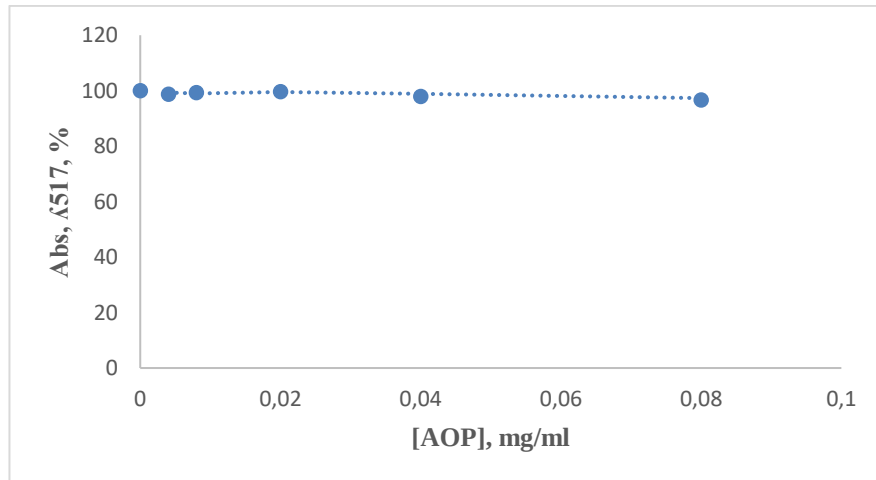
Şekil 6.12. AOE ekstraktının DPPH• radikalini indirgeme gücü.



Şekil 6.13. AOM ekstraktının DPPH[•] radikalini indirgeme gücü.



Şekil 6.14. AOK ekstraktının DPPH[•] radikalini indirgeme gücü.



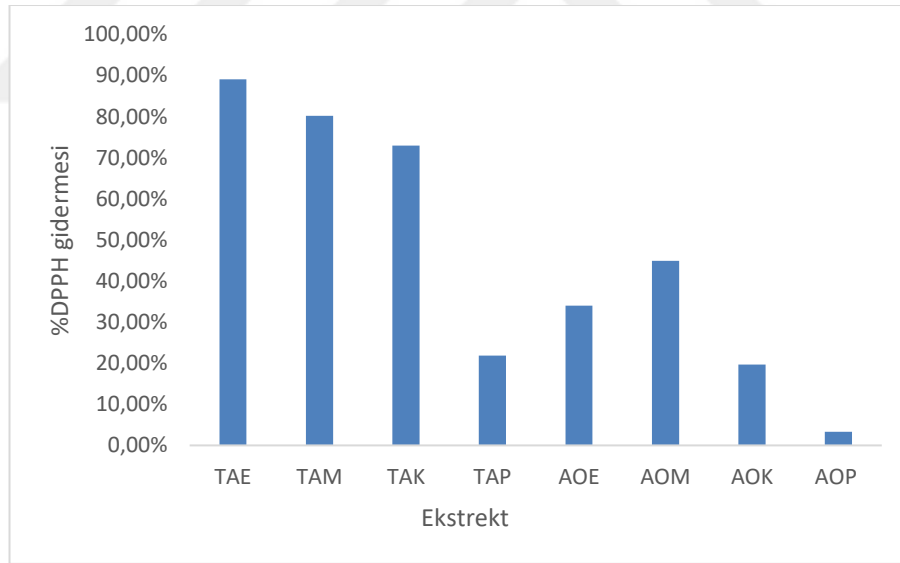
Şekil 6.15. AOK ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme gücü.

Bu eğrileri, konsantrasyonlar ile absorbans değerleri arasındaki ilişkiyi gösterir. Çalışmalar sonucunda 0.004 - 0.08 mg/mL konsantrasyon aralığında absorsiyonu %50'nin altına düşürenler için IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 6.4). Diğer ekstraktlar için çalışılan en yüksek konsantrasyondaki % inhibisyonu verildi. Buna göre TAP, AOE, AOM, AOK ve AOP değerleri sırasıyla (%21.84, %33.98, %44.93, %19.67, %3.28) kadar DPPH giderdiği bulunmuştur.

Çizelge 6.4. Ekstrelerin %DPPH gidermesini değerleri.

Bitki ek.	TAE	TAM	TAK	TAP	AOE	AOM	AOK	AOP
IC ₅₀ (µg/ml)	21.6	35.9	43.2	-	-	-	-	-

Sonuçlar, her bir bitki ekstre için farklı konsantrasyonlarda % DPPH giderme değerlerini sağladığı görüldü (Şekil 6.16). Bu değerler, bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesini yansıtır.

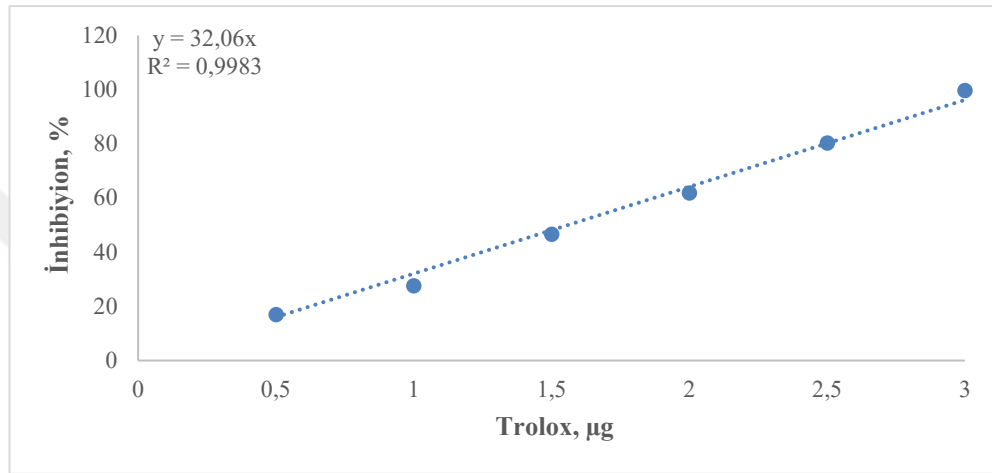


Şekil 6.16. Serbest Radikal Giderme Etkisinin (DPPH*) Sonuçları.

Tamarix arabica TAE, TAM ve TAK ekstraktları, konsantrasyona bağlı olarak önemli giderim etkilerine sahiptir. Kapsamlı karşılaştırma, *Tamarix arabica*'nın hem TAE'nin hem de TAM'ın DPPH testinde diğer ekstraktlara kıyasla daha güçlü temizleme etkileri gösterdiği belirlendi.

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

Çalışmada kullanılan ABTS reaktifi taze hazırlanmıştır. Uygun oranda seyreltilmiş 20 µL ekstraktler, 230 µL ABTS çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika beklenmiş ve 743 nm’de absorbanlar ölçülerek inhibisyon yüzdeleri Troloks analitinden elde edilen sonuçların kullanımıyla oluşturulan Troloks kalibrasyon eğrisinin kullanımı ile Troloks’a eşdeğer (TE) olarak hesaplanmıştır (Şekil 6.17).



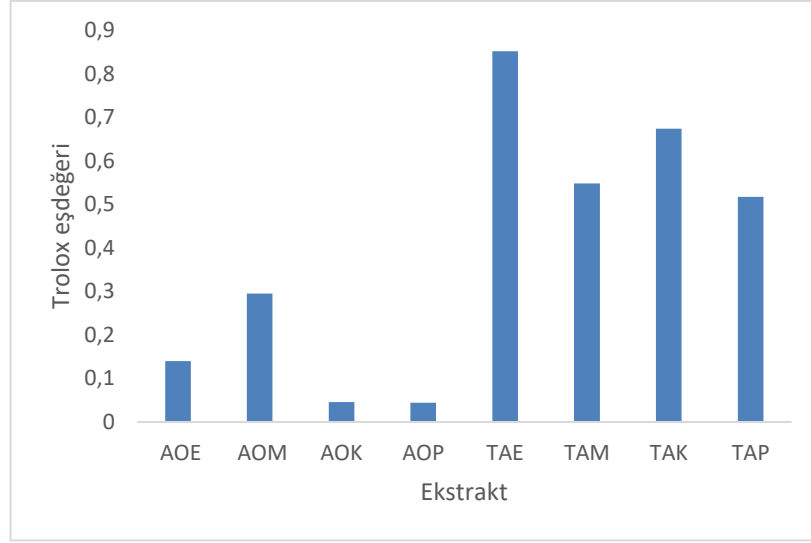
Şekil 6.17. Trolox Standart Eğrisi.

Bu grafikten elde edilen formülden yararlanarak numunenin antioksidan kapasitesi trolox eşdeğeri cinsinden hesaplandı (Çizelge 6.5). Değer ne kadar yüksek ise antioksidan kapasite o kadar yüksektir (Şekil 6.18).

Çizelge 6.5. Ekstraktlerin Trolox eşdeğeri.

Eks. (µg)	Trolox eşdeğeri (µg)*
AOE	0,14±0.014
AOM	0,295±0.057
AOK	0,046±0.0023
AOP	0,0444±0.0034
TAE	0,852±0.053
TAM	0,548±0.054
TAK	0,674±0.060
TAP	0,517±0.125

* Ortalama ± SD



Şekil 6.18. Katyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS^{•+}) Sonuçları.

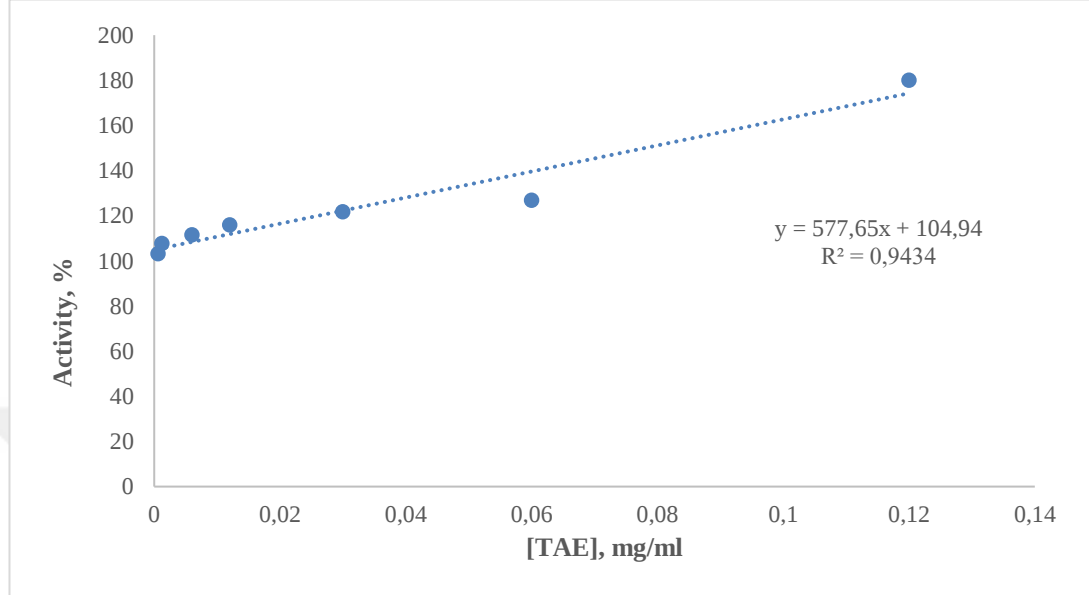
Bu yöntemde, bitki ekstralarının ABTS^{•+} radikallerini nasıl giderdiğini belirlemek için bir antioksidan etkinlik tespiti gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, troloksa eşdeğer olarak ifade edilerek antioksidan kapasitenin nicel bir değeri elde edilmiştir. Ekstrelerin absorban değerleri ve kalibrasyon denklemi kullanılarak ekstrelerdeki antioksidan kapasitesi μg Trolox eşdeğeri / μg ekstre cinsinden hesaplandıktan sonra en yüksek antioksidan kapasite TAE (1 μg TAE ekstraktı 0,852 μg Trolox eşdeğer) ve TAK (1 μg TAK ekstraktı 0,674 μg Trolox eşdeğer) ekstralarında ölçülürken; en düşük değerlere AOP (1 μg AOP ekstraktı 0,0444 μg Trolox eşdeğer) ve AOK (1 μg AOK ekstraktı 0,046 μg Trolox eşdeğer) ekstralarında rastlanmıştır.

6.3. ENZİM AKTİVİTE ÖLÇÜM SONUÇLARI

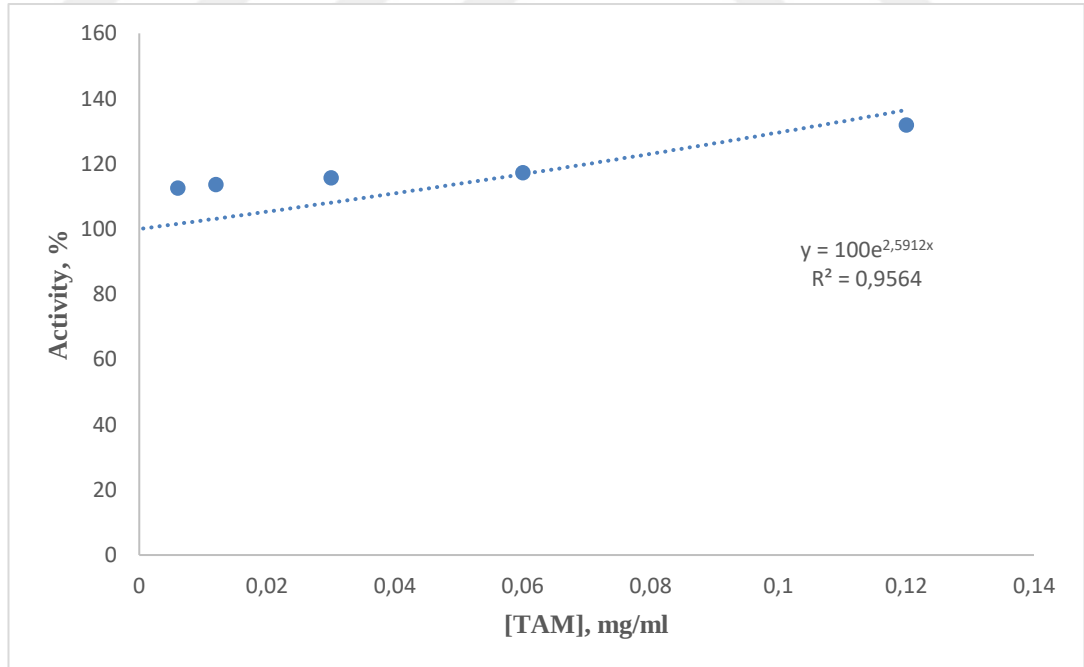
6.3.1. α -Amilaz Aktivi Ölçüm Sonuçları

Bu çalışmada doymuş substrat (nişasta) konsantrasyonunda bitki ekstralarının α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri çalışılmıştır. Belirlenen nişasta konsantrasyonlarında, her bir bitki ekstresi için α -amilaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Deneylerin sonunda oluşan reaksiyon ürünlerinin absorbanı 546 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Absorbanları 546 nm’de okunduktan sonra her bir bitki ekstraktı için ekstrakt

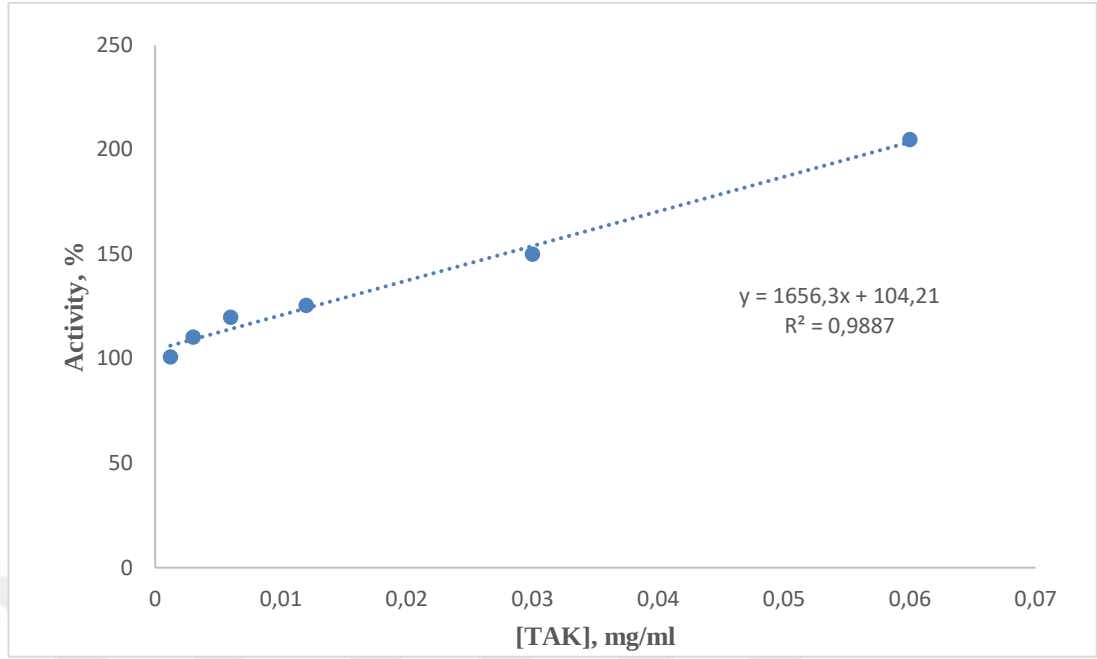
konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 6.19 - 6.26). %50'nin üzerinde aktivasyon etkisi gösteren ekstraktlar için AC₅₀ değerleri hesaplandı.



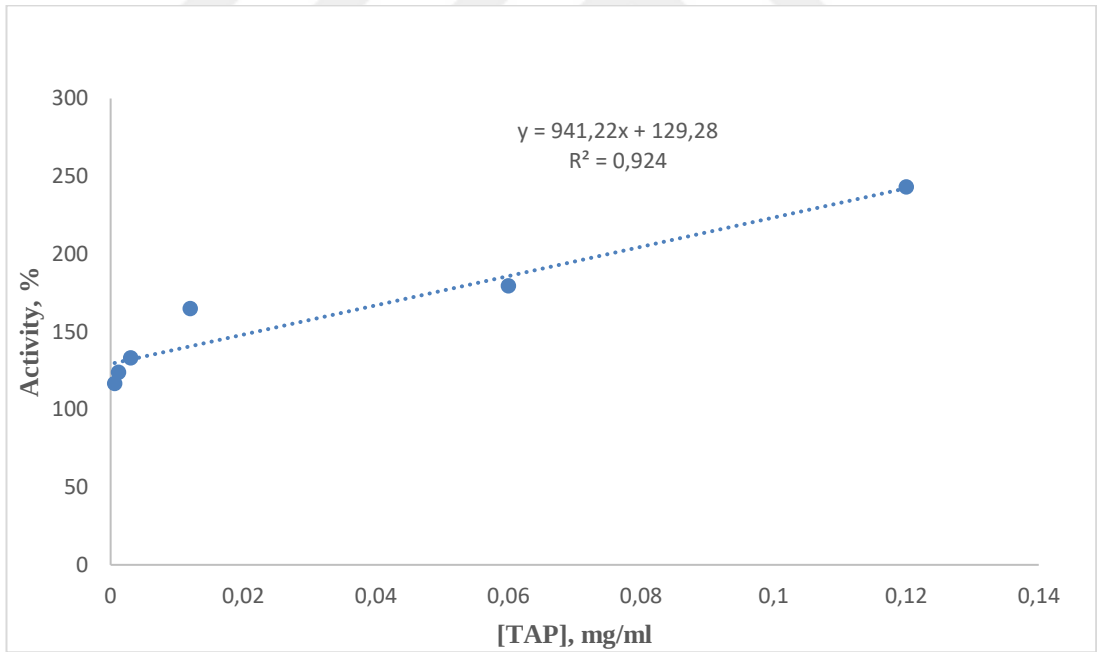
Şekil 6.19. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



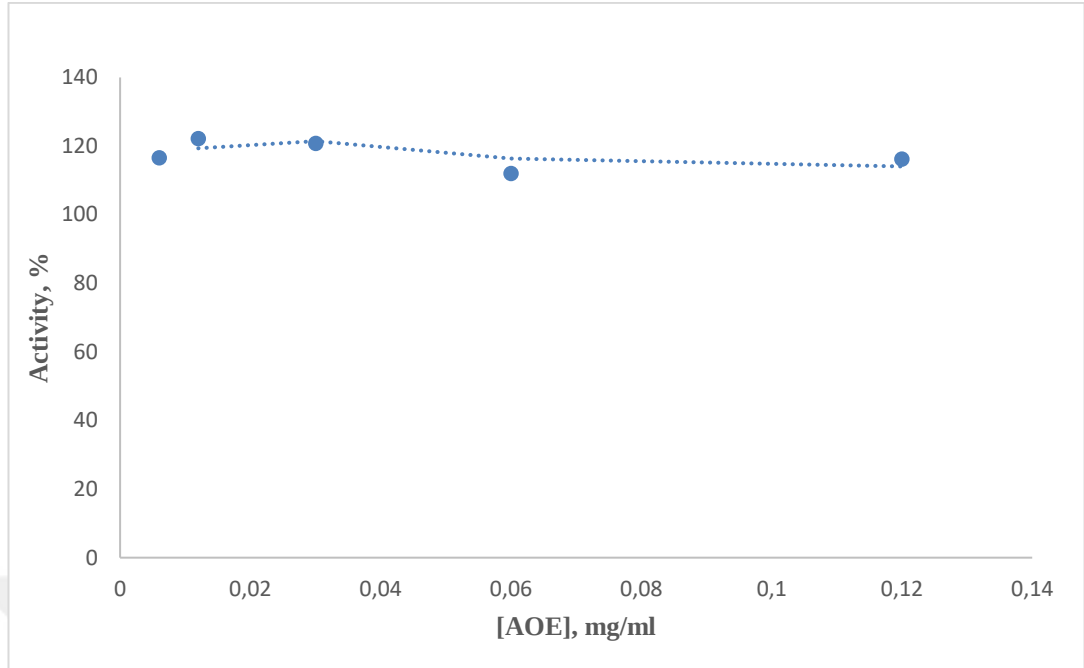
Şekil 6.20. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



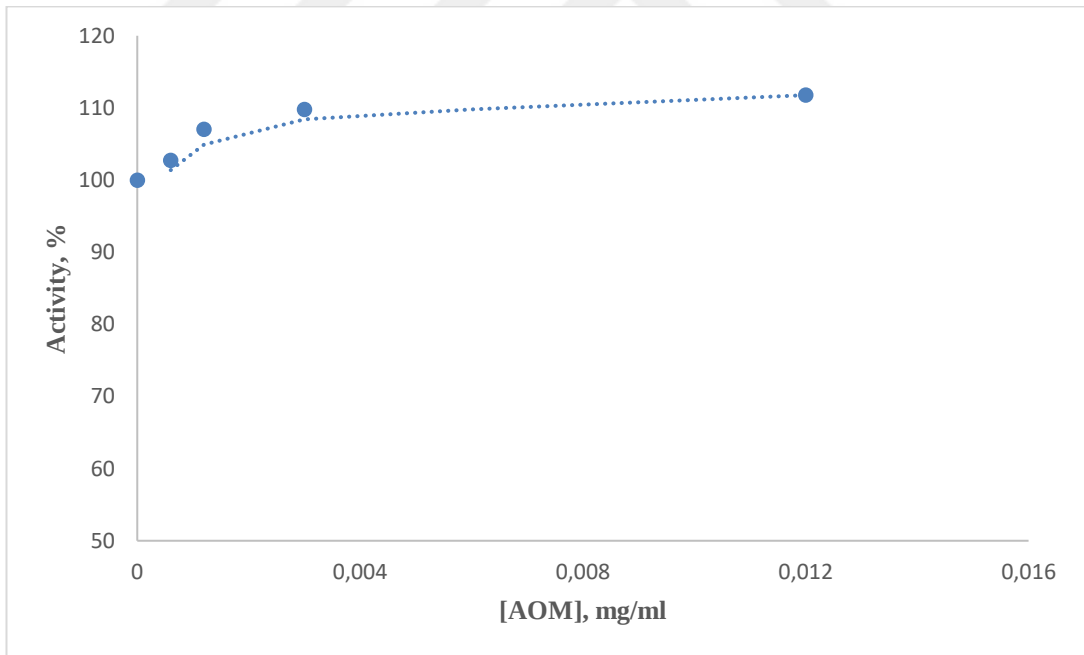
Şekil 6.21. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAK ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



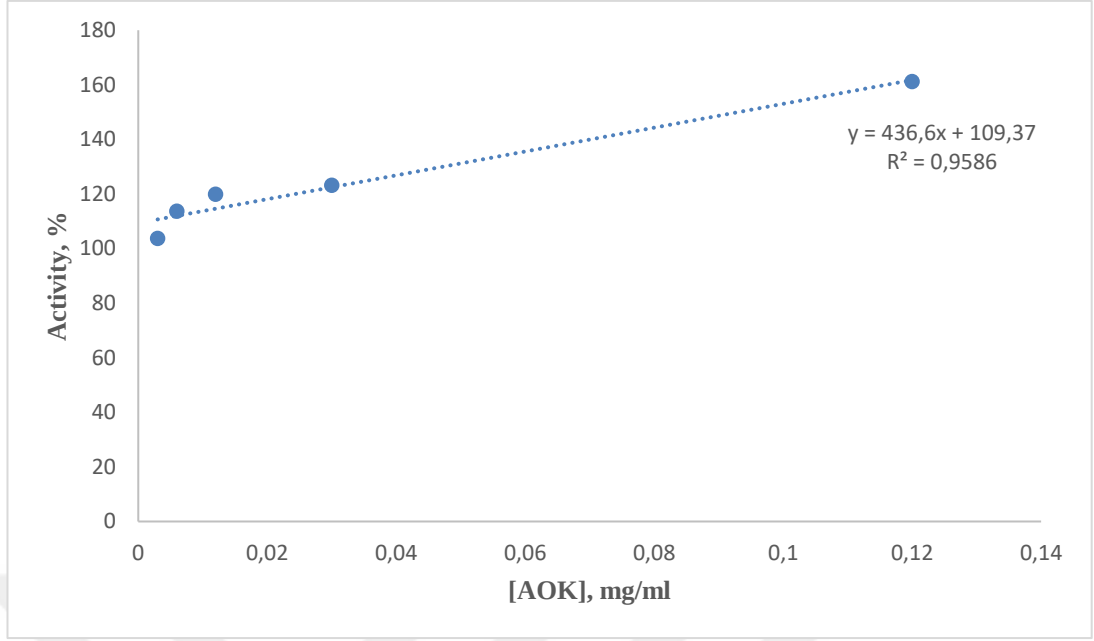
Şekil 6.22. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren TAP ekstreleri için aktivite (%) grafikleri



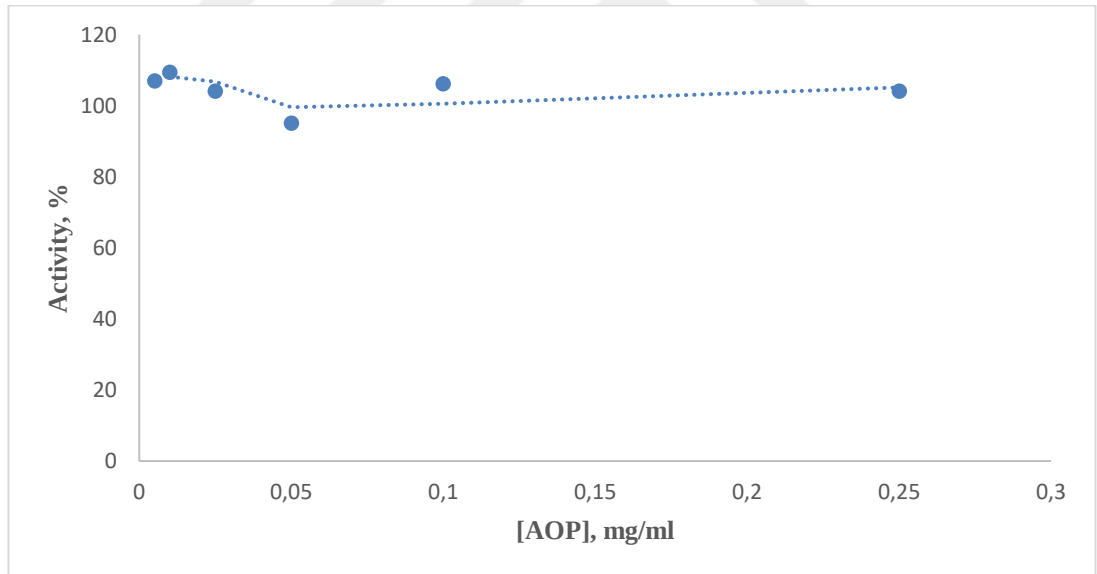
Şekil 6.23. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOE ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



Şekil 6.24. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOM ekstreleri için aktivite (%) grafikleri.



Şekil 6.25. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOK ekstraktları için aktivite (%) grafikleri.



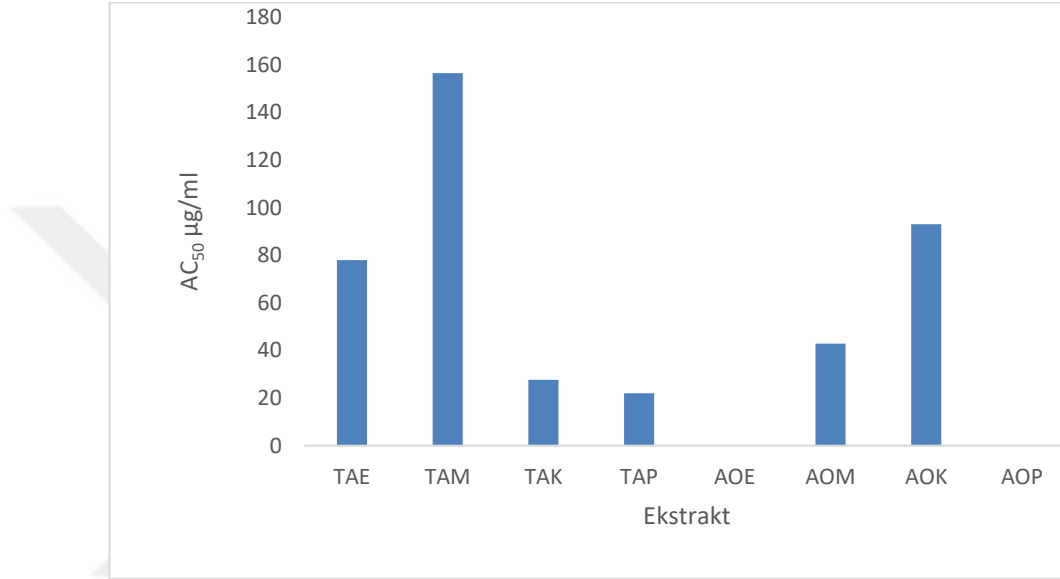
Şekil 6.26. α -Amilaz enzimi üzerine aktivasyon gösteren AOP ekstraktları için aktivite (%) grafikleri.

Bu grafikler üzerinden her bir bitki ekstresinin α -amilaz enzim aktivasyonu belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda AC_{50} değeri hesaplanmıştır (Çizelge 6.6).

Çizelge 6.6. Ekstrelerin α -Amilaz enzim aktivasyonu değerleri.

Bitki ek.	TAE	TAM	TAK	TAP	AOE	AOM	AOK	AOP
AC ₅₀ (μ g/ml)	78	-	27.6	22.01	-	-	93	-

Sonuçlar, bitki ekstrelerinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini göstermektedir (Şekil 6.27).



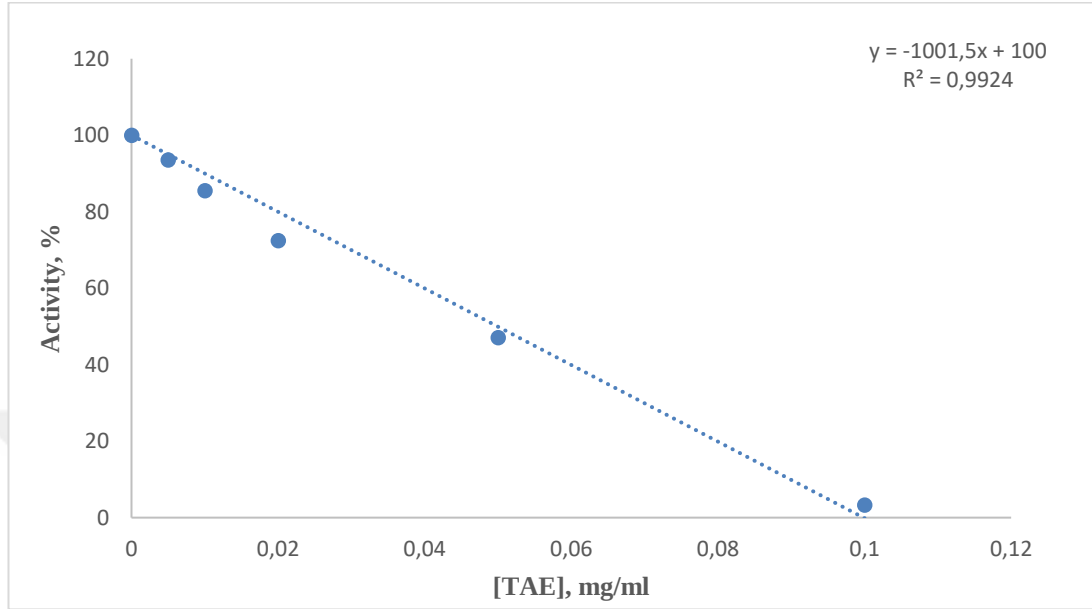
Şekil 6. 27. Ekstraktların α -Amilaz için AC₅₀ değerleri.

Tüm ekstrelerin AC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. AOE, AOP ekstreleri etki göstermemiştir. Diğer ekstrelerin α -Amilaz enzim aktivasyonu için hesaplanan AC₅₀ değerleri TAE ekstresi için 78 μ g/ml, TAM ekstresi için 156 μ g/ml, TAK ekstresi için 27.6 μ g/ml, TAP ekstresi için 22 μ g/ml, AOM ekstresi için 42.8 μ g/ml ve AOK ekstresi için 93 μ g/ml olarak tespit edilmiş. Bu bulgular uyarınca α -Amilaz enzimini in vitro olarak aktivite etme potansiyeli en yüksek olan ekstrenin TAM olduğu belirlenmiştir.

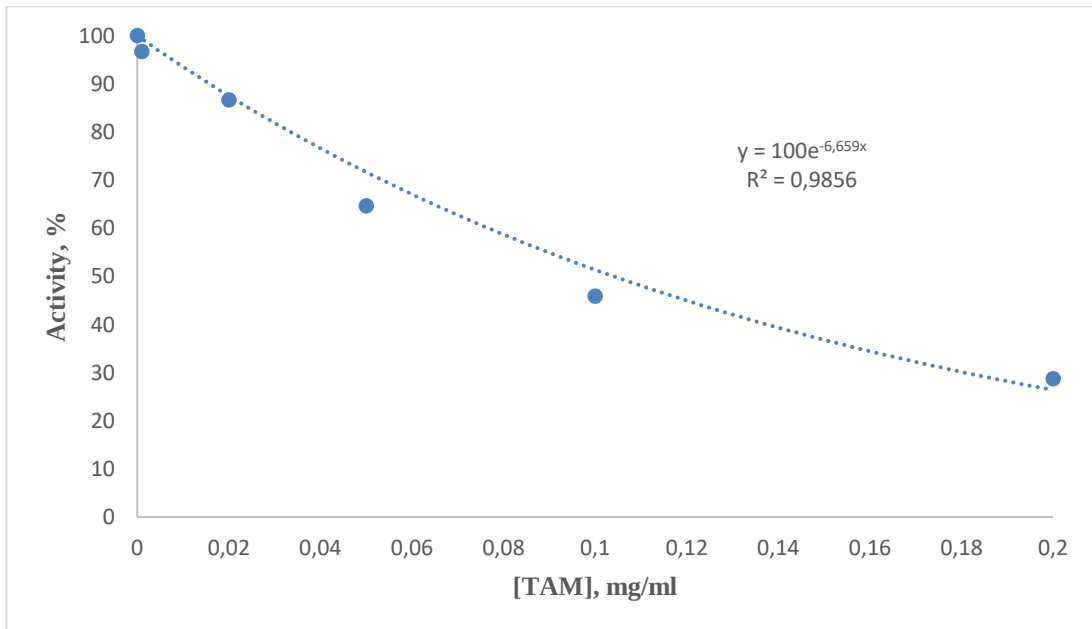
6.3.2. α -Glukozidaz Aktivite Ölçüm Sonuçları

Bu çalışmada, α -glukozidaz ölçümleri için olarak aktivite ölçümlerinde, birinci, ikinci ve üçüncü dakikada absorbans değerleri belirlendi ve başlangıç ile üçüncü dakikada okunan değer arasındaki fark alındı. Yapılan bu deney 3 kez tekrarlandıktan sonra absorbansların ortalaması belirlendi. Her bir bitki ekstraktı için ekstrakt konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 6.28 – 6.35) ve ve her

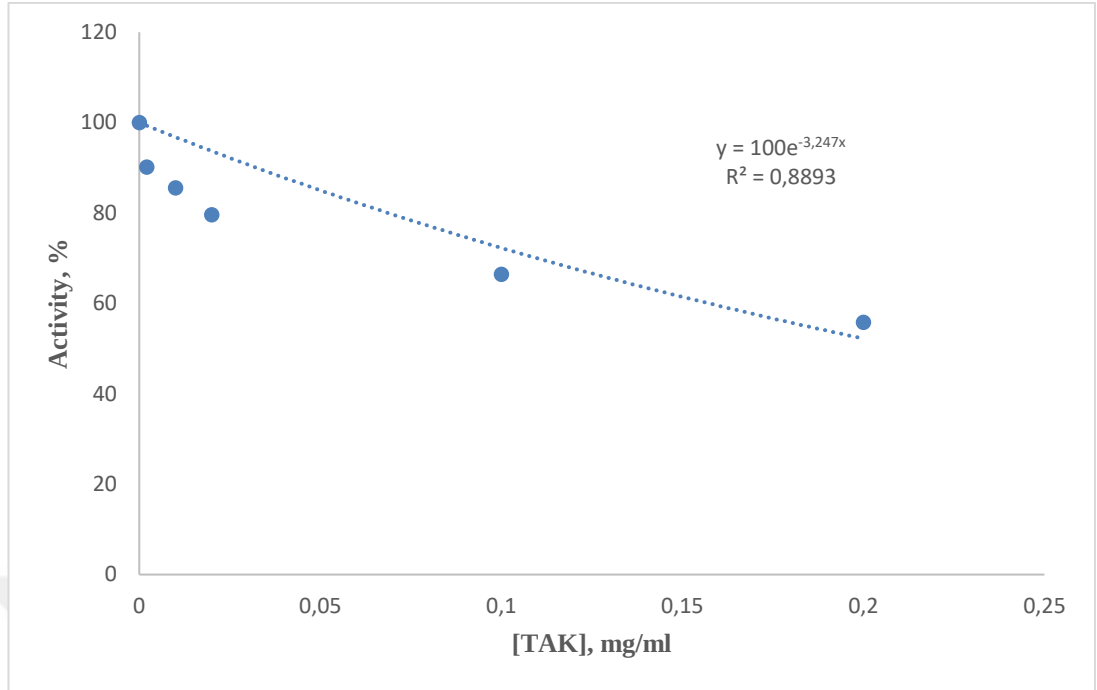
bir bitki ekstresinin 0.001 - 0.2 mg/mL konsantrasyon aralığında %50 α -glukozidaz enzim inhibisyonunu hesaplanmıştır.



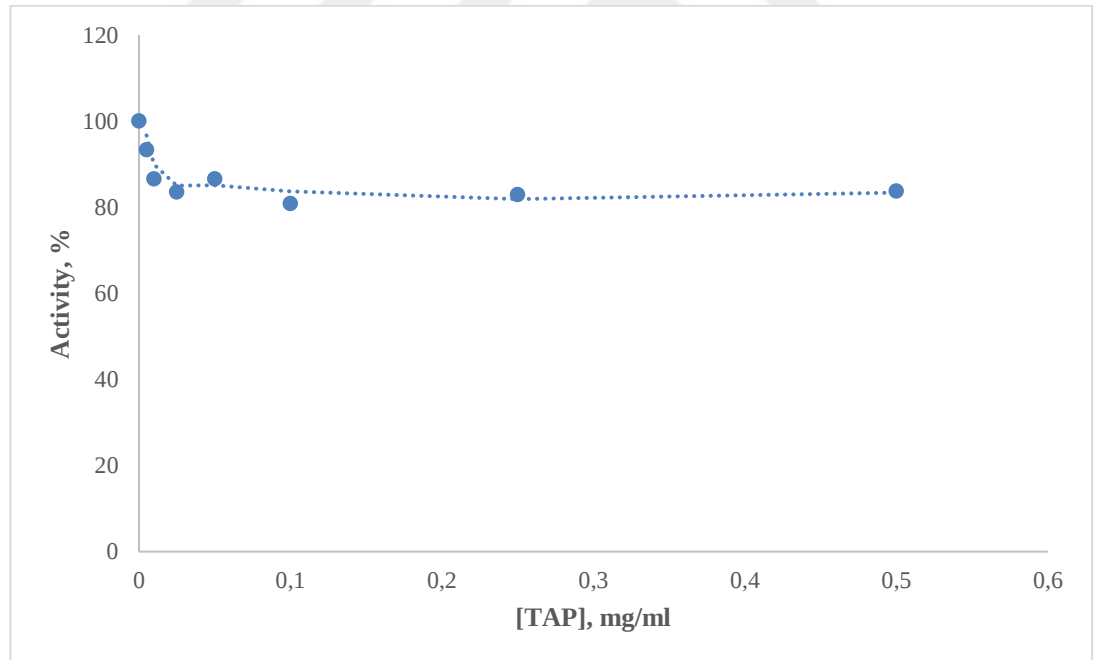
Şekil 6.28. α -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



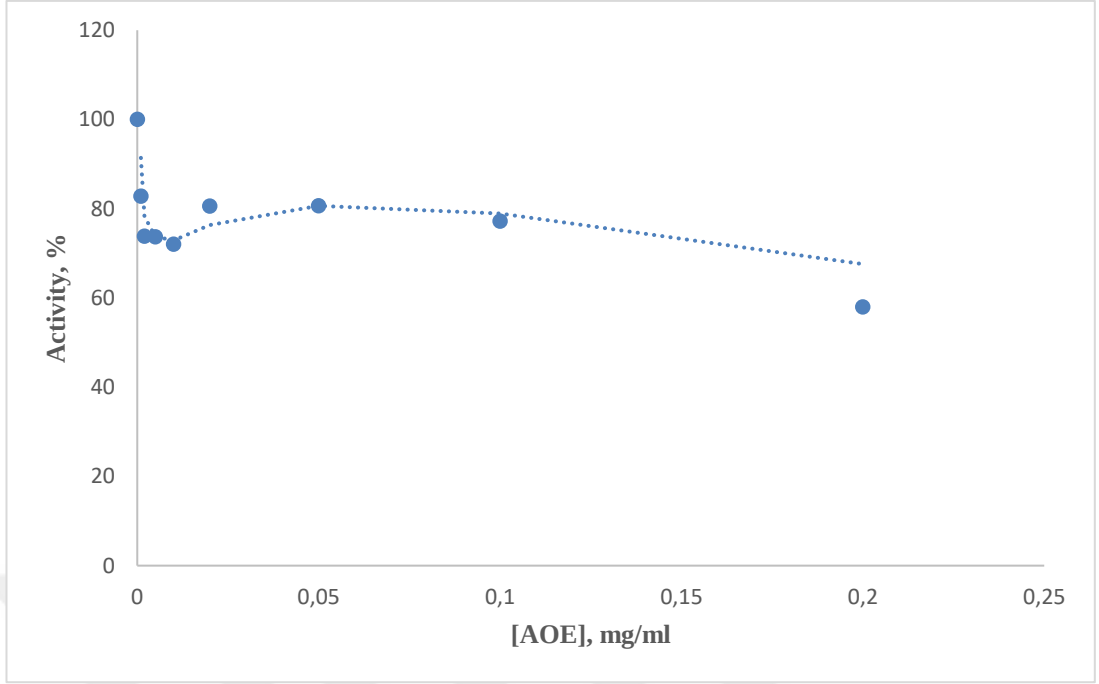
Şekil 6.29. α -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAM ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



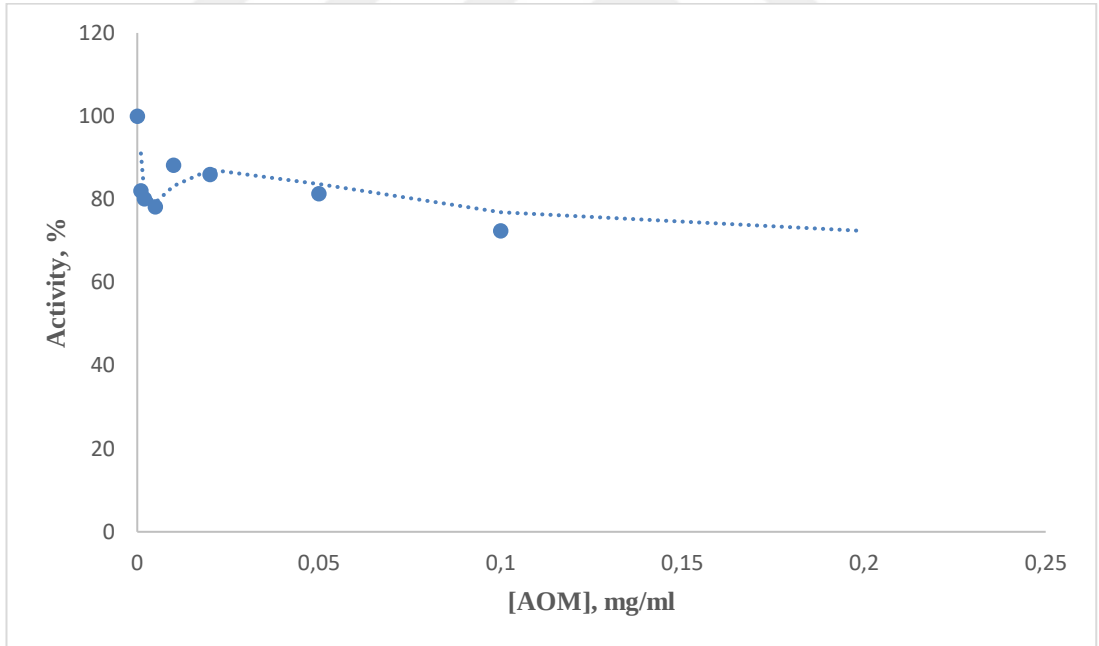
Şekil 6.30. α -Glukozidaz enzimi üzerine TAK ekstraktları için aktivite (%) grafiği.



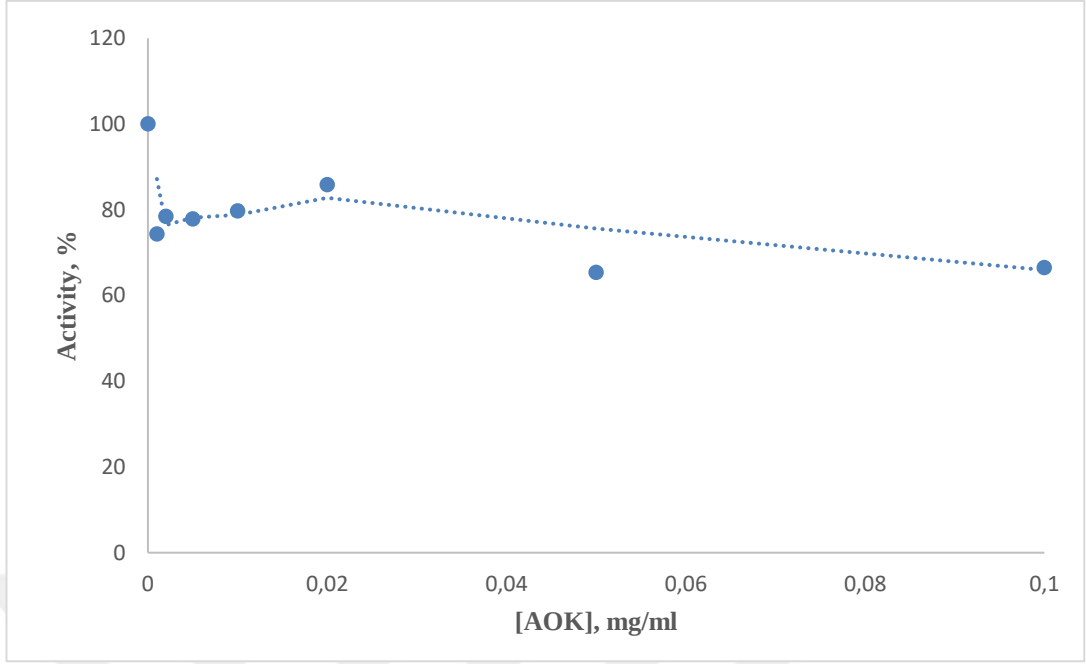
Şekil 6.31. α -Glukozidaz enzimi üzerine TAP ekstraktları için aktivite (%) grafikleri.



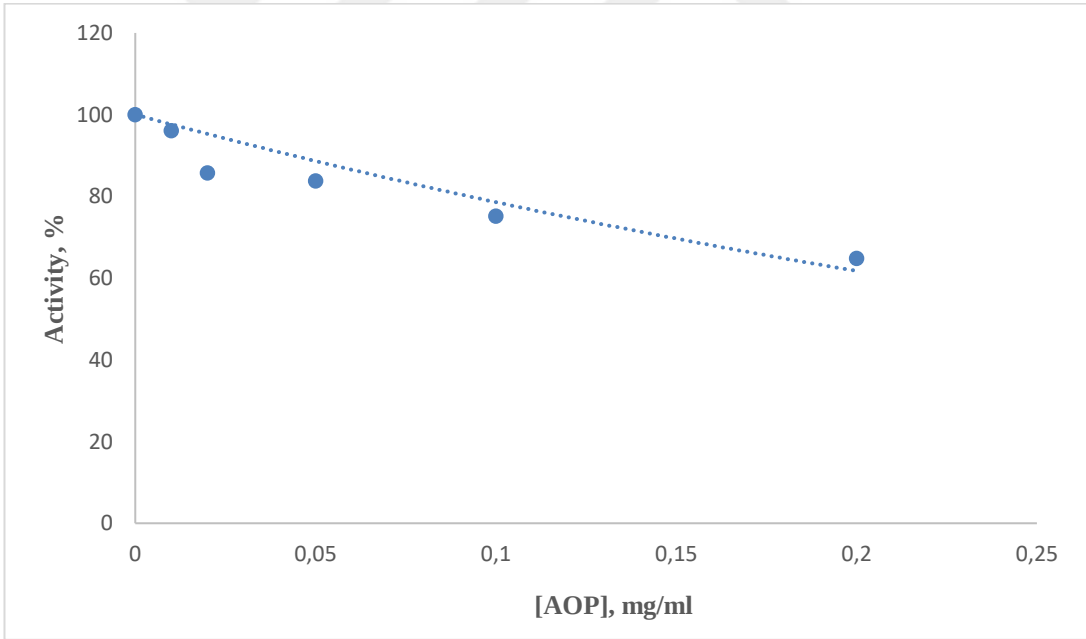
Şekil 6.32. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



Şekil 6.33. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOM ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



Şekil 6.34. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOK ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



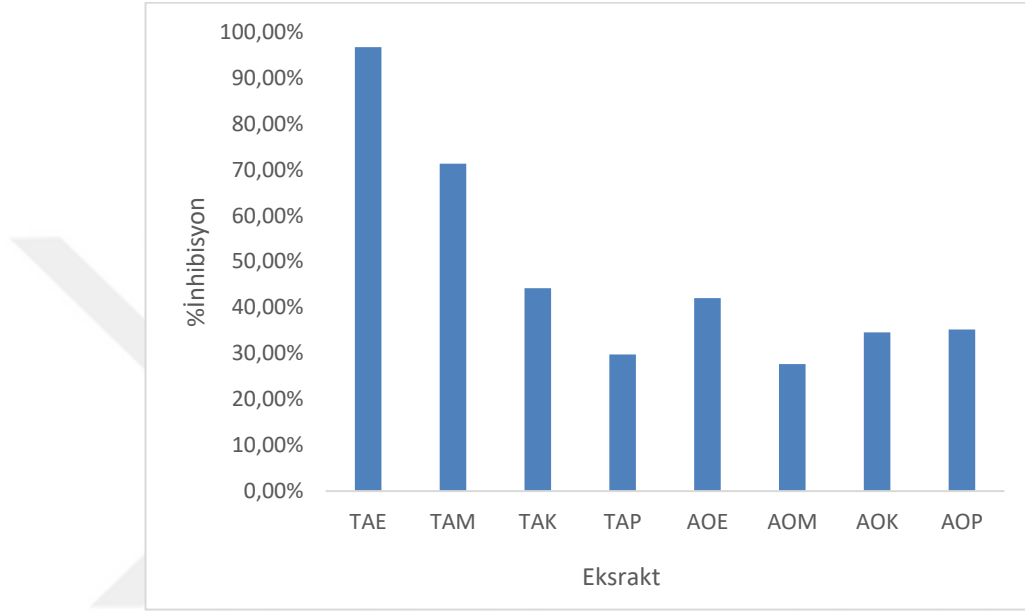
Şekil 6.35. α -Glukozidaz enzimi üzerine AOP ekstreleri için aktivite (%) grafiği.

Tez kapsamında çalışılan ekstrelerin 0.001 - 0.2 konsantrasyon aralığında % α -glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları %50'nin Çizelge 6.7'de verilmiştir.

Çizelge 6.7. Ekstrelerin α -Glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları.

Bitki ek.	TAE	TAM	TAK	TAP	AOE	AOM	AOK	AOP
IC ₅₀ (µg/ml)	49.9	104.1	-	-	-	-	-	-
İnhibisyon	% 96.68	% 71.29	% 44.22	-	-	-	-	% 35.2

Sonuçlar, bitki ekstrelerinin α -glukozidaz enzim inhibitesi üzerindeki etkilerini göstermektedir (Şekil 6. 36).



Şekil 6.36. α -Glukozidaz İnhibisyon Sonuçları.

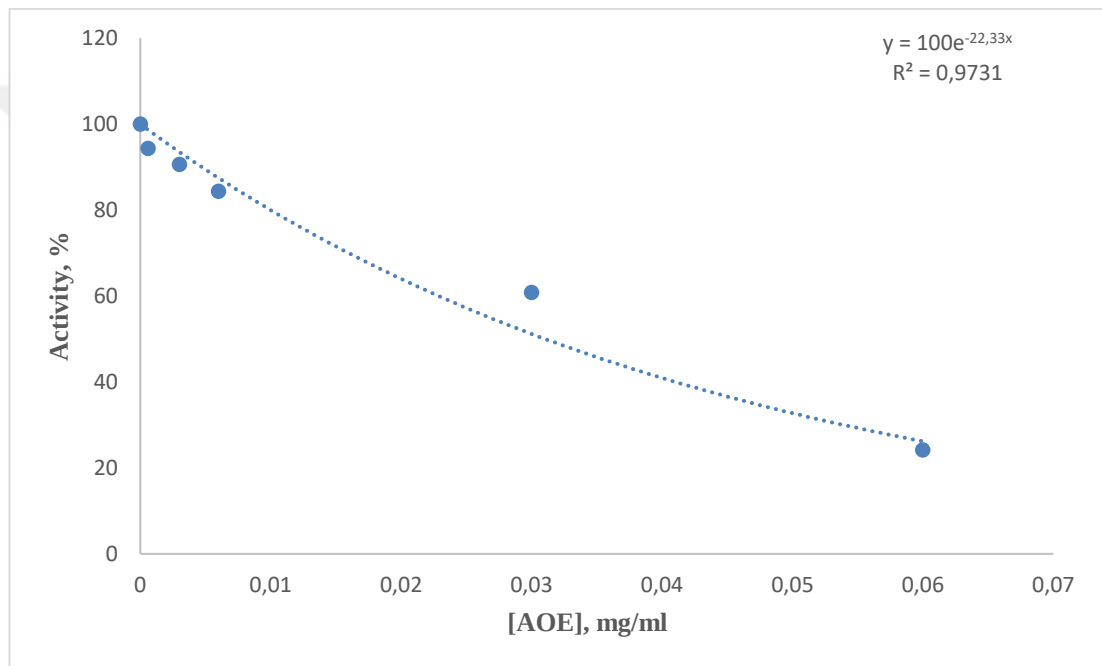
Bu eğrileri, konsantrasyonlar ile absorbans değerleri arasındaki ilişkiyi gösterir. Çalışmalar sonucunda 0.001 - 0.2 mg/mL konsantrasyon aralığında absorsiyonu %50'nin altına düşürenler için IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 6.4). Diğer ekstraktlar için çalışılan en yüksek konsantrasyondaki % inhibisyonu verildi. Buna göre TAE, TAM, TAK ve AOP değerleri sırasıyla (% 96.68, % 71.29, % 44.22, % 35.2) inhibisyona neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgular uyarınca göre α -glukozidaz enzimini in vitro olarak inhibe etme potansiyeli en yüksek olan ekstrenin TAE olduğu belirlenmiştir.

6.3.3. CA Aktivite Ölçüm Sonuçları

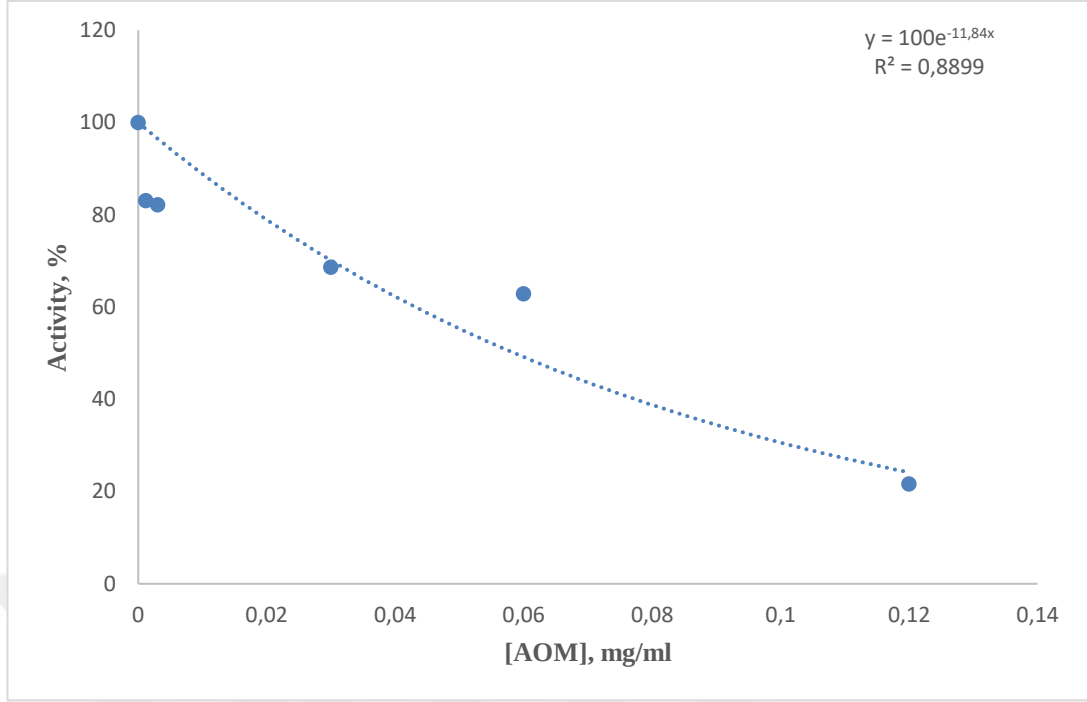
Karbonik anhidraz aktivite ölçüm için birinci, ikinci ve üçüncü dakikada absorbans değerleri belirlendi ve başlangıç ile üçüncü dakikada okunan değer arasındaki fark

alındı. Yapılan bu deney 3 kez tekrarlandıktan sonra absorbansların ortalamaları alındı. Her bir bitki ekstrekte için ekstrakt konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiğe geçirilmiş (Şekil 6.37 - 6.53) ve her bir bitki ekstreklerine ait 0.0006 - 0.12 mg/mL konsantrasyon aralığında % enzim inhibisyonu hesaplanmıştır. %50'nin üzerinde inhibisyon etkisi gösterenler için IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

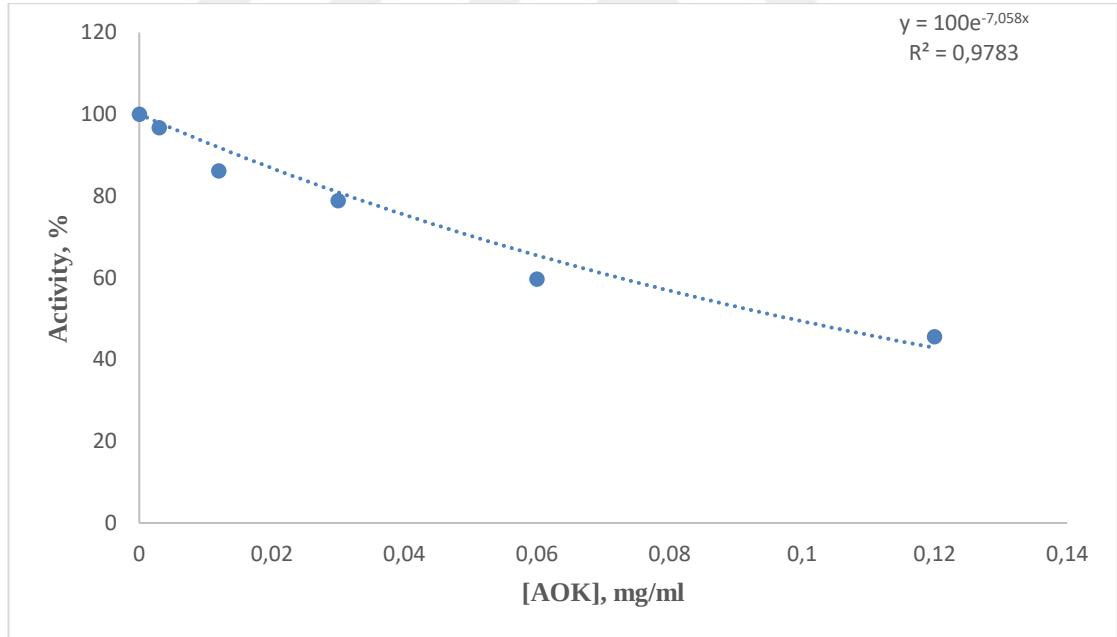
Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim Aktiviteye (%) grafikleri Şekil (6.37 - 6.44)'da gösterilmiştir.



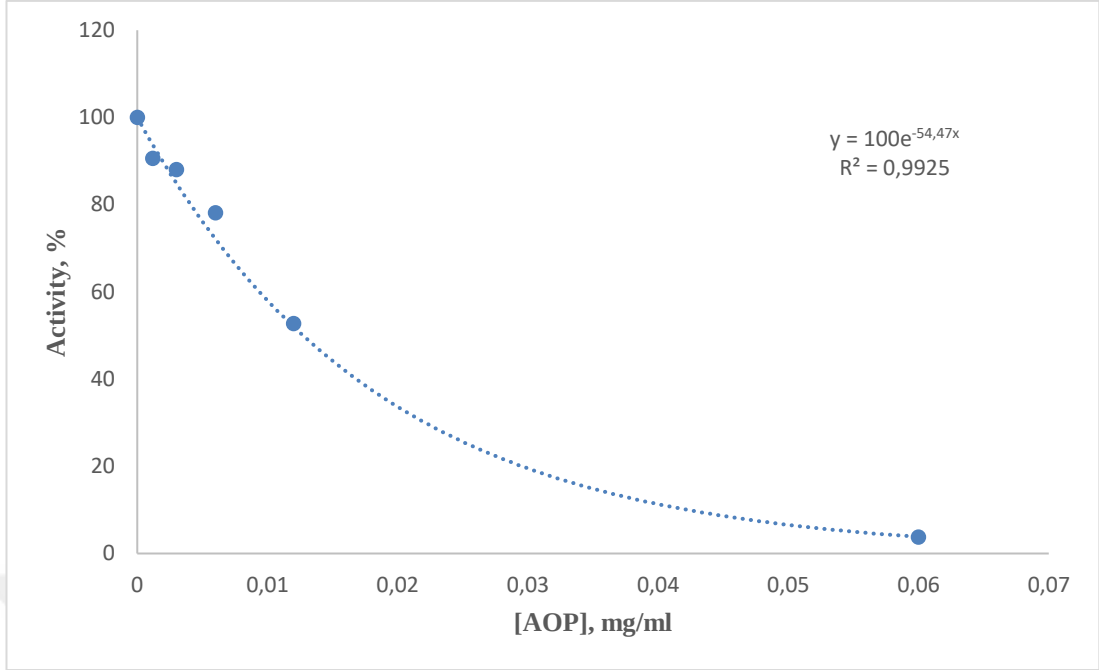
Şekil 6.37. AOE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.



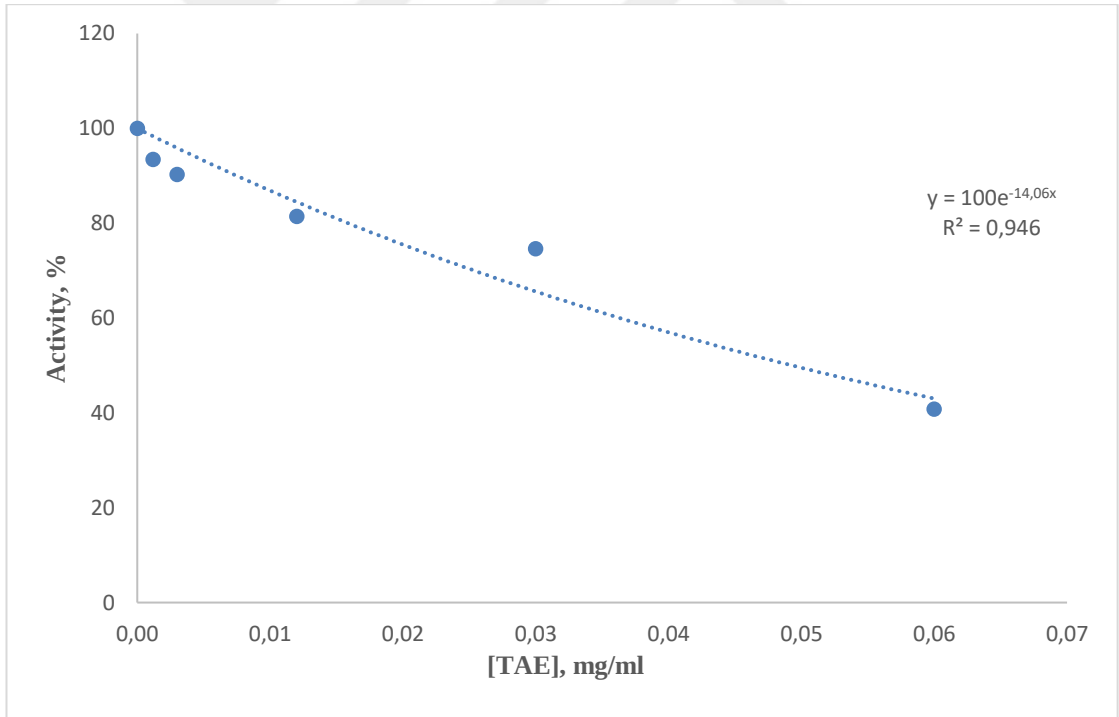
Şekil 6.38. AOM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.



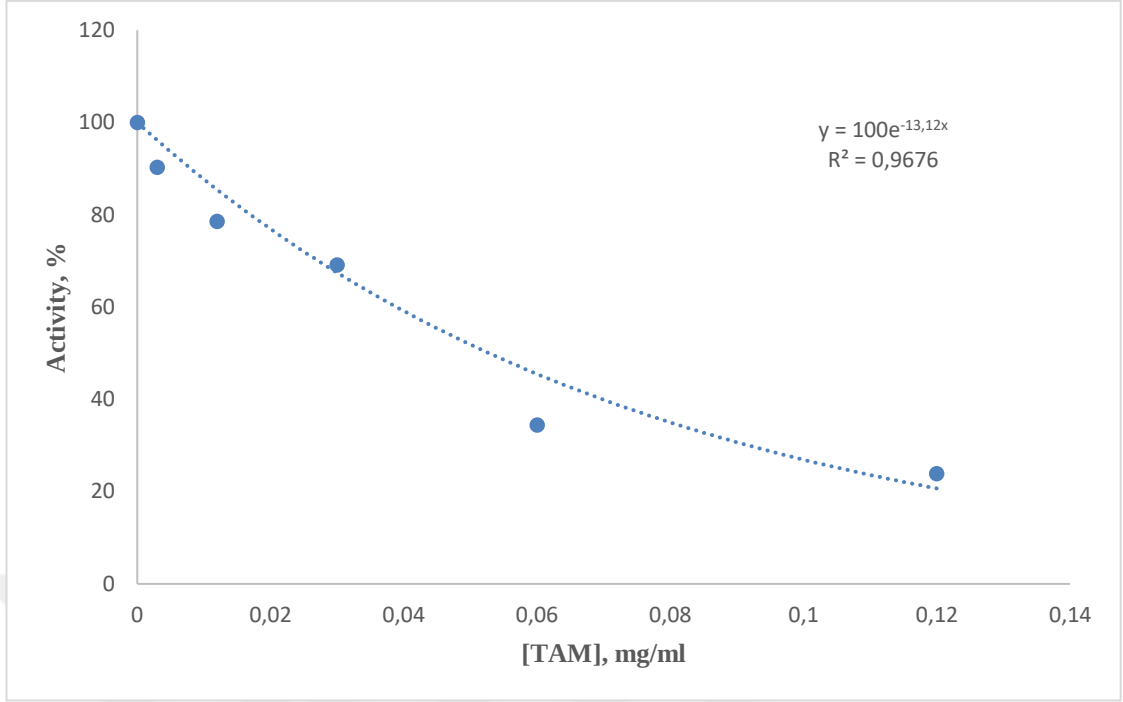
Şekil 6.39. AOK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.



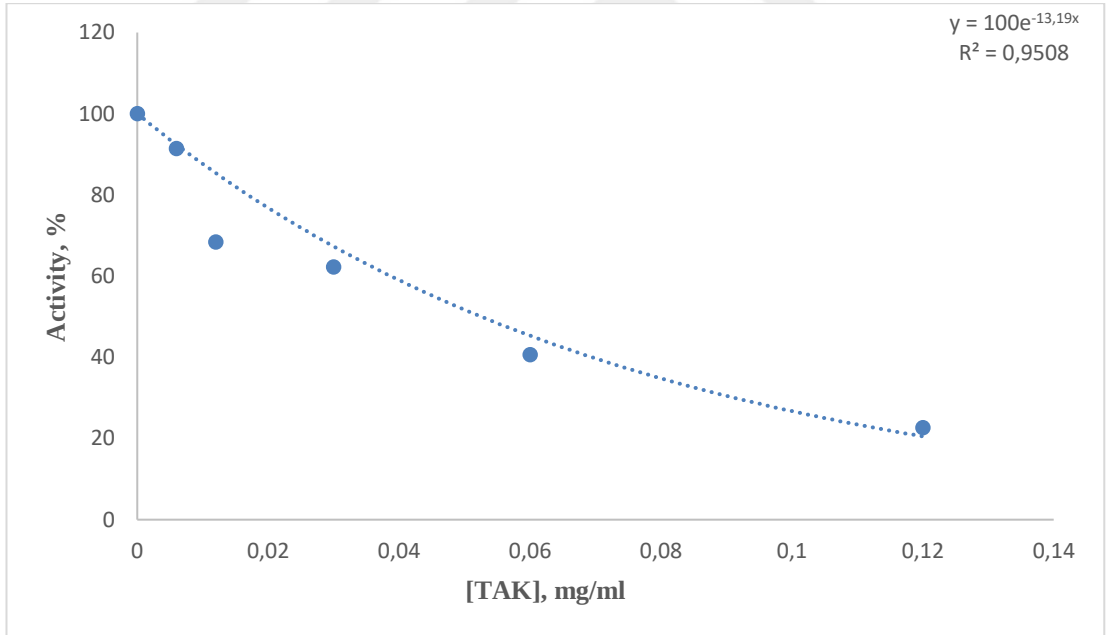
Şekil 6.40. AOP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.



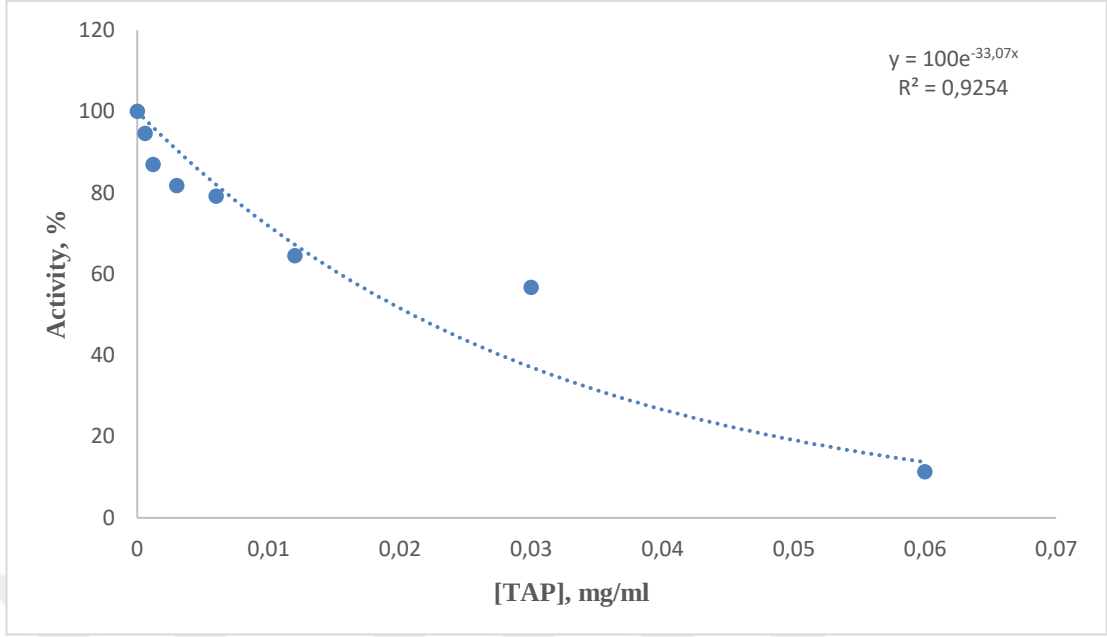
Şekil 6.41. TAE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.



Şekil 6.42. TAM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.



Şekil 6.43. TAK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.



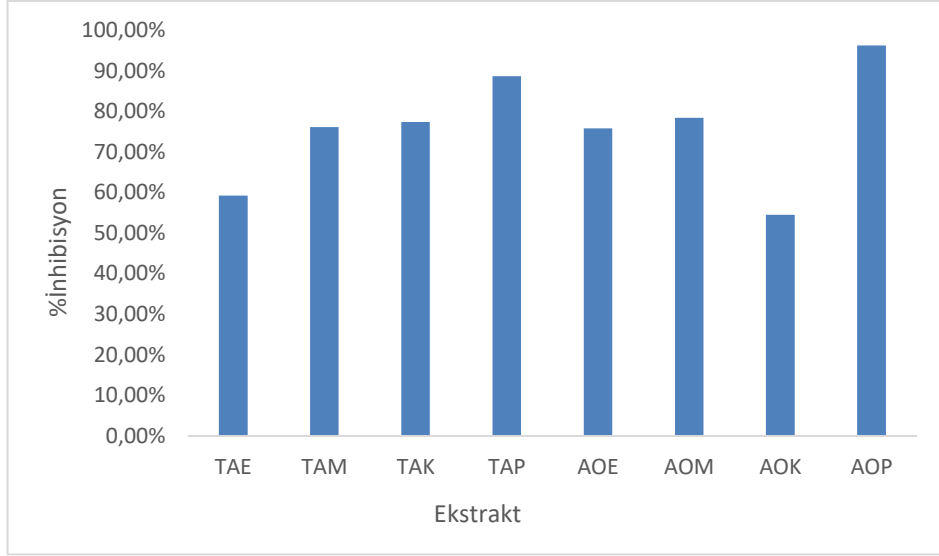
Şekil 6.44. TAP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA I enzim inhibisyonu (%) grafiği.

Tez kapsamında çalışılan ekstrelerin 0.0006 - 0.12 konsantrasyon aralığında % hCa I enzim inhibisyonu sonuçları %50'nin Çizelge 6.8'de verilmiştir.

Çizelge 6.8. Ekstrelerin hCA I enzim inhibisyonu sonuçları.

Bitki ek.	TAE	TAM	TAK	TAP	AOE	AOM	AOK	AOP
%İnhibisyon	% 59.21	% 76.11	% 77.38	% 88.66	% 75.85	% 78.4	% 54.5	% 96.24
IC ₅₀ (µg/ml)	49.3	52.83	52.55	20.96	31.04	58.5	98.2	12.72

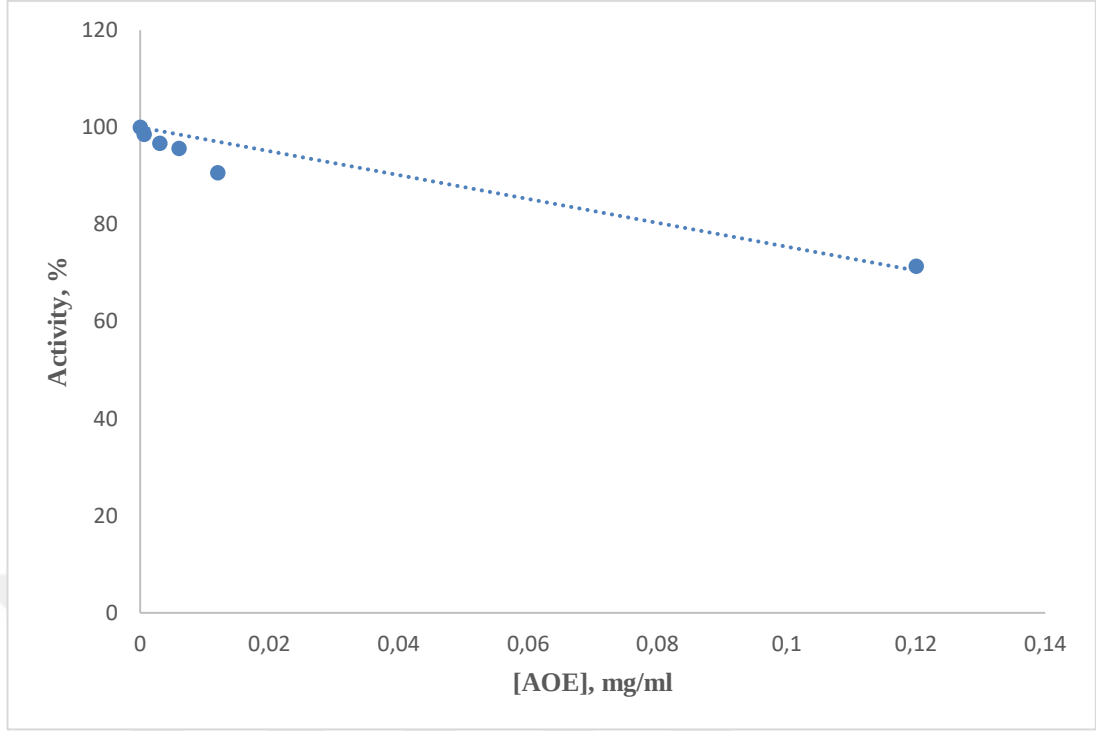
Sonuçlar, bitki ekstrelerinin hCA I enzim inhibitesi üzerindeki etkilerini göstermektedir (Şekil 6.45).



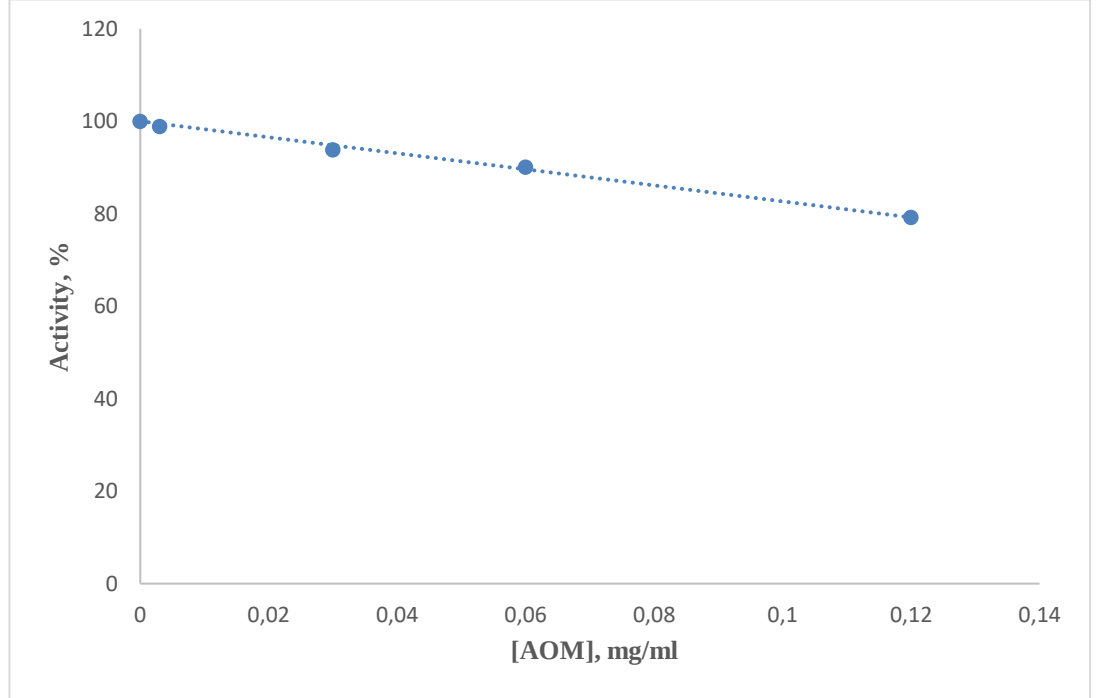
Şekil 6.45. hCA I enzim inhibisyonu sonuçları.

İnhibisyon etkisi gösteren tüm ekstrelerin 0.0006 - 0.12 konsantrasyon aralığında % enzim inhibisyonu hesaplanmıştır. TAE, TAM, TAK, TAP, AOE, AOM, AOK ve AOP değerleri sırasıyla (% 59.21, % 76.11, % 77.38, % 88.66, % 75.85, % 78.4, % 54.5, % 96.24) inhibisyonu neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara göre hCA I enzimini *in vitro* olarak inhibe etme potansiyeli en yüksek olan ekstre AOP elde edilen ekstre olduğu belirlenmiştir.

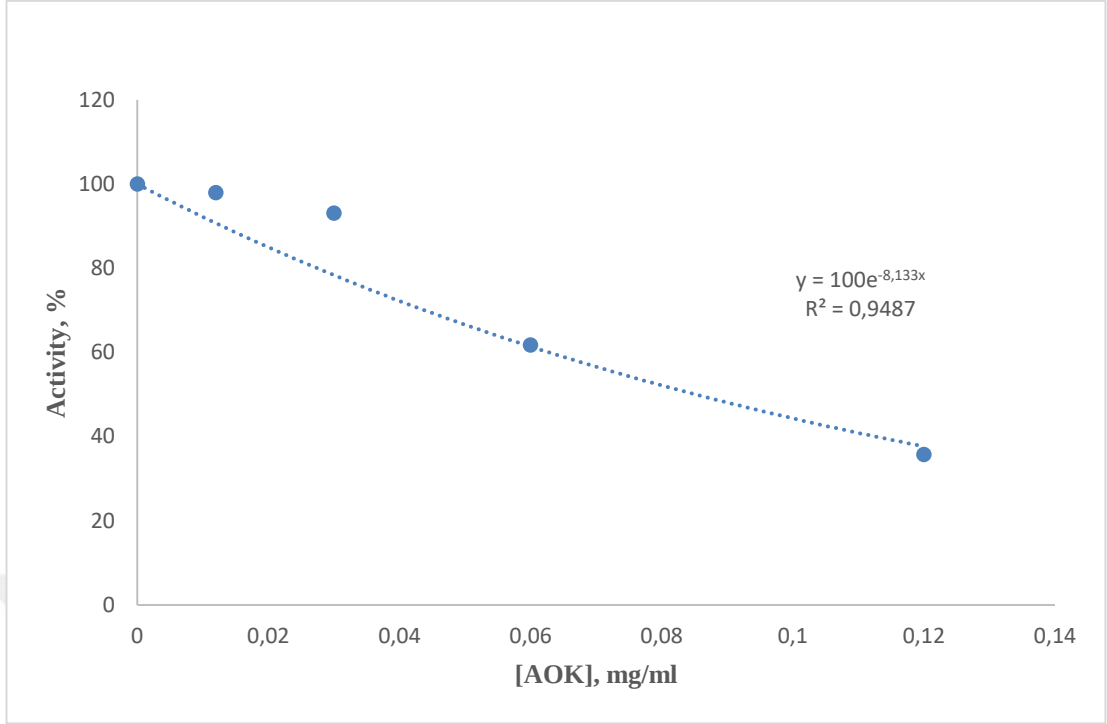
Ekstrelerin hCA II enzimi için konsantrasyona karşı Aktivite (%) grafikleri Şekil (6.46 - 6.53)'da gösterilmiştir.



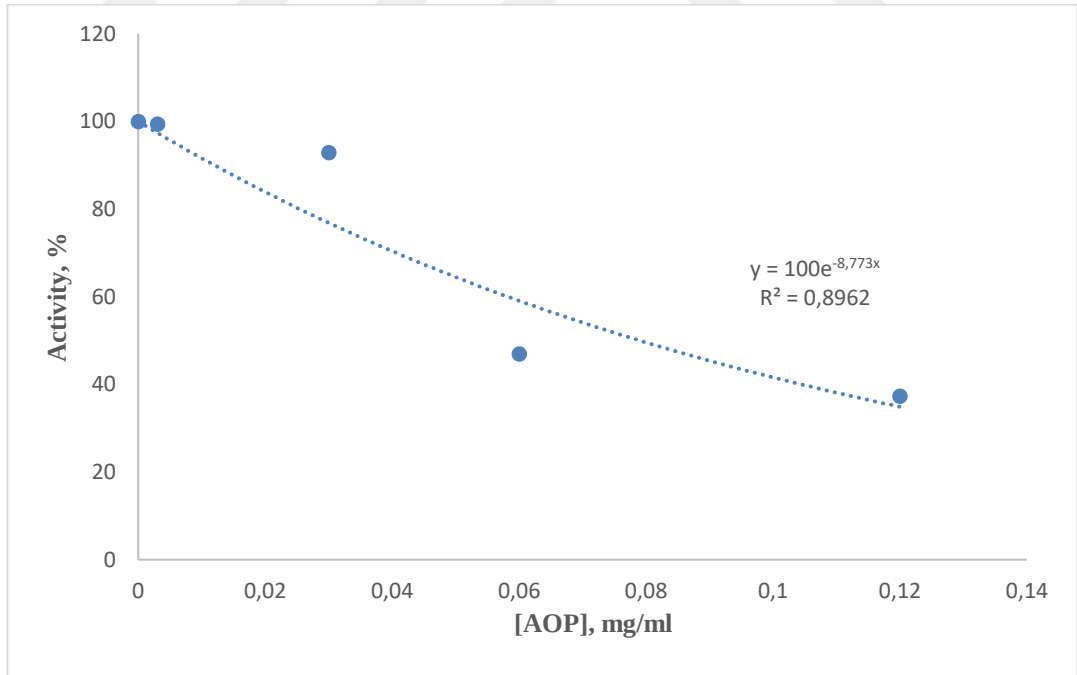
Şekil 6.46. AOE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.



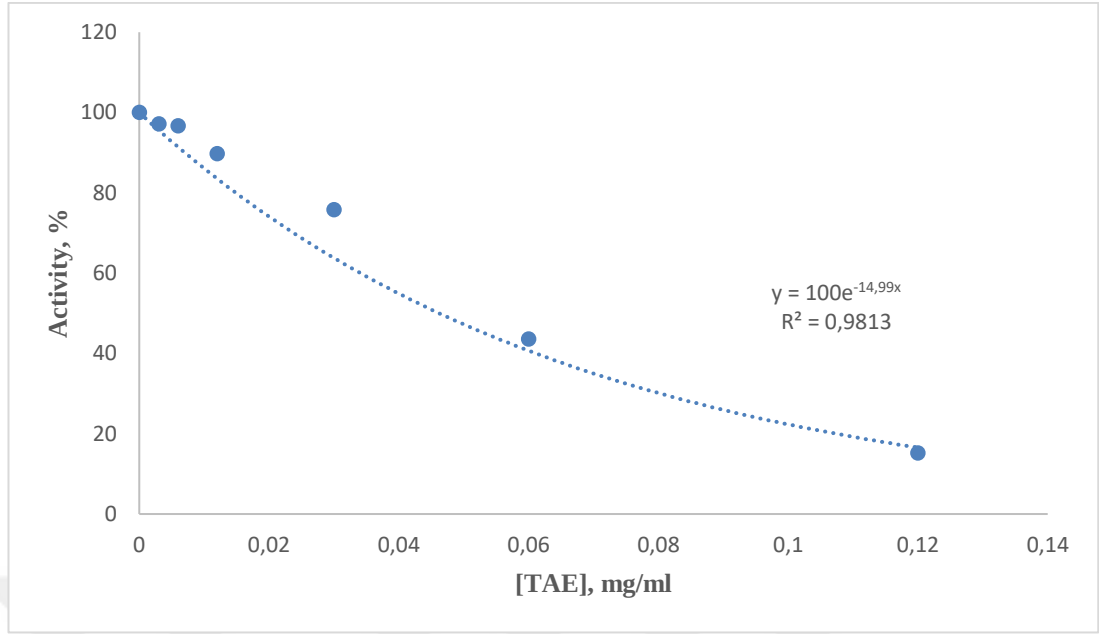
Şekil 6.47. AOM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.



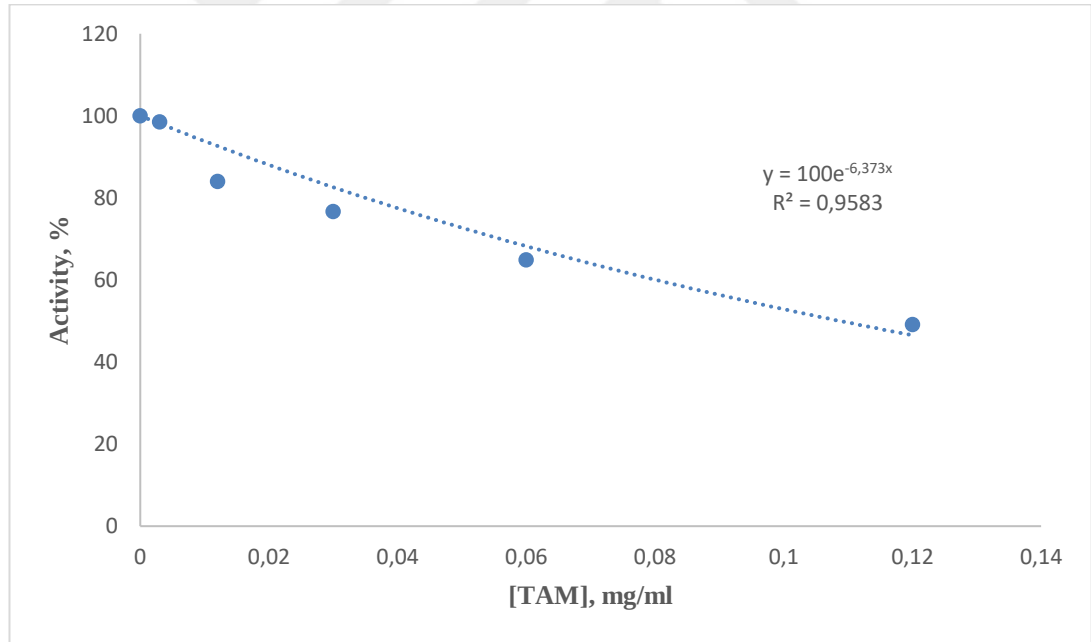
Şekil 6.48. AOK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.



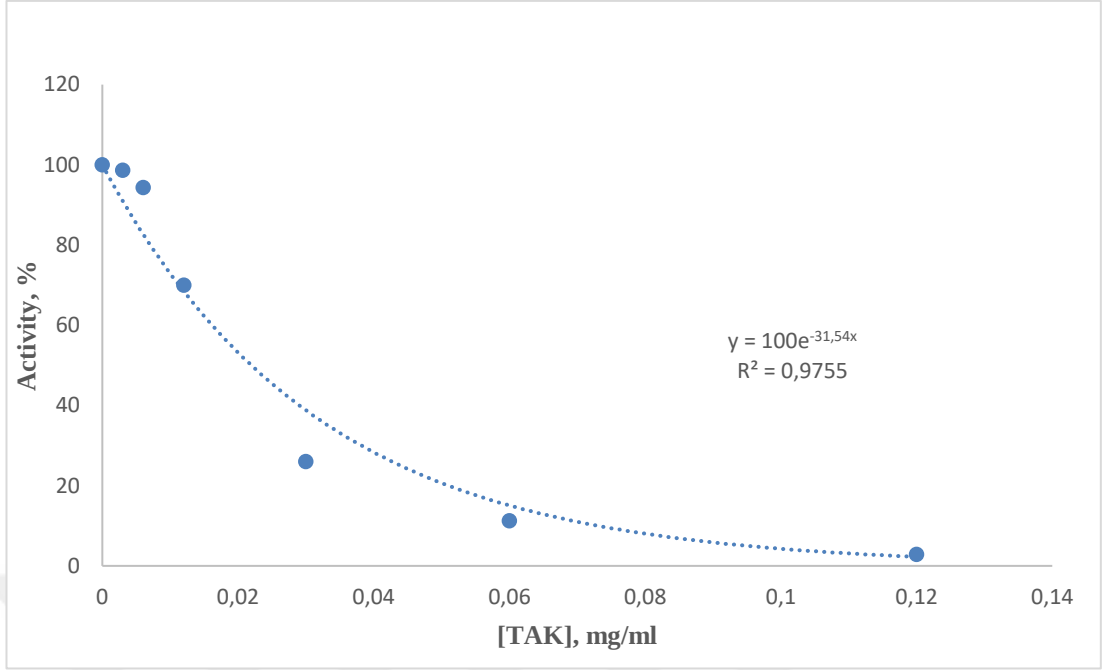
Şekil 6.49. AOP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.



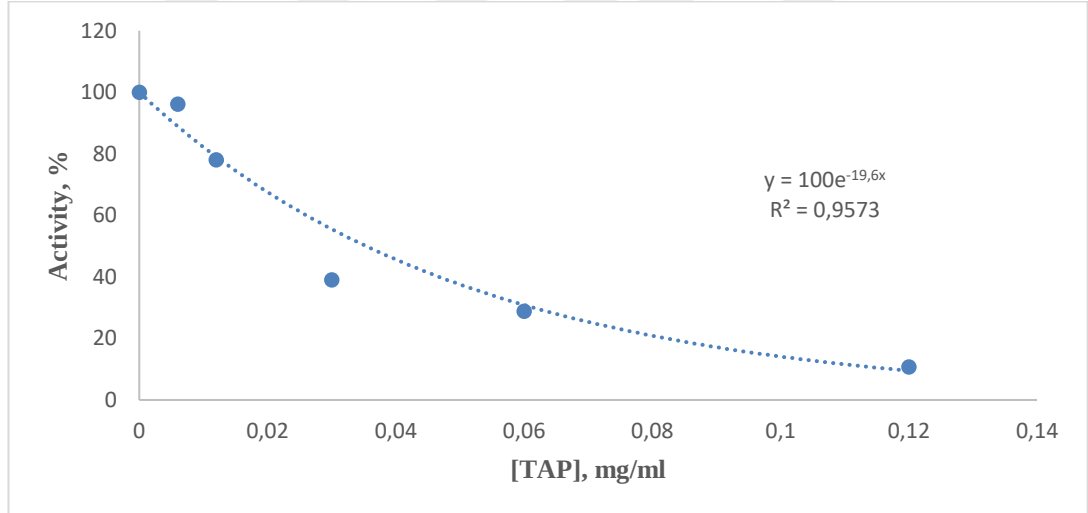
Şekil 6.50. TAE Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.



Şekil 6.51. TAM Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.



Şekil 6.52. TAK Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.



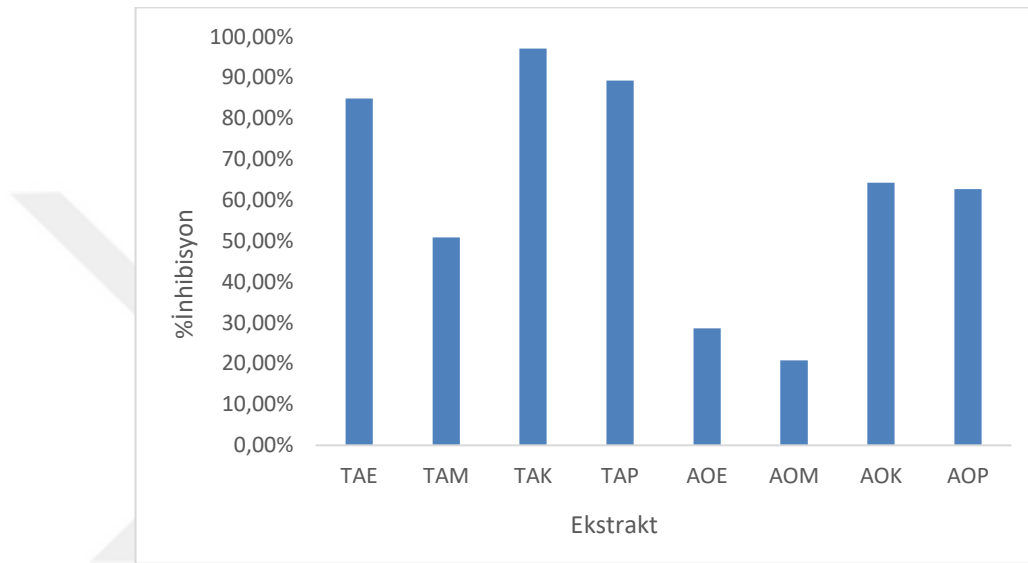
Şekil 6.53. TAP Ekstrelerin konsantrasyona karşı hCA II enzim inhibisyonu (%) grafiği.

Tez kapsamında çalışılan ekstrelerin 0.0006 - 0.12 konsantrasyon aralığında % hCA II enzim inhibisyonu sonuçları %50'nin Çizelge 6.9'de verilmiştir.

Çizelge 6.9. Ekstrelerin hCa II enzim inhibisyonu sonuçları.

Bitki ek.	TAE	TAM	TAK	TAP	AOE	AOM	AOK	AOP
%İnhibisyon	% 84.85	% 50.91	% 97.13	% 89.28	% 28.65	% 20.78	% 64.29	% 62.70
IC ₅₀ (µg/ml)	46.24	108.76	21.98	35.36	-	-	85.23	79.01

Sonuçlar, bitki ekstrelerinin hCA II enzim inhibitesi üzerindeki etkilerini göstermektedir (Şekil 6.54).

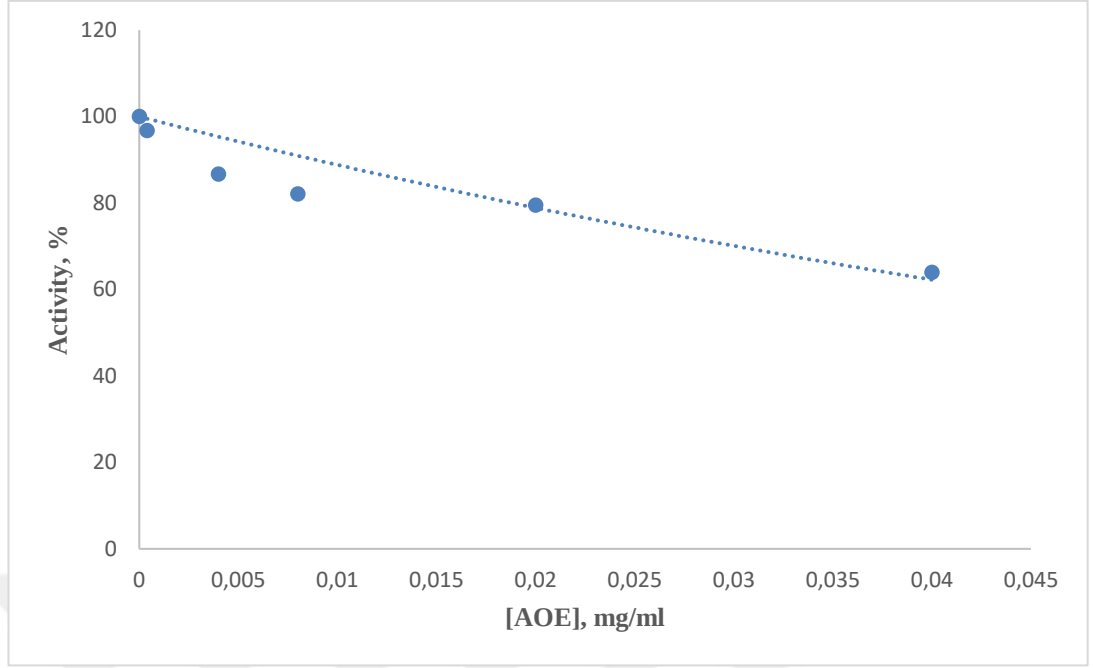


Şekil 6.54. hCA II enzim inhibisyonu sonuçları.

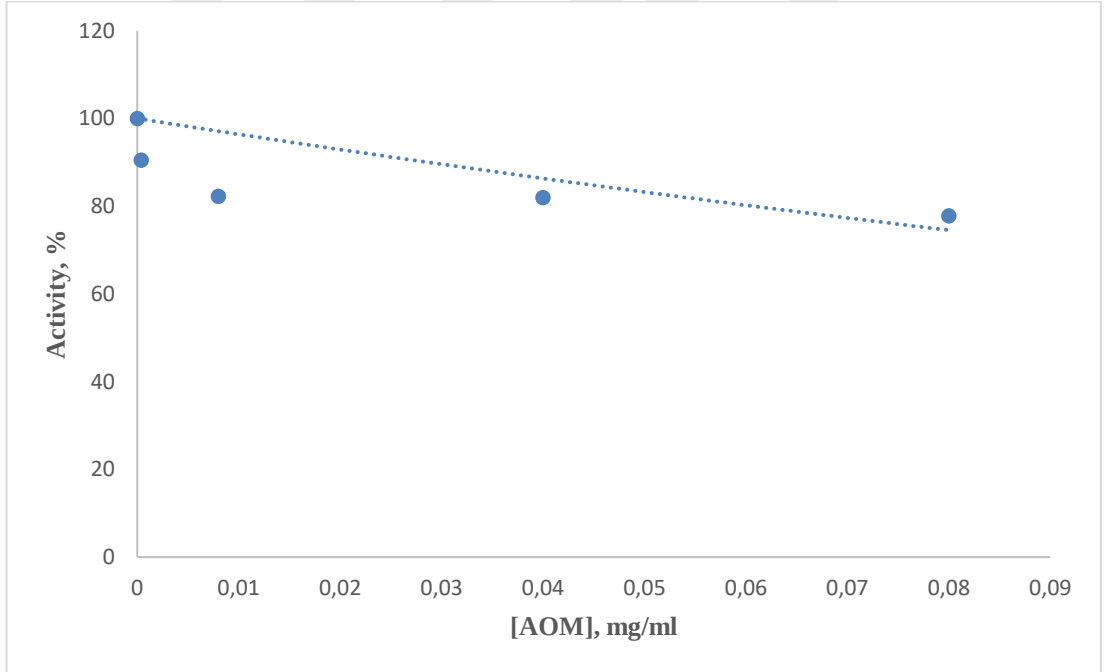
İnhibisyon etkisi gösteren tüm ekstrelerin 0.0006 - 0.12 konsantrasyon aralığında % enzim inhibisyonu hesaplanmıştır. TAE, TAM, TAK, TAP, AOE, AOM, AOK ve AOP değerleri sırasıyla (% 84.85, % 50.91, % 97.13, % 89.28, % 28.65, % 20.78, % 64.29, % 62.70) inhibisyonu neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgular uyarınca hCA II enzimini *in vitro* olarak inhibe etme potansiyeli en yüksek olan ekstrenin TAK olduğu belirlenmiştir.

6.3.4. AChE Aktivite Ölçüm Sonuçları

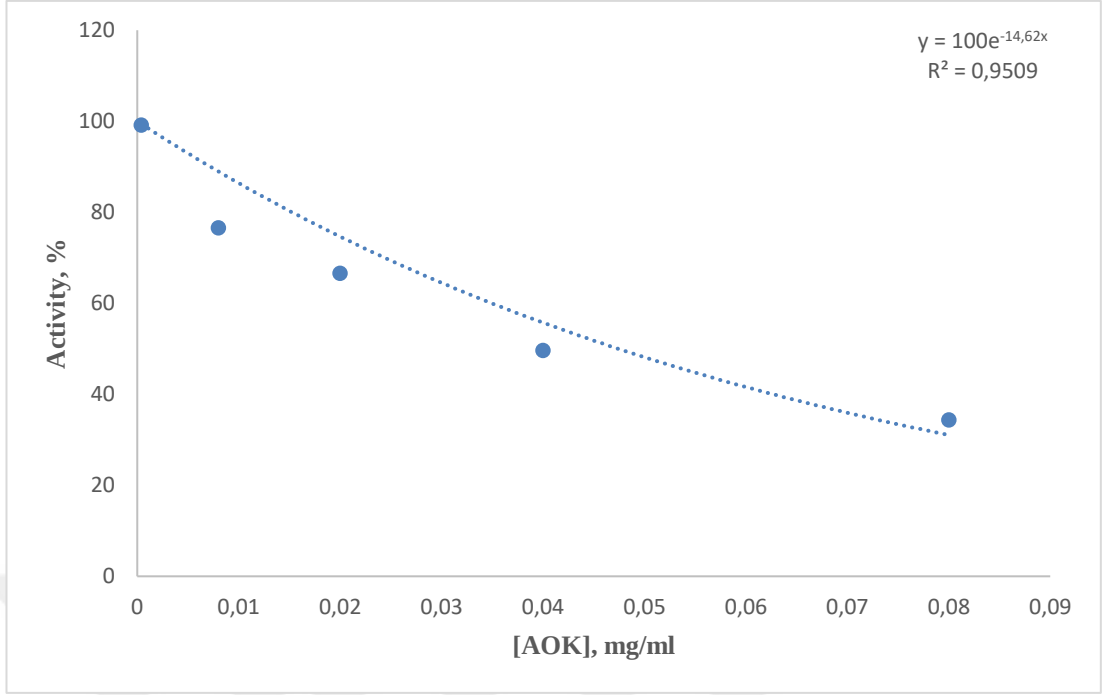
Bitkileri ekstrelerinin asetilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine etkileri çalışılmıştır. Her bir bitki ekstraktı için ekstrakt konsantrasyonları % Aktiviteye karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 6.55 -) ve her bir bitki ekstresinin 0.001 - 0.2 mg/mL konsantrasyon aralığında %50 α -glukozidaz enzim inhibisyonunu hesaplanmıştır.



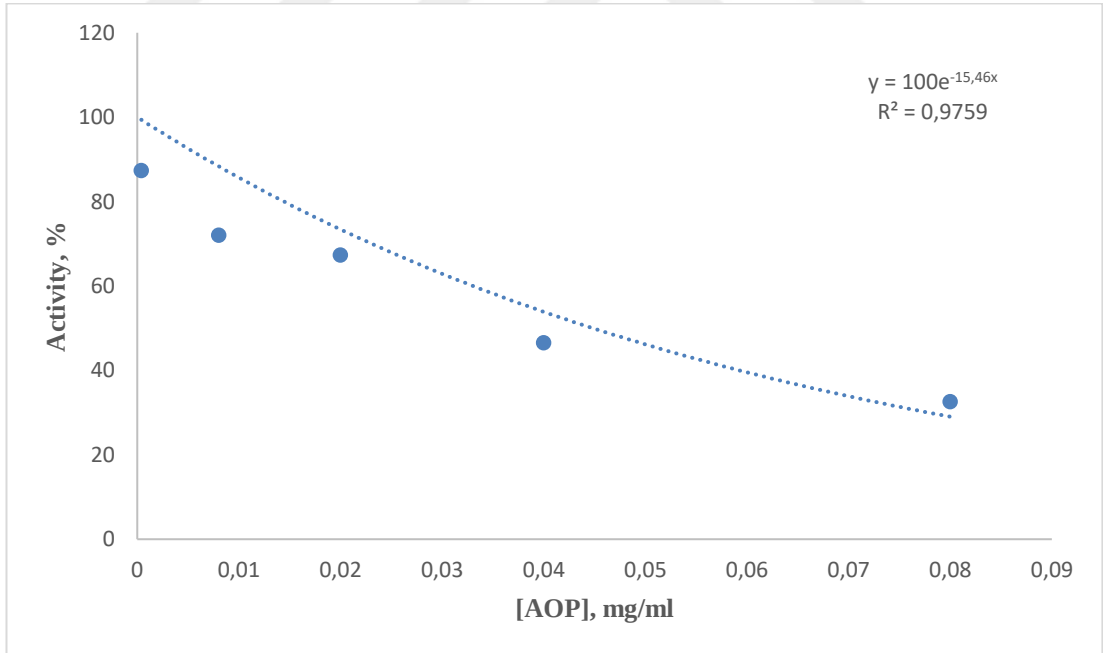
Şekil 6.55. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



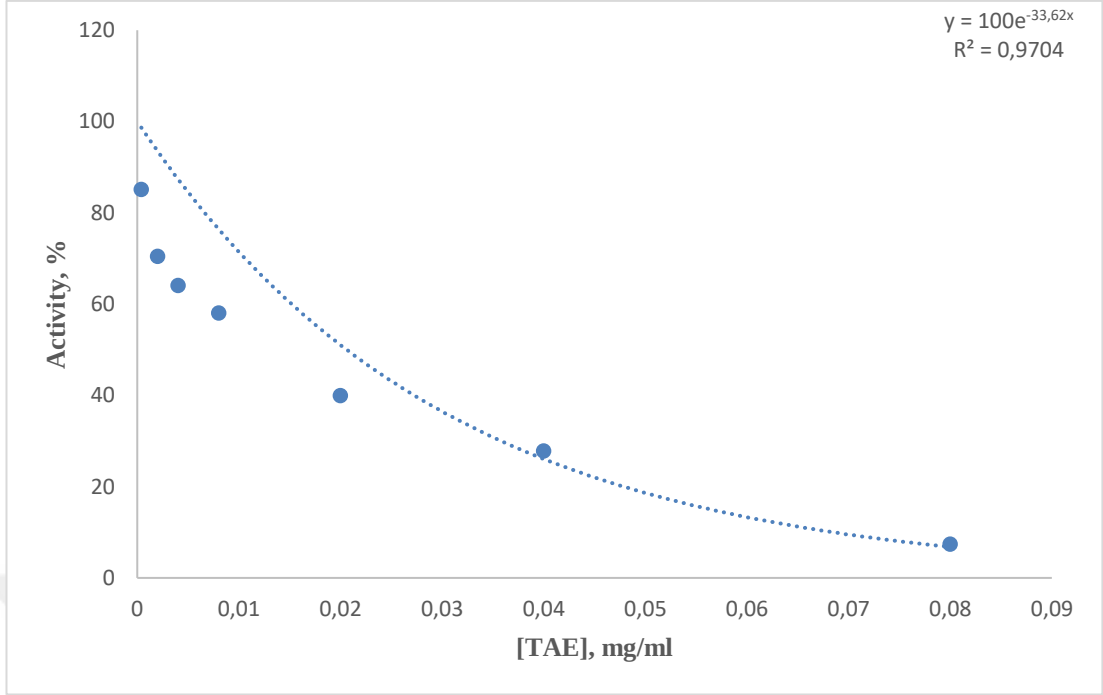
Şekil 6.56. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOM ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



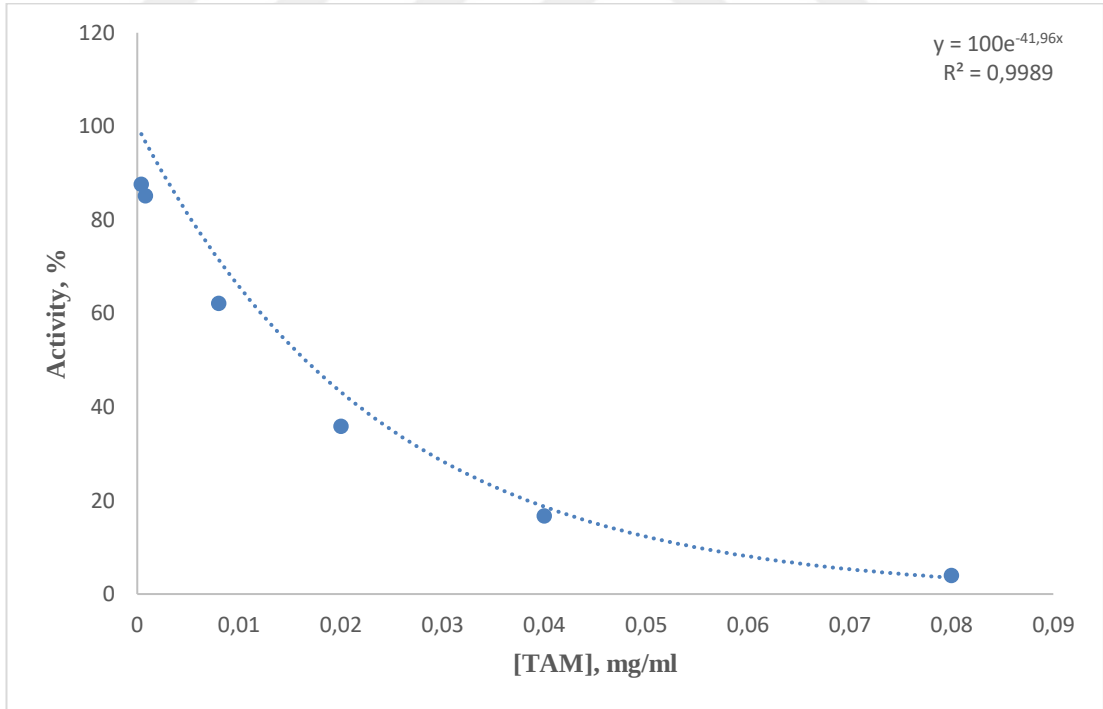
Şekil 6.57. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOK ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



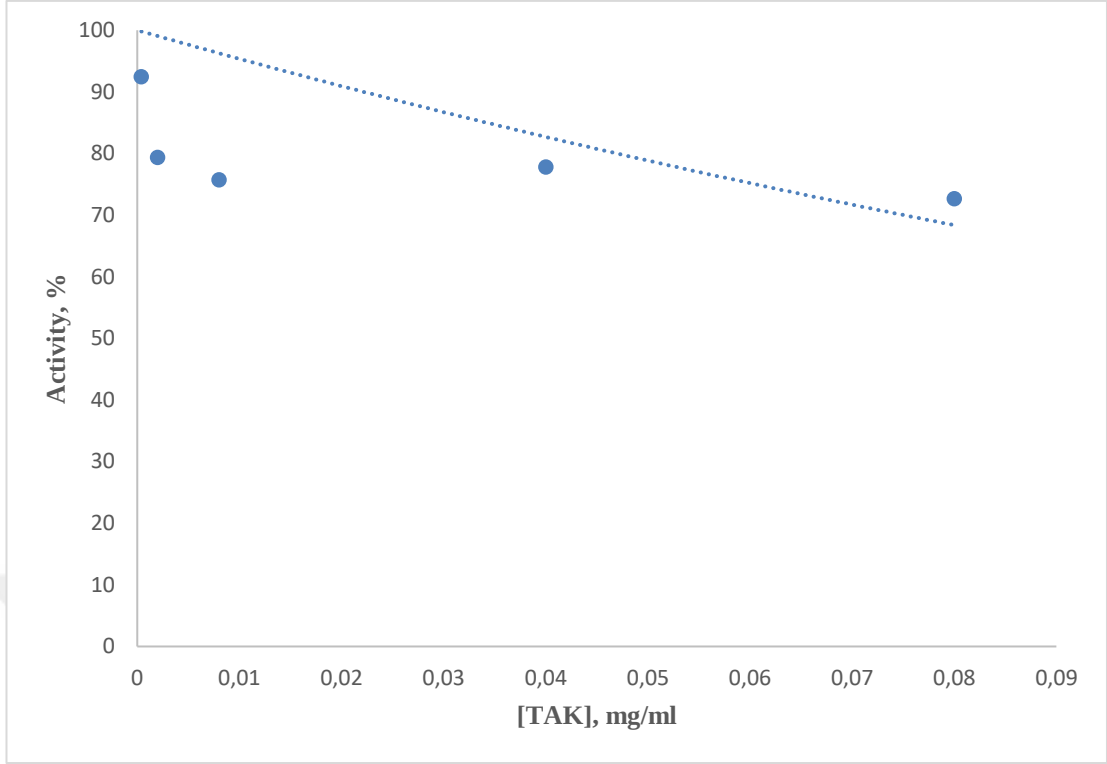
Şekil 6.58. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren AOP ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



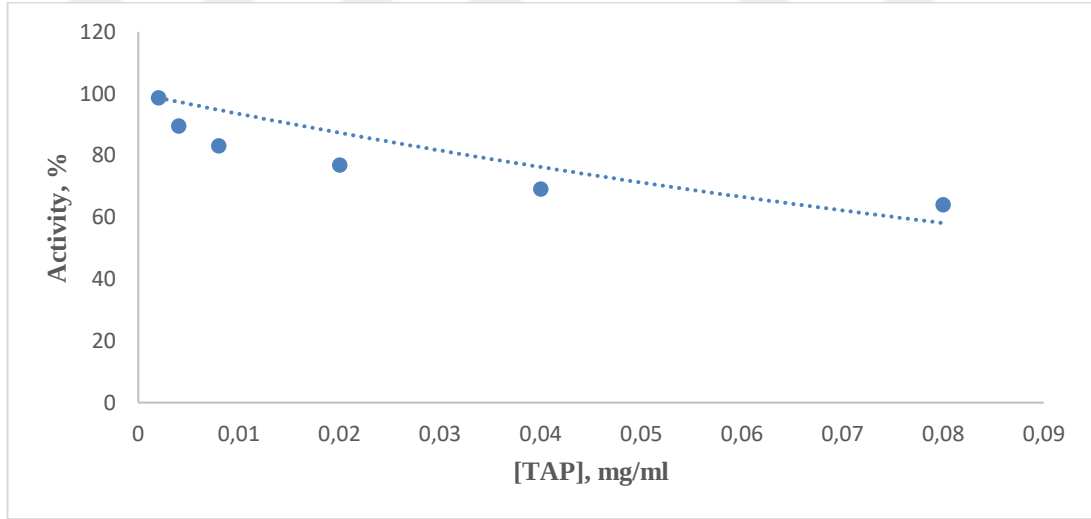
Şekil 6.59. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAE ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



Şekil 6.60. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAM ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



Şekil 6.61. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAK ekstreleri için aktivite (%) grafiği.



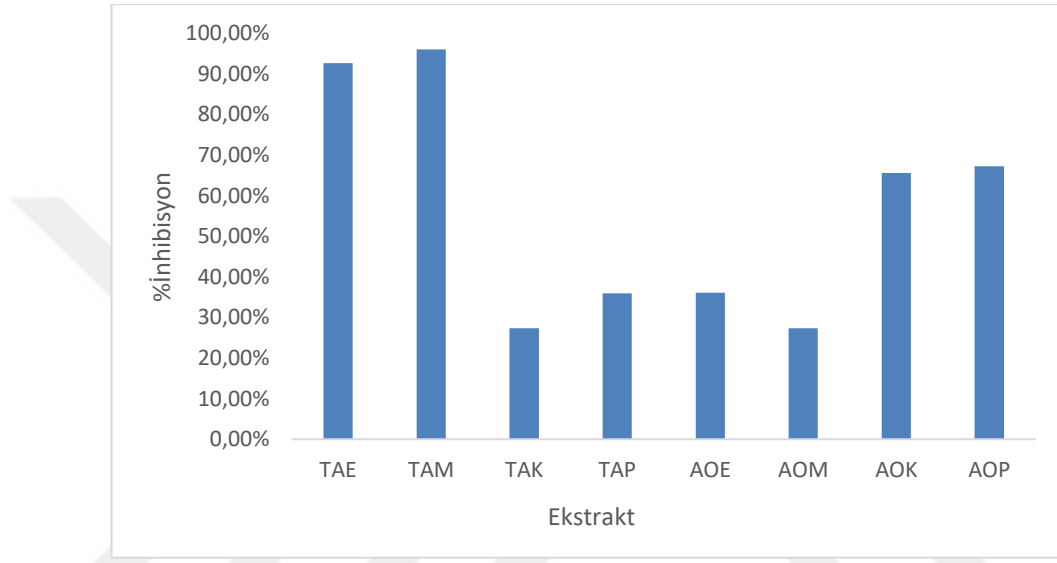
Şekil 6.62. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren TAP ekstreleri için aktivite (%) grafiği.

Tez kapsamında çalışılan ekstrelerin 0.0004 - 0.08 konsantrasyon aralığında % AChE enzim inhibisyonu sonuçları %50'nin Çizelge 6.10'de verilmiştir.

Çizelge 6.10. Ekstrelerin AChE enzim inhibisyonu sonuçları.

Bitki ek.	TAE	TAM	TAK	TAP	AOE	AOM	AOK	AOP
%İnhibisyon	% 92.65	% 96.08	% 27.37	% 35.93	% 36.08	% 27.16	% 65.64	% 67.42
IC ₅₀ (µg/ml)	20.62	16.52	-	-	-	-	47.41	44.83

Sonuçlar, bitki ekstrelerinin hCA II enzim inhibitesi üzerindeki etkilerini göstermektedir (Şekil 6.54).



Şekil 6.63. AChE enzim inhibisyonu sonuçları.

İnhibisyon etkisi gösteren tüm ekstrelerin 0.0004 - 0.08 konsantrasyon aralığında % enzim inhibisyonu hesaplanmıştır. TAE, TAM, TAK, TAP, AOE, AOM, AOK ve AOP değerleri sırasıyla (% 92.65, % 96.08, % 27.37, % 35.93, % 36.08, % 27.37, % 65.64, % 67.42) inhibisyonu neden olmasını göstermiştir. Bu bulgulara göre AChE enzimini *in vitro* olarak inhibe etme potansiyeli en yüksek olan ekstrenin TAM olduğu belirlenmiştir.

6.4. LC-MS/MS KROMATOĞRAFİSİ İLE ELDE EDİLEN SONUÇLARI

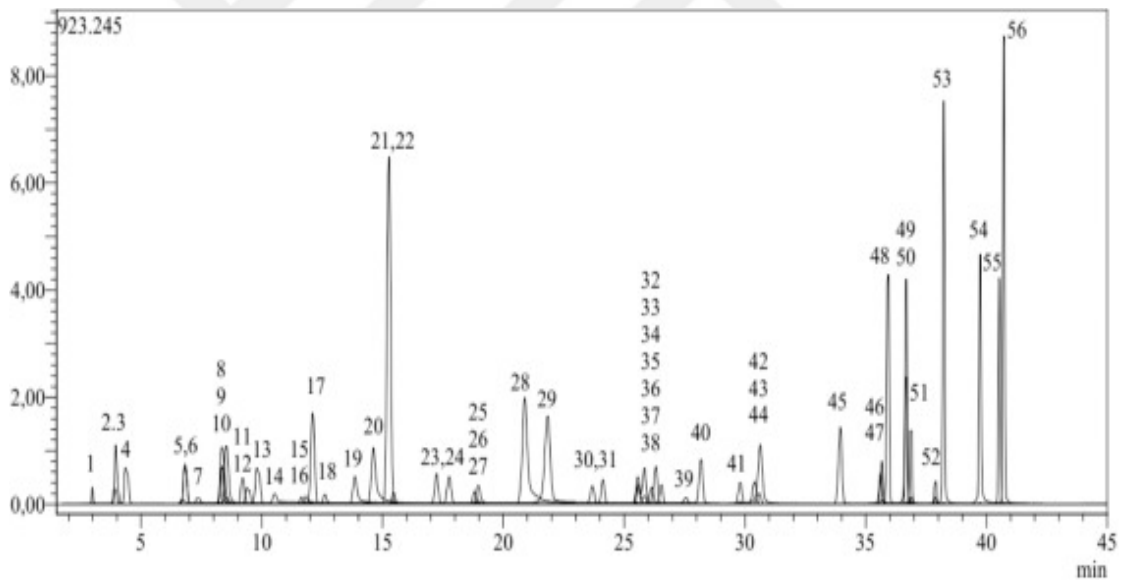
6.4.1. Yöntem Doğrulama Çalışmaları

Yılmaz (2020) tarafından geliştirilen LC-MS/MS yönteminin analitik doğrulama çalışmaları, yöntemin güvenilirliğini ve doğruluğunu değerlendirmek için bir dizi

parametre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu parametreler arasında günler arası ve gün içi hassasiyet (tekrarlanabilirlik), doğruluk (geri kazanım), doğrusallık gibi temel performans özellikleri yer almaktadır.

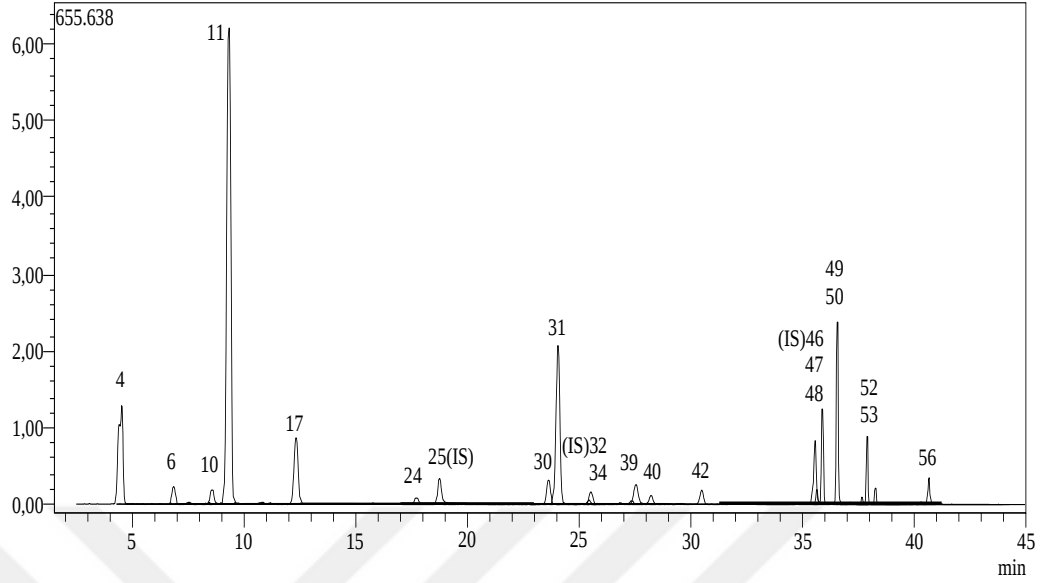
6.4.2. 53 Fitokimyasalın LC-MS/MS Tespiti

Tamarix arabica bitkisini incelemek için onaylanmış LC-MS/MS yöntemi kullanıldı. *Tamarix*'in metanol ekstraktında geliştirilen yöntemle kullanılan 53 fitokimyasaldan çok sayıda fenolik bileşik (50) ve fenolik olmayan bileşik (3) varlığı araştırıldı. Şekil 6.64 ve 6.65'teki 53 standart fitokimyasalın LC-MS/MS-TIC (toplam iyon kromatogramları) kromatogramlarını ve *Tamarix*'in metanol ekstraktını göstermektedir. *Tamarix arabica* ekstraktının ilgili LC-MS/MS kantitatif analiz verileri Çizelge 6.19'da sunulmaktadır.



Şekil 6.64. Standart fenolik bileşiklerin TIC (Toplam İyon Kromatogramı) kromatogramı (67).

(x100.000)



Şekil 6.65. *Tamarix arabica* ekstraktının geliştirilmiş LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilen TIC (Toplam İyon Kromatogramı) kromatogramı.

Çizelge 6.11. *Tamarix arabica*'nın metanol ekstraktındaki fitokimyasalların LC-MS/MS (mg/g ekstrakt) ile kantitatif taranması.

Analitler	TAM ekstresinin fenolik bileşik miktarları (mg/g)
Quinic acid / Kinik asit	Algılanmadı
Fumaric acid / Fumarik asit	Algılanmadı
Aconitic acid / Akonitik asit	Algılanmadı
Gallic acid / gallik asit	5.029
Epigallocatechin / Epigallokateşin	Algılanmadı
Protocatechuic acid / Protokatekuik asit	0.826
Catechin / Kateşin	Algılanmadı
Gentisic acid / Gentisik asit	Algılanmadı
Chlorogenic acid / Klorojenik asit	Algılanmadı
Protocatechuic aldehyde / Protokatekuik aldehit	0.398
Tannic acid / Tannik asit	16.653
Epigallocatechin gallate / Epigallokatekin galat	Algılanmadı
Cynarin / sinarin	Algılanmadı
4-OH Benzoic acid / 4-OH Benzoik asit	Algılanmadı
Epicatechin / Epikateşin	Algılanmadı
Vanillic acid / Vanilik asit	Algılanmadı
Caffeic acid / Kafeik asit	0.638
Syringic acid / Şıringa asidi	Algılanmadı
Vanillin / Vanilin	Algılanmadı
Syringic aldehyde / Şıringa aldehit	Algılanmadı
Daidzin / Daidzin	Algılanmadı
Epicatechin gallate / Epikateşin galat	Algılanmadı
Piceid / Piceid	0.293

p-Coumaric acid / p-Kumarik asit	Uygulanamaz
Ferulic acid-D3-Ish / Ferulik asit-D3-ISh	Algılanmadı
Ferulic acid / Ferulik asit	Algılanmadı
Sinapic acid / Sinapik asit	Algılanmadı
Coumarin / Kumarin	Algılanmadı
Salicylic acid / Salisilik asit	Algılanmadı
Cyranoside / sinarosit	1.03
Miquelianin	10.082
Rutin-D3-IS	Uygulanamaz
Rutin	Algılanmadı
Isoquercitrin / izokersitrin	0.812
Hesperidin	Algılanmadı
o-Coumaric acid / o-Kumarik asit	Algılanmadı
Genistin	Algılanmadı
Rosmarinic acid / Rosmarinik asit	Algılanmadı
Ellagic acid / Ellagik asit	12.618
Cosmosiin / kozmosin	0.359
Quercitrin / Kuersitrin	Algılanmadı
Astragalin	0.896
Nicotiflorin / Nikotiflorin	Algılanmadı
Fisetin	Algılanmadı
Daidzein	Algılanmadı
Quercetin-D3-IS	Uygulanamaz
Quercetin / Kuersetin	0.41
Naringenin	0.52
Hesperetin	0.021
Luteolin	0.608
Genistein	Algılanmadı
Kaempferol	0.436
Apigenin	0.152
Amentoflavone	Algılanmadı
Chrysin / Krizin	Algılanmadı
Acacetin / akasetin	0.166

Tamarix arabica bitkisinin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatografisi ile belirlenen kromatografik sonuçlara göre, en fazla bulunan fenolik bileşiklerin miktarları şu şekildedir: tannik asit (16.653 mg/g ekstre), ellagik asit (12.618 mg/g ekstre) ve miquelianin (10.082 mg/g ekstre).

Bu sonuçlara göre, *Tamarix arabica* bitkisinin metanol ekstresinde en yüksek konsantrasyona sahip olan fenolik bileşik tannik asittir. Onu sırasıyla ellagik asit ve miquelianin takip etmektedir. Bu bulgular, bitkinin potansiyel biyoaktif bileşenleri hakkında önemli bilgiler sağlayabilir ve bitkinin potansiyel sağlık yararları veya endüstriyel kullanım alanları hakkında bilgi verebilir.

BÖLÜM 7

TARTIŞMA

Şifalı bitkiler, eski çağlardan beri çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde ve toplumun gelişmesinde hayati bir rol oynamıştır [68]. Günümüzde insan organizmalarına gıda bileşeni olarak veya spesifik koruyucu ilaç olarak sağlanan, antioksidan özellikler sergileyen maddelere artan bir ilgi vardır. Sonuç olarak, antioksidanlar gıda koruma teknolojisinin ve çağdaş sağlık hizmetlerinin önemli bir parçası haline gelmiştir. Antioksidatif ve farmakolojik özelliklere sahip olan bitkilerin fenolik bileşiklerin, özellikle fenolik asitlerin ve flavonoidlerin varlığıyla ilişkili olduğu iyi bilinmektedir [36]. Fenolikler veya polifenoller antioksidan, antitümör, antiaterojenik ve kardiyoprotektif dahil olmak üzere önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Önceki araştırmalar *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica*'nın ana etken maddesinin fenoller ve polifenolikler olduğunu ortaya çıkarmıştı [8,24]. Bu çalışmada *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica*'nın ekstraktları TFMM belirlendi. TFMM değerleri mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/1gram ekstre cinsinden ifade edildi. Sonuçlar, TFMM değerlerinin şu sırayla azaldığını göstermektedir: TAE (111.706349 ± 15.13279 mg GAE/1 g ekstre) > TAK (105.489418 ± 23.41298 mg GAE/1 g ekstre) > TAM (105.357143 ± 16.07143 mg GAE/1 g ekstre) > AOK (40.0793651 ± 7.856742 mg GAE/1 g ekstre) > AOM (34.5238095 ± 3.600703 mg GAE/1 g ekstre) > TAP (23.4126984 ± 0.687322 mg GAE/1 g ekstre) > AOE (21.6269841 ± 2.812985 mg GAE/1 g ekstre) > AOP (13.9880952 ± 2.678576 mg GAE/1 g ekstre). Bu değerler, bitkisel ekstraktların toplam fenolik bileşik içeriği açısından farklılık gösterdiğini ve bu bitkilerin potansiyel olarak antioksidan ve diğer biyolojik aktiviteler sergileyebileceklerini göstermektedir.

Üzerine araştırma yapılan bitkilerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için; Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi (FRAP metodu), Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (CUPRAC metodu), ABTS•+ radikal giderme aktivitesi ve DPPH• radikal giderme aktivitesi kullanıldı. Birçok rapor, doğal bitki ekstraktlarının indirgeme gücünün antioksidan

aktiviteleriyle ilişkili olabileceğini göstermiştir [36,37]. Doğal bir bitki ekstraktının antioksidan etkisi ile indirgeme gücü arasındaki ilişkinin aydınlatılması için indirgeme gücünün araştırılması gerekmektedir. Antioksidan maddelerin indirgeme kapasitesini belirlemek için bu tez kapsamında kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgeme kapasitesine göre CUPRAC metodu ve Fe^{3+} -TPTZ indirgeme aktivitesine göre FRAP metodu olmakla iki farklı metotla çalışıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, bu yöntemlerde numunelerin konsantrasyonunun atması ile indirgeme kapasitesinin arttığı belirlendi. FRAP analizi, bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesini değerlendirmek için kullanılır. Örneklerdeki antioksidan miktarı, Fe^{2+} eşdeğeri ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ örnek gibi) şeklinde ifade edilmiştir. Yüksek Fe^{2+} eşdeğerleri, yüksek antioksidan kapasiteyi gösterir. [38,39]. Bu çalışmada, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica*'nın ekstraktlarının ferrik iyon azaltıcı aktiviteleri $\mu\text{mol Fe (II)}/\text{mg}$ ekstrakt olarak hesaplandı. FRAP değerlerinin sonucu benzer bir sıra gösterdi: TAE (1 mg ekstrakt 1.69 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) > TAK (1 mg ekstrakt 1.17 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) > TAM (1 mg ekstrakt 0.83 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) > AOM (1 mg ekstrakt 0.36 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) > AOE (1 mg ekstrakt 0.24 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) > TAP (1 mg ekstrakt 0.23 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) > AOK (1 mg ekstrakt 0,18 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri) > AOP (1 mg ekstrakt 0.021 mikromol Fe^{2+} eşdeğeri). CUPRAC metodunda kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar GA, BHT ve Troloks gibi gıda ve ilaç endüstrisinde çok fazla kullanılan sentetik antioksidanlarla karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucu tez kapsamında çalışılan bitki ekstraktlarının bakır indirgeme kapasitesinin sentetik antioksidanlardan düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda ekstraktlar ve standartların bakır iyonlarını indirgeme gücü tüm konsantrasyonlarda GA > BHA > Troloks > TAE > TAK > TAM > AOM > AOE > TAP > AOK > AOP şeklinde azalmaktadır. Bu sonuçlara göre, TAE ekstraktının en güçlü antioksidan aktiviteyi gösterdiği ve genel olarak *Adenium obesum* bitkisinin daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu söylenebilir.

Antioksidan kapasite belirlemek amacıyla kullanılan metotları hidrojen atomu transferi ve elektron transferi mekanizmasına dayanan metotlar olarak sınıflandırmak mümkündür [27]. Literatürde çok sayıda antioksidan kapasite metodu bulunmakta olup bu çalışmada kullanılan DPPH ve ABTS metodu elektron transferi mekanizmasına dayanan yöntemlerdir [36]. DPPH, doğal antioksidanların serbest radikal süpürme aktivitelerini incelemek için yaygın olarak kullanılan kararlı bir serbest radikaldir [31]. Serbest radikaller vücutta birçok önemli hastalıkta rol oynarlar. Bundan dolayı serbest radikalleri

temizleme gücü önemli bir antioksidan özelliktir [35]. Çalışmamızda *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitki ekstraktlarının beş farklı derişimdeki DPPH radikal süpürme aktivitesi araştırılmıştır. *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinin DPPH radikal giderme aktivitesi konsantrasyonla artmıştır. *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitki ekstraktlarının 0.004 - 0.08 mg/ml konsantrasyon aralığında TAE, TAM, TAK, TAP, AOE, AOM, AOK ve AOP değerleri sırasıyla %89.07, %80.17, %72.91, %21.84, %33.98, %44.93, %19.67, %3.28 kadar DPPH gidermesi sağladığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, TAE ekstraktının en güçlü DPPH radikal süpürme aktivitesini sergilediğini ve *Tamarix arabica*'nın çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstrelerinin de yüksek DPPH radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu gösteriyor. Bu, bitki ekstraktlarının antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve potansiyel olarak serbest radikallerle mücadele edebileceğini düşündürmektedir. ABTS radikal süpürme aktiviteleri deneyi her zaman toplam antioksidan aktiviteler için bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica*'nın ekstraktlarının antioksidan kapasitesi µg Trolox eşdeğeri / µg ekstrakt olarak hesaplandı. En yüksek antioksidan kapasite TAE (1 µg TAE ekstraktı 0,852 µg Trolox eşdeğer) ve TAK (1 µg TAK ekstraktı 0,674 µg Trolox eşdeğer) ekstrelerinde ölçülürken; en düşük değerlere AOP (1 µg AOP ekstraktı 0,0444 µg Trolox eşdeğer) ve AOK (1 µg AOK ekstraktı 0,046 µg Trolox eşdeğer) ekstrelerinde rastlanmıştır. Bu sonuçlar, TAE ve TAK ekstrelerinin diğerlerine göre daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu ve bu bitki ekstraktlarının potansiyel olarak serbest radikallerle mücadelede etkili olabileceğini göstermektedir.

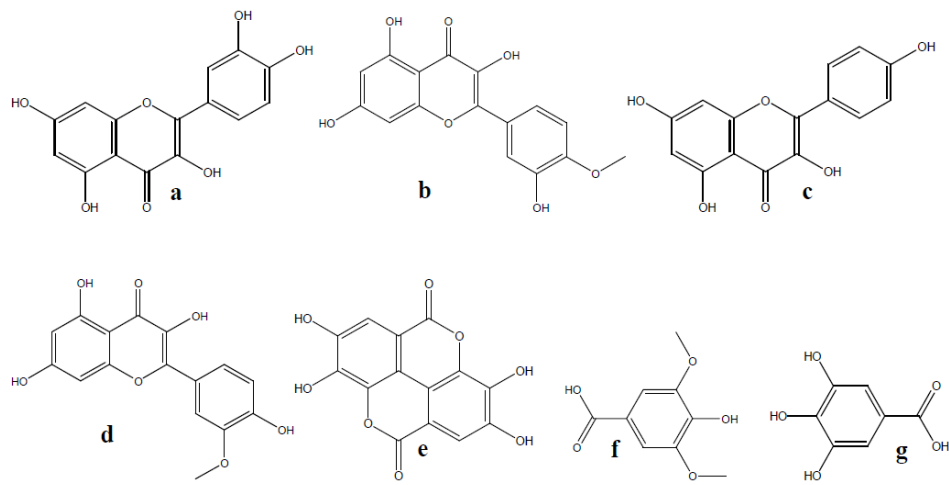
Bu çalışmada; kullanılan bitkisel materyallerin metanol, etanol, kloroform ve petroleteri ile ekstraktlarının alfa-glukozidaz, alfa-amilaz, karbonanik anhidraz ve asetilkolinesteraz enzimleri üzerine etkilerinin olup olmadığı incelenmiştir. Alfa amilaz ve alfa glukozidaz nişastanın parçalanması ve bağırsakta emiliminde ayrı ayrı anahtar enzim konumundadırlar. Bu enzimlerin inhibe edilmeleriyle kandaki glukoz seviyesinin artışında önemli ölçüde azalma olacaktır. Bu durum Tip 2 diyabete bağlı hipergliseminin yönetilmesinde önemli bir strateji olabilir [62]. Tez kapsamında araştırma materyali olarak seçilen *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin in-vitro antihiperglisemik etkileri araştırılmıştır. *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* ekstraktlar enzim aktivasyonu ve inhibisyonu bakımından değerlendirildiğinde; α-amilaz enzimini in vitro olarak aktive etme potansiyeli TAP ekstre en yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, özellikle TAP'nin α-amilaz enzimi üzerinde güçlü bir aktivasyon etkisi

gösterdiğini ve bu bitki ekstresinin potansiyel olarak karbonhidrat sindirimini artırma yeteneği olduğunu düşündürebilir. α -glukozidaz enzimini in vitro olarak inhibe etme potansiyeli TAE ekstre en yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, bu bitki ekstrelerinin potansiyel olarak karbonhidrat metabolizmasını düzenleme yeteneği olduğunu düşündürebilir ve potansiyel tıbbi uygulamalarını değerlendirmek için önemli bilgiler sağlayabilir. Özellikle TAE'nin α -glukozidaz enzimi üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiğini ve bu bitki ekstresinin potansiyel olarak diyabetle ilişkili kan şekerini kontrol etme yeteneği olduğunu düşündürebilir. İleriki çalışmalar, bu bitki ekstrelerinin aktif bileşenlerini ve aktivasyon mekanizmalarını daha ayrıntılı bir şekilde anlamak için yapılabilir.

Alzheimer hastalığının tedavisinde kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır [63] ve bu hastaların beyinde azalmış olan asetilkolin aktivitesi ve miktarını arttırmak amacıyla kolinesteraz inhibitörleri de geniş bir kullanıma sahiptir [64]. Alzheimer hastalarının plazma ve beyin hipokampusunda karbonik anhidraz-II seviyelerinin sağlıklı bireylere göre 1.24 kat arttığı görülmüştür. Bu tespit sonrası, plazma karbonik anhidraz-II seviyeleri ile Alzheimer hastalığı arasında kesin bir ilişki olduğu da gösterilmiştir [65]. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızdaki bitki ekstreleri ve elde edilen moleküllerin her iki aktivite yönünden değerlendirilmesine karar verilmiştir. Karbonik anhidraz (hCA I ve hCA II) enzimlerini inhibe etme potansiyeli, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitki ekstraktları üzerinde değerlendirilmiş ve 0.0006 - 0.12 konsantrasyon aralığında elde edilen % enzim inhibisyonu aşağıdaki gibidir: hCA I Enzim İnhibisyonu için; (TAE: %59.21, TAM: %76.11, TAK: %77.38, TAP: %88.66, AOE: %75.85, AOM: %78.4, AOK: %54.5, AOP: %96.24) ve hCA II Enzim İnhibisyonu için; (TAE: %84.85, TAM: %50.91, TAK: %97.13, TAP: %89.28, AOE: %28.65, AOM: %20.78, AOK: %64.29, AOP: %62.70). Bu sonuçlara göre, özellikle hCA I enzimini in vitro olarak en etkili şekilde inhibe eden bitki ekstresinin AOP olduğu, hCA II enzimini inhibe etme potansiyeli en yüksek olan ekstre ise TAK olduğu belirlenmiştir. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimini inhibe etme potansiyeli, *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitki ekstraktları üzerinde değerlendirilmiş ve 0.0004 - 0.08 konsantrasyon aralığında elde edilen % enzim inhibisyonu aşağıdaki gibidir: (TAE: %92.65, TAM: %96.08, TAK: %27.37, TAP: %35.93, AOE: %36.08, AOM: %27.37, AOK: %65.64, AOP: %67.42). Bu sonuçlara göre, AChE enzimini in vitro olarak en etkili şekilde inhibe eden bitki ekstresinin TAM olduğu belirlenmiştir. AChE inhibisyonu, sinir iletimi ile ilgili bir enzimin kontrol altına

alınması bakımından önemli olabilir ve bu tür potansiyel etkiler, bitki ekstraktlarının sinir sistemi sağlığı üzerindeki olası etkilerini anlamak için değerlendirilebilir.

Polifenolik bileşikler, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve antimikrobiyal etkiler gibi köklü biyolojik özelliklere sahip önemli bir fitokimyasal kategorisidir [66]. Flavonoidler, tanenler, fenolik asitler ve lignanlar gibi farklı alt gruplar altında sınıflandırılırlar. Şekil 7.1’de en önemli *Tamarix* spp.’nin fitokimyasallarının yapısını göstermektedir [24].



Şekil 7.1. *Tamarix* spp.’nin en önemli fitokimyasallarının yapısı. a: quercetin, b: tamarixetin, c: kaempferol, d: isorhamnetin, e: ellagik asit, f: siringik asit, g: gallik asit.

Tamarix flavonoidlerinin çoğu flavonol yapıya sahiptir, yani sabit 3 hidroksiflavon yapısına sahiptirler; naringenin gibi flavanonlar ve diğer flavonoid yapıların varlığı ise sınırlı görünmektedir. *Tamarix* türleri her üç yapıya da sahip birkaç fenolik asit içerir. Bu bitkilerin neredeyse tüm kısımları fenolik asitler içerir; ancak odunsu kısımlarda tanımlamaları daha baskındır. Kafeik asit, ellagik asit, ferulik asit, gallik asit, p-kumarik asit ve siringik asit, daha önce kanıtlanmış farmakolojik ve biyolojik aktiviteleri olan, *Tamarix* türlerinde yaygın olarak bulunan ve dolayısıyla bu bitkinin tedavi edici özelliklerinde rol oynayabilen, iyi bilinen fenolik asitlerdir [25]. Bu çalışmada, *Tamarix arabica* metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatografisi ile belirlenen fenolik bileşikler tayin edilmiş. Kromatografik metot sonucu fenolik bileşik

miktarları en fazla bulunan üç fenolik bileşik sırasıyla tannik asit (16.653 mg/g ekstre), ellagik asit (12.618 mg/g ekstre) ve miquelianin (10.082 mg/g ekstre) olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, tannik asit, Ellagik asit ve Miquelianin'in en baskın fenolik bileşikler olduğu belirlenmiştir. Bu bileşikler, *Tamarix* türlerinin farmakolojik ve biyolojik aktivitelerinden sorumlu olabilir ve bitkinin tedavi edici özelliklerine katkıda bulunabilir. Fenolik asitler, antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser gibi çeşitli biyolojik etkilerle ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, bitkinin biyolojik özellikleri ve potansiyel terapötik kullanımları hakkında değerli bir anlayış sağlar. Ayrıca, fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının belirlenmesi, bitkinin hangi özelliklerinin öne çıktığını ve hangi potansiyel sağlık yararlarının bulunduğunu anlamamıza yardımcı olabilir.

BÖLÜM 8

SONUÇLAR

Yemen halk tıbbında kullanılan *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinden elde edilen etanol, metanol, kloroform ve petroleteri ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, total fenolik tayini, α -amilaz enzim aktivitesi, α -glukozilaz, hCA1, hCA11 ve asetilkolinesteraz enzim inhibisyonları ve fenolik içeriklerinin LC-MS/MS kromatografisi ile belirlenmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Tamarix arabica (Ilgın), kurak alanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli iklimlerde kolayca yetiştirilen yenilebilir bir halofittir. Geleneksel olarak Asya ve Afrika ülkelerinin yerel halkı tarafından çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *Tamarix arabica* için çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterilmiştir; ancak çok az ticari takviye edici bu bitkiyi formülasyonlarında kullanmıştır. *Tamarix arabica*'nın sınırlı kullanımının nedenlerinden biri, bu türlerin tedavi edici ve toksikolojik özelliklerine ilişkin klinik çalışmaların bulunmamasıdır. Literatür taramamızda ılgın hakkında herhangi bir insan çalışması bulamadık. Daha önce tartışıldığı gibi, *Tamarix arabica*'nın antihiperglisemik, antikanser, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkiler gibi bazı farmakolojik özellikleri, metodolojik sorunlar nedeniyle bu derlemeye dahil edilen çalışmalara göre hala sorgulanabilir. Bu ortaya konan biyolojik aktivitelerine rağmen, geleneksel tıpta henüz bilimsel olarak değerlendirilmemiş birçok tedavi edici özelliği bulunmaktadır. Karaciğer ve dalak, geleneksel tıp ve etnofarmakolojik çalışmalara göre *Tamarix arabica*'nın iki ana hedef organıdır; bu nedenle *Tamarix arabica*'nın karaciğer ve dalak defektleri üzerindeki etkisine ilişkin klinik öncesi değerlendirmeler önerilmektedir. Yara iyileşmesi, ılgın otunun henüz geniş çapta araştırılmayan bir diğer özelliğidir; oysa bu türler antioksidan, antiinflamatuvar ve büzücü etkileri olan flavonoid ve tanenlerin yüksek içeriği nedeniyle uygun yara iyileştirici ajanlar olabilir. *Tamarix arabica*'nın fitokimyasal profili, bu bitkilerin geleneksel tıpta belirtildiği gibi diş eti iltihabı ve periodontitte de faydalı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle yara iyileşmesi ve periodontoloji uygulamaları klinik çalışmalarda değerlendirilmesi gereken uygun öncelikler olarak görünmektedir.

Çalışmamızda, *Tamarix arabica* bitkisinin tannik asit, ellagik asit ve miquelianin gibi yüksek fenolik bileşikler içerdiğini gösterilmiştir ve bitki ekstraktları etkili antioksidan aktivite göstermişlerdir. Yaptığımız bu tez çalışmasında diyabet hastalığıyla ilişkileri olan α -amilaz ve α -glukozidaz ve Alzheimer hastalığıyla ilişkileri olan karbonikanhidraz ve asetilkolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri çalışılmıştır. *Tamarix arabica* ekstraktların alfa-amilaz ve alfa-glukozidaz enzimleri üzerine etkilerinin az olduğu gözlenmiştir. Antidiyabetik etki bakımından en yüksek değer TAE ve TAM ekstrelerine ait olduğu bulunmuştur. Karbonik anhidraz ve asetilkolinesteraz enzimini tüm bitki ekstraktları farklı oranlarda inhibe etmiştir. Böylece, bu enzimlerin yüksek aktiviteleri ile ilişkilendiren birtakım hastalıkların tedavisinde ilaç olarak *Tamarix arabica* bitkisinin literatüre kazandırılması mümkün olabilecektir.

Adenium obesum (Forssk.) (Aile Apocynaceae), yaygın olarak 'Çöl Gülü' olarak bilinen, öncelikle bir süs bitkisidir. Bu bitkinin tüm parçaları (lateks dahil) geleneksel tıpta ciltteki şişliklerin, yaraların, kulak ağrısının, rinit, bel soğukluğunun ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin farklı kısımları geleneksel olarak Orta Doğu bölgesinde yaralardan cilt hastalıklarına, eklem ağrılarında kas ağrılarında kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *A. obesum*, geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi gösteren zengin bir kardiyak glikozit kaynağıdır. *Adenium obesum* çok çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren önemli bir tıbbi bitkidir. Bitki antikanser, antiviral, antibakteriyel, tripanosidal, akarissidal, yumuşakça öldürücü, antioksidan ve psisidal aktiviteler sergiler. Çalışmamızda, *Adenium obesum* bitki ekstraktları etkili antioksidan aktivite göstermişlerdir. Yaptığımız bu tez çalışmasında diyabet hastalığıyla ilişkileri olan α -amilaz ve α -glukozidaz ve Alzheimer hastalığıyla ilişkileri olan karbonikanhidraz ve asetilkolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri çalışılmıştır. *Tamarix arabica* ekstraktların alfa-amilaz ve alfa-glukozidaz enzimleri üzerine etkilerinin az olduğu gözlenmiştir. Antidiyabetik etki bakımından en yüksek değer AOM ve AOP ekstrelerine ait olduğu bulunmuştur. Karbonikanhidraz ve asetilkolinesteraz enzimini tüm bitki ekstraktları farklı oranlarda inhibe etmiştir. Böylece, bu enzimlerin yüksek aktiviteleri ile ilişkilendiren birtakım hastalıkların tedavisinde ilaç olarak *Tamarix arabica* bitkisinin literatüre kazandırılması mümkün olabilecektir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinden elde edilen etanol, metanol, kloroform ve petroleteri ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri çeşitli metotlarla araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar sentetik antioksidanlar olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırılmıştır. Çalışmalarda bitki ekstraktları etkili antioksidan aktivite göstermişlerdir. Genel olarak numunelerimizin antioksidan aktivitesinin, sentetik antioksidanların aktivitelerinden daha az olduğu görülmüştür. *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinden elde edilen etanol, metanol, kloroform ve petroleteri ekstraktlarının α -glukozidaz, karbonikanhidraz ve asetilkolinesteraz enzimlerini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak *Adenium obesum* ve *Tamarix arabica* bitkilerinin gelecekte farmakolojik uygulamalarda, ilaç üretimi ve dizaynı açısından kullanılabileceği ve doğal antioksidan kaynağı olarak da hastaların diyet listelerine eklenebileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Gurib-Fakim, Ameenah. "Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow." *Molecular aspects of Medicine* 27.1 (2006): 1-93.
2. Ashworth, Michael, and Emilie Cloatre. "Enacting a depoliticised alterity: law and traditional medicine at the World Health Organization." *International Journal of Law in Context* 18.4 (2022): 476-498.
3. Rasool Hassan, B. A. "Medicinal plants (importance and uses)." *Pharmaceut Anal Acta* 3.10 (2012): 2153-435.
4. Yadav, R. N. S., and Munin Agarwala. "Phytochemical analysis of some medicinal plants." *Journal of phytology* 3.12 (2011).
5. Smith-Hall, Carsten, Helle Overgaard Larsen, and Mariève Pouliot. "People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption." *Journal of ethnobiology and ethnomedicine* 8 (2012): 1-11.
6. Al-Fatimi, Mohamed, et al. "Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen." *Journal of ethnopharmacology* 111.3 (2007): 657-666.
7. Versiani, Muhammad Ali, et al. "Chemical constituents and biological activities of *Adenium obesum* (Forsk.) Roem. et Schult." *Chemistry & biodiversity* 11.2 (2014): 171-180.
8. Paul, Dipak, Karabi Biswas, and Sankar Narayan Sinha. "Biological activities of *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.: a concise review." *Malaya Journal of Biosciences* 2.4 (2015): 214-221.
9. Alzabib, Ali A., et al. "Molluscicidal activity of cardiac glycosides isolated from *Adenium obesum*." *Pest management science* 75.10 (2019): 2770-2775.
10. Villar, Jose L., et al. "Remarks on typification of nineteen names in *Tamarix* (Tamaricaceae)." *Nordic Journal of Botany* 33.5 (2015): 591-600.
11. Al-Judaibi, Awatif A. "Tamarix arabica and *Salvadora persica* as antibacterial agents." *AIMS microbiology* 6.2 (2020): 121.
12. DİNÇ, Yasemin, and Refiye YANARDAĞ. *Üreaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu*. Diss. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2009.

13. PEKŞEN, Erkut, and Cengiz ARTIK. "Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri." *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 20.2 (2005): 110-120.
14. Mekanizmalar, Etki, and Miyase BAYRAKTAR. "Oral Hipoglisemikler."
15. Alım, Zuhal, et al. "Some anti-inflammatory agents inhibit esterase activities of human carbonic anhydrase isoforms I and II: An in vitro study." *Chemical biology & drug design* 86.4 (2015): 857-863.
16. Xu, Yechun, et al. "Computational studies on acetylcholinesterases." *Molecules* 22.8 (2017): 1324.
17. Chhetri, Bhuwan K., Nasser A. Awadh Ali, and William N. Setzer. "A survey of chemical compositions and biological activities of Yemeni aromatic medicinal plants." *Medicines* 2.2 (2015): 67-92.
18. Suleiman, Mohamed HA, and Eid I. Brima. "Phytochemicals, trace element contents, and antioxidant activities of bark of Taleh (*Acacia seyal*) and desert rose (*Adenium obesum*)." *Biological Trace Element Research* 199 (2021): 3135-3146.
19. Versiani, Muhammad Ali, et al. "Chemical constituents and biological activities of *Adenium obesum* (Forsk.) Roem. et Schult." *Chemistry & biodiversity* 11.2 (2014): 171-180.
20. Akhtar, Mohammed Sohail, Mohammad Amzad Hossain, and Sadri Abdullah Said. "Isolation and characterization of antimicrobial compound from the stem-bark of the traditionally used medicinal plant *Adenium obesum*." *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7.3 (2017): 296-300.
21. Al Rashdi, Ruqaia Saif Yahya, Mohammad Amzad Hossain, and Salem Said Jarooof Al Touby. "Antioxidant and antibacterial activities of leaves crude extracts of *Adenium obesum* grown in Oman National Botanical Garden." *Advances in Biomarker Sciences and Technology* 3 (2021): 8-14.
22. Araújo, Ronilson Carlos, et al. "In vitro germination of *Adenium obesum* under the effects of culture medium and light emitting diodes of different colors." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 149.3 (2022): 523-533,
23. Şahin, Serkan. "Antidiabetic effect of tamarix parviflora dc. plant in experimental animal and preclinical toxicity study."
24. Bahramsoltani, Roodabeh, et al. "The genus *Tamarix*: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology." *Journal of ethnopharmacology* 246 (2020): 112245.
25. Abdelgawad, A. "*Tamarix nilotica* (Ehrenb) bunge: a review of phytochemistry and pharmacology." *J Microb Biochem Technol* 9.1 (2017): 544-553.

26. Chaouche, Tarik Mohammed, et al. "Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria." *Journal of the Chinese Medical Association* 77.6 (2014): 302-307.
27. Lu, Xiaonan, and Barbara A. Rasco. "Determination of antioxidant content and antioxidant activity in foods using infrared spectroscopy and chemometrics: a review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52.10 (2012): 853-875.
28. Antolovich, Michael, et al. "Methods for testing antioxidant activity." *Analyst* 127.1 (2002): 183-198.
29. Moharram, H. A., and M. M. Youssef. "Methods for determining the antioxidant activity: A review." *Alexandria Journal of Food Science and Technology* 11.1 (2014): 31-42.
30. Shahidi, Fereidoon, and Ying Zhong. "Measurement of antioxidant activity." *Journal of functional foods* 18 (2015): 757-781.
31. Kedare, Sagar B., and R. P. Singh. "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay." *Journal of food science and technology* 48 (2011): 412-422.
32. Sharma, Om P., and Tej K. Bhat. "DPPH antioxidant assay revisited." *Food chemistry* 113.4 (2009): 1202-1205.
33. Yeo, JuDong, and Fereidoon Shahidi. "Critical re-evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results." *Journal of agricultural and food chemistry* 67.26 (2019): 7526-7529.
34. Deng, Jing, Wangyuan Cheng, and Guangzhong Yang. "A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay." *Food Chemistry* 125.4 (2011): 1430-1435.
35. Mishra, Krishnanand, Himanshu Ojha, and Nabo Kumar Chaudhury. "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results." *Food chemistry* 130.4 (2012): 1036-1043.
36. Gulcin, İlhami. "Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview." *Archives of toxicology* 94.3 (2020): 651-715.
37. Gülçin, İlhami. "Antioxidant activity of food constituents: an overview." *Archives of toxicology* 86 (2012): 345-391.
38. Benzie, Iris FF, and Malegaddi Devaki. "The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications." *Measurement of antioxidant activity & capacity: Recent trends and applications* (2018): 77-106.

39. Hayes, William A., et al. "Determination of the molar extinction coefficient for the ferric reducing/antioxidant power assay." *Analytical Biochemistry* 416.2 (2011): 202-205.
40. Özyürek, Mustafa, et al. "A comprehensive review of CUPRAC methodology." *Analytical methods* 3.11 (2011): 2439-2453.
41. Özyürek, Mustafa, Kubilay Güçlü, and Reşat Apak. "The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30.4 (2011): 652-664.
42. Ault, Addison. "An introduction to enzyme kinetics." *Journal of chemical education* 51.6 (1974): 381.
43. Gurung, Neelam, et al. "A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond." *BioMed research international* 2013 (2013).
44. Farooq, Muhammad Adeel, et al. "Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review." *Archives of Microbiology* 203 (2021): 1281-1292.
45. Paul, Jai Shankar, et al. "Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193 (2021): 2649-2698.
46. Visvanathan, Rizliya, et al. "Critical review on conventional spectroscopic α -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100.7 (2020): 2836-2847.
47. de Melo, Eduardo Borges, Adriane da Silveira Gomes, and Ivone Carvalho. " α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity." *Tetrahedron* 62.44 (2006): 10277-10302.
48. Zhang, Xianlong, et al. "Emerging strategies for the activity assay and inhibitor screening of alpha-glucosidase." *Food & function* 11.1 (2020): 66-82.
49. Bundy, Hallie F. "Carbonic anhydrase." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 57.1 (1977): 1-7.
50. Lindskog, Sven. "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *Pharmacology & therapeutics* 74.1 (1997): 1-20.
51. Trevor, Anthony J., et al. "Acetylcholinesterases." *Life Sciences* 23.12 (1978): 1209-1220.
52. Appleyard, Margaret E. "Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme." *Trends in neurosciences* 15.12 (1992): 485-490.
53. Nair, Sindhu S., Vaibhavi Kavrekar, and Anshu Mishra. "In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts." *European journal of experimental biology* 3.1 (2013): 128-132.

54. Bhat, Menakshi, et al. "Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011 (2011).
55. Jeanes, Allene; Hodge, John (1975). [ACS Symposium Series] *Physiological Effects of Food Carbohydrates* Volume 15 || α -Amylase Inhibitors from Plants. , 10.1021/bk-1975-0015, 244–266.
56. Shah, Syed Bilal, et al. "Plant extracts are the potential inhibitors of α -amylase: a review." *MOJ Bioequiv Availab* 5.5 (2018): 270-273.
57. Miyazaki, Rie, Hiroyuki Yasui, and Yutaka Yoshikawa. " α -Glucosidase inhibition by new Schiff base complexes of Zn (II)." *Open Journal of Inorganic Chemistry* 6.2 (2016): 114-124.
58. Supuran, Claudiu T. "Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas." *Expert opinion on therapeutic patents* 28.10 (2018): 709-712.
59. Supuran, Claudiu T. "Carbonic anhydrase inhibitors." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20.12 (2010): 3467-3474.
60. Bagri, Kiran, Ashwani Kumar, and Parvin Kumar. "Computational studies on acetylcholinesterase inhibitors: From biochemistry to chemistry." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 20.14 (2020): 1403-1435.
61. Benfante, Roberta, et al. "Acetylcholinesterase inhibitors targeting the cholinergic anti-inflammatory pathway: a new therapeutic perspective in aging-related disorders." *Aging clinical and experimental research* 33.4 (2021): 823-83.
62. Puls, W., Keup, V., Krause, H. P., Muller, L., Schmidt, D. D., Thomas, G. & Truscheit, E., 1980. Pharmacology of a glucosidase inhibitor. *Front. Horm. Res.* 7:235-247.
63. Anand A, Patience AA, Sharma N, Khurana N. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 815: 364-375.
64. Santos-Neto LLd, de Vilhena Toledo MA, Medeiros-Souza P, de Souza GA. The use of herbal medicine in Alzheimer's disease—a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2006, 3: 441-445.
65. Jang BG, Yun S-M, Ahn K, Song JH, Jo SA, Kim Y-Y, Kim DK, Park MH, Han C, Koh YH. Plasma carbonic anhydrase II protein is elevated in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, 21: 939-945.
66. Rasouli, H., Farzaei, M.H., Khodarahmi, R., 2017. Polyphenols and their benefits: A review. *Int. J. Food. Prop.* 20, 1700-1741.

67. Yilmaz, Mustafa Abdullah. "Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation." *Industrial Crops and Products* 149 (2020): 112347.
68. Hossain, Md Amzad. "A review on Adenium obesum: A potential endemic medicinal plant in Oman." *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences* 7.4 (2018): 559-56



ÖZGEÇMİŞ

Afnan ALSHEPY ilk ve orta öğrenimini aynı şehirde tamamladı. Hayel Saeed Okulundan mükemmel not ortalaması ile mezun oldu. Üniversite eğitimine Türkiye'de öğrenimine başlamak için burs aldı. 2015 yılında İstanbul Aydın Üniversitesinde dil öğrenmeye ve ardından Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2020 yılında iyi bir notla mezun oldu. Pek çok gönüllü faaliyete katıldı, bunlardan biri de Türkiye'deki Yemenli Öğrenciler Birliği'nde çalıştı. Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Toksikolojisi Anabilim Dalı yüksek lisans programına 2020 yılında başladı ve 2023 yılında mezun oldu.