

## Determination of The Potential Using in The Treatment of Common Chronic Diseases of *Anchusa Azurea Kurdica* Roots Different Extract

Ako Hamasaeed Abdulqadir<sup>1,\*</sup>, İsmail Şen<sup>1</sup>, Gokhan Zengin<sup>2</sup>, Yavuz Selim Çakmak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aksaray University, Department of Molecular Biology and Genetics, Türkiye

<sup>2</sup>Selcuk University, Department of Biology, Türkiye

### Keywords

Bioactivity, Traditional medicine,  
Phytochemistry, Chronic diseases,  
Natural compounds

### Article information

Received: Oct 02, 2023

Revised: Oct 22, 2023

Accepted: Oct 26, 2023

Online: Jun 03, 2024

### Abstract

Today, some common chronic diseases still have no known treatment. For this reason, studies on method and drug development for the treatment of these diseases continue. Even if synthetic drugs are used successful in treatment, it is becoming increasingly common to prefer natural products in these drug development studies due to they have some side effects. This study focused on determining the antioxidant and enzyme inhibition activities of *Anchusa azurea* var. *kurdica* roots and revealing the plant's potential to be used in the treatment of diseases such as diabetes, Alzheimer's and cancer. Herein, antioxidant activities of extracts obtained from root parts with different solvents were determined by free radical scavenging activity (DPPH, ABTS), FRAP, CUPRAC, phosphomolybdate and metal chelation activity tests. Enzyme inhibition activities were investigated for cholinesterase (acetyl and butyryl),  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and tyrosinase enzymes. In addition, the total phenolic and flavonoid contents of the extracts were determined as well as their phenolic compounds. In antioxidant activity tests, methanol extract generally showed higher activity compared the others, while ethyl acetate extract was found to be more active in enzyme inhibition. While the total phenolic content in the methanol extract was found at 22.12 mg GAE/g extract, the flavonoid content was found at very low levels in all extracts. Quercetin and rosmarinic acid were high amounts components in the phenolic compositions of the extracts. According to the obtained datas, *A. azurea* var. *kurdica* root extracts showed a good antioxidant and enzyme inhibition activities. The results showed that the plant has a high potential to be used as raw material for drug development studies for the treatment of chronic diseases.

doi: [10.29002/asujse.1369488](https://doi.org/10.29002/asujse.1369488)

## *Anchusa Azurea* var. *Kurdica* Köklerinin Farklı Özütlerinin Yaygın Kronik Hastalıkların Tedavisinde Kullanım Potansiyellerinin Belirlenmesi

### Anahtar Kelimeler

Biyoaktivite, Geleneksel tıp,  
Fitokimya, Kronik hastalıklar,  
Doğal bileşenler

### Özet

Günümüzde yaygın olarak görülen bazı kronik hastalıkların hala bilinen bir tedavisi yoktur. Bu nedenle bu hastalıkların tedavisi için yöntem ve ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Sentetik ilaçlar tedavide başarılı bir şekilde kullanılsa bile, bazı yan etkileri nedeniyle bu ilaç geliştirme çalışmalarında doğal ürünlerin tercih edilmesi giderek yaygınlaşmaktadır. Bu çalışma *Anchusa azurea* var. *kurdica* köklerinin antioksidan ve enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenerek bitkinin diyabet, Alzheimer ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyelinin ortaya konulmasına odaklanmıştır. Burada kök kısımlarından farklı çözücüler ile elde edilen özütlerinin antioksidan aktiviteleri serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH, ABTS), FRAP, CUPRAC, fosfomolibdat ve metal şelatlama aktivite testleri ile belirlenmiştir. Enzim inhibisyon aktiviteleri kolinesteraz (asetil ve bütiril),  $\alpha$ -amilaz,  $\alpha$ -glukozidaz ve tirozinaz enzimleri için araştırılmıştır. Ayrıca özütlerin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri yanında fenolik bileşimleri de belirlenmiştir. Antioksidan aktivite testlerinde genel olarak metanol özütü diğerlerine kıyasla yüksek aktivite gösterirken, enzim inhibisyonunda etil asetat özütü daha aktif bulunmuştur. Metanol ekstraktındaki toplam fenolik içerik 22,12 mg GAE/g ekstrakt olarak bulunurken, flavonoid içeriği tüm ekstraktlarda oldukça düşük seviyelerde bulunmuştur. Özütlerin fenolik bileşimlerinde kuersetin ve rosmarinik asit yüksek oranda bulunan fenolik bileşenler olmuştur. Elde edilen verilere göre *A. azurea* var. *kurdica* kök özütleri iyi düzeyde antioksidan ve enzim inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Sonuçlar bitkinin kronik hastalıklarının tedavisine yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında hammadde olarak kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu göstermiştir.

\*Corresponding Author: \*e-mail: [akodekony@gmail.com](mailto:akodekony@gmail.com)  0000-0001-5404-0938



Articles in this journal is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

## 1. Giriş

Yirminci yüzyılın özellikle son dönemlerinde yaygınlaşan ve günümüzde de hız kazanarak devam eden, geleneksel tıbbi referans olarak bitkisel kaynaklı doğal biyoaktif bileşiklerin bilimsel olarak araştırılması bilim dünyasına bir çok alan için yeni kapılar aralamıştır. Biyoaktif bileşiklerin araştırılması sadece tıbbi kullanımlar için değil aynı zamanda gıda ve ilaç endüstrisinde de gelişmelere öncülük etmeye başlamıştır. Öyle ki özellikle ilaç ve gıda endüstrilerinde bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyer bütillhidrokin (TBHQ) ve propil gallat (PG) gibi sağlık üzerine olumsuz etkileri olduğu düşünülen birçok sentetik antioksidanın tercih ediliyor olması, sağlıklı yaşamın yanında hastalıklardan azami ölçüde korunmak isteyen insanoğlunu tükettiği besinlere daha çok dikkat etmeye duyarlı hale getirmiştir [1, 2]. Son yıllarda, bitkiler tarafından üretilen biyoaktif bileşikler üzerine yapılan çalışmalar, besin değerlerini aromalar, gıda katkı maddeleri ve endüstriyel kullanıma sahip biyokimyasallar olarak göstermiştir. Bu durum insanların doğala dönüş bilincinin gelişmesi vasıtasıyla biyoaktif bileşiklerin araştırılmasını ilgi odağı haline getirmiştir.

Biyoaktif bileşikler, insan vücudunda gerçekleşen ve hücrelerin enerji üretimi esnasında metabolik olaylarda oksijeni kullanması sonucunda oluşan serbest radikallerin giderilmesi için önemli bir aktivite göstermektedirler. Serbest radikaller son yörüngelerinde eşlenmemiş bir veya daha fazla elektron bulunduran ve bu sayede proteinler, lipidler ve DNA gibi biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girebilme potansiyeline sahip olan reaktif kimyasal türlerdir. Biyolojik moleküllerle etkileşime giren serbest radikaller onları okside ederek çeşitli hastalıkların oluşumunu tetiklemektedirler. Serbest radikaller genellikle süperoksit, hidroksil, hidroperoksil, singlet oksijen ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ve ayrıca hücrel redoks işlemlerinden kaynaklanan nitrik oksit, nitrojen dioksit ve nitroz oksit gibi reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak bilinmektedirler. Bu radikaller zararlı ve faydalı bileşikler olarak ikili bir rol oynamaktadır. Bu kimyasal türlerin hücrelerde veya dokularda birikmesiyle oksidatif stres meydana gelmektedir [3, 4]. Oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, gastrointestinal bozukluklar ve çoklu sistem etkileri ile sağlık üzerinde oldukça olumsuz etkilere sahiptir [5]. Bu noktada devreye giren antioksidan savunma sistemleri ise kompleks bir çalışma mekanizmasıyla meydana gelen serbest radikalleri ve onların oluşturduğu riskleri ortadan kaldırır veya etkilerini en aza indirerek biyolojik moleküllerin oksidasyonunu geciktirmeye yardımcı olurlar. Bu nedenle antioksidanlar, insan sağlığının korunmasında ve serbest radikallerin neden olduğu hastalıkların önlenmesinde hayati bir role sahiptir [6]. Öte yandan son dönemlerde prevalans hızı artan Alzheimer hastalığı ve diyabet gibi küresel hastalıkların enzim inhibitörlerinin keşfi ile tedavi edilmesine yönelik yapılan çalışmalar bir hayli önem kazanmıştır [7, 8]. Enzim inhibitörleri, düşük moleküler ağırlıkları ve enzimlerle anahtar kilit yapısı oluşturan substratların yapılarına benzeyen moleküllerdir. Bu moleküller katalitik süreçteki basamaklara müdahale etmek kaydıyla enzimlerin katalitik etkinliklerini engelleyebilirler [9]. Buna bağlı olarak tıbbi ve aromatik bitkilerin, yakıt, yapı, sinyal, enzimler üzerinde uyarıcı ve inhibe edici etkileri, kendi katalitik aktiviteleri, savunma ve diğer organizmalarla etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip olan sekonder metabolitleri önem taşımaktadır [10, 11]. Çevresel stres koşullarına göre geliştirmiş oldukları sekonder metabolitlerin izole edilerek enzim inhibitör kaynağı biçiminde değerlendirilmesi daha güvenli ve etkili olabileceği düşünüldüğü için araştırılması ön plana çıkmaktadır.

Tıbbi ve aromatik bitkileri kapsayan familyalardan biri olan Boraginaceae familyasının başta Avrupa ve Asya olmak üzere dünya çapında yaklaşık 2000 tür içerdiği tahmin edilmektedir. Aile, farmakoloji ve kozmetoloji için önemli olan bir bitki grubunu içerir. Bu familyaya ait olan *Anchusa* cinsi ise dünya çapında 146 cinsi ile bilinirken özellikle Irak bölgesinde 26 cins ve 193 tür ile karşımıza çıkmaktadır. Kuzey Irak bölgesi ise geleneksel tedavi yöntemlerinin günümüzde hala yaygın olduğu bölgelerden birisidir. Bu duruma bağlı olarak ülkede oldukça fazla sayıda bitki hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bölgede halk hekimliğinde *Anchusa* türlerinin yara iyileştirici ve idrar söktürücü olarak kullanıldığı bilinmektedir [12]. Ayrıca yapılan çalışmalarla bu türlerin içerdiği rosmarinik asitin antikanser, antidiyabetik, antiviral ve antioksidan etkilerinin de olduğu ortaya çıkartılmıştır [13-15]. Bu noktadan hareketle çalışmamızda yine Kuzey Irak bölgesinde yetişmekte olan ve sindirim sistemi hastalıklarının tedavisi, yara iyileştirme ve inflamasyon önleme gibi faydalı tıbbi etkileri ile medikal amaçlarla kullanılan bitkilerden biri olan *Anchusa azurea* var. *kurdica*'nın köklerinin antioksidan aktivitesi ve bazı enzimleri inhibe edebilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece bu çalışma *Anchusa* cinsinin bir türü olan *Anchusa azurea* var. *kurdica* hakkında nutrasötik ve farmakolojik endüstri için fitokimyasal özellikleriyle birlikte potansiyelinin ortaya konulması hakkında değerli bilgiler sağlayabilir.

## 2. Materyal ve Metotlar

### 2.1. Bitki Materyali

Çalışma materyali olan *A. azurea* var. *kurdica* bitkisinin kök kısımları bitkinin vejetasyon döneminde Kuzey Irak bölgesinin Halepçe iline bağlı Dekon köyü civarlarından 12.06.2017 yılında toplanmıştır.

## 2.2. Bitki Özütlerinin Hazırlanması

Olgunlaşma döneminde toplanan bitkiler gölgede kurutulmuştur. Tamamen kurutulmuş örnekler blender yardımı ile öğütülerek toz hale getirilmiştir. Öğütülmüş olan örneklerden 15'er gram tartılarak balon jodelere aktarılmış ve üzerine 250'şer mL çözücü (su, metanol, etil asetat) eklenerek Ultrasonic Cleaner cihazına koyulmuştur (4x15). Bu işlemden sonra örnekler iki defa tekrarlanmak kaydıyla filtre kağıdından geçirilerek süzümüştür. Sulu örnek liyofilize edilmiştir. Diğer örnekler ise 50-60 °C sıcaklıkta 150 rpm dönme hızında çalışan Rotary Evaporatör cihazı yardımıyla çözücülerini uçurulmuştur ve saf özütler elde edilmiştir. Kurutulmuş özütler analize kadar -20 °C'de depo edilmiştir. Analiz öncesinde ise bu özütlerden stok solüsyonlar (2 mg/mL) hazırlanmıştır.

## 2.3. Antioksidan Aktivite

### 2.3.1. Toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik

Bitki özütlerinin total fenolik içerikleri bazı modifikasyonlar ile Folin-Ciocalteu yöntemine göre saptanmıştır [16, 17]. Özetleyecek olursak, 1.5 mL distile su üzerine 0.5 mL %7'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek karıştırıldı ve stok örnek çözeltilerinden 0.2 mL alındı, ardından 3 dakika beklendi. Sonrasında Folin-Ciocalteu reaktifinden 1 mL eklendi. Standart olarak gallik asitin farklı konsantrasyonlarından (100, 50, 25, 12.5 µg/mL) alınmak kaydıyla aynı işlemler uygulandı. Kör olarak örneğin yerine 0.2 mL metanol koyuldu. Ardından 25 °C 2 saat süreyle karanlık bir ortamda inkübe edilen örneklerin 760 nm'de spektrofotometrede absorbansları okundu. Örneklerde içerdikleri farklı fenolik oranlarına göre yeşilden maviye doğru renk değişiminin olduğu gözlemlendi. Örnekler üçer tekrar olacak şekilde ölçülmüştür. Standardın absorbans konsantrasyon grafiğinde sağlanmış olan denklemden yararlanılarak örneklerin fenolik içerikleri Gallik asit eşdeğeri (GAE) olacak şekilde saptanmıştır.

Arvouet-Grand vd. [18]'ne göre spektrofotometrik olarak total flavonoid içerik belirlenmiştir. Bu yöntemde, 1 mL %2'lik AlCl<sub>3</sub> 1 mL özüt ile karıştırıldı. Her bir örnek için hazırlanmış olan kör örneğinde 1 mL metanol ve 1 mL özüt eklenmiştir. Rutin'in farklı konsantrasyonlarda standart olarak hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 415 nm'de köre karşı absorbans değerleri okunmuştur. Örneklerin flavonoid içerikleri Rutin eşdeğeri (RE) olarak, standardın absorbans konsantrasyon grafiğinde elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiştir.

### 2.3.2. DPPH ve ABTS için serbest radikal giderme aktivitesi

Bitki özütlerinin DPPH radikalini giderme aktivitesi Sarikurkcu vd. [19]'nin metodunda bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Metot için ilk önce DPPH'nin 10<sup>-5</sup> mM'lık çözeltisi hazırlanmıştır. Kontrol için 1 mL DPPH çözeltisi ve 1 mL metanol, kör için ise yalnızca metanol konulmuştur. Örnekler için ise farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan 1 mL özüt üzerine 1 mL DPPH eklenmiş oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin DPPH radikali inhibe oranları (%I) aşağıdaki formüle (1) göre hesaplanmıştır:

$$\%I = 100 \times (A_0 - A_1) / A_0 \quad (1)$$

(A<sub>0</sub>:Kontrolün absorbansı, A<sub>1</sub>:Özütün absorbansı)

Ayrıca radikalın %50'sinin inhibe edildiği konsantrasyon olan IC<sub>50</sub> değerleri de ayrı ayrı her bir özüt için hesaplanmıştır.

ABTS katyon radikaline karşı temizleme aktivitesi, Re vd. [20]'nin yöntemine göre küçük bir değişikliklerle ölçüldü. Kısaca ABTS radikal katyonu, 7 mM ABTS çözeltisinin 2.45 mM potasyum persülfat ile reaksiyona sokulması ve karışımın oda sıcaklığında karanlıkta 12-16 saat beklemesiyle hazırlandı. Deneye başlamadan önce, ABTS çözeltisi metanol ile 734 nm'de 0.700±0.02 absorbansa seyreltildi. ABTS solüsyonuna (2 mL) numune solüsyonu (1 mL) ilave edildi ve karıştırıldı. Örnek absorbansı, oda sıcaklığında 30 dakikalık bir inkübasyondan sonra 734 nm'de okunmuştur. ABTS radikal katyon süpürme aktivitesi, troloks eşdeğerleri (mg TE/g) olarak ifade edildi.

### 2.3.3. Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve bakır iyonları indirgeme aktivitesi (CUPRAC)

Bu yöntem bitki özütlerinin demir iyonlarına karşı indirgeme aktivitesinin tespit edilmesi prensibine bağlı olarak gerçekleştirilmiştir [21]. İlk aşamada 31.2 mg TPTz, 10 mL distile su ve 50 µL hidroklorik asit karışımında çözülmüştür. Ardından 10 mL distile suda 32 mg FeCl<sub>3</sub> çözülmüştür. Bu aşamadan sonra 4.1 mL asetik aside (%80) 250 mL distile su eklenmiş olup sonrasında 0.66 gr sodyum asetat bu çözelti içerisinde tamamen çözülmüştür. Tampon, FeCl<sub>3</sub> ve TPTz 10/1/1 oranlarında karıştırılmıştır ve bu karışımın 2 mL'si ile 0.1 mL bitki özütü karıştırılıp sonrasında 30 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbans değerleri 593 nm'de okunmuştur. Troloks çözeltisinin farklı konsantrasyonları (25, 50, 75, 100, 150, ve 200 µg/mL) standart olarak hazırlanmıştır. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) cinsinden verilmiştir.

Bu yöntem Apak vd. [22]'den ufak modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Yöntem için amonyum asetat, neocuproine ve  $CuCl_2$  çözeltilerinin her birinden 1'er mL alınmıştır. Üzerine ise farklı konsantrasyonlardaki bitki özütleri ve standart BHA ve BHT'den 0.5 mL eklenmiştir. Sonrasında her bir tüpe 1'er mL distile su eklenmiştir. Son olarak karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm'de köre karşı absorbands değerleri okunmuştur. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) cinsinden verilmiştir.

#### 2.3.4. Toplam antioksidan kapasite (PBD)

Fosfomolibdenum metodunda Cakmak vd., [23]'ne göre uygulanarak total antioksidan kapasitenin belirlenmiştir. Test için 4 mM amonyum molibdat, 28 mM sodyum fosfat ve 6 M sülfürik asit çözeltileri karıştırılarak reagent çözeltisi hazırlanmıştır. Sonrasında reagent çözeltisinden 3 mL alınarak üzerine farklı konsantrasyonlardaki (0.0625-1 mg/mL) askorbik asit çözeltileri ve 0.1 mL özüt eklenmiştir. Kör örneğinde ise 0.3 mL metanol eklenmiştir. Daha sonra tüpler 90 dakika ve 95 °C'de inkübe edildikten sonra 695 nm'de absorbands değerleri okunmuştur. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) cinsinden verilmiştir.

#### 2.3.5. Metal şelatlama aktivitesi (MCA)

Tez kapsamında değerlendirilen *A. azurea* var. *kurdica* özütlerinin metal şelatlama yetenekleri ferrozin metodu ile belirlendi. Bitkisel özütler ile  $FeCl_2$  reaksiyona tabii tutularak ortamdaki demir (II) varlığı ferrozin kullanılarak belirlendi. Deney sonucunda absorbandslar 562 nm'de ölçüldü. Aynı işlemler EDTA içinde yapıldı ve sonuçlar EDTA eş değer (mg EDTA/g) olarak verildi [24].

### 2.4. Enzim İnhibisyon Testleri

#### 2.4.1. Kolinesteraz inhibisyonu

Ellman metodu kullanılarak kolinesteraz (ChE) inhibitör aktivitesi ölçülmüştür [25]. Örnek çözeltisi (50 µL), asetilkolinesteraz (veya bütirilkolinesteraz) çözeltisi (25 µL) ve DTNB (125 µL) Tris-HCl tamponu (pH 8.0) içerisinde karıştırılmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu mikroplate içerisinde 25 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon bütirilkolin klorid veya asetilkolin iyodinin eklenmesiyle başlatılmıştır. Benzer biçimde her bir özüt için kör, enzim bulundurmeyen bir tüp olarak hazırlanmıştır. Örnek ve kör absorbands değerleri 405 nm'de 10 dakika ve 25 °C'de inkübasyondan sonra okunmuştur. Kolinesteraz inhibitör aktivitesi galantamine eşdeğeri (GALAE) olarak verilmiştir.

#### 2.4.2. Alfa-amilaz inhibisyonu

$\alpha$ -amilaz enzimi için inhibisyon aktivitesi Caraway-Somogyi iyodin/potasyum iyodid (IKI) yöntemi ile yapılmıştır [26]. Örnek çözeltileri (50 µL), fosfat tamponu (pH 6.9, 6 mM sodyum klorid) ve (25 µL)  $\alpha$ -amilaz çözeltisi 96 kuyucuklu mikroplate içerisinde karıştırılmıştır. Karışım 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Ön inkübasyonun ardından nişasta çözeltisi (50 µL, %0.05) eklendiğinde reaksiyon başlatılmıştır. Benzer olarak enzim bulundurmeyen kör çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir ve reaksiyon HCl (25 µL, 1 M) eklendiğinde durdurulmuştur. Bunun ardından iyodin-potasyum iyodid çözeltisi (100 µL) eklenmiştir. Örnek ve kör absorbands değerleri 630 nm'de okundu.  $\alpha$ -amilaz inhibitör etkinliği sonuçları akarboz eşdeğeri (ACAIE) olarak verilmiştir.

#### 2.4.3. Alfa-glukozidaz inhibisyonu

Test Palanisamy vd. [27]'nin yöntemine uygulanarak inhibisyon aktiviteleri belirlenmiştir. Örnek çözeltisi (50 µL),  $\alpha$ -glukozidaz çözeltisi (50 µL), glutatyon (50 µL), PNP (50 µL) ve fosfat tamponu (pH 6.8) çözeltisi 96 kuyucuklu mikroplate içerisinde karıştırılmış ve 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Kör örneği enzim içermeyecek şekilde hazırlanmıştır. Sodyum karbonat (50 µL, 0.2 M) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve kör absorbands değerleri 400 nm'de okunmuştur. İnhibisyon aktivitesi akarboz eşdeğeri (ACAIE) şeklinde verilmiştir.

#### 2.4.4. Tirozinaz inhibisyonu

Tirozinaz enzimi için inhibisyon aktivitesi L-DOPA'nın substrat olarak kullanıldığı dopachrome yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [28]. Örnek çözeltisi (25 µL), fosfat tamponu (100 µL, pH 6.8) ve tirozinaz çözeltisi (40 µL) ile 96 kuyucuklu mikroplate içerisinde karıştırılmış ardından 25 °C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Reaksiyon başlatılması ortamına L-DOPA (40 µL) eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler içerisinde enzim bulundurmeyen kör çözeltisi hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri 25 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiş ardından maksimum absorbandsa sahip olduğu 492 nm'de okunmuştur. İnhibitör aktivitesi sonuçları kojik asite eşdeğer (KAE) olarak verilmiştir.

## 2.5. Fenolik Bileşim

Farklı ekstraktların fenolik bileşim analizi, Caponio vd. [29] tarafından açıklanan yöntem de yapılan küçük modifikasyonlarla elde edildi. Analiz C18 kolonu ve diyot dizisi dedektörü DAD ile donatılmış bir HP Agilent marka 1200 Infinity Series modeli HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hareketli faz, (A) su ve (B) metanol içinde %3 asetik asit (v/v) kullanıldı. Enjeksiyon hacimleri 10 µL idi ve ekstrakt konsantrasyonları 2 mg/mL idi. Eluatlar 278 nm'de saptandı. Test edilen örnekler metanol içinde hazırlandı. Elüsyon gradyanı kullanıldı ve takip oranı şu şekildedir: %93 A-%7 B (0.1 dk), %72 A-%28 B (20 dk), %75 A-%25 B (8 dk), %70 A-%30 B (7dk); ve 15 dakika boyunca aynı gradyan %67 A-%33 B (10 dakika), %58 A-%42 B (2 dakika), %50 A-%50 B (8 dakika), %30 A-%70 B idi (3 dk), %20 A-%80 B (2 dk) ve %100 B çalışmanın son 5 dakikası boyunca kullanıldı (Abdulqadir et al. 2018). Ayrıca kullanılan standartlar 3-Hidroksi Benzoik Asit, 4- Hidroksi Benzoik Asit, Benzoik Asit, Katesin Hidrat, Klorojenik Asit, Kafeik Asit, Epikatesin, Gallik Asit, Hesperidin, P-Kumarik Asit, Kuersetin, Rosmarinik Asit, Sinapik Asit, Siringik Asit, t-Sinamik Asit ve t-Ferulik Asit. Bu çalışmada, (ppm=mg/kg-mg/L) olarak ifade edilen her bir bileşik her bir özüt için incelenmiştir.

## 3. Araştırma Bulguları ve Tartışma

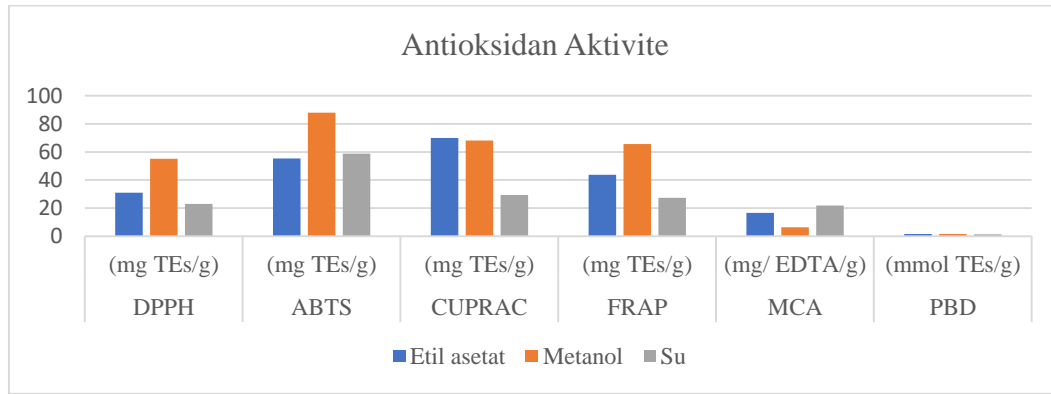
### 3.1 Antioksidan aktivite

Çalışmamızda *A. azurea* var. *kurdica* türünün toprak altı kısımlarından hazırlanan etilasetat, metanol ve su özütlerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için toplam fenolik (TPC) ve toplam flavonoid (TFC) içerikleri başta olmak üzere DPPH ve ABTS serbest radikal süpürme aktivitesi, FRAP ve CUPRAC iyon indirgeme gücü, toplam antioksidan kapasite (PBD), Metal şelatlama aktivitesi (MCA) gibi bazı yaygın antioksidan aktivite testleri uygulanmıştır (Tablo 1 ve Şekil 1).

**Tablo 1.** *A. azurea* var. *kurdica* kök özütlerinin antioksidan aktiviteleri.

Çözücüler	DPPH (mg TEs/g)	ABTS (mg TEs/g)	CUPRAC (mg TEs/g)	FRAP (mg TEs/g)	MCA (mg/ EDTA/g)	PBD (mmol TEs/g)
Etil asetat	30.89±1.06*	55.37±3.78*	69.94±2.91*	43.83±0.65*	16.60±1.48*	1.59±0.09*
Metanol	55.01±0.28	87.89±0.89	68.15±2.32	65.63±0.34	6.40±0.56	1.70±0.11
Su	22.94±0.98	58.71±2.32	29.29±2.20	27.30±0.82	21.81±0.43	1.37±0.01

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma.TE; troloks eşdeğeri.



**Şekil 1.** *A. azurea* var. *kurdica* kök özütlerinin antioksidan aktiviteleri.

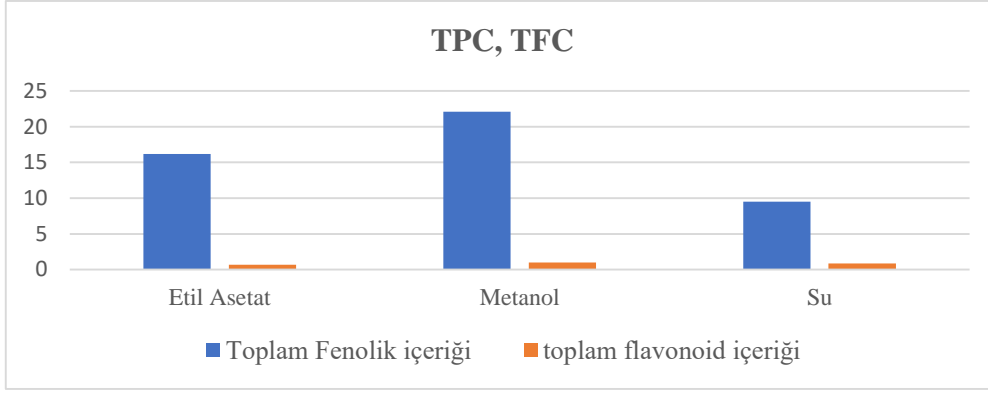
### 3.1.1 Toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik (TPC ve TFC)

Fenolik içerik Folin-Ciocalteu reaktifi ile gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden hesaplanmıştır. Flavonoid içerik Rutin eşdeğeri (RE) cinsinden hesaplanmıştır. Uygulanan testlerin sonucunda toplam fenolik içerik için sonuçlar sırasıyla metanol özütü için 22.12±0.42 mg GAE/g, etil asetat özütü için 16.20±0.60 mg GAE/g ve su özütü için 9.51±0.11 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Toplam Flavonoid içerik ise sonuçlar sırasıyla metanol özütü için 0.98±0.04 RE/g, su özütü için 0.84±0.34 RE/g ve etil asetat özütü için 0.68±0.58 RE/g olarak hesaplanmıştır (Tablo 2 ve Şekil 2).

**Tablo 2.** *A. azurea* var. *kurdica* kök özütlerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri.

Özüt	Toplam Fenolik İçerik (TPC) mg GAE/g özüt	Toplam flavonoid içerik (TFC) RE/g özüt
Etil Asetat	16.20±0.60*	0.68±0.58*
Metanol	22.12±0.42	0.98±0.04
Su	9.51±0.11	0.84±0.34

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma. GAE; gallik asit eşdeğeri, RE; rutin eşdeğeri.



Şekil 2. *A. azurea* var. *kurdica* kök özütlерinin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri.

Sabih Ozer vd. [30] yapmış oldukları bir çalışmada Boraginaceae familyasına ait olan *Alkanna tinctoria* subsp. *tinctoria* türünden hazırlanmış oldukları dört farklı özütün toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriklerini belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda toplam fenolik içerik için en yüksek aktiviteyi  $110.46 \pm 0.31$   $\mu\text{g}$  GAEs/mg ile su özütünde tespit ederlerken toplam flavonoid içerik için en yüksek aktiviteyi  $24.81 \pm 0.36$   $\mu\text{g}$  QEs/mg ile metanol özütünde tespit etmişlerdir. Alali vd. [31] yaptıkları çalışmada Boraginaceae familyasından *Anchusa* cinsine ait olan *Anchusa italica* Retz. ve *Anchusa strigosa* Banks & Sol. türlerinin su ve metanolik özütlerinin total fenolik içeriğini belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda *Anchusa italica* Retz. için sonuçlar sırasıyla metanol özütü için  $16.2$  mg GE/g ve su özütü için  $12.3$  mg GE/g olarak bulunmuştur. *Anchusa strigosa* Banks & Sol. için ise sonuçlar sırasıyla su özütü için  $10.5$  mg GE/g ve metanol özütü için  $6.1$  mg GE/g olarak bulunmuştur. Bir diğer çalışmada Gharib ve Godarzee [32] *Anchusa arvensis* türünün etanol ve su özütlerinin toplam fenolik içeriği ve toplam flavonoid içeriğini belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda toplam fenolik içerik için etanol özütünü  $35.54 \pm 0.57$  mg GAE/g ve su özütünü  $28.15 \pm 2.40$  mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. Toplam flavonoid içeriği ise etanol özütü için  $29.13 \pm 1.05$  mg QE/g ve su özütü için  $21.74 \pm 1.80$  mg QE/g olarak tespit etmişlerdir.

### 3.1.2. DPPH ve ABTS radikalleri giderme aktivitesi

DPPH ve ABTS testleri, radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılan iki yöntemdir. DPPH yönteminde radikal en zayıf antioksidanlarla bile etkileşime girebildiği için yöntemi avantajlı bir hale getirmektedir. Öte yandan hem DPPH hem de ABTS yöntemlerinde radikaller lipofilik ve hidrofilik antioksidanlarla etkileşime girebildiği için bu yöntemlerin uygulanması önemlidir [33, 34]. DPPH ve ABTS serbest radikal giderme aktiviteleri troloks eşdeğeri (TE) cinsinden hesaplanmıştır. *A. azurea* var. *kurdica* türünün kök kısımlarının DPPH ve ABTS serbest radikal giderme aktivitesi testlerinde en iyi sonuçlar sırasıyla DPPH testi için metanol özütünde  $55.01 \pm 0.28$  mg TE/g olarak hesaplanmış ve ABTS testi için metanol özütünde  $87.89 \pm 0.89$  mg TE/g olarak hesaplanmıştır (Tablo 1 ve Şekil 1).

Sarikurkcü vd. [35] yapmış oldukları bir çalışmada *Anchusa undulata* L. subsp. *hybrida* (Ten.) Coutinho türünün metanol özütünün DPPH ve ABTS serbest radikal giderme aktivitesini çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda DPPH için radikal yakalama aktivitesini  $2.086 \pm 0.102$  mmol TE/g ve ABTS için radikal yakalama aktivitesini  $0.112 \pm 0.002$  mmol TE/g olarak tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada Tufa vd. [36] Boraginaceae familyasına ait olan *Alkanna sfikasiana* türünün toprak üstü ve kök kısımlarından hazırlanmış oldukları farklı özütlerin DPPH ve ABTS serbest radikal giderme aktivitesini test etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda DPPH için en yüksek sonucu  $96.00 \pm 0.32$  mg TE/g, ABTS için ise en yüksek sonucu  $441.97 \pm 9.33$  mg TE/g olarak bulmuşlardır. Zengin vd. [37] yapmış oldukları bir çalışmada Boraginaceae familyasına ait olan *Moltkia aurea* ve *Moltkia coerulea* türlerinin metanolik özütlerinin DPPH ve ABTS serbest radikal yakalama aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *Moltkia aurea* türünden hazırlanan özüt için DPPH aktivitesini  $54.33 \pm 0.92$  mg TE/g, ABTS aktivitesini ise  $184.88 \pm 8.73$  mg TE/g olarak tespit etmişlerdir. *Moltkia coerulea* türünden hazırlanan özüt için ise DPPH aktivitesini  $18.81 \pm 0.97$  mg TE/g, ABTS aktivitesini ise  $44.32 \pm 4.63$  mg TE/g olarak tespit etmişlerdir. Trifan vd. [38] *Anchusa ochroleuca* M. Bieb. türünün kök kısımlarından hazırlanmış oldukları diklorometan, metanol ve etanol özütlerinin DPPH ve ABTS radikal giderme aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda bitkinin kök kısmından hazırlanan özütlerden DPPH testi için en yüksek sonucu  $216.98 \pm 3.58$  mg TE/g ile etanol özütü, ABTS testi için ise yine en yüksek sonucu  $311.97 \pm 6.85$  mg TE/g olarak etanol özütünün verdiğini tespit etmişlerdir. Marini vd. [39] Boraginaceae familyasının *Cordia* cinsine ait olan *Cordia bicolor*, *Cordia megalantha* ve *Cordia dentata* türlerinin metanolik özütlerinin DPPH ve ABTS serbest radikal yakalama aktivitelerini

belirlemleridir. Çalışmanın sonucunda DPPH serbest radikal yakalama aktivitesinde sırasıyla en yüksek sonucu gösterenleri 195.68±0.30 mg TE/g ile *Cordia megalantha*, 166.83±1.5 mg TE/g ile *Cordia bicolor* ve 101.42±2.13 mg TE/g ile *Cordia dentata* olarak tespit etmişlerdir. ABTS serbest radikal yakalama aktivitesinde ise sırasıyla en yüksek sonucu verenleri 476.78±1.26 mg TE/g ile *Cordia megalantha*, 268.70±10.6 mg TE/g ile *Cordia bicolor* ve 152.45±1.06 mg TE/g ile *Cordia dentata* olarak tespit etmişlerdir.

### 3.1.3. İyon indirgeme aktivitesi (FRAP ve CUPRAC)

Elektron transferine bağlı olan bu iki yöntemden CUPRAC'ta nötr bir pH'da neokuproin (Nc)'in bakır (II) ile birlikte oluşturduğu renkli bakır (II) neokuproin kompleksi bakır (I) neokuproin şelatına indirgenerek 450 nm'de maksimum absorbanı vermesi özelliği antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır [40]. CUPRAC metodu fizyolojik pH'da aktif olması nedeniyle diğer elektron transferi yöntemlerinden üstündür [41]. FRAP'ta ise asidik ortamda, antioksidanların varlığında ferrictripirydyltriazine kompleksi Fe<sup>+3</sup>'den Fe<sup>+2</sup>'ye indirgenmesiyle renkli kompleksler oluşur ve bu durum çözelti 595 nm'de absorbanı artışa neden olur [42]. Çalışmamızda *A. azurea* var. *kurdica* türünün kök kısımlarından hazırlanmış olan üç farklı özütün FRAP ve CUPRAC iyon indirgeme kapasiteleri belirlenmiştir. Sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden verilmiştir. Uygulanan testlerin sonucunda CUPRAC testi için en iyi sonuçlar sırasıyla etil asetat (69.94±2.91 mg TE/g), metanol (68.15±2.32 mg TE/g) ve su özütü (29.29±2.20 mg TE/g) iken FRAP testi için en iyi sonuçlar metanol (65.63±0.34 mg TE/g), etil asetat (43.83±0.65 mg TE/g) ve su özütü (27.30±0.82 mg TE/g) şeklinde tespit edilmiştir (Tablo 1 ve Şekil 1).

Loizzo vd. [43] yaptıkları bir çalışmada *Anchusa azurea* Mill. türünün etanol özütünün FRAP iyon indirgeme gücünü araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda etanol özütünün iyon indirgeme gücünü 26.1±3.8 µM Fe(II)/g olarak hesaplamışlardır. Menghini vd. [44] Boraginaceae familyasına ait bir tür olan *Cynoglossum creticum* türünün çiçek, yaprak ve kök kısımlarının etanol/su ekstraktlarını hazırlamışlar ve FRAP iyon indirgeme gücünü test etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda yaprak kısmında 149.88±0.68 mg TE/g olarak en yüksek sonucu, ardından 64.70±1.86 mg TE/g ile çiçek özütünü ve son olarak kök özütünden 43.91±0.89 mg TE/g olarak FRAP iyon indirgeme gücünü tespit etmişlerdir. Varvouni vd. [45] ise yine Boraginaceae familyasına ait olan *Symphytum anaticum* ve *Cynoglottis barrelieri* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış oldukları metanol özütlerinin CUPRAC iyon indirgeme aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *Symphytum anaticum* türü için CUPRAC iyon indirgeme aktivitesini 182±8 mg TE/g, *Cynoglottis barrelieri* türü için ise CUPRAC iyon indirgeme aktivitesini 407±5 mg TE/g olarak tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise Boğa vd. [46] Boraginaceae familyasının bir üyesi olan *Trachystemon orientale* türünden farklı konsantrasyonlarda diklorometan, etanol ve su özütlerini hazırlayarak bitkinin CUPRAC iyon indirgeme aktivitesini test etmeyi hedeflemişlerdir. Çalışmanın sonucunda diklorometan özütü için en iyi sonucu 100 µg/mL konsantrasyonda 0.718±0.0195 tespit etmişlerdir. Etanol özütü için en iyi sonucu yine 100 µg/mL konsantrasyonda 1.48±0.0735 olarak tespit etmişlerdir. Son olarak su özütünde ise en iyi sonucu yine 100 µg/mL konsantrasyonda 0.108±0.0031 olarak tespit etmişlerdir.

### 3.1.4. Toplam antioksidan kapasite (PBD)

Toplam antioksidan kapasite fosfomolibdat testi ile ölçülmüştür. Fosfomolibdat testi bir indirgeyici ajan (antioksidan) varlığında molibden (VI)'nın molibden (V)'e indirgenmesi ve yeşil bir fosfomolibdat (V) kompleksi oluşturması esasına dayanmaktadır. Test, bir elektron transfer mekanizması içermektedir. Fenoller ve flavonoidler dahil bir çok doğal ürün bu testle tespit edilebilir [47]. Çalışmamızda *A. azurea* var. *kurdica* türünün kök kısımlarından hazırlanmış olan üç farklı özütün toplam antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Sonuçlar troloks eş değeri cinsinden hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucuna göre en iyi aktivite gösteren 1.70±0.11 mmol TE/g olarak metanol özütü olmuştur (Tablo 1. ve Şekil 1) .

Zengin vd. [48] Boraginaceae familyasına ait bir tür olan *Cerintho minor* subsp. *auriculata*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanmış oldukları farklı özütlerle toplam antioksidan kapasitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda metanol özütünün 1.40±0.08 mmol TE/g, etil asetat özütü 1.07±0.06 mmol TE/g ve su özütü 0.97±0.03 mmol TE/g olarak hesaplanmıştır. Abdel-Aleem vd. [49] Boraginaceae familyasının bir üyesi olan *Cordia myxa* L. türünün yaprak kısımlarından hazırladıkları farklı fraksiyonlara fosfomolibdat testini uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda en yüksek antioksidan kapasiteyi etil asetat fraksiyonunda (103.40±0.05 mg AAE/g) tespit etmişlerdir. Boskovic vd. [50] yaptıkları çalışmada *Anchusa officinalis* türünün toprak üstü kısımlarından hazırladıkları özütlerle total antioksidan kapasiteyi tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda etanol özütünün 90.26±0.99 µg AA/g olarak en yüksek sonucu verdiğini bildirmişlerdir.

### 3.1.5. Metal şelatlama aktivitesi (MCA)

Canlı sistemlerde esansiyel bir mikro mineral olarak bilinen demir; oksijenin kırmızı kan hücreleri vasıtasıyla taşınımı, kullanımı ve depolanması ile redoks potansiyelleri gibi çeşitli biyolojik işlevde rol almaktadır [51]. Aşırı demir

yüklenmesi, protein oksidasyonunu, karaciğer fibrozunun ve lipid peroksidasyonunun başlamasını içeren reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırır [52]. Antioksidanların metal bağlama yapan fonksiyonel grupları nedeniyle etkili bir Fe bağlama yeteneğine sahip oldukları tespit edilmiştir [53]. Metal şelatlama genel olarak en çok tercih edilen ve yaygın bir antioksidan yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda *A. azurea* var. *kurdica* türünün kök kısımlarından hazırlanan farklı özütlerin metal şelatlama aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda 21.81±0.43 mg TE/g olarak su özütü en yüksek aktiviteyi gösterirken onu 16.60±1.48 mg TE/g ile etil asetat özütü ve 6.40±0.56 mg TE/g ile metanol özütü takip etmiştir. Sonuçlar Tablo 1. ve Şekil 1.'de verilmiştir.

Taskın ve Bitis [54] yapmış oldukları bir çalışmada *Anchusa undulata* subsp. *hybrida* türünün toprak üstü kısımlarının etanolik özütünü hazırlayarak metal şelatlama aktivitesini tespit etmek istemişlerdir. Çalışmanın sonucunda metal şelatlama aktivitesini 2.82±0.06 mM EDTAE/g olarak tespit etmişlerdir. Ozntamar-Pouloglou vd. [55] yapmış oldukları bir çalışmada Boraginaceae familyasının bir üyesi olan *Heliotropium procumbens* türünden hazırlamış oldukları metanolik ve sulu özütlerin metal şelatlama aktivitesini tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda sulu özütün metal şelatlama aktivitesini 13.97±0.06 mg EDTAE/g olarak hesaplamışlardır. Metanolik özütün metal şelatlama aktivitesini ise 11.76±1.12 mg EDTAE/g olarak tespit etmişlerdir. Zengin vd. [56] yapmış oldukları bir çalışmada Boraginaceae familyasına ait olan *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. türünün toprak üstü kısımlarından hazırlamış oldukları metanolik özütün metal şelatlama kabiliyetini 17.60±0.61 mg EDTAE/g olarak tespit etmişlerdir.

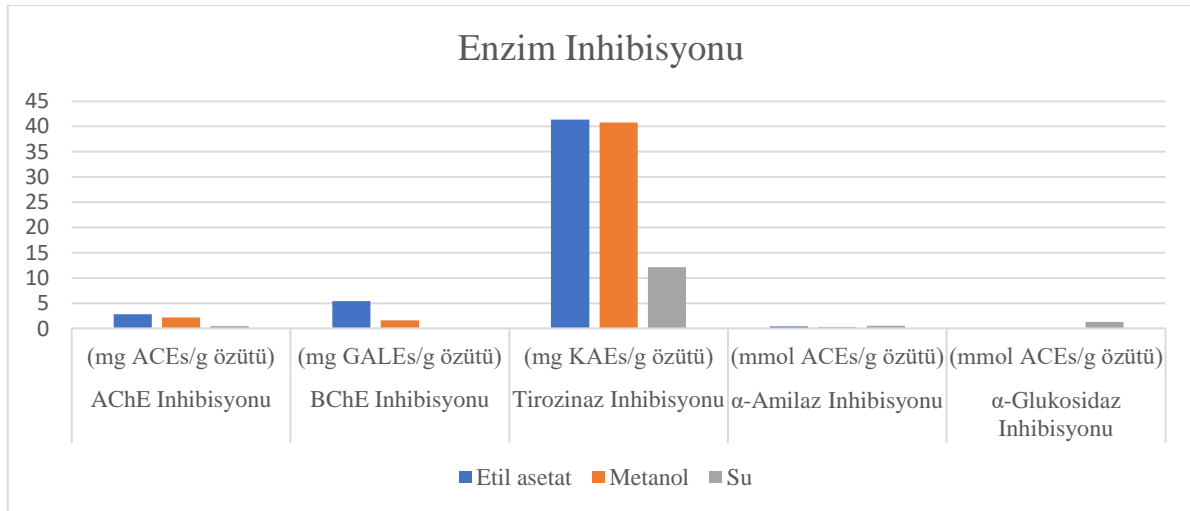
### 3.2. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibitör teorisi hiperpigmentasyon, Alzheimer hastalığı ve diyabet hastalığı da dahil olmak üzere küresel sağlık sorunlarının tedavisi için en önde gelen stratejilerden bir tanesidir. Bu nedenle, enzim inhibitörü olarak yeni kaynakların keşfi için yapılan araştırmalar bilimsel alanda son dönemlerde oldukça fazla ilgi çekmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda *Anchusa azurea* var. *kurdica* türünün kök kısımlarından hazırlanmış olan etilasetat, metanol ve su özütlerinin Asetilkolinesteraz (AChE), Bütirilkolinesteraz (BChE), tirozinaz,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilme potansiyelleri araştırılmıştır (Tablo 3 ve Şekil 3).

**Tablo 3.** *A. azurea* var. *kurdica* kök özütlerinin enzim inhibisyon aktiviteleri.

Özüt	AChE İnhibisyonu (mg GALAEs/g özütü)	BChE İnhibisyonu (mg GALAEs/g özütü)	Tirozinaz İnhibisyonu (mg KAEs/g özütü)	$\alpha$ -Amilaz İnhibisyonu (mmol ACAEs/g özütü)	$\alpha$ -Glukozidaz İnhibisyonu (mmol ACAEs/g özütü)
Etil asetat	2.85±0.25*	5.43±0.34*	41.37±0.58*	0.41±0.09*	0.11±0.01*
Metanol	2.17±0.15	1.60±0.04	40.82±0.69	0.27±0.00	0.02±0.00
Su	0.50±0.09	na	12.12±0.31	0.56±0.01	1.30±0.02

\*Üç paralel analiz için ortalaması±standart sapma. AChE; asetilkolinesteraz, BChE; bütirilkolinesteraz, GALAE; galantamin eşdeğeri, KAE; kojik asit eşdeğeri, ACAE; akarboz eşdeğeri.



**Şekil 3.** *A. azurea* var. *kurdica* kök özütlerinin enzim inhibisyon aktiviteleri.

#### 3.2.1. Kolinesteraz inhibisyonu (asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz)



Asetilkolinesteraz (AChE), merkezi ve çevresel sinir sistemlerinde çok sayıda yolakta nörotransmitter olarak görev yapan asetilkolinin (ACh) hızlı bir şekilde hidrolizi ile uyarı oluşmasının engellenmesinde etkilidir. Alzheimer ise farklı fizyolojik süreçlerde, ACh üreten ve kullanan hücrelere zarar verir veya onları yok eder, böylece diğer hücrelere mesaj iletmek için mevcut miktarı azaltır. AChE aktivitesini inhibe eden kolinesteraz inhibitörleri ilaçlar, yıkım hızını azaltarak ACh seviyesini korur. Böylelikle, ön beyin bölgelerinde kolinerjik sinir iletimini artırırlar ve işleyen beyin hücrelerinin kaybını telafi ederler [57]. Butirilkolinesteraz (BChE) ise, vücuttaki esterlerin hidrolizini katalize eden bir serin hidrolazdır. Butirilkolinesterazın geniş bir substrat kapsamı ve daha düşük asetilkolin katalitik etkinliği vardır. Butirilkolinesteraz üzerine yapılan ilk çalışmalar, enzimin inhibisyonunun beyin asetilkolin düzeylerinin artmasına yol açtığını göstermiştir. BChE, devam eden AD'de dengeleyici bir enzim olarak çok önemli bir rol oynar [58]. BChE'nin anormal  $\beta$ -amiloid ( $\beta$ ) birikimi ile yüksek oranda korele olduğu gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalar, BChE inhibisyonunun ilerlemiş AD'nin tedavisi için potansiyel bir strateji olduğunu öne sürmüştür [59]. Bu bilgiler doğrultusunda Alzheimer hastalığının tedavisi kapsamında bu enzimleri inhibe edebilecek doğal inhibitörlerin araştırılması önemlidir. Çalışmamızda *Anchusa azurea* var. *kurdica* türünden hazırlanmış olan üç farklı özütün asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) inhibisyon yetenekleri tespit edilmiştir. AChE inhibisyonu için en yüksek aktiviteyi  $2.85 \pm 0.25$  mg GALAE/g ile etilasetat özütü gösterirken BChE inhibisyonu için en yüksek aktiviteyi yine  $5.43 \pm 0.34$  mg GALAE/g ile etilasetat özütü göstermiştir (Tablo 3 ve Şekil 3).

Gholamhoseinian vd. [60] yaptıkları bir çalışmada Boraginaceae familyasından *Cordia mixa* türünün meyvelerinden hazırlanmış oldukları metanol özütünün AChE inhibisyonunu araştırmışlardır ve çalışmanın sonucunda metanol özütünün AChE inhibisyonunu %9 olarak tespit etmişlerdir. Imran vd. [61] yaptıkları bir çalışmada *Nonea micrantha* türünden hazırlanmış oldukları farklı fraksiyonların farklı konsantrasyonlarda ki AChE ve BChE % inhibisyonlarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda AChE inhibisyonu için en yüksek aktiviteyi  $1000 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda  $\%75.51 \pm 0.73$  ile hekzan fraksiyonunda tespit etmişlerdir. BChE inhibisyonu için ise en aktif konsantrasyon olan  $1000 \mu\text{g/mL}$ 'da  $\%83.49 \pm 0.27$  ile ham saponin fraksiyonunda tespit etmişlerdir. Istifli [62] yaptığı bir çalışmada Boraginaceae familyasından olan *Onosma trachytricha* türünün toprak üstü kısımlarının metanol özütünün AChE ve BChE enzimlerini inhibe edebilme potansiyelini araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda metanol özütünün AChE ve BChE enzimlerini inhibe edebilme potansiyelleri sırasıyla  $2.21$  mg GALAE/g ve  $0.58$  mg GALAE/g olarak tespit etmiştir.

### 3.2.2. Tirozinaz inhibisyonu

Melanin pigmenti cildin zararlı etkilere karşı etkili bir savunma sistemini temsil etmektedir. Fakat anormal melanin pigmentasyonu ve melanomda da rol oynar. Bu sebeple, cilt bozukluklarının araştırılmasına yönelik çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yaklaşımların önde gelenlerinden biri melanin biyosentezinin ilk iki adımında kilit rol oynayan tirozinaz enzimi ve hiperpigmentasyon bozukluklarında depigmente edici ajan olarak giderek önemli hale gelen tirozinaz inhibitörlerinin araştırılmasıdır. Bu açıdan güvenilir ve yeni inhibitörlerin tespiti için testin yapılması önem taşımaktadır [63]. Yapmış olduğumuz çalışmada *Anchusa azurea* var. *kurdica* bitkisinin farklı çözücüler içerisinde hazırlanmış özütlerinin tirozinaz inhibisyonu araştırılmış ve veriler kojik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde sırasıyla etilasetat özütünün tirozinaz inhibisyonu  $41.37 \pm 0.58$  mg KAE/g, metanol özütünün tirozinaz inhibisyonu  $40.82 \pm 0.69$  mg KAE/g ve su özütünün tirozinaz inhibisyonu  $12.12 \pm 0.31$  mg KAE/g olarak tespit edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 3).

Kaplan [64] yapmış olduğu bir çalışmada Boraginaceae familyasından *Moltkia coerulea* türünün yaprak ve çiçek kısımlarının sulu ve metanolik özütlerinin tirozinaz inhibisyonunu araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda yaprak kısımlarından hazırlanan özütlerin tirozinaz inhibisyonu sulu özüt için  $0.860 \pm 0.00$  mmol KAE/g, metanol özütü için ise  $0.761 \pm 0.00$  mmol KAE/g olarak hesaplanmıştır. Bitkinin çiçek kısımlarından hazırlanan özütlerin tirozinaz inhibisyonu ise metanol özütü için  $0.610 \pm 0.04$  mmol KAE/g iken sulu özüt için  $0.480 \pm 0.01$  mmol KAE/g olarak hesaplanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada Sarikurku vd. [65] Boraginaceae familyasından olan *Onosma ambigens* türünün toprak üstü kısımlarından hazırladıkları farklı özütlerin (su, etilasetat, ve metanol) tirozinaz enzimini inhibe edebilme potansiyellerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda tirozinaz inhibisyonu açısından sonuçları sırasıyla metanol özütü için  $95.67$  mg KAEs/g, su özütü için  $71.19$  mg KAEs/g ve etilasetat özütü için  $60.99$  mg KAEs/g olarak tespit etmişlerdir.

### 3.2.3. Diyabet ile ilişkili enzimlerin inhibisyonu ( $\alpha$ -amilaz ve $\alpha$ -glukozidaz)

Tip 2 diyabet hastalığında postprandiyal hiperglisemiyi kontrol altına almanın terapötik yaklaşımlarından biri, diyetdeki karbohidratların sindirimini engellenmesidir. Pankreatik  $\alpha$ -amilaz, sindirim sisteminde nişasta gibi diyetdeki karbohidratları basit monosakaritlere parçalayan anahtar bir enzimdir. Bunlar ayrıca  $\alpha$ -glukosidazlar tarafından glikoza parçalanır ve emildiğinde kan dolaşımına girer. Bu nedenle,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukosidaz enzimlerinin inhibe edilmesi, karbohidrat sindirimini baskılayabilir, glikoz alımını geciktirebilir ve sonuç olarak kan şekeri seviyelerini azaltabilir [66].

Bu açıdan değerlendirildiğinde  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilecek inhibitörlerin keşfi önem arz etmektedir. Bu kapsamda çalışmamızda *A. azurea* var. *kurdica* türünden hazırlanmış olan farklı özütlerin glukoz metabolizmasında rol alan enzimler olan  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilme yetenekleri tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda  $\alpha$ -amilaz enzim inhibisyonu için bulgular sırasıyla su özütü için  $0.56 \pm 0.01$  mmol ACAE/g, etilasetat özütü için  $0.41 \pm 0.09$  mmol ACAE/g ve metanol özütü için  $0.27 \pm 0.00$  mmol ACAE/g düzeyindedir. Özütlerin  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyonu ile ilgili yapılan çalışmaların sonucunda su özütü  $1.30 \pm 0.02$  mmol ACAE/g, etilasetat özütü  $0.11 \pm 0.01$  mmol ACAE/g ve metanol özütü  $0.02 \pm 0.00$  mmol ACAE/g düzeyinde inhibisyon aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3 ve Şekil 3).

Saravanakumar vd. [67] *Onosma isaurica* ve *Onosma bracteosa* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış oldukları metanol özütünün  $\alpha$ -amilaz inhibisyon yeteneğini araştırmışlar ve çalışmanın sonucunda *O. isaurica* için  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunu  $130.19 \pm 13.86$  mg ACES/g ve *O. bracteosa* için  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunu  $396.02 \pm 6.58$  mg ACES/g olarak tespit etmişlerdir. Katanić Stanković vd. [68] *Onosma sericea* ve *Onosma stenoloba* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış oldukları metanolik özütlerin  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilme kabiliyetlerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *O. sericea* türü için  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunu  $1.26 \pm 0.07$  mmol ACAE/g ve ise  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyonunu  $33.38 \pm 6.44$  mmol ACAE/g olarak bildirmişlerdir. *O. stenoloba* türü için ise  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunu  $0.89 \pm 0.02$  mmol ACAE/g ve  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyonunu  $43.74 \pm 0.16$  mmol ACAE/g olarak bildirmişlerdir. Varvouni vd. [69] *Anchusa aucheri* türü Toprak üstü kısımları üzerinde ile yürüttükleri çalışmada hazırlanmış oldukları metanol özütünün  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilme potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda ise  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyonunu  $3.66 \pm 0.13$  mmol ACAE/g ve  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunu  $0.54 \pm 0.03$  mmol ACAE/g olarak tespit etmişlerdir.

### 3.3. Fenolik bileşikler

*A. azurea* var. *kurdica* türünden hazırlanan etilasetat, metanol ve su özütlerinde bulunan fenolik bileşiklerin konsantrasyonları, kalibrasyon eğrilerinden hesaplandı ve ppm özüt olarak ifade edildi (Tablo 4). Elde edilen sonuçlara göre *A. azurea* var. *kurdica*'nın etilasetat ekstraktında kuersetin  $5.922$  ppm ile en iyi sonucu vermiştir. Bu sonucu  $3.740$  ppm ile Hesperidin, ve  $3.367$  ppm ile Rosmarinik asit izledi. Metanol özütünde en yüksek sonuçlar sırasıyla;  $33.057$  ppm ile Kafeik asit,  $9.017$  ppm ile kuersetin ve  $4.224$  ppm ile rosmarinik asit olarak tespit edilmiştir. Su özütünden elde edilen sonuçlar ise sırasıyla; kuersetin  $6.271$  ppm, epikateşin  $2.705$  ppm ve rosmarinik asit  $1.723$  ppm olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.** *A. azurea* var. *kurdica* türünün kök kısımlarının fenolik bileşim analizi.

Fenolik Bileşik*	A.R.EA. (ppm)	A.R.M. (ppm)	A.R.W. (ppm)
3-Hidroksi Benzoik Asit	N.D.	1.633	N.D.
4- Hidroksi Benzoik Asit	N.D.	N.D.	0.489
Benzoik Asit	N.D.	N.D.	N.D.
Kateşin Hidrat	N.D.	N.D.	N.D.
Klorojenik Asit	N.D.	24.785	N.D.
Kafeik Asit	2.180	33.057	0.982
Epikateşin	3.009	N.D.	2.705
Gallik Asit	N.D.	N.D.	0.671
Hesperidin	3.740	N.D.	N.D.
P-Kumarik Asit	N.D.	1.237	0.422
Kuersetin	5.922	9.017	6.271
Rosmarinik Asit	3.367	4.224	1.723
Sinapik Asit	0.181	2.687	N.D.
Siringik Asit	0.945	N.D.	0.929
t-Sinamik Asit	0.460	0.914	0.301
t-Ferulik Asit	N.D.	1.846	N.D.

\* 1, 5, 10, 20, 50, 70, 100 ppm konsantrasyonlarda saf standart çözeltileri okutularak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. \*\*N.D.=Not Detected; RT=Retention Time. \*\*\*ppm=mg/kg-mg/L. A.R.E.A.: *A. azurea* var. *kurdica* kök etilasetat özütü; A.R.M.: *A. azurea* var. *kurdica* kök metanol özütü; A.R.W.: *A. azurea* var. *kurdica* kök su özütü.

Sowa vd. [70] yapmış oldukları bir çalışmada Boraginaceae familyasından *Symphytum officinale* türünün kök kısımlarından hazırlanmış oldukları etanol/su ve su özütlerinin HPLC yöntemiyle kimyasal içeriğini belirlemeye

çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda su özütü için 100 µg/mL konsantrasyonda 10.99 µg/mL allantoin olarak tespit etmişlerdir. Etanol/su özütü için ise 100 µg/mL konsantrasyonda 10.14 µg/mL allantoin olarak tespit etmişlerdir. Paun vd. [71] yaptıkları bir çalışmada *Anchusa officinalis* türünden hazırlanmış oldukları özütlerin kimyasal bileşenlerini belirlemek amacıyla HPLC-MS yöntemini kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda luteolin ve klorojenik asit bileşiklerinin en iyi sonuçları verdiğini tespit etmişlerdir.

#### 4. Sonuç

Çalışma halk arasında geleneksel tıpta çeşitli amaçlarla kullanılan *A. azurea* var. *kurdica* bitkisinin sahip olduğu bileşenler ve biyolojik aktiviteler dolayısıyla kronik hastalıklarda kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle tirozinaz enzimine karşı göstermiş olduğu yüksek inhibisyon özelliği bitkinin deri hastalıklarının tedavisinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bitkinin kökleri yetiştiği alanlardaki bölge halkı tarafından sebze olarak da tüketilmektedir. Sonuç olarak bitki köklerinin farklı özütleri önemli düzeyde faydalı bileşenlere ve biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu durum göz önüne alındığında bitkinin köklerinin farmakoloji endüstrisi için iyi bir hammadde kaynağı olabileceği değerlendirilmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma doktora tezinin bir kısmını içermektedir. Çalışmada kullanılan bitkilerin teşhisinde destek aldığımız Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

- [1] Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., ve Duran, A. (2013). Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 290-296.
- [2] Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Wang, X., ve Martínez, M. A. (2021). Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action, *Food Chemistry*, 353, 129488.
- [3] Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*, 4, 2, 89-96.
- [4] Di Meo, S., ve Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1-32.
- [5] Rekatsina, M., Paladini, A., Piroli, A., Zis, P., Pergolizzi, J. V. ve Varrassi, G. (2020). Pathophysiology and therapeutic perspectives of oxidative stress and neurodegenerative diseases: a narrative review, *Advances in Therapy*, 37, 1, 113-139.
- [6] Akbari, B., Baghaei-Yazdi, N., Bahmaie, M., ve Mahdavi Abhari, F. (2022). The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress, *BioFactors*, 48, 3, 611-633.
- [7] Lopa, S. S., Al-Amin, M., Hasan, M., Ahammed, M., Islam, K. M., Alam, A. H. M. ve Sadik, M. (2021). Phytochemical analysis and cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Enhydra fluctuans* relevant in the management of Alzheimer's disease, *International Journal of Food Science*, 8862025.
- [8] Li, Y., Zhang, W., Zhao, R. ve Zhang, X. (2022). Advances in oral peptide drug nanoparticles for *diabetes mellitus* treatment, *Bioactive Materials*, 15, 392-408.
- [9] Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41.
- [10] Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production, *Biological Research*, 52.
- [11] Tiwari, R., ve Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review, *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3, 5, 661-670.
- [12] Hussain, F. H. S., Ahamad, J., ve Osw, P. S. (2019). A Comprehensive Review on Pharmacognostical and Pharmacological Characters of *Anchusa Azurea*, *Advances in Medical, Dental and Health Sciences*, 3, 33-37.
- [13] Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62, 2, 121-125.

- [14] Lau, C. H., Chua, L. S., Lee, C. T., & Aziz, R. (2015). Fractionation of rosmarinic acid from crude extract of *Orthosiphon stamineus* by solid phase extraction. *Journal of Engineering Science and Technology*, 10, 104-112.
- [15] Amoah, S. K., Sandjo, L. P., Kratz, J. M., & Biavatti, M. W. (2016). Rosmarinic acid—pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Medica*, 82, 05, 388-406.
- [16] Juranović Cindrić, I., Kunštić, M., Zeiner, M., Stingeder, G., ve Rusak, G. (2011). Sample preparation methods for the determination of the antioxidative capacity of apple juices, *Croatica chemica Acta*, 84, 3, 435-438.82.
- [17] Agbor, G. A., Vinson, J. A., ve Donnelly, P. E. (2014). Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay, *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 3, 8, 147-156.
- [18] Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., ve Legret, P. (1994). Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, 6, 462-468.
- [19] Sarikurkcü, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., ve Harmandar, M. (2008). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays, *Bioresource Technology*, 99, 10, 4239-4246.
- [20] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 9-10, 1231-1237.
- [21] Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., ve Duran, A. (2013). Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey, *Food Chemistry*, 141, 1, 91-97.
- [22] Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E., ve Ercag, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 5/6, 292–304.
- [23] Çakmak, Y. S., Aktumsek, A., ve Duran, A. (2012). Studies on antioxidant activity, volatile compound and fatty acid composition of different parts, *Glycyrrhiza echinata* L, *EXCLI Journal*, 11, 178-187.
- [24] Uysal, S., Zengin, G., Locatelli, M., Bahadori, M. B., Mocan, A., Bellagamba, G., De Luca, E., Mollica, A. ve Aktumsek, A. (2017). Cytotoxic and enzyme inhibitory potential of two *Potentilla* species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and their chemical composition, *Frontiers in Pharmacology*, 8, 290.
- [25] Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S., ve Duran, A. (2013). Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 290-296.
- [26] Yang, X-W., Huang, M-Z., Jin, Y-S., Sun, L-N., Song, Y., ve Chen, H-S. (2012). Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties, *Fitoterapia*, 83, 7, 1169-1175.
- [27] Palanisamy, U.D., Ling, L.T., Manaharan, T., ve Appleton, D. (2011). Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity, *Food Chemistry*, 127, 1, 21–27.
- [28] Orhan, I. E., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Sekeroglu, N., Kartal, M., ve Sener, B. (2012). Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses, *Food Chemistry*, 130, 4, 882-888.
- [29] Caponio F., Alloggio V., Gomes T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques, *Food Chemistry* 64: 203-209.
- [30] Sabih Ozer, M., Sarikurkcü, C., Tepe, B., ve Can, S. (2010). Essential oil composition and antioxidant activities of alkanet (*Alkanna tinctoria* subsp. *tinctoria*), *Food Science and Biotechnology*, 19, 1177-1183.
- [31] Alali, F. Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., ve Oberlies, N. H. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project, *Natural Product Research*, 21, 12, 1121-1131.
- [32] Gharib, A., ve Godarzee, M. (2016). Determination of secondary metabolites and antioxidant activity of some boraginaceae species growing in Iran, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15,11, 2459-2465.

- [33] Danet, A. F. (2021). Antioxidants-Benefits, Sources, Mechanisms of Action, Waisundara, V. Y., Recent advances in antioxidant capacity assays, IntechOpen, London, UK.
- [34] Seyhan, S. A. (2019). DPPH antioksidan analizinin yeniden değerlendirilmesi, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 9, 2, 125-135.
- [35] Sarikurkcu, C., Zengin, G., Aktumsek, A., Ceylan, O., ve Uysal, S. (2015). Screening of possible in vitro neuroprotective, skin care, antihyperglycemic, and antioxidative effects of *Anchusa undulata* L. subsp. *hybrida* (Ten.) Coutinho from Turkey and its fatty acid profile, *International Journal of Food Properties*, 18, 7, 1491-1504.
- [36] Tufa, T., Damianakos, H., Zengin, G., Graikou, K., ve Chinou, I. (2019). Antioxidant and enzyme inhibitory activities of disodium rabsosin isolated from *Alkanna sfikasiana* Tan, Vold and Strid, *South African Journal of Botany*, 120, 157-162.
- [37] Zengin, G., Ceylan, R., Katanić, J., Mollica, A., Aktumsek, A., Boroja, T., ve Mahomoodally, M. F. (2017). Combining in vitro, in vivo and in silico approaches to evaluate nutraceutical potentials and chemical fingerprints of *Moltkia aurea* and *Moltkia coerulea*, *Food and Chemical Toxicology*, 107, 540-553.
- [38] Trifan, A., Zengin, G., Sinan, K. I., Wolfram, E., Skalicka-Woźniak, K., ve Luca, S. V. (2021). LC-HRMS/MS phytochemical profiling of *Symphytum officinale* L. and *Anchusa ochroleuca* M. Bieb.(Boraginaceae): Unveiling their multi-biological potential via an integrated approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 204, 114283.
- [39] Marini, G., Graikou, K., Zengin, G., Karikas, G. A., Gupta, M. P., ve Chinou, I. (2018). Phytochemical analysis and biological evaluation of three selected *Cordia* species from Panama, *Industrial Crops and Products*, 120, 84-89.
- [40] Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Bekdeşer, B. ve Bener, M. (2014). The CUPRAC methods of antioxidant measurement for beverages, In *Processing and impact on antioxidants in beverages* (pp. 235-244) Academic Press.
- [41] Özyürek, M., Güçlü, K. ve Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30, 4, 652-664.
- [42] Albayrak, S., Sağdıç, O. ve Aksoy, A., (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26, 4, 401-409.
- [43] Loizzo, M. R., Pugliese, A., Bonesi, M., Tenuta, M. C., Menichini, F., Xiao, J., ve Tundis, R. (2016). Edible flowers: A rich source of phytochemicals with antioxidant and hypoglycemic properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2467-2474.
- [44] Menghini, L., Ferrante, C., Zengin, G., Mahomoodally, M. F., Leporini, L., Locatelli, M., ve Orlando, G. (2019). Multiple pharmacological approaches on hydroalcoholic extracts from different parts of *Cynoglossum creticum* Mill.(Boraginaceae), *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(5), 633-639.
- [45] Varvouni, E. F., Zengin, G., Graikou, K., Ganos, C., Mroczek, T., ve Chinou, I. (2020). Phytochemical analysis and biological evaluation of the aerial parts from *Symphytum anatolicum* Boiss. and *Cynoglottis barrelieri* (All.) Vural & Kit Tan (Boraginaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 92, 104128.
- [46] Boğa, M., Hacıbekiroğlu, I., & Kolak, U. (2011). Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 290-295.
- [47] Ahmed, D., Khan, M. M. ve Saeed, R. (2015). Comparative analysis of phenolics, flavonoids, and antioxidant and antibacterial potential of methanolic, hexanic and aqueous extracts from *Adiantum caudatum* leaves, *Antioxidants*, 4, 2, 394-409.
- [48] Zengin, G., Nithiyantham, S., Locatelli, M., Ceylan, R., Uysal, S., Aktumsek, A., ve Maskovic, P. (2016). Screening of in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of different extracts from two uninvestigated wild plants: *Centranthus longiflorus* subsp. *longiflorus* and *Cerintho minor* subsp. *auriculata*, *European Journal of Integrative Medicine*, 8, 3, 286-292.

- [49] Abdel-Aleem, E. R., Attia, E. Z., Farag, F. F., Samy, M. N., ve Desoukey, S. Y. (2019). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antidiabetic activities of *Cordia myxa* L. leaves, *Clinical Phytoscience*, 5, 1, 29.
- [50] Boskovic, I., Đukić, D. A., Maskovic, P., Mandić, L., ve Perovic, S. (2018). Phytochemical composition and antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Anchusa officinalis* L. extracts, *Biologia*, 73, 1035-1041.
- [51] Ince, C. ve Çağındı, Ö. (2020). Effect of white mulberry (*Morus alba*) leaves and pulp on the antioxidant and antidiabetic activity of white and whole wheat bread, *GIDA-Journal of Food*, 45, 5, 977-988.
- [52] Sarkar, R., Hazra, B. ve Mandal, N. (2012). Reducing power and iron chelating property of *Terminalia chebula* (Retz.) alleviates iron induced liver toxicity in mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 144.
- [53] Gulcin, İ. ve Alwasel, S. H. (2022). Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method, *Processes*, 10, 1, 132.
- [54] Taskin, T., ve Bitis, L. (2016). In vitro antioxidant activity of eight wild edible plants in Bursa province of Turkey, *Medicine*, 64, 5, 706-711.
- [55] Ozntamar-Pouloglou, K. M., Cheilari, A., Zengin, G., Graikou, K., Ganos, C., Karikas, G. A., ve Chinou, I. (2023). *Heliotropium procubens* Mill: Taxonomic Significance and Characterization of Phenolic Compounds via UHPLC–HRMS-In Vitro Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities, *Molecules*, 28, 3, 1008.
- [56] Zengin, G., Ceylan, R., Katanić, J., Aktumsek, A., Matic, S., Boroja, T., ve Mahomoodally, M. F. (2018). Exploring the therapeutic potential and phenolic composition of two Turkish ethnomedicinal plants–*Ajuga orientalis* L. and *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb, *Industrial Crops and Products*, 116, 240-248.
- [57] Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. ve Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, *Current Neuropharmacology*, 11, 3, 315-335.
- [58] Ha, Z. Y., Mathew, S. ve Yeong, K. Y. (2020). Butyrylcholinesterase: a multifaceted pharmacological target and tool, *Current Protein and Peptide Science*, 21, 1, 99-109.
- [59] Zhou, S. ve Huang, G., (2022). The biological activities of butyrylcholinesterase inhibitors, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112556.
- [60] Gholamhoseinian, A., Moradi, M. N., ve Sharifi-Far, F. (2009). Screening the methanol extracts of some Iranian plants for acetylcholinesterase inhibitory activity, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 4, 2, 105.
- [61] Imran, M., Ullah, F., Ayaz, M., Sadiq, A., Shah, M. R., Jan, M. S., ve Ullah, F. (2017). Anticholinesterase and antioxidant potentials of *Nonea micrantha* Bioss. & Reut along with GC-MS analysis, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 499.
- [62] Istifli, E. S. (2021). Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Onosma bourgaei* and *Onosma trachytricha* and in silico molecular docking analysis of dominant compounds, *Molecules*, 26, 10, 2981.
- [63] Di Petrillo, A., González-Paramás, A. M., Era, B., Medda, R., Pintus, F., Santos-Buelga, C. ve Fais, A. (2016). Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 453.
- [64] Kaplan, A. (2021). Investigation of in vitro Enzyme Inhibitory Properties and Antioxidant Activity of *Moltkia coerulea* (Willd.) Lehm.(Boraginaceae) Growing in Raman Mountain-Batman, *International Journal of Secondary Metabolite*, 8(4), 312-320.
- [65] Sarikurkcü, C., Sahinler, S. S., Ceylan, O., ve Tepe, B. (2020). *Onosma ambigens*: Phytochemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory activity, *Industrial Crops and Products*, 154, 112651.
- [66] Alqahtani, A. S., Hidayathulla, S., Rehman, M. T., ElGamal, A. A., Al-Massarani, S., Razmovski-Naumovski, V., ve AlAjmi, M. F. (2019). Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from *Nuxia oppositifolia*, *Biomolecules*, 10, 1, 61.

- [67] Saravanakumar, K., Sarikurcu, C., Sarikurcu, R. T., ve Wang, M. H. (2019). A comparative study on the phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibition activities of two endemic *Onosma* species, *Industrial Crops and Products*, 142, 111878.
- [68] Stanković, J. S. K., Ceylan, R., Zengin, G., Matić, S., Jurić, T., Diuzheva, A., ve Aktumsek, A. (2020). Multiple biological activities of two *Onosma* species (*O. sericea* and *O. stenoloba*) and HPLC-MS/MS characterization of their phytochemical composition, *Industrial crops and products*, 144, 112053.
- [69] Varvouni, E. F., Zengin, G., Graikou, K., Ganos, C., Mroczek, T., ve Chinou, I. (2021). Chemical profile and biological properties of the endemic Turkish species *Phyllocara aucheri*, *South African Journal of Botany*, 137, 340-344.
- [70] Sowa, I., Paduch, R., Strzemeski, M., Zielińska, S., Rydzik-Strzemska, E., Sawicki, J., ve Wójciak-Kosior, M. (2018). Proliferative and antioxidant activity of *Symphytum officinale* root extract, *Natural product research*, 32, 5, 605-609.
- [71] Paun, G., Neagu, E., Albu, C., Savin, S., ve Radu, G. L. (2020). In vitro evaluation of antidiabetic and anti-inflammatory activities of polyphenolic-rich extracts from *Anchusa officinalis* and *Melilotus officinalis*, *ACS omega*, 5, 22, 13014-13022.