
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

ENDEMİK *THYMUS CAPPADOCICUS* VAR. *CAPPADOCICUS* BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN, ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYON VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Elif Mihrinaz AYTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK, 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Elif Mihrinaz AYTEKİN
03/01/2023

ENDEMİK *THYMUS CAPPADOCICUS* VAR. *CAPPADOCICUS* BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN, ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYON VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Elif Mihrinaz AYTEKİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak, 2023

ÖZET

Bu tez çalışması kapsamında endemik *Thymus cappadocicus* Boiss var. *cappadocicus* bitkisinin kimyasal içeriğinin, asetilkolinesteraz inhibisyon ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* bitkisi endemik bir tür olup daha önceden bu varyetenin asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi, fenolik profili ve yağ asitleri içeriği ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bitkisel fenolik bileşikler antioksidan ve antikolinesteraz özelliği bakımından önemli bileşiklerdir. Antikolinesterazlar nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan inhibitörlerdir. Bununla birlikte, oksidatif stresin en önemli kaynakları olan reaktif oksijen ve azot türleri ile en iyi mücadeleyi antioksidanlar sağlamaktadır. Bu amaçla, öncelikle Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Diyot Dizisi Dedektörü (High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector (HPLC/DAD)) yöntemi ile bitki ekstraktlarındaki 19 fenolik bileşiğin kantitatif ve kalitatif analizleri yapılmıştır. Ayrıca, bitki ekstraktların yağ asitleri içerikleri Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör (Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID)) analizi ile belirlenmiştir. Alzheimer gibi hızla ilerleyen ve kesin bir tedavisi olmayan nörodejeneratif bir hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere, bitki ekstraktlarının asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi Ellman metodu esas alınarak ölçülmüştür. Bitkinin antioksidan aktivitesi ise 2,2- difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderim aktivitesi yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *T. cappadocicus* var. *cappadocicus*'un üç ekstraktı (TM (metanol), TS (su) ve TE (etil asetat)) HPLC/DAD ile analiz edilerek ana bileşik rosmarinik asit olarak bulunmuştur (TM=17,26 ± 0,02 mg/g; TS=12,14 ± 0,02 mg/g; TE=11,68 ± 0,02 mg/g). GC-FID analizinde ekstraktlarda (n-6)–Linoleik asit ω6 yağ asidi ön plana çıkmıştır. Üç ekstrakt arasında en yüksek etkiyi hem asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesinde (IC_{50} =295,90 ± 2,12 µg/mL) hem de DPPH radikali süpürücü aktivitesinde (IC_{50} = 38,26± 0,98 µg/mL) TM ekstraktı göstermiştir. Bu çalışmalar sonucunda, *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* bitkisinin doğal ve güvenilir bir antioksidan olarak gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılabilirliği ve özellikle Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar için ilaç endüstrisinde kullanım olanakları hakkında bilgiler edinilmiştir.

Bilim Kodu	:	20309
Anahtar Kelimeler	:	Fenolik Bileşikler, Nörodejeneratif hastalıklar, Asetilkolin, DPPH, *Thymus cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus*
Sayfa Adedi	:	51
Danışman	:	Doç. Dr. Feyza ÖKE ALTUNTAŞ

INVESTIGATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION, ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ENDEMIC *THYMUS CAPPADOCICUS* VAR. *CAPPADOCICUS*

M. Sc. Thesis

Elif Mihrinaz AYTEKİN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January, 2023

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the chemical content, acetylcholinesterase inhibition, and antioxidant activities of the endemic *Thymus cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus*. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* examined in this study is an endemic species and there has been no previous study on the acetylcholinesterase inhibition activity, phenolic profile, fatty acid content of this variety. Herbal phenolic compounds are important compounds in terms of antioxidant and anticholinesterase properties. Anticholinesterases are inhibitors, the main class of drugs currently used in the treatment of Alzheimer's disease, a neurodegenerative disease. However, antioxidants play a vital role against reactive oxygen and nitrogen species, the most important oxidative stress sources. For this purpose, firstly, quantitative and qualitative analyzes of 19 phenolic compounds in plant extracts were performed by the High Performance Liquid Chromatography/ Diode Array Detector (HPLC/DAD) method. In addition, the fatty acid contents of the plant extracts were determined by Gas Chromatography Flame Ionization Detector (GC-FID) analysis. The acetylcholinesterase inhibition activity of *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* extracts was measured based on the Ellman method, to be used in the treatment of Alzheimer disease that progresses rapidly and does not have a definite cure. The plant's antioxidant activity was investigated by the 2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity method. As a result of the HPLC-DAD analysis, the main compound was found as rosmarinic acid in three extracts (TM (methanol); TS (water); TE (ethyl acetate)) of *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* (TM=17.26 ± 0.02 mg/g; TS=12.14 ± 0.02 mg/g; TE= 11.68 ± 0.02 mg/g). In the GC-FID analysis, g-Linolenic acid ω6 fatty acid came to the fore in the extracts. Among the three extracts of *T. cappadocicus* var. *cappadocicus*, TM extract showed the highest effect in both acetylcholinesterase inhibitory activity (IC_{50} = 295.90 ± 2.12 µg/mL) and DPPH radical scavenging activity (IC_{50} = 38.26 ± 0.98 µg/mL). As a result of these studies, Our data indicate that *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* can be used in the food and pharmaceutical industry as a natural and reliable antioxidant and can be used in pharmacetiual industry against neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

Science Code : 20309
Key Words : Phenolic compounds, Neurodegenerative disease, Acetylcholine, DPPH, *Thymus cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus*
Page Number : 51
Supervisior : Assoc. Prof. Dr. Feyza ÖKE ALTUNTAŞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yüksek anlayışı ve sabrı ile çeşitli zorlukları atlatmamda her zaman yol göstericim olan kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Feyza ÖKE ALTUNTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım. Bitki materyalimi temin etmemde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Hayri DUMAN'a, değerli bilgileri ile tez çalışmasına katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ'a ve bu tez çalışmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Ufuk ÖZBEK'e ve Doç. Dr. Nurcan ÖZYURT KOÇAKOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere gelmemde emekleri büyük olan ve her türlü destekleri ile yanımda olan aileme; annem Ayşe SEVİN ve babam Erkut SEVİN'e, mutluluk ve motivasyon kaynağım canım kardeşim Hazal SEVİN'e, varlığı mutlu eden pamuk anneannem Zeynep SAĞDIK'a, bu yolda desteğini esirgemeyen sevgili eşim Sercan AYTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışmasını 7328 numaralı proje ile destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

RESİMLERİN LİSTESİ xi

SİMGELER VE KISALTMALAR xii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Lamiaceae Familyası 3

2.2. *Thymus* L. (Lamiaceae) Cinsi 4

2.2.1. *Thymus* L. (Lamiaceae) cinsinin kullanım alanları 6

2.3. Bitkilerdeki Sekonder Metabolitler 7

2.3.1. Bitkilerdeki sekonder metabolitlerin sınıflandırılması 7

2.3.2. Bitkilerdeki fenolik bileşikler 8

2.4. Yağ Asitleri 11

2.5. Nörodejeneratif Hastalıklar 12

2.5.1. Alzheimer hastalığı ve sebepleri 12

2.5.2. Kolinesteraz inhibitörleri 13

2.6. Antioksidanlar 14

2.6.1. Antioksidanların sınıflandırılması 15

2.6.2. Antioksidanların çalışma mekanizmaları 16

2.6.3. Antioksidan kapasite ölçme metotları 17

Sayfa

3. MATERYAL VE YÖNTEM 19

3.1. Materyal 19

3.1.1. *Thymus cappadocicus* var. *cappadocicus* materyali 19

3.1.2. Kimyasallar 19

3.2. Yöntemler 20

3.2.1. Ekstraktların hazırlanışı 20

3.2.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile fenolik bileşiklerin teşhisi ve miktar tayini 22

3.2.3. Gaz kromatografi alev iyonlaşmalı dedektör ile yağ asitlerinin belirlenmesi 23

3.2.4. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivite tayin yöntemleri 24

3.2.5. DPPH radikali süpürme testi 25

3.3. İstatistiksel Analizler 26

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 27

4.1. HPLC Fenolik Bileşik Analizi 27

4.2. Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör (GC-FID) ile Yağ Asitleri Testi 31

4.4. Endemik *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* Türü Antioksidan Aktivitesi 35

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR 37

KAYNAKLAR 45

ÖZGEÇMİŞ 51

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Türkiye Lamiaceae familyasında takson sayısına göre en büyük 15 cins .. 3

Çizelge 2.2. Bitkilerdeki Fenolik Bileşik Sınıflandırılması 9

Çizelge 2.3. Antioksidan Kapasite Ölçme Metotları 17

Çizelge 3.1. HPLC analizinde uygulanan gradient akış programı 22

Çizelge 3.2. Fenolik Bileşikler Standart Miktarları 23

Çizelge 4.1. Fenolik Bileşikler HPLC Analiz Sonuçları (mg/g) 27

Çizelge 4.2. GC/FID Yağ Asitleri Bileşimi % Tablosu 31

Çizelge 4.3. Ekstraktların/standartın anti-asetilkolinesteraz aktiviteleri (IC_{50}, µg/mL) . 33

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Lamiaceae familyasının Türkiye'deki Coğrafi Bölgeleri ve Takson Dağılımı 4

Şekil 2.2. Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması 8

Şekil 2.3. Fenolik Bileşiklerin Oluşum Yolu 10

Şekil 2.4. Antioksidanların Sınıflandırılması 16

Şekil 4.1. TS ekstraktı kromatogramı 28

Şekil 4.2. TM ekstraktı kromatogramı 28

Şekil 4.3. TE ekstraktı kromatogramı 29

Şekil 4.4. TM-TS-TE ortak bulunan 9 fenolik bileşiğin kimyasal formülleri 30

Şekil 4.5. TE ekstraktı yağ asitleri diyagramı 32

Şekil 4.6. TM ekstraktı yağ asitleri diyagramı 32

Şekil 4.7. TS ekstraktı yağ asitleri diyagramı 33

Şekil 4.8. Ekstraktların/standartın asetilkolinesteraz inhibitor aktiviteleri 34

Şekil 4.9. Ekstraktların/standartın asetilkolinesteraz enzimine karşı % inhibisyon değerleri 34

Şekil 4.10. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi 36

Şekil 4.11. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi IC_{50} değerleri 36

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* 5

Resim 3.1. *Thymus cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus* 19

Resim 3.2. Soxhlet ekstraksiyon cihazı BUCHI Ekstraksiyon Sistem B-811 21

Resim 3.3. Heidolph Hei-VAP Hassas rotary evaporator..... 21

Resim 3.4. HPLC 1200 Infinity Agilent Cihazı..... 23

Resim 3.5. Mikroplaka Spektrofotometresi Biotek Epoch 25

Resim 3.6. Thermo Scientific Multiskan Go-UV-visible Spektrofotometre 26

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
µm	Mikrometre
°C	Celcius (Santigrat) derece
CO_2	Karbondioksit
dH_2O	Distile su
g	Gram
m	Metre
mg	Miligram
mg/g	Miligram/Gram
mg/mL	Miligram/Mililitre
mL	Mililitre
mL/dk	Mililitre/Dakika
mm	Milimetre
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogram
nm	Nanometre
Ppm	Milyonda bir birim
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
µg	Mikrogram
µg/mL	Mikrogram/Mililitre
µL	Mikrolitre
ω	Omega

Kısaltmalar	Açıklamalar
ABTS	2,2'-azino bis (3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit)
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz Enzimi
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
BChE	Bütirilkolinesteraz enzimi
BHA	Bütillendirilmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksi tolüen
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite)
DAD	Diode Array Detector (Diyot dizisi dedektörü)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
DNTB	5,5′-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
DPPH	2,2-difenil-1 pikrilhidrazil
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
GC	Gas Chromatography (Gaz Kromatografi)
GC-FID	Gas Chromatography with Flame Ionization Detector **(**Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör)
HIV	Human Immunodeficiency Virus **(**İmmün Yetmezlik Virüsü)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi)
IC_{50}	The Half-Maximal İnhibitory Concentration (%50 inhibisyon oluşturan konsantrasyon)
KOH	Potasyum Hidroksit
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Oksijen radikalleri emilme kapasitesi)
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
sn.	Saniye
subsp.	Subspecies (alttür)

Kısaltmalar	Açıklamalar
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter (Toplam Radikal Yakalama Antioksidan Parametresi)
var.	Varyete

1. GİRİŞ

Günümüzde yaşanan sağlık problemlerine ve var olan sağlık durumunun korunması adına atalardan gelen, topraktan gelenin iyileştirici gücü inancı ve genlerimizin içine işlemiş olan doğaya, doğala dönüşün getirdiği gereksinimler ile bitkilerin tıbbi olarak kullanılması fitokimyasalları ve fitoterapiyi modern tıp ile bütünleştirme gerekliliğini doğurmuştur. Tıbbi bitkiler eski zamanlardan beri tedavi etmeye yönelik kullanılmaktadır. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanılmasında içerdikleri kimyasal bileşiklerin, sentezlendikleri metabolik yol ve fonksiyonların incelenmesi etken olmuştur. Bitkilerdeki kimyasal bileşikler; primer metabolitler ve sekonder metabolitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Primer metabolitler canlılar için hayati faktörlerde (üreme, gelişme, metabolizma faaliyetleri gibi) rol alırken, sekonder metabolitler; primer metabolitlerden biyosentetik yollarla üretilir ve sağlığın korunması ve sürdürülmesinde önemli rolleri vardır (Ülger ve Ayhan, 2020). Fenolik bileşikler ve bitkilerde sekonder metabolit olarak bulunan bileşikler bitki metabolizmalarında pentoz fosfat, şikimat ve fenilpropanoid izlerinden köken alan bileşiklerdir (Bacanlı, Taner ve Başaran, 2015). Fenolik bileşikler meyveler, sebzeler, baklagiller ve tahıllar dahil olmak üzere bitki kaynaklı gıdalardan bira, kahve, çay, şarap gibi içeceklerde ve ayrıca tarçın, zerdeçal, adaçayı ve kekik gibi baharat olarak tükettiğimiz hemen hemen tüm gıdalarda bulunur (Muller, Sarker, Saleem ve Hutcheon, 2019).

Fenolik bileşiklerin antioksidan, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, antialerjik, antiarterojenik, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral, antimutajenik ve antitrombotik etkiler ve benzeri birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Bacanlı ve diğerleri, 2015). Bu etkilerden bir diğeri ise antikolinesteraz aktivitedir. Antikolinesterazlar nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan enzim inhibitörlerdir. Nöron işlevselliğinde çevresel etmenler, genetik yatkınlık veya her ikisinin etkileşimi ile yapısal olarak bozulma ve zamanla gittikçe artan kayıplar nörodejeneratif hastalıklar olarak bilinmektedir. Dünya genelinde en yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklar ileri yaşlarda daha çok görülen Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı ve erken yaşlarda kendini gösterme eğiliminde olan Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington hastalığıdır (Korkmaz ve Kaya, 2019). Alzheimer hastalığı (AH) nörodejeneratif hastalıklardan biri olmakla birlikte demansla yol alan en yaygın ve gittikçe gelişen patofizyolojisi ile ilgili özellikleri oldukça iyi belirlenmiş olmasına karşın, hala AH'nın

kesin sebepleri net olarak anlaşılamamıştır. Mevcut AH tedavisi semptomatiktir ve temelde kolinesteraz inhibitörleri üzerine odaklıdır (Topcu ve Kusman, 2014).

Doğal antioksidanların en önemli gruplarını fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Bu özellikleri bilhassa redoks özelliklerinden dolayıdır (Bacanlı ve diğerleri, 2015). Bitkilerin başlıca yaprak, gövde ve tohumları öncelikli olmak üzere bütün dokularında doğal antioksidanlar oluşabilmektedir. Bitki orijinli antioksidanların aktif olarak kullanılabilmesi için bu bileşiklerin madde miktarlarının bilinmesi önemlidir (Deveci ve diğerleri, 2016). Antioksidanlar oksidasyonu (yükseltgenme) engelleyen, serbest radikalleri tutma ve stabilize etme yeteneğini barındıran, gıdalarda ve insan vücudundaki serbest radikallerin olumsuz tesirini ve oluşumunu gideren veya yok eden maddeler şeklinde de tanımlanmaktadır (Çelik ve Ayran, 2020).

Thymus türleri yaygın olarak baharat ya da çay olarak tüketilmesinin yanı sıra fitoterapi, aromaterapi, ilaç ham maddesi olarak ilaç üretimi gibi birçok alanda da kullanılmaktadır. *Thymus* (Lamiaceae) cinsi fenolik bileşikler açısından zengin olup bu cinsin çeşitli türlerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur. Ancak, çalışma konumuzu oluşturan *Thymus* türü (*Thymus cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus*) endemik bir tür olup daha önceden bu varyetenin fenolik kompozisyonu, yağ asitleri ve asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu da çalışmanın özgünlüğü açısından önemlidir. Bu tez çalışması sonucunda *Thymus cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus* bitkisinin biyoteknoloji, sağlık, eczacılık, fitoterapi gibi birçok alanda uygulanabilirliği hakkında veriler elde edilecektir. Bu çalışma ile toksik ve kanser oluşturma potansiyeline sahip olan sentetik antioksidanların yerine gıda endüstrisinde kullanılabilecek doğal ve güvenilir antioksidanların keşfedilmesi ve bu bitkinin asetilkolinesteraz inhibisyon aktivite özelliklerinin araştırılması ile de özellikle Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneretif hastalıklar için ilaç endüstrisinde kullanım olanakları hakkında bilgiler edinilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

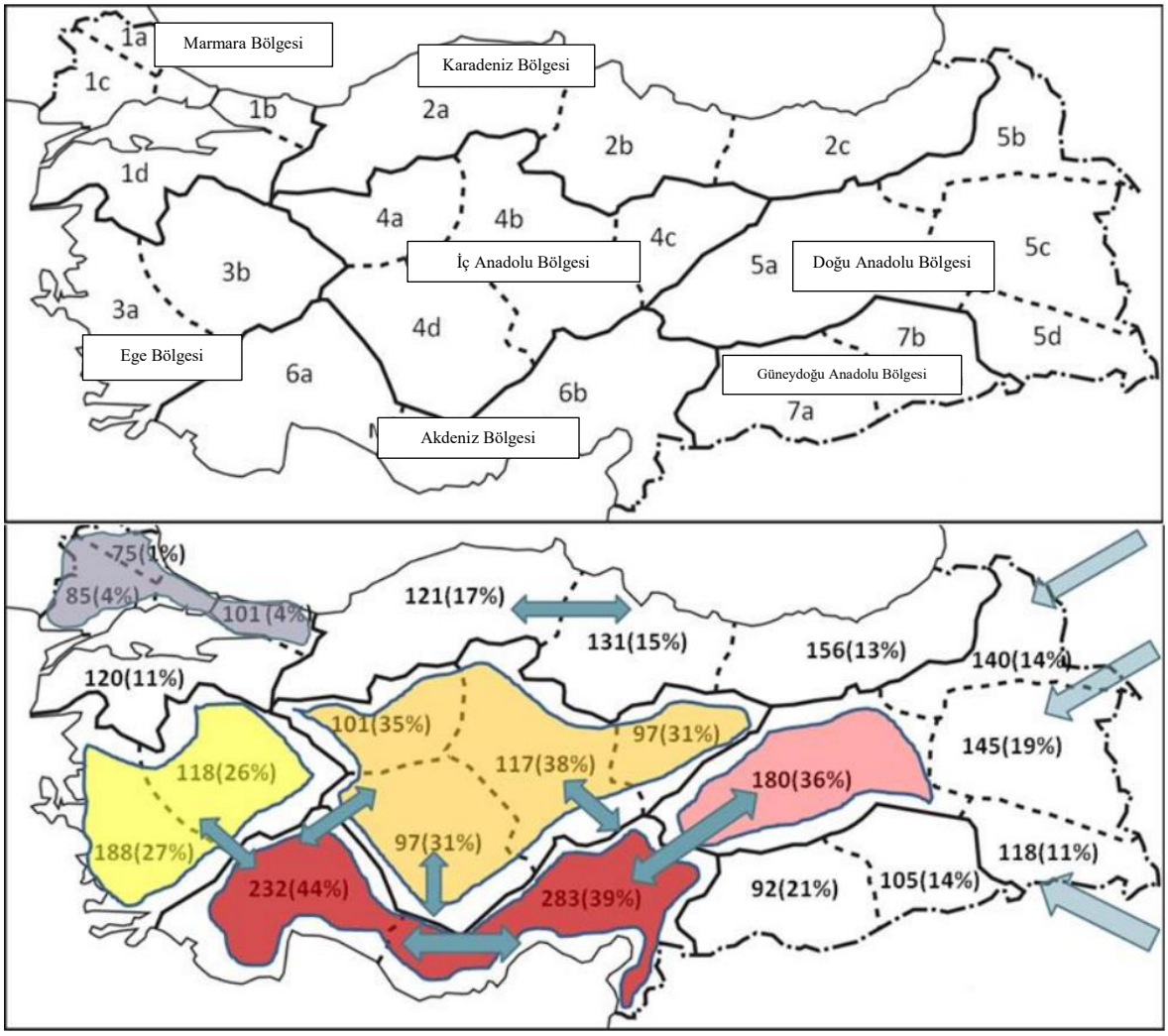
2.1. Lamiaceae Familyası

Lamiaceae familyası Dünya üzerinde 245'ten fazla cins ve 7886 tür içermektedir. Lamiaceae familyası Türkiye'de takson numarasına dayalı üçüncü en büyük, tür sayısına göre dördüncü en büyük familyadır. 1 Şubat 2017 tarihinde güncellenen verilere göre 346 tanesi endemik olmak üzere 782 takson (%44,2 endemizm oranı) içermektedir. Lamiaceae familyası Türkiye'de 48 cins tür sayısına göre bakıldığında ise; 271 türü endemik olmak üzere 603 tür (%44,9 endemizm oranı) içermektedir (Celep ve Dirmenci, 2017). Çizelge 2.1'de Türkiye Lamiaceae familyasında yer alan takson sayısına göre en büyük 15 cins gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Türkiye Lamiaceae familyasında takson sayısına göre en büyük 15 cins (Celep ve Dirmenci, 2017).

	Cins	*Takson Sayısı*	*Tür Sayısı*	*Endemik Takson Sayısı, (%)*	*Endemik Tür Sayısı, (%)*
1	*Stachys*	118	90	53 (45%)	43 (48%)
2	*Salvia*	107	100	58 (54%)	53 (53%)
3	*Sideritis*	54	45	40 (74%)	36 (80 %)
4	*Phlomis*	53	33	30 (57%)	16 (48%)
5	*Teucrium*	49	36	17 (35%)	15 (42%)
6	*Thymus*	47	42	20 (43%)	20 (48%)
7	*Nepeta*	46	39	20 (43%)	17 (44%)
8	*Scutellaria*	39	17	17 (44%)	6 (35%)
9	*Origanum*	31	27	18 (58%)	18 (67%)
10	*Marrubium*	27	21	17 (63%)	11 (52%)
11	*Lamium*	26	15	5 (19%)	4 (27%)
12	*Clinopodium*	25	16	7 (24%)	3 (19%)
13	*Ajuga*	23	13	7 (30%)	6 (46%)
14	*Ballota*	18	12	11 (61%)	8 (67%)
15	*Satureja*	17	16	6 (35%)	5 (31%)

Lamiaceae çok yıllık veya tek yıllık, çalı ve otsu formda bitkilerdir, genellikle yoğun salgı tüylerine sahip ve aromatiklerdir. İçerdikleri sekonder metabolitler ve yağların çeşitliliğinden kaynaklı birçok biyolojik aktiviteye sahiptirler (Kokkini ve Hanlidou, 2003). Şekil 2.1'de Türkiye'deki coğrafi bölgeleri ve takson dağılımı gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Lamiaceae familyasının Türkiye'deki Coğrafi Bölgeleri ve Takson Dağılımı (Haritalardaki a,b,c,d her bir coğrafi bölüm için alt bölümleri; sayı ve parantez içindeki yüzdeler ise o alt bölümlerdeki tür sayısı ve endemizm oranını; oklar ise hareket veya göç yollarını göstermektedir) (Celep ve Dirmenci, 2017).

2.2. *Thymus* L. (Lamiaceae) Cinsi

Çeşitli *Thymus* (Lamiaceae) türleri Akdeniz florasının aromatik bitkileridir, çoğunlukla baharat olarak gıda alanında ya da çeşitli biyolojik aktiviteleri ile de geleneksel tıp alanında kullanılmaktadır. Lamiaceae familyasının bir cinsi olan *Thymus*'un 42 türü ve 20'si Türkiye florasında endemik olmak üzere 47 taksonu bulunmaktadır. Antispazmodik, antibakteriyel, antiviral, balgam söktürücü ve antioksidan aktivite özelliklerine sahiptirler (Kaytanlıoğlu, Sarıkaya ve Fakir, 2022). *Thymus* (kekik) bitkisi uçucu yağının kimyasal özellikleri bitkinin genetik özellikleri ile alakalı olmasının yanı sıra önemli ölçüde çevresel etmenler ve üretilme koşulları ile alakalı olarak da değişiklik göstermektedir. *T. cappadocicus* (Resim

2.1) endemik bir tür olmakla birlikte açık kireçli zemin üzerinde genellikle deniz seviyesinden 1.000 ile 1.800 m yükseklikte yetişmektedir (Albayrak ve Aksoy, 2013).



Resim 2.1. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus*

T. cappadocicus var. *cappadocicus* cinsinin bitki taksonomisi hiyerarşisinde yeri;

Alem: Plantae
Altalem: Tracheobionta
Bölüm: Magnoliophyta
Sınıf: Magnoliopsida
Altsınıf: Asteridae
Familya: Lamiaceae
Cins: *Thymus* L.
Tür: *Thymus cappadocicus* Boiss.

2.2.1. *Thymus* L. (Lamiaceae) cinsinin kullanım alanları

Thymus türleri var oldukları bölgelerde yaşayan insanlar tarafından stres azaltıcı etkisinden yararlanmak için en çok çay olarak tüketilmektedir. Sindirimi kolaylaştırması, yemeklere hoş bir koku aroması katmasıyla da et ve benzeri yemeklerde tercih edilmektedir. Bazı peynir üretim aşamalarında (özellikle *Thymus serpyllum* L.) kullanılmaktadır (Bozdemir, 2019).

Kekiğin birçok uygulama alanı vardır bunlardan bazıları; akciğer (verem, astım, bronşit) hastalıkları, bronşlar, bağırsaklar, sindirim sistemi, mide hastalıklarıdır. İdrar arttırma, balgam söktürme, anemi, kan periyodunu ayarlayan, nefes alma verme yollarını temizleme, diş ile ilgili problemlerde, iştah arttırma, sindirim zorlukları, iltihabı giderme, ishaller, soğuk algınlığı, romatizmada kullanılabilmektedir. Vücudu güçlendirir, düzensiz kalp atışlarını azaltır, kandaki glikoz dengesini sağlar. Bununla birlikte kekik suyu ile yıkanma dirençsiz, solgun ve direnç düşüklüğü olan çocukların tedavisinde, kekiğin su ile demlenmiş hali gelişim dönemindeki sivilcelerin tedavisinde kullanılmaktadır. Kekiğin dekoksiyon hali ve gıdalar ile birlikte tüketilmesinin insan vücuduna hiçbir yan tesiri olmamakla birlikte tiroid bezi çalışmasını hızlandırmasından dolayı kekik yağının dikkatli ve az kullanılması önerilmektedir. *Thymus vulgaris* L. insomnia, şiddetli baş ağrısı, grip, sinir ve dolaşım sistemi hassasiyetleri ve dengeyi sağlayamama gibi durumların tedavisinde kullanılmaktadır (Bozdemir, 2019).

Kimyasal madde kullanımında doğal seçeneklerin kullanımına yönelik artan ilgi ile birçok sektörde yapay (sentetik) antioksidanlara yönelik kullanımın azaldığı ve doğal antioksidanların araştırılması üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. (El Abed ve diğerleri, 2014).

Türkiye'de ticari amaçla kullanılan bazı *Thymus* türleri bulunmaktadır. Bunlardan örneğin; *Thymus citriodorus* L. gargara ve parfüm bileşimlerinde kullanıldığı bildirilmektedir. Çiçekleri ürettikleri zengin nektar ile balarılarını çeken bir etkiye sahiptir. Ülkemizde doğal yayılışı olmayan limon kekiği ya da altın kekiği olarak bilinen tür dikkat çeken çiçekli yapısı ve taze limon kokusu ile daha çok peyzaj amaçlı kullanılmaktadır (Bozdemir, 2019).

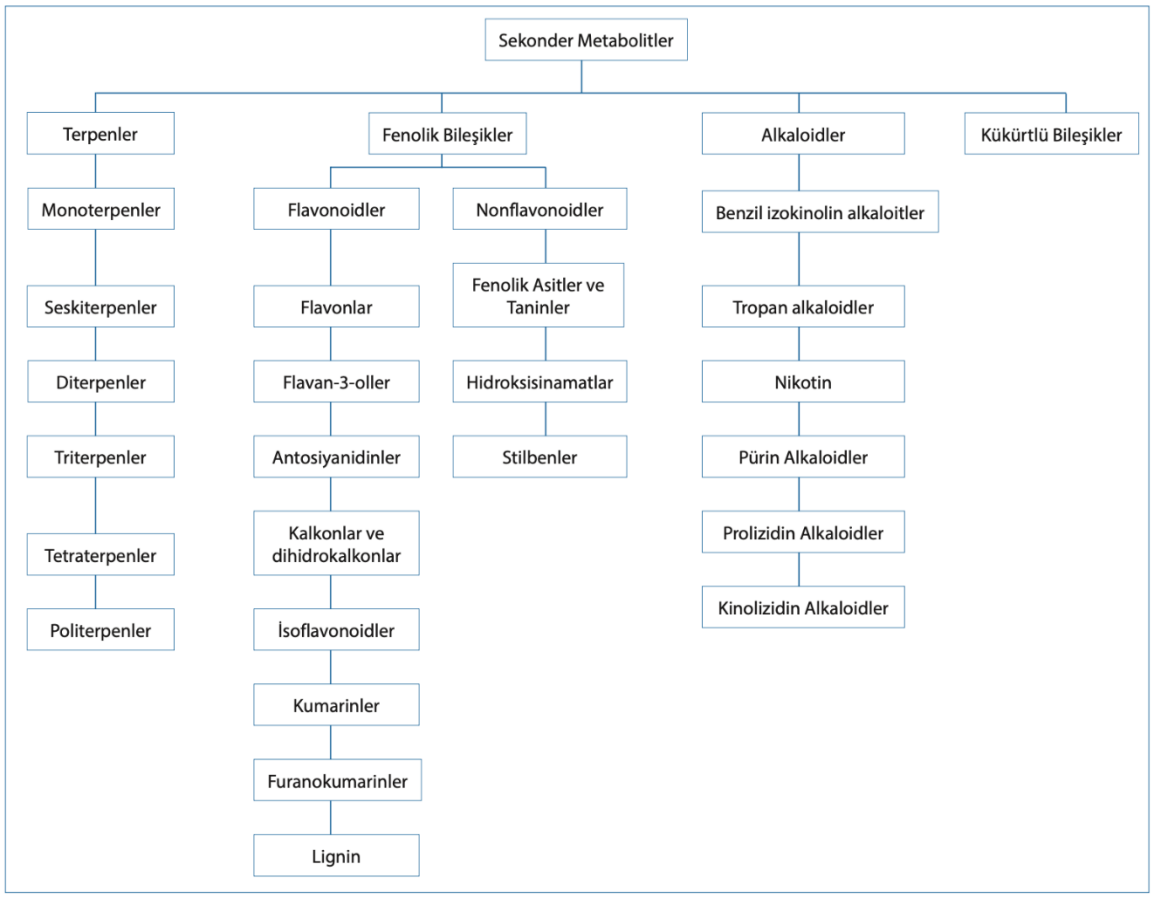
Kekik bitkisi sahip olduğu allelopati ve uçucu yağ içermesi sayesinde Fransa'da depolanan tarımsal ürünleri böceklerden koruyabilme hedefi ile de değerlendirildiği bildirilmektedir (Saraç ve Tunç, 1995).

2.3. Bitkilerdeki Sekonder Metabolitler

Bitki kimyasal bileşikleri fonksiyon ve metabolik sentezlenme yöntemlerine bağlı olarak primer (birincil) ve sekonder (ikincil) metabolitler olacak şekilde iki ayrı şekilde adlandırılırlar. Primer metabolitler hayat için esas olan gelişme, metabolizma ve çoğalma gibi görevleri yerine getirirken, sekonder metabolitler primer metabolitlere göre daha kompleks yapıda olmakla birlikte, bitkinin yaşam temellerini oluşturan yapılarda etken bir görevleri yoktur; fakat yoklukları ya da eksiklikleri bitkinin uzun devrede yıpranmasına hatta yaşam faaliyetinin sonlanmasına sebep olabilecek etkiye sahiptirler. Sekonder metabolitler bitkinin etrafını kaplayan ortama uyum sağlamasında, üreme olayına katkı sağlamada, bitki müdafaasında ve çevre ile irtibatında etkin işlevi olan bitkinin belirli gelişim etaplarında ya da stres zamanlarında üretilen organik bileşiklerdir (Topcu ve Çölgeçen, 2015).

2.3.1. Bitkilerdeki sekonder metabolitlerin sınıflandırılması

İlk defa 1891 yılında tarif edilen sekonder metabolitler bileşimleri, kimyasal yapıları ve birtakım çözücülerdeki çözünürlük pozisyonlarına durumlarına bağlı kategorize edilse de İngiliz Beslenme Vakfı (British Nutrition Foundation) dört temel kategoride tanımlamıştır (Ülger ve Ayhan, 2020). Şekil 2.2'de sekonder metabolitlerin sınıflandırılması yer almaktadır.



Şekil 2.2. Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması (Ülger ve Ayhan, 2020)

2.3.2. Bitkilerdeki fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler, bitki aleminde çeşitli miktarlarda olan ve sekonder metabolit olarak bilinen doğal olarak oluşan organik bileşikler sınıfıdır (Arruda, Neri-Numa, Kido, Júnior ve Pastore, 2020). Bitkilerin tohum, çiçek, meyve, gövde, dal ve yapraklarında var olan ve bitki metabolizmalarında fenilpropanoid, pentoz fosfat ve şikimat basamaklarından temel alan bileşiklerdir. Temel kimyasal formülleri C6-C3-C6 karbon iskeleti şeklinde olup basit fenoliklerden yüksek polimerize kadar birçok çeşidi mevcuttur (Bacanlı ve diğerleri, 2015). Fenolik bileşikler polifenoller olarak da adlandırılırlar ve yapılarında bulunan aromatik halkalara ek olarak birden fazla olmak üzere hidroksil grupları barındırırlar (Dey ve Harborne, 1989).

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Fenolik bileşikler, basit polifenollerden yüksek polimerize bileşiklere kadar farklılık gösteren bileşikler oluştururlar. Mono, oligo ve polisakkaritlerle konjugat oluşturmuş halde bulunan formları genellikle doğal olarak bulunan fenolik bileşiklerdir, buna ek olarak esterler gibi fonksiyonel formları da bulunmaktadır (Balasundram, Sundram ve Samman, 2006). Bitkilerdeki fenolik bileşik sınıfları karbon sayısı artışına göre Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

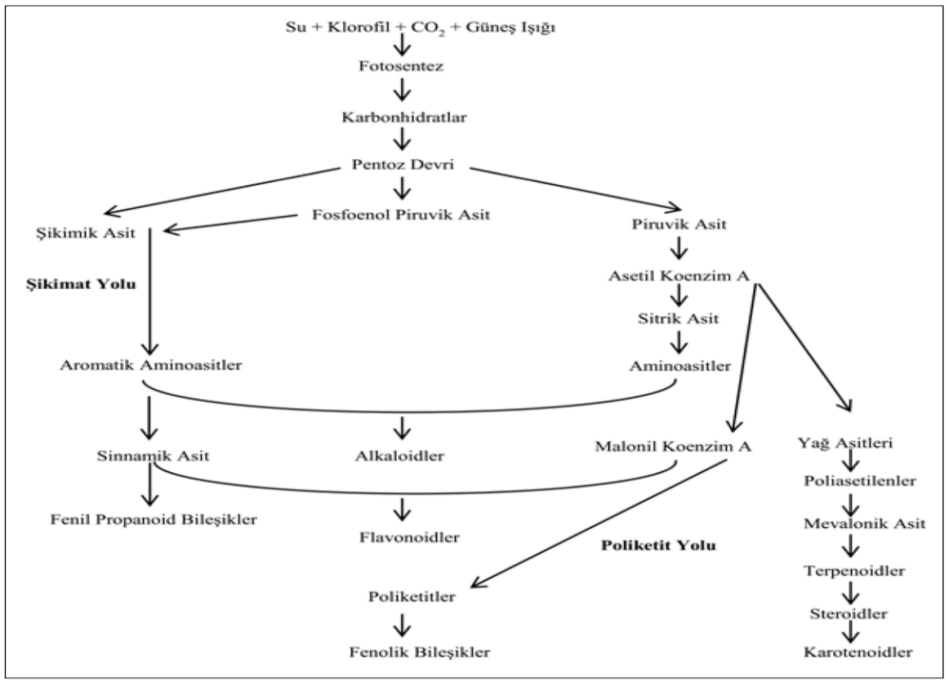
Çizelge 2.2. Bitkilerdeki Fenolik Bileşik Sınıflandırılması (Dey ve Harborne, 1989)

Karbon Atomu Sayısı	Temel İskelet	Sınıf	Örnekler
6	C_6	Basit Fenoller, Benzokinonlar	Kateşol, hidrokinon, 2,6-dimetoksi benzokinon
7	C_6-C_1	Fenolik asitler	p-hidroksi benzoik asit, Salisilik asit
8	C_6-C_2	Asetofenonlar, Fenilasetik asitler	3-Asetil-6-metoksi benzaldehit p-hidroksifenilasetik asit
9	C_6-C_3	Hidroksisinnamik asitler, Fenil propenler, Kumarinler, Izokumarinler, Kromonlar	Kafeik asid, Ferulik asid, Miristisin, Eugenol, Umbelliferon, Aesculetin, Bergenin, Eugenin.
10	C_6-C_4	Naftakinonlar	Juglon, plumbagin
13	C_6-C_1-C_6	Ksantonlar	Mangiferin
14	C_6-C_2-C_6	Stilbenler, Antrakinonlar	Lunularik asit, Emodin
15	C_6-C_3-C_6	Flavonoidler, İzoflavonoidler	Kersetin, Siyanidin, Genistein
18	$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanlar, Neolignanlar	Pinoresinol, Eusiderin
30	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoidler	Amentoflavon
n	$(C_6$-$C_3)_n$ $(C_6)_6$ $(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Lignin Kateşol Melanin Flavolanlar (Kondense Tanenler)	

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin biyogenetik olarak incelenmesi

Fenolik bileşikler kimyasal sınıflandırılması her zaman yeterli olmadığından bu sıralamanın yanı sıra biyogenetik olarak da sınıflandırılırlar. Bitkilerde yer alan fenolik bileşikler biyogenetik olarak incelendiklerinde iki temel yoldan oluşur;

1. Şikimik asid yolu; Direkt hidroksi sinnamik asit ve kumarinler ve benzeri fenil propanoidleri oluşturan.
2. Basit fenolleri ve kinonları oluşturabilen poliketit yolu (Hazer ve Çölgeçen, 2017). Şekil 2.3'de fenolik bileşiklerin oluşum yolu gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Fenolik Bileşiklerin Oluşum Yolu (Hazer ve Çölgeçen, 2017)

Fenolik bileşiklerin bitkiler için önemi

Sekonder metabolitler olarak bilinen fenolik bileşikler bitkilerin büyüme-gelişme evresinde, meyve ve sebzelerin tat ve renk özelliklerini vermede, bitkilerin pestlere karşı korunmasında etkin rolü olan organik maddelerdir (Bacanlı ve diğerleri, 2015). Aynı zamanda bitkiler maruz kaldıkları biyotik ya da abiyotik streslere karşı kendilerini savunmak için de bu sekonder metabolitlere güvenirler (Mazlun, Sabran, Mohamed, Abu Bakar ve Abdullah, 2019).

İnsan diyetinde fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler, meyveler, sebzeler, baklagiller ve tahıllar dahil olmak üzere bitki kaynaklı gıdalardan kahve, çay, bira ve şarap gibi içeceklerde ve ayrıca baharatlara kadar tükettiğimiz hemen hemen tüm gıdalarda yer almaktadır (Muller ve diğerleri, 2019). Diyet bitki polifenolleri ve polifenol bakımından zengin ürünler; karbonhidrat ve lipid metabolizmasını ayarlar, insülin direnci ve hiperglisemiyi azaltır. Hücre fonksiyonu ve yağ dokusu metabolizmasını iyileştirir, insülin salgısını uyarır. Oksidatif stresi, strese duyarlı sinyal yollarını ve inflamatuar süreçleri hafifletir. Metabolik sendrom riskini ve Tip 2 diyabetin ilgili komplikasyonlarını azaltması söz konusudur (Lin ve diğerleri, 2016).

Fenolik bileşiklerin insan sağlığı açısından etkileri

Fenolik bileşikler güçlü bir antioksidan kaynağı olmakla birlikte antikolinesteraz, antiinflamatuvar, antialerjik, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral, antimutajenik, antiülser ve benzeri birçok aktiviteye sahip oldukları düşünülmekte ve bu etkiler sayesinde özellikle sağlık, eczacılık ve uygulamalı bilim alanlarında artan bir değere sahiptir (Moure ve diğerleri, 2001). Fenolik bileşikler ile yapılan çalışmalarda üzüm çekirdeği ekstraktının nörodejeneratif hastalıklara karşı etkisi incelenmiş ve bu çalışmada sıçanlarda yapılan gözlem sonucunda farklı nöronlarda antioksidan etkisi olduğu belirlenmiştir (Balu, Sangeetha, Murali ve Panneerselvam, 2006). Bitkisel bir fenolik olan baisalin ile yapılan bir çalışmada insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve antiinflamatuvar etki gözlenildiği belirtilmiştir (Li ve diğerleri, 2000).

Serbest radikalleri imha etme ve lipid peroksidasyon oluşturma özelliği olan metal iyonlarla şelasyon yaparak antioksidan etki gösteren maddeler fenolik bileşik yapıdadırlar (Bravo 1998). Fenoliklerin antioksidan etkileri redoks özelliklerinden dolayıdır. Bu özelliklerden dolayı indirgeme ajanı, hidrojen vericiler, tekli oksijen önleyici olarak etki ederler (Deveci ve diğerleri, 2016). Fenolik bileşiklerin antioksidan tesirleri;

- Enerji çeşitlerine ve metabolizma kademelerine,
- Plazmada gezinen metoksi ve konjuge yapılarının faliyetlerine,
- Polimerik polifenol ya da basit monomerik polifenol olmasına,
- Flavonollerdeki şeker gruplarının varlığı ve pozisyonlarına bağlıdır (Bacanlı ve diğerleri, 2015).

2.4. Yağ Asitleri

Yağ asitleri düz bir hidrokarbon zinciri olup yapısında karboksil grubu (-COOH) taşırlar ve yağın en önemli öğesi olarak bilinirler. Bütün yağ bitkilerinde gliserol aynı olmakla birlikte buna karşılık yağ asitleri her bir yağ bitkisinde farklı bir şekilde bulunmakta ve bitkilerin barındırdıkları yağ asitleri şekilleri yağın farklı kullanım opsiyonlarını ortaya koymaktadır. Yağ asitleri öncelikle doymuş ve doymamış olmak üzere iki esas grupta toplanmaktadır (Karaca ve Aytaç, 2007).

Çoklu doymamış bir omega-6 yağ asidine dahil olan linoleik asitin bağışıklık sistemi kuvvetlenmesinde, beyin gelişimi ve koroner kalp hastalıkları gibi önemli sağlık problemlerinin oluşumunu engelleme etkilerinin yanı sıra bu grubun eksikliğinde insanlarda bazı deri hastalıkları (cilt kuruluğu), büyümede gerileme, astım ve oldukça yaygın olan şeker hastalığı ve kanserin bazı türlerinin yanında beyin gelişiminde aktif rol oynaması sebebi ile öğrenme eksikliği gibi etkilerde görülmektedir (Eseceli ve diğerleri, 2006).

2.5. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nöron işlevselliğinde çevresel etmenler, genetik yatkınlık veya her ikisinin etkileşimi ile yapısal olarak bozulma ve zamanla artan kayıplar nörodejeneratif hastalıklar olarak bilinmektedir. Dünya genelinde en yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklar ileri yaşlarda daha çok görülen Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı ve erken yaşlarda kendini gösterme eğiliminde olan Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington hastalığıdır (Korkmaz ve Kaya, 2019). Nörodejeneratif hastalıklar, heterojen klinik ve patolojik ifadelerin, işlevsel anatomik sistemlerde nöronların belirli alt kümeleri etkileri sonucu ortaya çıkan geniş bir nörolojik bozukluk grubunu temsil eder; ortaya çıkış nedenleri tam olarak bilinmez ve çok hızlı bir şekilde ilerlerler (Przedborski, Vila ve Jackson-Lewis, 2003).

2.5.1. Alzheimer hastalığı ve sebepleri

Beyinde 100 milyar sinir hücresi vardır. Her sinir hücresi de belirli görevleri yerine getirebilmek adına iletişim ağları oluşturmak için diğerleriyle bağlantı kurar. Her bir sinir hücresi grubuna tahsis edilmiş görevler vardır; nefes alma, görme, koklama, düşünme, öğrenme ve hatırlama. Tıpkı bir fabrika gibi işleyen bu sistemin beklenmedik bir şekilde mikroskobik beyin değişikliklerine uğramasıyla sistemde büyük ve kalıcı hasarlara neden olur. Alzheimer hastalığı nörodejeneratif bir hastalık olmakla beraber nörodejenerasyon da tipik olarak limbik sistemde başlangıç gösteren ve yavaş yavaş paralimbik bölgelere oradan da primer duysal ve motor kortekse kadar yayılma gösterir. Alzheimer tanısında patogenezi tam olarak net olmasa da hücre dışında gözlemlenen senil plaklarının oluşumuna sebep olan amiloid β proteinlerin aşırı birikmesi ve bunun sonucu meydana gelen oksidatif stres ve bir diğer etmende hücre içinde yumaklar şeklinde gözlemlenen nörofibrillerin oluşmasına sebep olan tau proteinlerinin bulunması hastalığın teşhisindeki önemli etmenlerdir (Aslan,

2016).

Sağlıklı bireylerde bulunan amiloid proteinleri zamanla beyin hücreleri arasındaki iletişimi perdeleyerek beyin hücrelerinin yok olmasına neden olur. Amiloid proteinlerinin üç farklı enzim ürettiği ve bu enzimlerinde farklı bir kombinasyonla beta amiloid adı verilen farklı bir protein ortaya çıkardıkları ve bu beta amiloid proteinin hücre dışına çıktığında normal şartlar altında erimesi gerekirken bu durumun aksine daha yapışkan bir şekilde fibriller üreterek plakalara sebep olduğu sonucuna varılmıştır (Hartman, 2010). Alzheimer hastalarında görülen ise bu plakaların birikmesinin sebep olduğu iltihaplanma sonucu meydana gelen oksidatif stresin nöronların zamanla yapısal işlevini bozmasıdır. Bu durumda Alzheimer hastalığı patolojisinde oksidatif stresinde etken bir rol üstleneceğini göstermektedir (Zhao, Y. ve Zhao, B., 2013).

Alzheimer tanısında etken rolü bulunan tau proteini normal şartlar altında mikrotübülleri stabilize eden ve bu sayede sinir hücreleri ve vücut hücreleri arasındaki dengeyi sağlayan ve hücre morfolojisini düzenleyen çoğunlukla nöronlarda eksprese edilen bir proteindir. Fakat Alzheimer hastalığı gibi patolojik koşullarda tau anormal şekilde hiperfosforile edilir ve bu da mikrotübüllere olan afinitesinde azalmaya sebep olur (Barron ve diğerleri, 2017). Alzheimer hastalığı patolojisinde nörofibriler yumaklar ve amiloid plak var oluşu dışında gliozis, nöron ve sinaps eksilmeleri, aksonal ve dendritik morfolojik farklılıklar ve diğer nörotransmitter sistemlerindeki kayıplarda Alzheimer hastalığı nöropatoloji etmenlerini meydana getirirler (Gürvit, 2004).

2.5.2. Kolinesteraz inhibitörleri

Alzheimer hastalığı için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı ilk patolojik tedaviler kolinesteraz inhibitörlerdir (Çulhaoğlu, Hatipoğlu, Dönmez ve Topçu, 2015). Sağlıklı bir insan vücudunda iki tip kolinesteraz bulunur. Bunlar; kolinerjik aksonlarda ve nöronların hücre gövdelerinde bulunan asetilkolinesteraz (AChE) ve ağırlıklı olarak bir nöroglial dağılıma sahip olan bütirilkolinesterazlardır (BChE). AChE'nin sinir ağı oluşumunu, tümör baskılanmasını, hücre adezyonunu sağlamak gibi birçok rolü bulunmaktadır. Bunlarla birlikte esas rolü, ACh'nin sinaptik boşlukta serbest bırakılmasıyla oluşan sinirsel impulsunu olabilecek en hızlı şekilde sonlandırmaktır (Schumacher ve diğerleri, 1986). Alzheimer hastalığı gözlemlenen kişilerin beyinlerinde anormal derecede

düşük asetilkolin konsantrasyonlarına sahip olduğu bulunmuştur. Bu durumda beraberinde AChE enzim artışını azaltmanın Alzheimer hastalığı ve benzeri beyin fonksiyonel bozukluklarının tedavisinde yararlı olabileceği anlamına gelmektedir (Topçu ve Kuşman, 2014). Bu sebeple tedavi seçenekleri arasında çoğunlukla asetilkolin (ACh) seviyesini eski haline getirmeyi amaçlayan, yani kolinerjik sistemin aktivitesini arttırmaya yönelik asetilkolinesteraz inhibitörlerini hedefleyen bir tedavi seçimine artan bir ilgi durumu söz konusudur.

2.6. Antioksidanlar

Oksijen canlı yaşamı için gerekli olan en önemli maddelerden biridir fakat bu özelliğinin her zaman olumlu yönde kullanımı, oksijen serbest radikal yapısında olduğunda pek de mümkün olmamaktadır. Serbest radikaller; bağımsız olarak varlığını sürdürebilen, bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron barındıran atom ya da atom grupları şeklinde tanımlanabilir. Aerobik metabolizmada oluşan serbest radikaller, hücre çoğalması, apoptoz ve gen ekspresyonu gibi bir dizi düzenleyici süreçte görev alırlar. Fazla üretildiğinde serbest radikaller, hücre proteinlerini, karbonhidratları, membran lipidlerini, DNA'yı ve enzimleri oksitleyip hücredeki temel molekülleri bozarak, antioksidan sistemin savunma kabiliyetine karşı koyabilir. Oksidatif stres, sitotoksik bileşiklerin oluşumuna neden olur ve normal hücre işleyişini karakterize eden oksidan ve antioksidan dengesini değiştirir (Pisoschi, Pop, Cimpeanu ve Predoi, 2016).

Serbest radikallerin ortaya çıkardığı oksidasyonları engelleme, serbest radikalleri tutma ve sağlamlaştırma özelliğini barındıran maddeler “antioksidan” olarak adlandırılmaktadır (Çelik ve Ayran, 2020).

Yüksek reaktiviteye sahip oksidan moleküller olan oksijen serbest radikalleri, hücrenin önemli molekülleri ile tepkimeye girerek oksidatif hasar meydana getirirler. Reaktif oksijen türleri (ROT) stabil ilerleyen metabolizma sırasında eser miktarda oluşur, serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilir ya da çeşitli serbest radikallerin oluşumuna katkı sağlayabilir. Antioksidan savunma sistemi ve oksidan türler arasındaki dengesizlik, oksidatif tahribata neden olabilen spesifik faktörleri tetikleyebilir; kontrolünü kaybetmiş protein kodlayan genler olan onkogen genlerinin fazlaca üretilmesini, hücrelerin kontrolsüzce çoğalması ve değişmesine neden olan mutajen bileşiklerinin oluşumunu,

ateromatöz dejenerasyon teşviki, iltihaplanma ve yaşlılık plak oluşumu gibi. Bu durum beraberinde kanser, nörodejenerasyon, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve böbrek hastalıkları olmak üzere birçok hastalığın gelişmesine sebep olur (Pisoschi ve Pop, 2015). Antioksidanlar ROT'un oksidatif süreçlerini ve zararlı etkilerini azaltmada hem gıda sistemlerinde hem de insan vücudunda önemli bir role sahiptirler (Gülçin, 2020).

2.6.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidan kavramı; enzimatik ve enzimatik olmayan, engelleyici veya onarım sistemleri, endojen ve ekzojen, birincil ve ikincil, suda ve yağda çözünür, doğal veya sentetik olmak üzere birkaç farklı şekilde gruplanabilir. Genel olarak etki düzeneklerine göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak adlandırılırlar (Yılmaz ve Boyacıoğlu, 2020).

Birincil antioksidanlar; tokoferoller ve bazı fenolik bileşikler gibi. Bu maddeler hidrojen vericiler olarak hareket ederek oksidasyonun zincir reaksiyonunu engeller. İkincil antioksidanlar; metal iyonları, tekli oksijen, prooksidatif enzimler ve diğer oksidanlar gibi. Bu maddeler ise oksidasyon promotörlerini baskı altına alarak oksidasyonu engeller veya geciktirme etkisi gösterirler. Aynı zamanda indirgeyici ajanlarda redoks reaksiyonları yoluyla lipid peroksitleri ve ilgili oksidanları azaltma etkisine sahiptirler. Askorbik asit benzeri bazı ikincil antioksidanlar, hidrojen atomunu yenileyerek birincil antioksidanları tekrar üretebilir bu durum ile de önemli birincil antioksidanların tükenme olasılığı engellenir. Diğer ikincil antioksidanlar, hidroperoksitlerin radikal olmayan türlere ayrışmasını teşvik eder veya UV radyasyonunu emer, böylece lipidleri UV kaynaklı fotooksidasyondan korur (Shahidi ve Zhong, 2015).

Antioksidanlar bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunabilir veya kimyasal yollarla sentezlenebilir. Şekil 2.4'de antioksidanların sınıflandırılması iki şekilde gruplandırılmıştır.



Şekil 2.4. Antioksidanların Sınıflandırılması

2.6.2. Antioksidanların çalışma mekanizmaları

Antioksidanların etki ve çalışma düzenekleri;

1) Serbest radikalleri toplama ve giderme özellikleri sayesinde tutturarak ya da stabil moda getirerek,
2) Serbest radikalleri bağlayarak ilişkili reaksiyonları oluşturma reaksiyonlarını durduran zincir kırıcı etki ile,
3) Reaksiyon hızını baskılayıcı etki ile azaltarak,
4) Lipit, protein, DNA benzeri yapılarda meydana gelebilecek hasarları onarıcı etki ile yenilenme,
5) Oksidasyon reaksiyonlarını hücresel kinaz azalışını engelleyerek.

Serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyelleri, antioksidanların kimyasal aktivitelerini açıklamada etkendir (Bacanlı ve diğerleri, 2015).

2.6.3. Antioksidan kapasite ölçme metotları

Antioksidanların aktivitesi çoğunlukla yapısal özellikleri, konsantrasyonu, sıcaklığı, oksidasyon substratının tipi ve sistemin fiziksel durumu ile antioksidan sistemleri inhibe eden maddeler ve aynı yönde etki edenlerin varlığı gibi bir dizi faktörden etkilenir (Yanishlieva ve Maslarova, 2001).

Antioksidanların aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntem ve testler son birkaç yılda değerli ölçüde gelişmiştir. Antioksidan kapasite ölçme yöntemleri tercih edilen kimyasal reaksiyon bakımından iki ana başlıkta toplanabilir;

1) Hidrojen atomu iletimine dayanan metotlar
2) Elektron atomu iletimine dayanan metotlar, Çizelge 2.3'de antioksidan kapasite ölçme metotları gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Antioksidan Kapasite Ölçme Metotları

Hidrojen Atomu Transferine Dayanan Metotlar	*Elektron Atomu Transferine Dayanan Metotlar*
Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC)	Serbest radikal giderim aktivitesi metodu (DPPH)
Toplam radikal tutma parametresi (TRAP)	Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) metodu
Luminol Metodu	Trolaks eşdeğeri antioksidan kapasite metodu
Fikoeritrin (PE) temelli metotlar	Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü metodu
Folin Ciocalteu Metodu	
Alüminyum nitrat	
DCFH-DA metodu	
Krosin metodu	
Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi metotu	

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Thymus cappadocicus* var. *cappadocicus* materyali

T. cappadocicus var. *cappadocicus* bitkisi Gazi Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Hayri Duman tarafından 12 Temmuz 2017 yılında yukarı Fırat bölgesi Erzincan (İliç), çöpler madeni sahası ve kilise çevresi, 1550 m yükseklik ve kalkerli step bölgesinden toplanmış ve teşhis edilmiştir. HD numarası 10471'tir. (Yukarı Fırat bölgesi, Kapadokya bölgesinin kapsadığı alana dahildir.) Resim 3.1'de *T. cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus* bitkisi yer almaktadır.



Resim 3.1. *Thymus cappadocicus* Boiss. var. *cappadocicus*

3.1.2. Kimyasallar

HPLC çalışmalarında kullanılan kimyasallar ultra saf su, asetonitril ve fosforik asit Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Analizde kullanılan standartlarda Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

Yağ asitleri çalışmalarında kullanılan kimyasallar n-hekzan ve potasyum hidroksit ISOLAB'tan, metanol J.T.Baker'dan temin edilmiştir.

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite çalışmalarında; Sodyum fosfat monobazik: Sigma-Aldrich, S0751-500G, Sodyum fosfat dibazik: Sigma-Aldrich, S0876-500G, dimetil sülfoksit (DMSO): Merck, 1029522511, asetilkolinesteraz enzimi (AchE): Sigma-Aldrich, C3389-500UN, Acetylcholinesterase from Electrophorus electricus (electric eel)", 5,5′-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB): Sigma-Aldrich D8130-5G, Asetiltiyokoliniyodür iyodür: Sigma-Aldrich, 01480-5G, Galantamin: Sigma-Aldrich, G1660-10 mg olarak temin edilmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasallardan; 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH), metanol ve dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ekstraktların hazırlanışı

Bitki materyali (50 g), yaklaşık 24 saat boyunca sabit bir kütleye kadar dondurularak kurutulmuştur ve bir kahve değirmeni kullanılarak homojen bir toz halinde öğütülmüştür. Soxhlet ekstraksiyonu bir BUCHI Ekstraksiyon Sistem B-811'de (Buchi, İsviçre) yapılmıştır (Resim 3.2). Toz haline getirilen bitki materyalinin (8 g) soxhlet ekstraksiyonu, yaklaşık 8 saat boyunca 100 mL çözücü ile gerçekleştirilmiştir. Çözücü ekstraksiyonu için ayrı ayrı; su, metanol ve etil asetat çözücüleri kullanılmıştır. Çözücüler Heidolph Hei-VAP Hassas motorlu rotavapor ile uzaklaştırılmıştır (Resim 3.3). Elde edilen ekstraktlar kullanıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir (Gercek, Celik ve Bayram, 2021).



Resim 3.2. Soxhlet ekstraksiyon cihazı BUCHI Ekstraksiyon Sistem B-811(Buchi, İsviçre)



Resim 3.3. Heidolph Hei-VAP Hassas rotary evaporator

3.2.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile fenolik bileşiklerin teşhisi ve miktar tayini

Türden elde edilen metanol, etil asetat ve su ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin teşhisi ve miktar tayini Iğdır Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkez laboratuvarında HPLC analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir.

T. cappadocicus var. *cappadocicus* su, metanol ve etil asetat ekstraktları fenolik bileşikleri yüksek basınçlı sıvı kromatogrofisi (HPLC) ile tanımlanmıştır. Ekstraktlar 80:20 su:metanol olacak şekilde çözülmüş ve önce 0.20 µm tek kullanımlık LC filtre diskinden geçirilip analiz edilmiştir. Ace generix C18 kolonu (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) ayırma için 30°C kullanılmıştır. Çözücü akış hızı 0,8 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL olacak şekilde çalışılmıştır. Kullanılan mobil fazlar her üç ekstrakt içinde %0,1 fosforik asit suda ve %100 asetonitril olmuştur (Çizelge 3.1.). HPLC 1200 infinity agilent cihazında (Resim 3.4) çalışılmıştır. Analizler üç kez tekrarlanmış ve her bir fenolik bileşik için standartlar kullanılmış ve sonuçlar mg/g olarak verilmiştir (Çizelge 3.2.) (Tel-Çayan ve diğerleri, 2022).

Çizelge 3.1. HPLC analizinde uygulanan gradient akış programı

Zaman	Mobil Faz A %83 (0,1 Fosforik asit suda)	Mobil Faz C %17 (%100 Asetonitril)
0	83	17
7	85	15
20	80	20
24	75	25
28	70	30
30	60	40
32	50	50
36	30	70
40	83	17

*Akış hızı: 0,8 ml/dk

Çizelge 3.2. Fenolik Bileşikler Standart Miktarları

Fenolik Bileşikler	Standart(ng/ul)
Klorojenik asit	4,000
Kateşin hidrat	4,000
Kafeik asit	2,000
4-Hidroksi benzoik asit	4,000
Vanilin	3,000
p-Kumarik asit	4,000
Rutin	10,000
t-Ferulik asit	4,000
Hidroksi sinamik asit	3,000
Naringin	10,000
o-kumarik asit	2,000
Rosmarinik asit	1,500
Salisilik asit	5,000
Resveratrol	2,000
Kuersetin	2,000
t-Sinamik asit	2,000
Naringenin	2,000
Krisin	10,000
Flavonlar	2,000



Resim 3.4. HPLC 1200 Infinity Agilent Cihazı

3.2.3. Gaz kromatografi alev iyonlaşmalı dedektör ile yağ asitlerinin belirlenmesi

Türden elde edilen metanol, etil asetat ve su ekstraktlarında bulunan yağ asitleri tayini Iğdır Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkez laboratuvarında GC-FID analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir.

0,2 g örnek alınarak üzerine 2 mL Hekzan eklenmiştir (sabit yağların incelenmesi için metil esterleme). Daha sonra 0,2 mL 1N KOH çözeltisi eklenmiştir (1 N KOH çözeltisi metanolle hazırlanmıştır). İyice bir karıştırma işlemi uygulanmış ve faz ayrımı görülmüştür. Üst faz berraklaşıncaya kadar tüpler karanlık ortamda bekletilmiştir. Berraklaşma işlemi gerçekleşince üst faz viallere alınarak GC-FID cihazı ile yağ asitleri analizi yapılmıştır. Standart olarak Supelco ® 37 Component FAME Mix- Sigma-Aldrich kullanılmıştır (AOCS, 1989).

3.2.4. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivite tayin yöntemleri

Ekstraktların ve standartın asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi, Ellman metoduyla spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Ellman, Courtney, Andres Jr. ve Featherstone, 1961). Özetle, 96 kuyucuklu mikroplakanın her bir kuyucuğuna 180 µL 0,1 M pH=8 fosfat tamponu, 5 farklı konsantrasyonda DMSO'da hazırlanan ekstrakt ve standarttan 45 µL (stok çözelti konsantrasyon aralıkları: 1000-62,5 µg/mL; kuyucuklardaki ekstraktların son konsantrasyon aralıkları: 150-9,38 µg/mL), AchE çözeltisinden ise 45 µL ilave edilmiş, ardından mikroplaka 25 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyucuklara 15 µL DTNB çözeltisi ve 15 µL asetiltiyokoliniyodür ilave edilmiştir. Asetiltiyokolin iyodürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonunun 412 nm dalga boyunda absorbans değişimi mikroplaka spektrofotometrisi (Biotek Epoch)'nde (Resim 3.5) olarak 6 dakika boyunca izlenmiştir. Kontrol olarak DMSO, standart olarak ise AH tedavisinde kullanımı onaylı olan etken madde Galantamin kullanılmıştır (Im, Nguyen, Choi ve Lee, 2016).

Ekstraktların anti-asetilkolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

% inhibisyon = [(A kontrol- A örnek) / A kontrol)) x100

A kontrol; test örnekleri olmayan enzim aktivasyonu

A örnek; test örnekleri olan enzim aktivasyonu

Testler üç defa tekrarlanmış olup sonuçlar, IC_{50} (µg/mL) değeri olarak verilmiştir.



Resim 3.5. Mikroplaka Spektrofotometresi Biotek Epoch

3.2.5. DPPH radikali süpürme testi

Ekstraktların serbest radikal giderim aktiviteleri 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH) kullanılarak belirlenmiştir (Blois, 1958). DPPH testi, daha önceki çalışmalara göre küçük modifikasyonlarla yapılmıştır. Bu test için 0,0024 g DPPH, 0,6 mM reaktif hazırlamak üzere 100 mL metanol içinde çözündürülmüştür. 250 µL bitki ekstraktına (25-125 µg/mL) 2,5 mL DPPH solüsyonu eklenmiş ve 2,5 mL metanol eklenerek süpürücü aktiviteler takip edilmiştir. 2,5 mL DPPH reaktifine 2,5 mL metanol eklenip negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak ise gallik asit kullanılmıştır. Kontrol grupları ve örnekler 30 dk karanlıkta tutulmuştur. Sonunda, güçlü bir serbest radikal DPPH'nin nötralizasyon süreci ölçülerek 517 nm'de Thermo Scientific Multiskan Go-Uv-visible Spektrofotometrik (Resim 3.6) olarak örneklerin antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir ve IC_{50} değerleri elde edilmiştir (Diken, Bayhan, Acar ve Dogan, 2022).

İnhibisyon (%) = 100 – ((A1 /A0) x 100)
(Burada; A0 kontrolün absorbansı ve A1 örneğin absorbansıdır.)



Resim 3.6. Thermo Scientific Multiskan Go-UV-visible Spektrofotometre

3.3. İstatistiksel Analizler

Antioksidan aktivite çalışmaları için;

Tüm çalışmalar üç tekrarlı ve üç paralelli olacak şekilde yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucu, bu tekrarların ortalaması ± standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analizler ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA), SPSS 20 (SPSS, Chicago, IL, USA) programı, post host Tukey testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ alınmıştır.

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivite çalışmaları için;

İstatistiksel analiz, Graphpad Prism 5.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırma, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

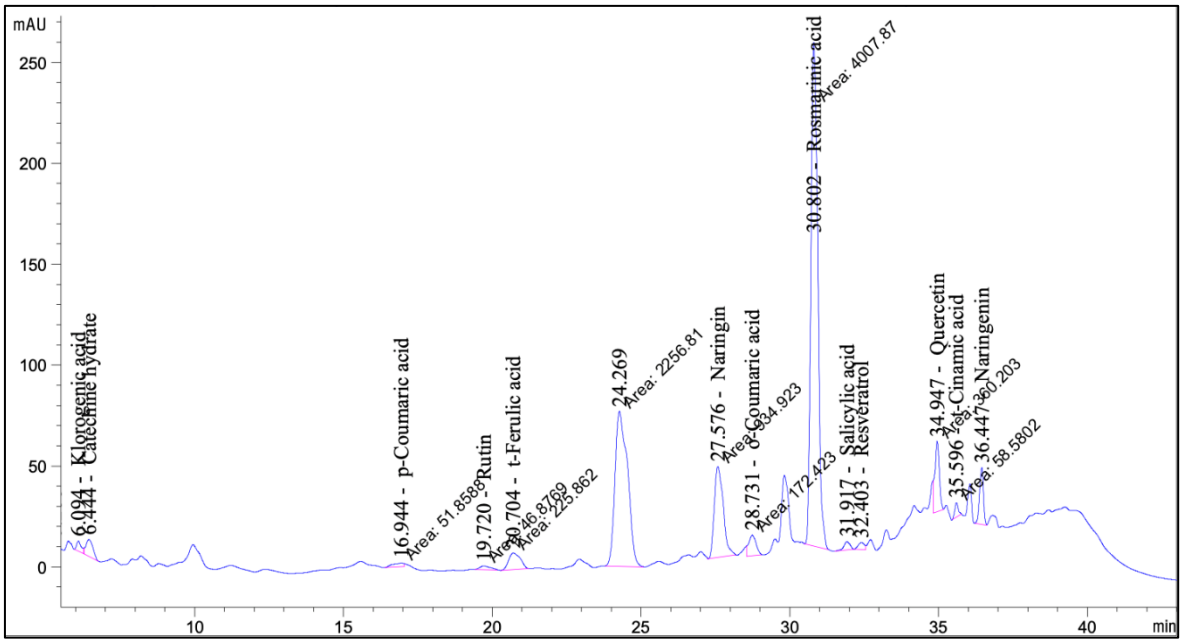
T. cappadocicus var. *cappadocicus* bitkisi toprak üstü kısımlarından (8 g) soxhlet ekstraksiyonu ile 3 ekstrakt elde edilmiş ve tüm çalışmalar bu 3 ekstrakt ile gerçekleştirilmiştir (metanol, etil asetat ve su).

4.1. HPLC Fenolik Bileşik Analizi

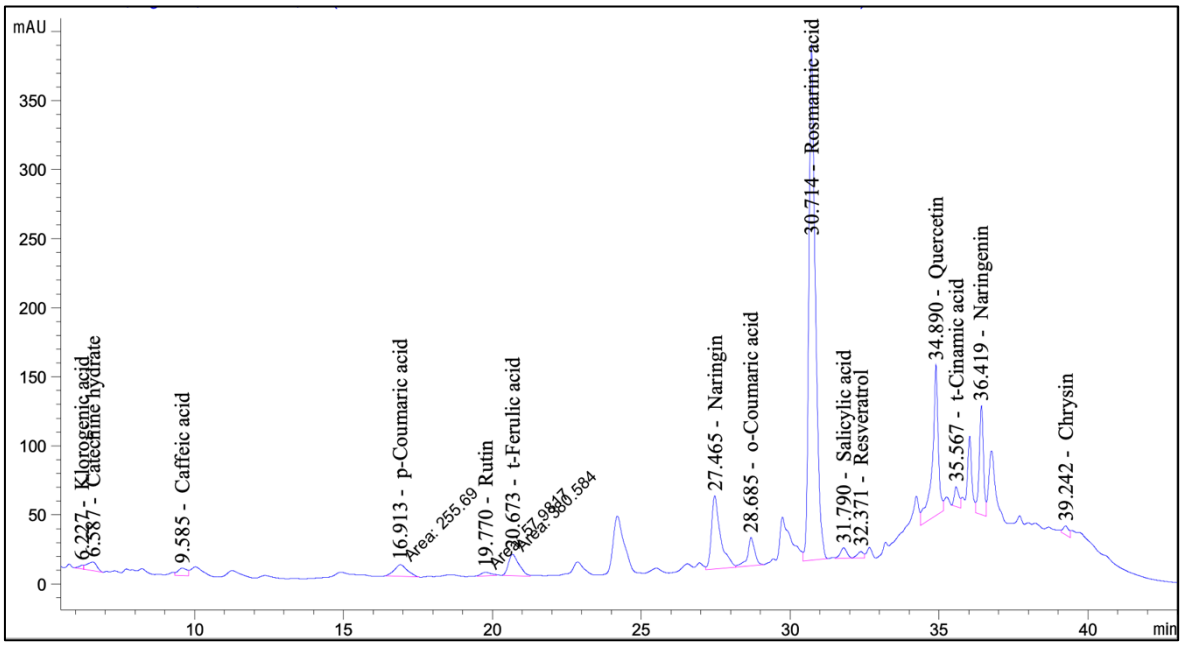
Bu çalışmada endemik bir tür olan *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türü ekstraktları (metanol, etil asetat ve su) fenolik bileşikleri HPLC-DAD yöntemi ile ölçülmüştür. 10 mg *Thymus* metanol, etil asetat ve su ekstraktları ayrı ayrı olacak şekilde tartılmış, 1mL metanol ile çözdürülmüştür. Filtrasyon işleminden sonra 10mg/mL yani 10000 ppm konsatrasyon da içerisinde standart karışımı olan cihaza (Agilent 1260 DAD dedektörlü HPLC) verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fenolik Bileşikler HPLC Analiz Sonuçları (mg/g)

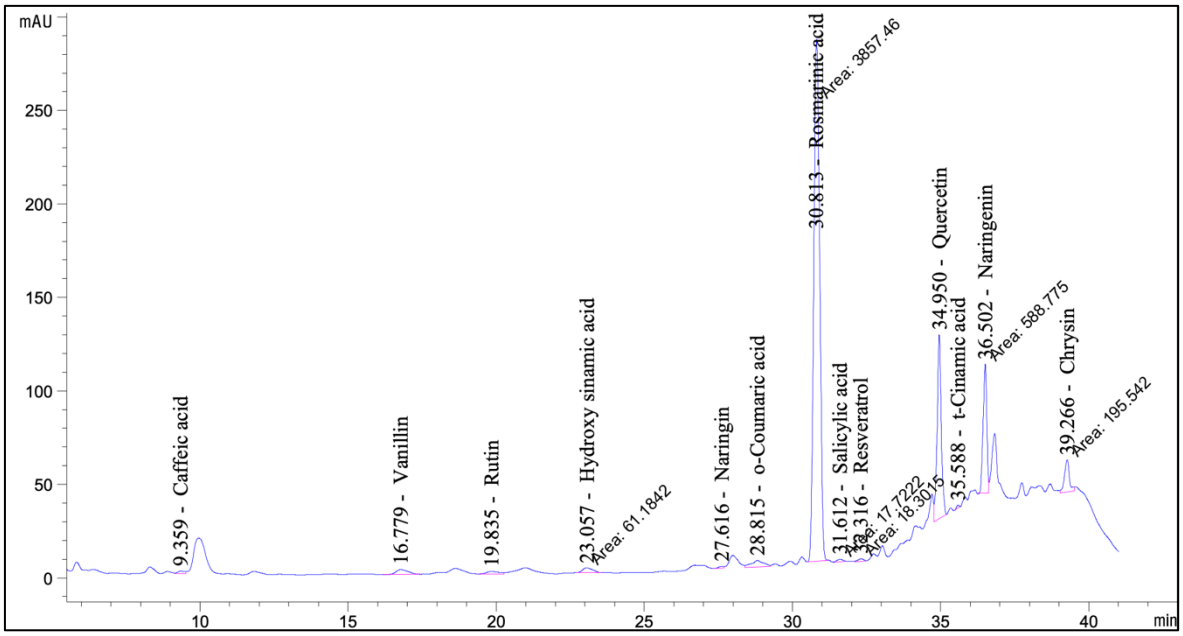
Fenolik Bileşikler	TE (mg/g)	TM (mg/g)	TS (mg/g)
Klorojenik asit	-	0,17 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Kateşin hidrat	-	1,09 ± 0,01	1,05 ± 0,01
Kafeik asit	0,065 ± 0,01	0,31 ± 0,01	-
4-Hidroksi benzoik asit	-	-	-
Vanilin	0,24 ± 0,01	-	-
p-Kumarik asit	-	0,70 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Rutin	0,19 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,26 ± 0,01
t-Ferulik asit	-	1,31 ± 0,01	0,77 ± 0,01
Hidroksi sinamik asit	0,14 ± 0,01	-	-
Naringin	0,077 ± 0,001	11,39 ± 0,02	9,54 ± 0,02
o-kumarik asit	0,22 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,40 ± 0,01
Rosmarinik asit	11,68 ± 0,02	17,26 ± 0,02	12,14 ± 0,02
Salisilik asit	0,04 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Resveratrol	0,046 ± 0,001	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Kuersetin	2,50 ± 0,01	3,94 ± 0,01	0,98 ± 0,01
t-Sinamik asit	0,021 ± 0,001	0,44 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Naringenin	2,41 ± 0,01	3,22 ± 0,01	1,05 ± 0,01
Krisin	5,83 ± 0,02	2,69 ± 0,02	-
Flavonlar	-	-	-



Şekil 4.1. TS ekstraktı kromatogramı (Dedektör dalga boyu:300/200 nm, Ref:500/100 nm)

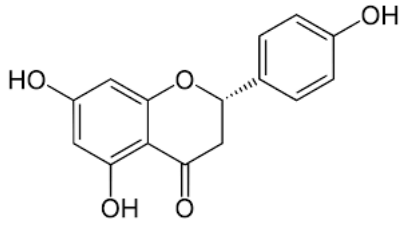


Şekil 4.2. TM ekstraktı kromatogramı (Dedektör dalga boyu:300/200 nm, Ref:500/100 nm)

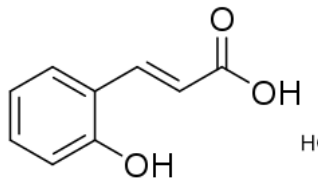


Şekil 4.3. TE ekstraktı kromatogramı (Dedektör dalga boyu:300/200 nm, Ref:500/100 nm)

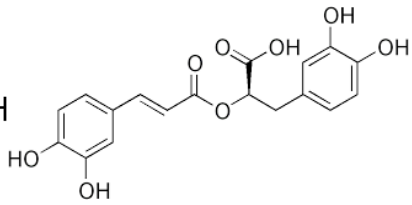
Çizelge 4.1 veya Şekil 4.1,4.2 ve 4.3 incelendiğinde; HPLC/DAD analizi sonucunda incelenen 19 fenolik bileşikten 9'u metanol ekstraktı, su ekstraktı ve etil asetat ekstraktlarının hepsinde tespit edildi (Şekil 4.4). Ekstraktların fenolik bileşik miktar ve çeşitliliklerini en fazla metanol ekstraktının gösterdiği onu sırasıyla su ve etilasetat ekstraktının takip ettiği görülmektedir. Üç ekstraktda ortak olarak meydana çıkan fenolik bileşikler incelendiğinde oldukça güçlü bir antioksidan etki gösteren rosmarinik asit ön plana çıkmaktadır. Ekstraktların içerdiği rosmarinik asit miktarı incelendiğinde en fazla metanol ekstraktı (17,26 ± 0,02 mg/g) onu sırasıyla su ekstraktı (12,14 ± 0,02 mg/g) ve etilasetat ekstraktı (11,68 ± 0,02 mg/g) takip etmektedir. Su ve metanol ekstraktlarında, rosmarinik asitten sonra narinjin (TM=11,39 ± 0,02 mg/g; TS=9,54 ± 0,02 mg/g) önemli bir bileşik olarak belirlenmiştir. Etil asetat ekstratında, rosmarinik asitten sonra en fazla bulunan fenolik ise krisin (5,83 mg/g) olarak belirlenmiştir. İncelenen fenolikler arasında 4-Hidroksi benzoik asit ve flavonlar her üç ekstrakt için de tespit edilememiştir.



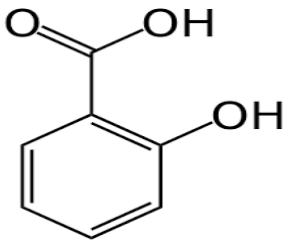
*Naringin



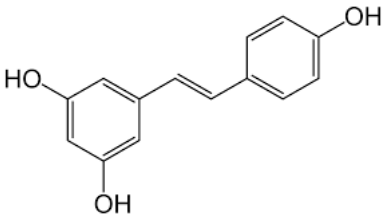
*o-kumarik asit



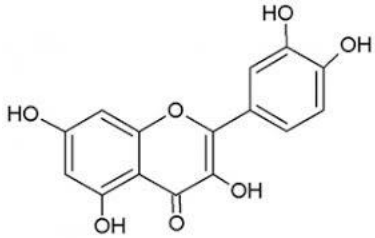
*Rosmarinik asit



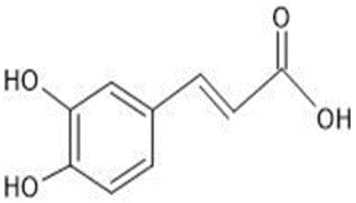
*Salisilik asit



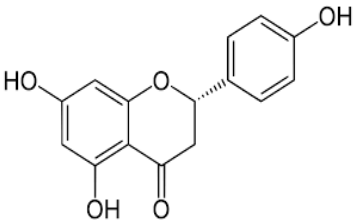
*Resveratrol



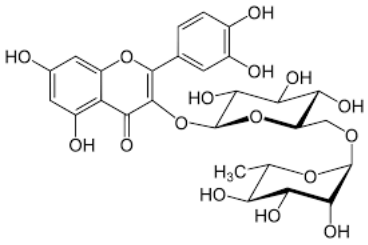
*Kuersetin



* t-Sinnamik asit



*Naringenin



*Rutin

Şekil 4.4. TM-TS-TE ortak bulunan 9 fenolik bileşiğin kimyasal formülleri

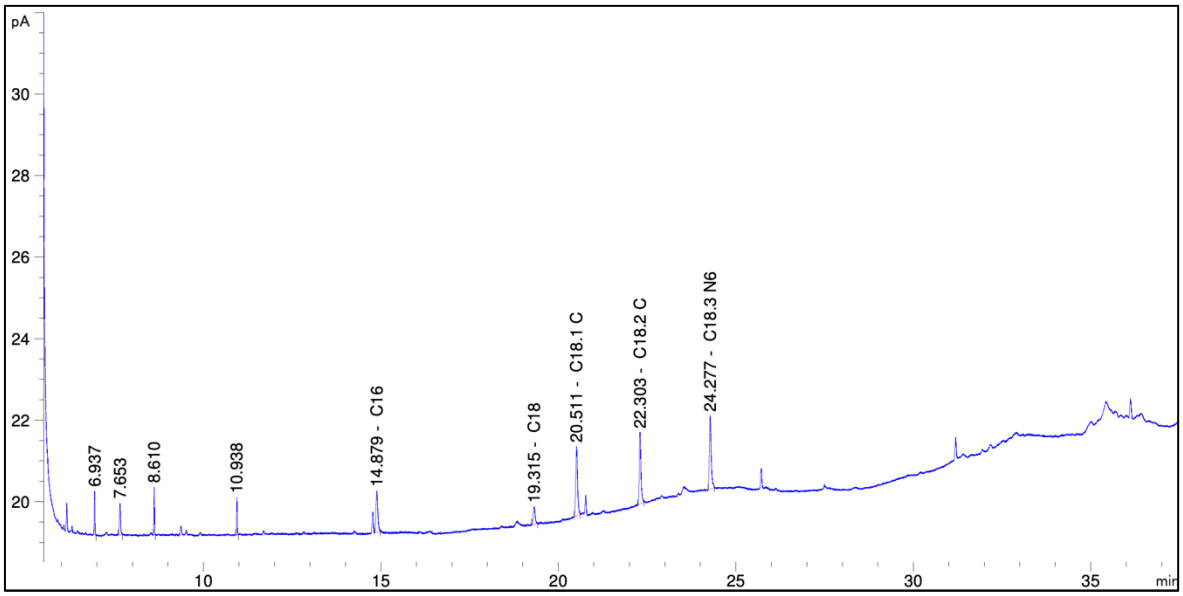
4.2. Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör (GC-FID) ile Yağ Asitleri Testi

Bu çalışmada endemik bir tür olan *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türü ekstraktları (metanol, etil asetat ve su) yağ asitleri GC-FID cihazı ile ölçülmüştür. 10 mg *Thymus* metanol, etil asetat ve su ekstraktları ayrı ayrı olacak şekilde 0,2 g örnek alınarak üzerine 2 mL Hekzan eklenmiştir. Daha sonra 0,2 mL 1N KOH çözeltisi eklenmiştir (1 N KOH çözeltisi metanolle hazırlanmıştır). Güçlü bir karıştırma işlemi uygulanmış ve faz ayrımı görülmüştür. Üst faz berraklaşıncaya kadar tüpler karanlık ortamda bekletilmiştir. Berraklaşma işlemi gerçekleşince üst faz viallere alınarak GC-FID cihazı ile yağ asitleri analizi yapılmıştır.

Şekil 4.5,4.6 ve 4.7 veya Çizelge 4.2 incelendiğinde metanol ekstraktında yağ asitlerinden (n-6)–Linoleik asit ω6 en fazla yoğunluğu göstermektedir. Bu yağ asidi omega-6 yağ asitleri grubuna dahildir ve eksikliğinde özellikle beyinde bulunması sebebi ile ciddi rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Üç ekstrakt içinde incelendiğinde metanol ekstraktı (%33,703) en yoğun (n-6)–Linoleik asit ω6 yağ asidini içerdiği ve onu sırasıyla etil asetat ekstraktı (%20,365) ve su ekstraktının (%18,807) takip ettiği görülmektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde su ekstraktının kaprik asit içerdiği de görülmektedir. Trans-9-Elaidik asit ve G-Linolenik asit ω6'da ekstraktlardaki diğer önemli yağ asitleri olarak ön plana çıkmıştır.

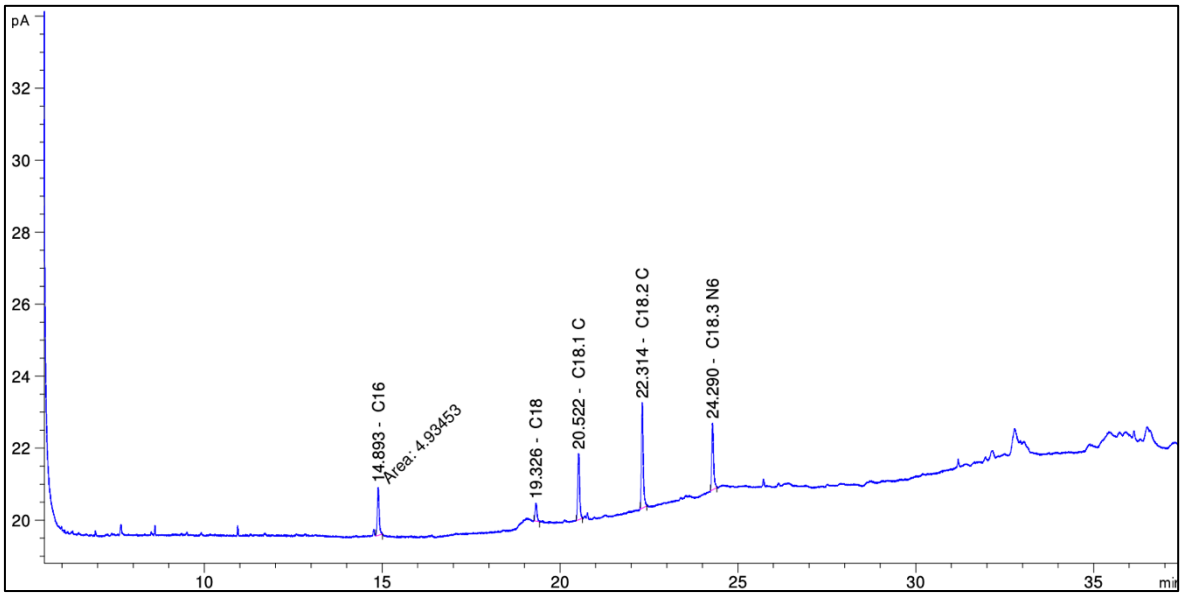
Çizelge 4.2. GC/FID Yağ Asitleri Bileşimi % Tablosu

GC/FID Analiz Sonuçları	TE Ekstraktı (%)	TM Ekstraktı (%)	TS Ekstraktı (%)
Palmitik asit	12,220	16,094	6,798
Stearik asit	5,198	5,838	3,860
Trans-9-Elaidik asit	20,391	22,375	20,084
(n-6)–Linoleik asit ω6	20,365	33,703	18,807
G-Linolenik asit ω6	21,676	21,991	15,123
Kaprik asit	-	-	14,414



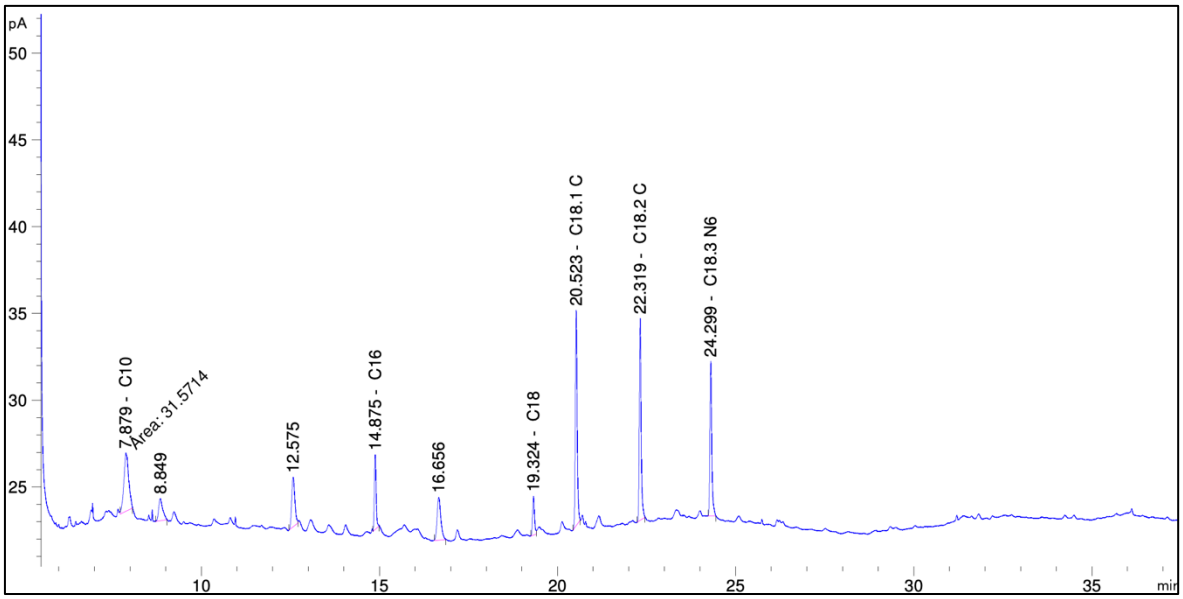
C16:0–Palmitik asit C18:0–Stearik asit C18:1–trans-9-Elaidik asit C18:2 (n-6)–Linoleik asit ω6 C18:3 (n-6)–g-Linolenik asit ω6

Şekil 4.5. TE ekstraktı yağ asitleri diyagramı



C16:0–Palmitik asit C18:0–Stearik asit C18:1–trans-9-Elaidik asit C18:2 (n-6)–Linoleik asit ω6 C18:3 (n-6)–g-Linolenik asit ω6

Şekil 4.6. TM ekstraktı yağ asitleri diyagramı



C10:0 Kaprik asit C16:0 Palmitik asit C18:0 Stearik asit C18:1 trans-9-Elaidik asit C18:2 (n-6)–Linoleik asit ω6 C18:3 (n-6) g-Linolenik asit ω6

Şekil 4.7. TS ekstraktı yağ asitleri diyagramı

4.3. Asetilkolinesteraz İnhibisyon Aktivite Testi Analizleri

Bu çalışmada endemik bir tür olan *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türü ekstraktları (metanol, etil asetat ve su) ve standartın asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi, Ellman metoduyla spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

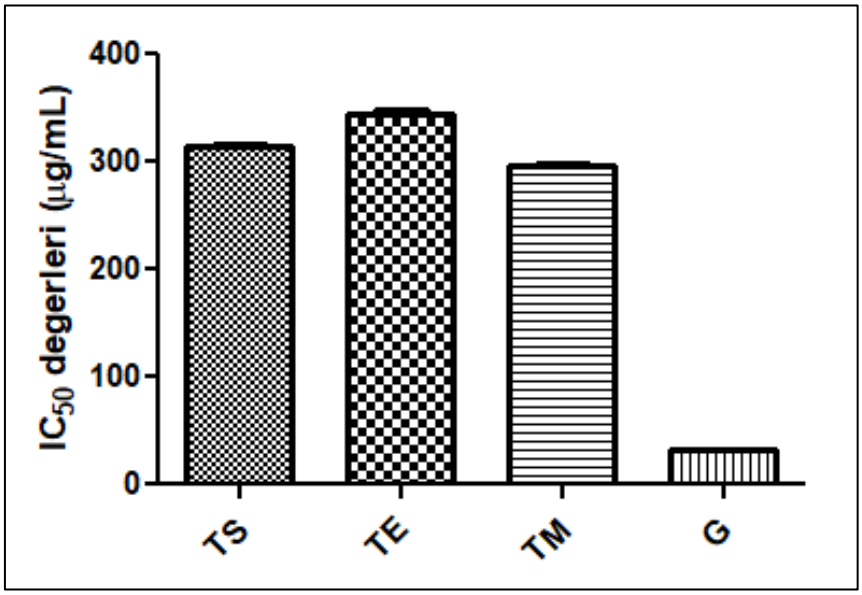
Çizelge 4.3. Ekstraktların/standartın anti-asetilkolinesteraz aktiviteleri (IC_{50}, µg/mL)

	*TS**	*TE*	*TM*	*G*
Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite	313,50±3,39^{c}	344,50±4,46^{d}	295,90±2,12^{b}	32,16±1,15^{a}

*TS, TE, TM ve G kodları sırasıyla *Thymus* sulu ekstraktı, *Thymus* etil asetat ekstraktı, *Thymus* metanol ekstraktı ve Galantamini gösterir.
** Tablodaki her bir değer ortalama ± SD (n = 3) olarak verilmiştir. Aynı satırda yer alan değerler üzerinde üssü olarak gösterilen farklı harfler değerler arasında önemli farklılıkları gösterir ($p < 0.05$).

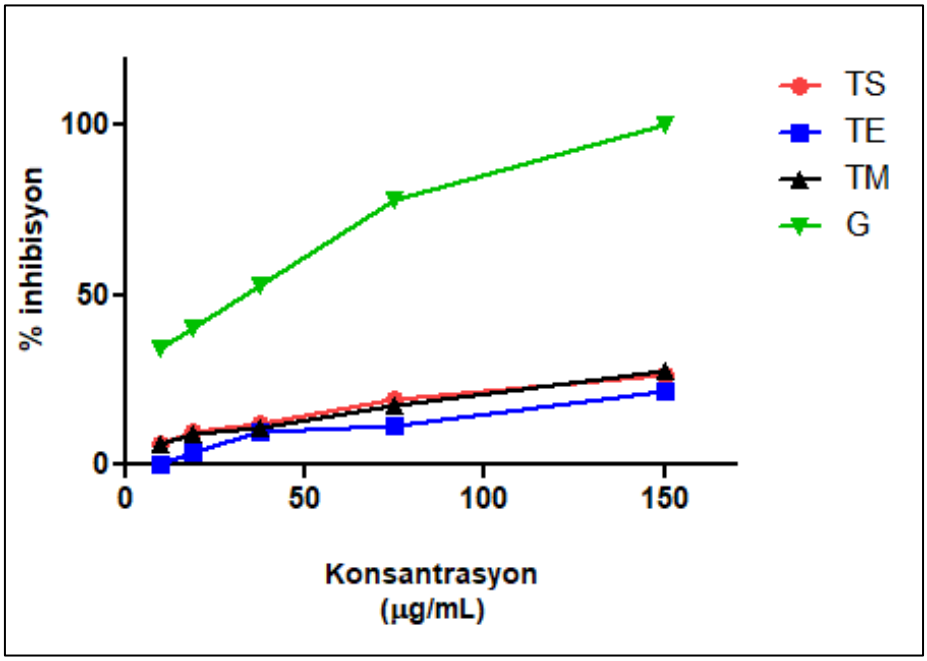
Düşük IC_{50} (Enzimin aktivitesini %50 oranında durduran ekstrakt konsantrasyonu) yüksek aktiviteyi gösterir. Çizelge 4.3 veya şekil 4.8 veya şekil 4.9'da ekstraktların asetilkolinesteraz inhibitor aktiviteleri karşılaştırıldığında, en iyi aktiviteyi TM (IC_{50}=295,90±2,12)'nin gösterdiği onu sırasıyla TS (IC_{50}=313,50±3,39) ve TE

(344,50±4,46)'nin takip ettiği görülmektedir. Ekstraktların aktiviteleri standart olarak kullanılan galantaminle kıyaslandığında düşük bulunmuştur.



*TS, TE, TM ve G kodları sırasıyla *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* sulu ekstraktı, *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* etil asetat ekstraktı, *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* metanol ekstraktı ve galantamini gösterir.

Şekil 4.8. Ekstraktların/standartın asetilkolinesteraz inhibitor aktiviteleri (IC_{50}, µg/mL)



Şekil 4.9. Ekstraktların/standartın asetilkolinesteraz enzimine karşı % inhibisyon değerleri

4.4. Endemik *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* Türü Antioksidan Aktivitesi

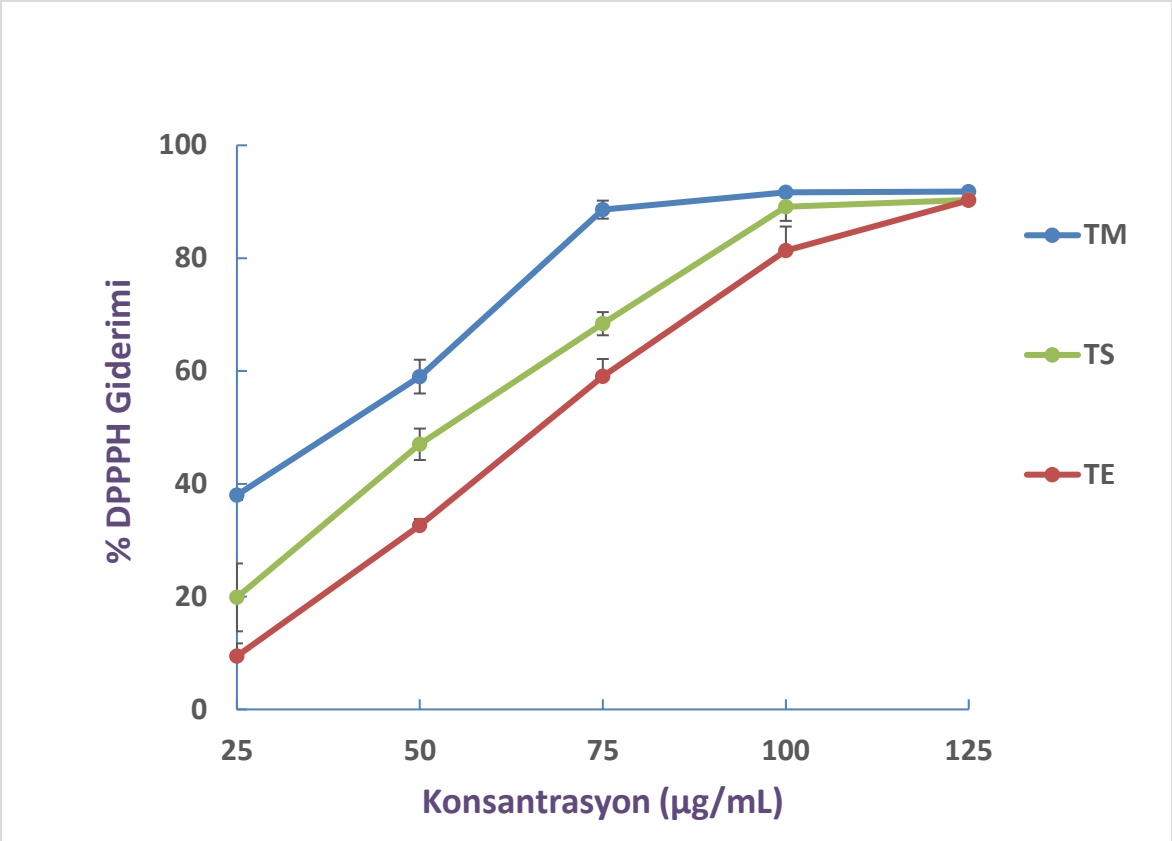
Elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesi DPPH testi ile ölçülmüştür. Bitki ekstraktlarının ve sentetik antioksidanın % DPPH giderim aktiviteleri 25 ile 125 µg/mL arasında değişen 5 farklı konsantrasyonda ölçülmüştür ve bu değerlere göre IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi belirtmektedir.

Çizelge 4.4 veya şekil 4.10 ve şekil 4.11 incelendiğinde DPPH radikal süpürücü aktivitesinin IC_{50} değerlerine göre belirlenen etkinlikteki azalma sırası TM>TS>TE şeklinde sıralanmıştır. Elde edilen veriler, *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* TM ekstraktının TS ve TE ekstraktlarından daha iyi bir DPPH giderim kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Tüm ekstraktlar arasında en yüksek etki TM ekstraktında çıkarken (IC_{50} = 38,26±0,98 µg/mL), en düşük etki TE ekstraktında çıkmıştır (IC_{50} = 66,90±1,23 µg/mL).

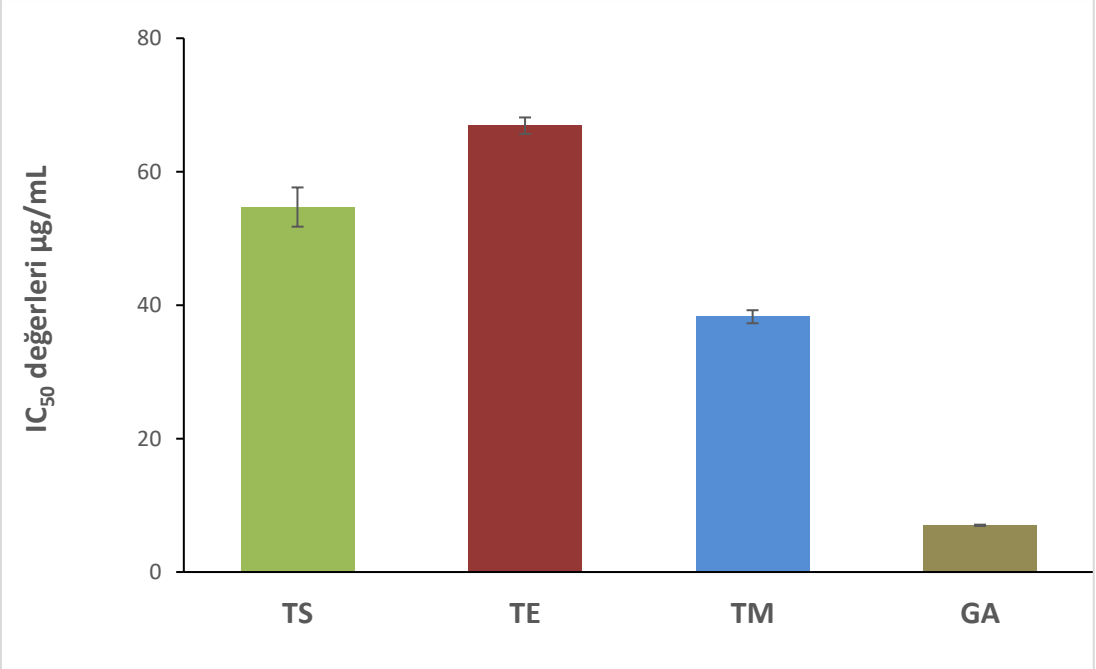
Çizelge 4.4. Ekstraktların DPPH Radikal Giderim Aktivitesi (IC_{50} µg/mL)

	TS	*TE*	*TM*	*GA*
DPPH Radikal Giderim Aktivitesi (µg/mL)	$54,70±2,94^{c}$	$66,90± 1,23^{d}$	$38,26±0,98^{b}$	$7,00±0,10^{a}$

*TS, TE, TM ve GA kodları sırasıyla *Thymus* sulu ekstraktı, *Thymus* etil asetat ekstraktı, *Thymus* metanol ekstraktı ve Gallik asiti göstermektedir.
** Tablodaki her bir değer ortalama ± SD (n = 3) olarak verilmiştir. Aynı satırda yer alan değerler üzerinde üssü olarak gösterilen farklı harfler değerler arasında önemli farklılıkları gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 4.10. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi



Şekil 4.11. *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi IC_{50} değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de endemik olarak bulunan *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türüne ait ekstraktların HPLC analizi ile fenolik bileşik içerik miktarları, GC/FID analizi ile yağ asidi tayini, Ellman yöntemi ile asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi ve DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi ile antioksidan aktivitesi belirlenmiştir.

Yapılan literatür incelemelerinde Türkiye'de yayılış gösteren *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türü ile ilgili kalitatif ve kantitatif fenolik bileşik içeriği çalışması bulunmamıştır. Çalışmamızda *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türünün metanol (TM), su (TS) ve etilasetat (TE) olacak şekilde 3 ekstraktının HPLC-DAD cihazı ile fenolik bileşik içeriğine bakılmıştır. Bu çalışma sonucunda fenolik bileşik çeşitliliği en fazla metanol ekstraktında bulunmuştur. Bu çalışmada fenolik bileşiklere bakıldığında rosmarinik asidin etkili bir fenolik bileşik olarak bu bitki ekstraktlarında var olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatürde *Thymus* ile ilgili yapılmış diğer çalışmalara baktığımızda ise rosmarinik asitin *Thymus* türlerinde önemli bir fenolik bileşik olarak ön plana çıktığı görülmüştür. *Thymus lotocephalus* L. türünün HPLC analizi yöntemi ile fenolik bileşik miktarı incelenmiş ve bunun sonucunda rosmarinik asit (10,413 mg) ekstraktlarda ana bileşik olarak bulunmuştur (Gonçalves ve diğerleri, 2021).

Güney Kazakistan florasından *Thymus marschallianus* Willd ve *Thymus seravschanicus* Klokov türleri ile yapılan bir çalışmada fenolik bileşik miktarlarını HPLC analizi yöntemi ile incelenmiş ve bunun sonucunda *T. marschallianus* için en karakteristik bileşikleri rosmarinik asit (1,05±0,01 mg/g), protokateşik asit (2,08±0,01 mg/g), luteolin 7-O-glukozit (7,77±0,14 mg/g) ve apigenin 7-O-glukuronid (7,22±0,01 mg/g) olurken, protokateşik asit (3,06±0,01 mg/g), luteolin 7-O-glukozit (20,17±0,12 mg/g), luteolin 7-O-glukuronid (16,84±0,05 mg/g) ve eriodiktyol (13,54±0,4 mg/g) *T. seravschanicus* türünde baskın olarak bulunmuştur (Zhumakanova ve diğerleri, 2021).

Thymus zygis, Thymus pulegioides L. ve *Thymus fragrantissimus* türleri ile gerçekleşen bir çalışmada fenolik bileşik miktarlarını HPLC analizi yöntemi ile incelenmiş ve bunun sonucunda *T. zygis* (62,36±2,72 mg/g) *T. pulegioides* (81,65±7,02 mg/g) ve *T.*

fragrantissimus (81,04±7,93 mg/g) rosmarinik asit açısından yüksek bulunmuştur (Afonso, Pereira, Válega, Silva ve Cardoso, 2018).

Literatürde rosmarinik asitin antioksidan aktivitelerini inceleyen birçok çalışma mevcuttur. Rosmarinik asidin güçlü bir antioksidan etkisi olan fenolik bileşik olduğuna dair yapılan bir çalışmada *Mentha piperita* L. metanol ekstraktlarının in-vitro antioksidan aktivitelerini ve rosmarinik asit düzeylerini değerlendirilmesi amaçlanmış ve HPLC analizi ile ekstraktta rosmarinik asit 1,9 mg/mL bulunmuş, rosmarinik asidin antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile incelenmiş ve güçlü bir antioksidan etkisi (IC_{50}=0,160 mg/mL) olduğu bulunmuştur (Aldoghachi ve Shari, 2021).

11 *Thymus* türü ekstraktı ile gerçekleştirilen bir çalışmada HPLC analizi ile fenolik bileşik içerikleri incelenmiş ve çalışılan türler arasında yüksek çeşitlilik gözlemlenmiştir. Rosmarinik asit, salvianolik asit, sinnamik asit, ferulik asit, kafeik asit apigenin, değerlendirilen 11 türde *Thymus* metanolik ekstraktının ana polifenolik bileşenleri olarak tespit edilmiştir. Fenolik asitler arasında rosmarinik asit en yüksek içeriğe sahipken, flavonoidler arasında en yüksek değerler apigenin ve bunu naringenin ve epikateşin takip ettiği görülmüştür (Sarfaraz, Rahimmalek ve Saeidi 2021).

Hypericum perforatum L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Malva sylvestris* L., *Melissa officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. bitki ekstraktlarında rosmarinik asit düzeyleri ve antioksidan etkileri incelenmesi amaçlanmış ve çalışma sonucunda *H. perforatum* (2,76 mM) ve *M. officinalis* (1,73 mM)'de rosmarinik asit içeriği yüksek bulunmuştur. Antioksidan aktivite testi ise DPPH yöntemi ile ele alınmış ve bunun sonucunda *H. perforatum*, *M. officinalis* ve *S. officinalis* antioksidan aktivite sıralamaları %92,7, %95,2 ve %94,7 (0,1 mg/mL ekstraktta) şeklinde bulunmuş ve rosmarinik asit ile antioksidan aktivite arasındaki ilişkiyi destekleyici bir çalışma gerçekleştirmişlerdir (Nicolai ve diğerleri, 2016).

Literatür çalışmalarıda *Thymus* türlerinde rosmarinik asitin yoğun bir şekilde bulunduğunu ve bunun antioksidan aktivite ile orantılı olabileceğini gösterir yönde ilerlemiştir, bu da bizim çalışmamızda yer alan endemik *Thymus* türü için de rosmarinik asit ve antioksidan aktivite ile paralellik olabileceğini göstermektedir.

HLPC-DAD analizi sonucu majör bileşikler olarak belirlenen krisin ve naringin maddeleri için literatür taramaları yapıldığında krisin maddesinin ağırlıklı olarak nörodejenaratif hastalık tedavisinde etken madde olarak kullanıldığı görülmüştür, krisin (5,7-dihidroksiflavon), bal, propolis ve çeşitli şifalı bitki ve meyvelerde bulunan, oksidatif stresin önlenmesi, iltihaplanma, nörodejenerasyon ve karsinojenez dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan bir bileşiktir (Stompor-Goracy ve diğerleri, 2021).

Deney hayvanları ile yapılan birçok çalışmada krisin etken maddesinin Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda tedavi süreçlerinde; toksik olmamaları ve tıbbi bitkilerden elde edilebilmeleri sebebi ile etken madde olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Ahmed ve diğerleri, 2018). Sıçan hipokampal bölgesinde amiloid β25-35 ile indüklenen oksidatif strese karşı krisin etken maddesini kullanarak Alzheimer hastalığı ile mücadele etmek için potansiyel bir terapötik ve beyin hedefleme stratejisi olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir (Vedagiri ve Thangarajan, 2016). Bu çalışmalarda varılan sonuçların tez çalışmamızda ele aldığımız bitki türünden elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik gösterdiği görülmektedir.

Thymus praecox Opiz türü ile yapılan bir çalışmada 5 farklı çözücü (saf su, etanol, etil asetat, metanol-su ve metanol) ile ekstre edilen bitki HPLC metot analizi ile fenolik bileşik içeriği bakımından incelenmiş ve 5 ekstrakt içinde naringin fenoliği önemli bileşiklerden biri olarak belirlenmiştir (84.374 ($\mu g.g^{-1}$ bitki) ve 2578.03 ($\mu g.g^{-1}$ bitki) aralığında bulunmuştur) (Şener ve diğerleri, 2021).

Narenciye flavonoidi olarak bilinen naringin etken maddesine bakıldığında naringin takviyesinin obezite, diyabet, hipertansiyon ve metabolik sendromun tedavisi için faydalı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmuştur (Alam, Subhan, Rahman, Uddin, Reza ve Sarker, 2014). Naringin nispeten güvenli ve toksik olmayan biyoaktif bir bileşik olmakla birlikte günlük kullanımında alınan dozun etkisi önem sarf etmektedir ve antikanser, enflamasyon, proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz ve istilası üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur (Stabrauskiene, Kopustinskiene, Lazauskas ve Bernatoniene, 2022).

Bu tez çalışması kapsamında yapılan literatür incelemelerinde Türkiye'de yayılış gösteren *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türü ile yağ asitlerine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen GC/FID analizi ile bu endemik türün

ilk kez yağ asitleri incelemesi de yapılmıştır. Bunun sonucunda bu türün omega-6 grubuna dahil linoleik asit içerdiği tespit edilmiştir.

Lamiaceae familyasına ait birden fazla tür ekstraktlarının yağ asitleri konsantrasyonları için GC/FID analiz edilmiş ve analiz edilen türler arasında *Thymus capitatus* L.'da 15 yağ asidi tanımlanmış, lipit içeriğinin %95'i için; iki ana yağ asidi, α-linolenik asit (%29,6) ve linoleik asit (%15,1) olarak bulunmuş, bununla birlikte çalışılan diğer türlerde linoleik asit ve α-linolenik asit baskın olarak bulunmuştur (Cacan, Kökten ve Kılıç, 2018).

Thymus cariensis L. ve *Thymus cilicicus* L. türleri ekstraktları ile yağ asitleri analizi GC/FID ile yapılmış ve her iki bitki ekstraktında da linolenik asit, linoleik asit, behenik asit ve palmitik asit çoğunlukta bulunmuştur. Linolenik asit, linoleik asit, behenik ve palmitik asitler sırasıyla %22,65, %14,37, %12,54, %15,08 olacak şekilde *T. cariensis* için bulunmuş, *T. cilicicus* içinse; %26,37, %7,57, %8,08 ve %11,41 şeklinde bulunmuştur (Küçükaydın, Tel-Çayan, Duru, Kesdek ve Öztürk, 2021).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde *Thymus* bitkisi farklı tür ve ekstraktlarında yağ asitleri çeşitlilik göstermekle birlikte linoleik asit birçoğunda baskın olarak bulunmuş ve bu durumda bizim de tez çalışmamızda yer aldığı gibi güçlü bir omega yağ asidi grubuna dahil olan linoleik asitin *Thymus* türlerinde baskın olduğu görülmüştür.

Bu konuda yapılan literatür araştırmasında, bu türe ait asetilkolinesteraz inhibitör analizi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Türkiye'de yayılış gösteren endemik *Thmyus cappadocicus* var. *cappadocicus* türünün üç farklı ekstraktı (metanol, etil asetati, su) ile Ellman metodu kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada doza bağlı olarak asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi sergilediği gözlemlenmiştir. *Thymus* metanol ekstraktının (295,90±2,12 µg/mL IC_{50}) en yüksek aktiviteyi gösterdiği, bunu takiben su ve etil asetat ekstraktlarının doza bağlı artış gösterdiği belirlenmiştir.

Thymus cinsinden diğer türlere ait asetilkolinesteraz inhibisyon aktivite çalışmalarına bakıldığında; bir çalışmada *Thymus lotocephalus* ekstraktı ile asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesine bakılmış ve *T. lotocephalus* esansiyel yağında bulunan konsantrasyonlara dayalı olarak AChE ve BChE'ye karşı sırasıyla 0,90±0,04 ve 0,50±0,12 µg/mL IC_{50} değerleri ile yüksek asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi sergilediği sonucuna ulaşılmıştır (Topcu ve

Kuşman, 2014).

Bir başka çalışmada ise 6 farklı *Thymus* türleri ile yapılan çalışmada bitkiler etanol ile ekstrakte edilmiş 3 farklı konsantrasyon olacak şekilde Ellman metodu ile AChE inhibitör aktivitesine bakılmış ve *Thymus longicaulis*, *Thymus pulegioides* ve *Thymus vulgaris* test edilenler arasında güçlü bir AChE inhibitör etkiye sahip oldukları bulunmuştur. IC_{50} değerleri; 656,06-667,91 µg/mL aralığında bulunmuştur. Kalan 3 türün azalan sıralamasının; *Thymus serpyllum* subsp. *serpyllum*> *Thymus striatus* > *Thymus praecox* subsp. *polytrichus* olduğu görülmüştür (Kindl, Blažeković, Bucar ve Vladimir-Knežević, 2015).

Thymus cinsine ait *T. spathulifolius* türü ile yapılan bir çalışmada ise türe ait uçucu yağının ve standart bileşiklerin AChE inhibitör aktiviteleri incelenmiş ve sonuçlar IC_{50} (mg/mL) olarak uçucu yağ, galantamine (AChE için 1,51 µg/mL) kıyasla zayıf anti-AChE (0,95 mg/mL) aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Ceylan ve diğerleri, 2016).

Cyclotrichium niveum, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* türlerinin asetilkolinesteraz inhibitör aktivite ve antioksidan aktivite özellikleri incelenmiş ve bu çalışma sonucunda asetilkolinesteraz inhibitör aktivite çalışması için Ellman yöntemi ile *T. praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisi ekstraktlarında AChE inhibisyon etkisi bulunamamıştır, aynı bitkilerin ekstraktları ile antioksidan aktivite özelliklerini DPPH yöntemi ile incelenmiş ve bunun sonucunda en yüksek aktiviteyi *T. praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinin etilasetat (%87,80) ve etanol (%85,42) ekstraktında gözlemlenmiştir (Orhan ve diğerleri, 2009).

Alzheimer hastalığı teşhis ve tedavisinde önemli bir rolü olan asetilkolinesteraz maddesi inhibisyon aktivite çalışmalarına bakıldığında farklı *Thymus* türleri ekstraktlarının güçlü bir etken madde olarak kullanılabileceği görülmüştür, incelenen çalışmalar tez çalışmamızla paralellik göstermekle birlikte ele aldığımız endemik türünde bu hastalığın tedavisinde etken madde olarak kullanılabilir olma ihtimalini göstermiştir.

Antioksidan aktivite ile ilgili olarak Türkiye'de yayılış göstermekte olan ve endemik bir tür olarak bilinen *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* ile ilgili sadece Albayrak ve Aksoy'un (2013) çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmada üç farklı bitki ekstrakt olacak şekilde

(metanol, etanol, su) antioksidan aktivitelerini DPPH ile incelemişler ve metanol ekstraktının (15,89 µg/mL) en aktif ve onu sırasıyla etanol ekstraktı (24,57 µg/mL) ve su ekstraktı (55,28 µg/mL) olacak şekilde belirlemişlerdir ve aynı zamanda ekstraktların linoleik asit oksidasyonuna karşı güçlü bir inhibisyon sergilediği bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada 11 *Thymus* türleri ile DPPH analizi ile antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve bunun sonucunda *T. vulgaris* ekstraktı diğer türlerle karşılaştırıldığında en yüksek antioksidan aktiviteyi (IC_{50}=273,8 µg/mL) *T.pubescens* en zayıf aktiviteyi (IC_{50}=679,3 µg/mL) göstermiş olarak bulunmuştur (Sarfaraz ve diğerleri, 2021).

Güney Kazakistan florasından *Thymus marschallianus* ve *Thymus seravschanicus* türlerinin antioksidan aktivite DPPH yöntemi ile incelenmiş ve kontrol olarak gallik asit kullanılan bu çalışma sonucunda her iki ekstraktın antioksidan aktivitesi *T.marshallianus* için (IC_{50}=24,23±0,29 µg/mL) ve *T.seravschanicus* için (IC_{50}=21,47±1,63 µg/mL) olarak bulunmuştur (Zhumakanova ve diğerleri, 2021).

Lamiaceae familyasına ait olan *Thymus* bitkileri ile üç tür *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides* ve *Thymus fragrantissimus* olacak şekilde bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesi DPPH analiz yöntemi ile incelenmiş ve üç ekstrakt arasında, *T.pulegioides* en düşük DPPH IC_{50} değerine (IC_{50}=9,50±1,98 µg/mL) sahip olduğunu ve bunu sırasıyla *T.zygis* (IC_{50}=12,65±2,30 µg/mL) ve *T.fragrantissimus* (IC_{50}=12,87±3,79 µg/mL) takip ettiği belirlenmiştir (Afonso ve diğerleri, 2018).

Yaygın bir tür olan *Thymus vulgaris*'e baktığımızda, polar özleri antioksidan yeteneği de dahil olmak üzere bir dizi biyolojik etki için araştırılmıştır. Bu tür için rapor edilen veriler arasında, bu bitki orijinli su, metanolik ve hidroalkolik ekstraktların 1,8-44,7 µg/mL aralığında DPPH IC_{50} değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Kindl ve diğerleri, 2015; Brahmi ve diğerleri, 2015; Kozics ve diğerleri, 2013).

Literatür araştırmalarında *Thymus* türlerinin antioksidan aktivitesinin, fenolik zenginlikleri ve/veya spesifik fenolik kompozisyonları ile yakından ilişkili olmakla birlikte çalışmamızda yer alan endemik türünde güçlü bir antioksidan aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (Mendez-Tovar ve diğerleri, 2015).

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda;

- ◊ Bu çalışma ile endemik bir tür olan *T. cappadocicus* var. *cappadocicus'un* ilk kez fenolik kompozisyonu, yağ asitleri içeriği ve asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi ile ilgili veriler elde edilmiştir.
- ◊ Yapılan tüm testlerde bitki metanol ekstraktının, su ekstraktı ve etil asetat ekstraktından daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.
- ◊ Bu çalışma ile *T. cappadocicus* var. *cappadocicus'un* fenolik bileşiklerinin HPLC-DAD ile ilk kez kalitatif ve kantitatif olarak analizleri yapılmıştır ve güçlü bir antioksidan olan rosmarinik asit, ekstraktların ana bileşeni olarak belirlenmiştir.
- ◊ HPLC/DAD analizi ile gerçekleştirilen fenolik bileşik analizinde 19 fenolik bileşik incelenmiş ve bunun sonucunda metanol ekstraktı, su ekstraktı ve etil asetat ekstraktı ile ortak 9 fenolik bileşik bulunmuştur.
- ◊ Bu tez kapsamında bu endemik türün ilk kez GC-FID cihazı ile yağ asitleri analizi yapılmış ve metanol ekstraktının en yoğun (n-6)–Linoleik asit ω6 yağ asidini içerdiği ve onu sırasıyla etil asetat ekstraktı ve su ekstraktının takip ettiği belirlenmiştir
- ◊ *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türü ile ilk kez Alzheimer hastalığında etken madde olan asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi incelenmiştir ve doza bağlıdır.
- ◊ Antioksidan aktivite çalışmasında TM ekstraktının TS ve TE ekstraktlarından daha iyi bir DPPH süpürücü kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında Türkiye'de yayılış gösteren endemik *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* türü ile ilk kez nörodejenaratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı gibi önemli bir hastalığın etken maddesinin inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve bunun sonucunda bu türün içerdiği fenolik bileşiklerin nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilme ihtimalini ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışma ile elde ettiğimiz sonuçlar *T. cappadocicus* var. *cappadocicus'un* güçlü bir radikal giderim aktivitesine sahip olduğunu ve bu nedenle *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* ekstraktlarının ilaç ve gıda endüstrisinde alternatif bir antioksidan ajan olarak kullanım olasılığını göstermiştir.

Bu çalışmalar sonucunda *T. cappadocicus* var. *cappadocicus* bitkisinin biyoteknoloji, sağlık, eczacılık, fitoterapi gibi birçok alanda uygulanabilirliği hakkında veriler elde edilmiştir. *Thymus* cinsi türleri ile yapılan çalışmalar bu türlerin içerdikleri zengin biyoaktif bileşiklerin (özellikle rosmarinik asit, luteolin gibi) birçok alanda kullanılabilirliğini ve içerdikleri bileşik çeşitlerine göre kullanılabilir alanları arttırmayı hedefleyip bu doğrultuda çıkan sonuçlarla bunları çeşitli disiplinler, endüstriyel alanda tercih edilebilir hale getirebildiğini göstermeyi amaçlamıştır.

İleriki çalışmalarda bu tez kapsamında çalışılan ekstraktların içeriğindeki etken maddeleri ortaya çıkarabilmek için izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Ayrıca biyoaktif bileşiklerin insan sağlığına olası yan etkilerininde aydınlatılması ve *in vitro* şartlarda etkin görülen ekstraktların *in vivo* testler ile araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Afonso, A. F., Pereira, O. R., Válega, M., Silva, A. M. and Cardoso, S. M. (2018). Metabolites and biological activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* grown under organic cultivation. *Molecules*, 23(7), 1514.

Ahmed, M. R., Shaikh, M. A., Haq, S. H. I. U. and Nazir, S. (2018). Neuroprotective role of chrysin in attenuating loss of dopaminergic neurons and improving motor, learning and memory functions in rats. *International Journal of Health Sciences*, 12(3), 35.

Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M. and Sarker, S. D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, 5(4), 404-417.

Albayrak, S. and Aksoy, A. (2013). Essential oil composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *thymus cappadocicus* boiss. *Journal of food processing and preservation*, 37(5), 605-614.

Aldoghachi, F. E. H., UM, N. A. M. and Shari, F. H. (2021). Antioxidant activity of rosmarinic acid extracted and purified from *Mentha piperita*. *Archives of Razi Institute*, 76(5), 1279.

AOCS, Official Method Ce (1989). Fatty acid composition in official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, Method. 1-62.

Arruda, H. S., Neri-Numa, I. A., Kido, L. A., Júnior, M. R. M. and Pastore, G. M. (2020). Recent advances and possibilities for the use of plant phenolic compounds to manage ageing-related diseases. *Journal of Functional Foods*, 75, 104203.

Aslan, E. (2016). *Ferulago blancheana bitkisindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bezm-i Âlem Vakıf Üniversitesi, 38-40.

Bacanlı, M., Taner, G., Başaran, A. A. ve Başaran, N. (2015). Bitkisel kaynaklı fenolik yapıdaki bileşikler ve sağlığa yararlı etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 4(1), 9-16.

Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.

Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G. and Panneerselvam, C. (2006). Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Research Bulletin*, 68(6), 469-473.

Barron, M., Gartlon, J., Dawson, L. A., Atkinson, P. J. and Pardon, M. C. (2017). A state of delirium: deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 94, 103-107.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Bozdemir, Ç. (2019). Türkiye'de yetişen kekik türleri, ekonomik önemi ve kullanım alanları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(3), 583-594.

Brahmi, N., Scognamiglio, M., Pacifico, S., Mekhoukhe, A., Madani, K., Fiorentino, A. and Monaco, P. (2015). 1H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties. *Food Research International*, 76, 334–341.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.

Cacan, E., Kokten, K. and Kilic, O. (2018). Leaf fatty acid composition of some Lamiaceae taxa from Turkey. *Progress in Nutrition*, 20, 231-236.

Celep, F. ve Dirmenci, T. (2017). Systematic and biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 4 (4), 14-27.

Ceylan, R., Zengin, G., Uysal, S., Ilhan, V., Aktumsek, A., Kandemir, A. and Anwar, F. (2016). GC-MS analysis and in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Journal of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 31(6), 983-990.

Çelik, S. A. ve Ayran, İ. (2020). Antioksidan kaynağı olarak bazi tibbi ve aromatik bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 13(2), 115-125.

Çulhaoğlu, B., Hatipoğlu, S. D., Dönmez, A.A. and Topçu, G. (2015). Antioxidant and anticholinesterase activities of lupane triterpenoids and other constituents of *Salvia trichoclada*. *Medicinal Chemistry Research*, 24(11), 3831-3837.

Deveci, H. A., Gökhan, N.U.R., Ali Kirpik, M., Harmankaya, A. ve Yildiz, Y. (2016). Fenolik bileşik içeren bitkisel antioksidanlar. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1), 26-32.

Dey, PM. and Harborne, JB. (1989). *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 283-323.

Diken, M.E., Bayhan, H., Acar, M. and Dogan, S. (2022). Cytoprotective, antimutagenic/antirecombinogenic and antibacterial properties of lallemantia iberica extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3(1), 1-12.

El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., Marzouki, M.N. and Ben Hadj Ahmed, S. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(30), 152487.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V. and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.

Eseceli, H., Değirmencioğlu, A., Kahraman, R. (2006*). Omega yağ asitlerinin insan sağlığı yönünden önemi*. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 403-406.

Gercek, Y. C., Celik, S. and Bayram, S. (2021). Screening of plant pollen sources, polyphenolic compounds, fatty acids and antioxidant/antimicrobial activity from bee Pollen. *Molecules*, 27(1), 117.

Gonçalves, S., Mansinhos, I., Rodríguez-Solana, R., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M. and Romano, A. (2021). Impact of metallic nanoparticles on in vitro culture, phenolic profile and biological activity of two mediterranean Lamiaceae species: *Lavandula viridis* L'Hér and *Thymus lotocephalus* G. López and R. Morales. *Molecules*, 26(21), 6427.

Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.

Gürvit, İ. H. (2004). *Demans sendromu, Alzheimer hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. by Öge AE*. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri, 367-415.

Hartman, R. E. (2010). Micronutrients and Brain Health. In Cadenas, E. & Packer, L. (Eds.). *Actions of bioactive phytochemicals in cell function and Alzheimer's disease pathology (pp. 227)*. Londora: Routledge, 227.

Hazer, Y. ve Çölgeçen, H. (2017). Briyofitlerden elde edilen fenolik bileşikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(1), 333-340.

Im, K. H., Nguyen, T. K., Choi, J. and Lee, T. S. (2016). In vitro antioxidant, anti-diabetes, anti-dementia, and inflammation inhibitory effect of *Trametes pubescens* fruiting body extracts. *Molecules*, 21(5), 639.

Karaca, E. ve Aytaç, S. (2007). Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi,* 22(1), 123-131.

Kaytanlıoğlu, E. H. T., Sarıkaya, A. G. ve Fakir, H. (2022). İki farklı yörede doğal yayılış gösteren aş kekiği (*Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis*)'nin uçucu bileşenlerinin belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1(35), 76-81.

Kindl, M., Blažeković, B., Bucar, F. and Vladimir-Knežević, S. (2015). Antioxidant and anticholinesterase potential of six *thymus* species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(3), 403950.

Kokkini, S., Karousou, R. and Hanlidou, E. (2003). *Herbs of the labiatae*. Amsterdam: Elsevier, 233-302.

Korkmaz, Ü. ve Kaya, M. (2019). Experimental models in neurodegenerative diseases. *Nukleer Tıp Seminerleri*, 5(1), 69.

Kozics, K., Klusová, V., Srančíková, A., Mučaji, P., Slameňová, D., Hunáková, Ľ., Kusznierewicz, B. and Horváthová, E. (2013). Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. *Food Chemistry*, 141(3), 2198-2206.

Küçükaydın, S., Tel-Çayan, G., Duru, M. E., Kesdek, M. and Öztürk, M. (2021). Chemical composition and insecticidal activities of the essential oils and various extracts of two *Thymus* species: *Thymus cariensis* and *Thymus cilicicus*. *Toxin Reviews*, 40(4), 1461-1471.

Li, B. Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J. A., Ruscetti, F. W., & Wang, J. M. (2000). Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 534-538.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. and Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.

Mazlun, M. H., Sabran, S. F., Mohamed, M., Abu Bakar, M. F. and Abdullah, Z. (2019). Phenolic compounds as promising drug candidates in tuberculosis therapy. *Molecules*, 24(13), 2449.

Méndez-Tovar, I., Sponza, S., Asensio-S-Manzanera, M. C. and Novak, J. (2015). Contribution of the main polyphenols of *Thymus mastichina* subsp. *mastichina* to its antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 66, 291-298.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Nunez, M.J. and Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.

Muller, A. G., Sarker, S. D., Saleem, I. Y. and Hutcheon, G. A. (2019). Delivery of natural phenolic compounds for the potential treatment of lung cancer. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(1), 433-449.

Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R. F., Reis, C. P., Roberto, A. and Rijo, P. (2016). Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement*, 89, 328-332.

Orhan, I., Şenol, F. S., Gülpinar, A. R., Kartal, M., Şekeroglu, N., Deveci, M., Kan, Y. and Şener, B. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1304-1310.

Pisoschi, A. M. and Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.

Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C. and Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. H. (Eds.). (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. Florida: CRC press.

Przedborski, S., Vila, M. and Jackson-Lewis, V. (2003). Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we?. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(1), 3-10.

Saraç, A. and Tunç, I. (1995). Toxicity of essential oil vapours to stored-product insects/Die Toxizität von ätherischen Öl-Dämpfen auf vorratsschädliche Insekten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 1(1), 69-74.

Sarfaraz, D., Rahimmalek, M. and Saeidi, G. (2021). Polyphenolic and molecular variation in *Thymus* species using HPLC and SRAP analyses. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.

Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S. S., Friedmann, T. and Taylor, P. (1986). Primary structure of Torpedo californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 319(6052), 407-409.

Şener, İ., Tekelioğlu, F., Zurnacı, M., Baloglu, P., Mahmut, G. Ü. R. and Güney, K. (2021). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Thymus Praecox*. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 21(1), 65-73.

Shahidi, F. and Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.

Stabrauskiene, J., Kopustinskiene, D. M., Lazauskas, R. and Bernatoniene, J. (2022). Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities. *Biomedicines*, 10(7), 1686.

Stompor-Gorący, M., Bajek-Bil, A. and Machaczka, M. (2021). Chrysin: Perspectives on contemporary status and future possibilities as pro-health agent. *Nutrients*, 13(6), 2038.

Tel-Çayan, G., Deveci, E., Çayan, F., Molo, Z., Duru, M. E. and Yeşil, Y. (2022). Chemometrics evaluation of phytochemicals and antioxidant activities of the extracts of chaerophyllum bulbosum roots and aerial parts. *Analytical Letters*, 55(2), 327-342.

Topcu, Ş. and Çölgeçen, H. (2015). Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* 8(2), 09-29.

Topçu, G. and Kuşman, T. (2014). Lamiaceae family plants as a potential anticholinesterase source in the treatment of Alzheimer's disease. *Bezmialem Science*, 2014(1), 1-25.

Ülger, T.G. ve Ayhan, N. Y. (2020). Bitki sekonder metabolitlerinin sağlık üzerine fonksiyonel etkileri. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(3), 384-390.

Vedagiri, A. and Thangarajan, S. (2016). Mitigating effect of chrysin loaded solid lipid nanoparticles against Amyloid β25–35 induced oxidative stress in rat hippocampal region: An efficient formulation approach for Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 58, 111-125.

Yanishlieva-Maslarova, N. V. (2001). *Inhibiting oxidation*. Antioxidants in food:Practical applications, 22-70.

Yılmaz, Ö.B. ve Boyacıoğlu, M. (2020). Bazı sentetik antioksidanların 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin araştırılması. *Veteriner Hekimlikte Araştırma Dergisi*, 39(2), 67-72.

Zhao, Y. and Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013(6), 1-12.

Zhumakanova, B. S., Korona-Głowniak, I., Skalicka-Woźniak, K., Ludwiczuk, A., Baj, T., Wojtanowski, K. K., Józefczyk, A., Zhaparkulova, K., Sakipova, Z.B. and Malm, A. (2021). Phytochemical fingerprinting and in vitro antimicrobial and antioxidant activity of the aerial parts of *Thymus marschallianus* Willd. and *Thymus seravschanicus* Klokov Growing Widely in Southern Kazakhstan. *Molecules*, 26(11), 3193.



GAZİ GELECEKTİR...