

**ÇİVİT OTU TÜRÜ, *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*
BİTKİSİNDEN SAFLAŞTIRILAN METABOLİTLERİN ENZİM
İNHİBİSYON ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Nimet AKBAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Ana Bilim Dalı

Doç. Dr. Tuba AYDIN

AĞRI-2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Nimet AKBAŞ

**ÇİVİT OTU TÜRÜ, *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* BİTKİSİNDEN
SAFLAŞTIRILAN METABOLİTLERİN ENZİM İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Tuba AYDIN

AĞRI-2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİVİT OTU TÜRÜ, *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* BİTKİSİNDEN SAFLAŞTIRILAN METABOLİTLERİN ENZİM İNHİBİSYON ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Nimet AKBAŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tuba AYDIN

Bu tez çalışmasında *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* bitkisinin toprak üstü kısımlarının diklorometan:metanol (50:50) ekstresinden kromatografik yöntemlerle izole edilen İG-1 (β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit), İG-2 (tetratriakontan), İG-3 (flavonoit karışımı) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit) kodlu maddelerin insan karbonik anhidraz I (hCA-I), insan karbonik anhidraz II (hCA-II), asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BChE) ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı.

Ekstraksiyon işleminde kurutulmuş ve öğütülmüş bitkiye diklorometan:metanol (50:50) çözücü karışımı ilave edildikten sonra 24 saat bekletilerek maserasyona bırakıldı. İzolasyon çalışmalarında ince tabaka kromatografisi (İTK) ve silika jel kolon kromatografisi (SKK) yöntemleri kullanıldı. Saflaştırılan maddelerin kimyasal yapılarını karakterize etmek için 1D ve 2D ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektroskopik yöntemleri kullanıldı. Biyolojik aktivite çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit (İG-1), tetratriakontan (İG-2) ve luteolin 7-O-glukozit (İG-4)'ün BChE enzimi için IC_{50} değerleri sırasıyla $1,98 \pm 0,019$; $1,45 \pm 0,010$ ve $1,58 \pm 0,021$ μM olarak hesaplandı. Pozitif kontrol takrin (IC_{50} : $3,21 \pm 0,041$ nM) ile kıyaslandığında orta düzeyde inhibisyon etkiye sahip olduğu belirlenen maddelerin özellikle BChE enzimi üzerinde daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Karbonik anhidraz enzimleri üzerine yapılan çalışmalarda İG-2 kodlu tetratriakontan ve İG-3 kodlu flavonoit karışımı inhibisyon göstermedi. En güçlü inhibisyon etkisini ise İG-4 kodlu luteolin 7-O-glukozit, hCA-I izoenzimi üzerinde gösterdi. Test edilen maddelerin α -glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği tespit edildi.

2024, 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*, izolasyon, sekonder metabolitler, biyolojik aktivite

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

IDENTIFICATION OF THE ENZYME INHIBITION EFFECTS OF METABOLITES PURIFIED FROM *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* PLANT

Nimet AKBAS

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Tuba AYDIN

In this study, inhibition effects of the IG-1 (β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside), IG-2 (tetratriacontan), IG-3 (an flavonoid mixture) and IG-4 (luteolin 7-O-glucoside) isolated by chromatographic methods from the dichloromethane:methanol (50:50) extract of the aerial parts of the *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* were investigated on human carbonic anhydrase I (hCA-I), human carbonic anhydrase II (hCA-II), acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and α -glucosidase enzymes activities.

During the extraction process, dichloromethane:methanol (50:50) solvent mixture was added to the dried and ground plant sample was macerated by for 24 hours at room temperature. Thin layer chromatography (TLC) and silica gel column chromatography (SCC) methods were used in the isolation process of the compounds ^1H NMR, ^{13}C NMR, 1D and 2D-NMR spectroscopic methods were used to characterize the chemical structures of the isolated compounds. According to the results obtained from biological activity studies, the IC_{50} values for the BChE of β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (IG-1), tetratriacontan (IG-2) and luteolin 7-O-glucoside (IG-4) are 1.98 ± 0.019 , respectively; it was calculated as 1.45 ± 0.010 and 1.58 ± 0.021 μM . It was determined that the compounds have a moderate inhibitory effect compared to the tacrine (IC_{50} : 3.21 ± 0.041 nM) showing more strong inhibition effect on the BChE. In studies performed on carbonic anhydrase enzymes, the compounds, IG-2 (tetratriacontan) and IG-3 (a flavonoid mixture) did not show any inhibition. Luteolin 7-O-glucoside (IG-4), showed the strongest inhibition effect on the hCA-I isoenzyme. However the tested compounds did not have an inhibitory effect on the α -glucosidase enzyme.

2024, 73 pages

Key Words: *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*, isolation, secondary metabolites, biological activity

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için her türlü şartı sağlayan ve bana her zaman her türlü desteği sunan aynı zamanda akademik çalışmaların önemini bana sevdiren mesleğini çok seven değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Tuba AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca NMR spektrumlarının alınmasında yardımlarını esirgemeyen, örnek ve ideal bilim insanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Cavit KAZAZ'a teşekkür ederim.

Enzim aktivitesi çalışmalarında desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Rüya SAĞLAMTAŞ'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elife KAYA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında değerli yardımları ile bana yardımcı olan eşim Sayın Memet AKBAŞ, kızlarım Zeynep Rana ve Elif Reyhan'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
BİRİNCİ BÖLÜM	1
1. GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM	3
2. KURUMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Genel Bilgiler ve Tarihçe	3
2.2. <i>Isatis</i> Türleri	4
2.3. <i>Isatis</i> Türlerinin Etnobotanik Kullanımı	6
2.4. <i>Isatis</i> Türleri Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar	7
2.5. <i>Isatis</i> Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri	8
2.5.1. Anti-inflamatuar aktivite	9
2.5.2. Antimikrobiyal ve antiviral aktivite	9
2.5.3. Anti-tümör aktivite.....	9
2.5.6. Karbonik anhidraz enzimleri	11
2.5.7. Asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri.....	13
2.5.8. α -Glukozidaz enzimi	14
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Bitki Materyali	15
3.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler	15
3.3. Enzim Materyalleri	15
3.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar	16
3.5. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar	16

3.6. Yöntem.....	16
3.6.1. Ekstraksiyon	16
3.6.2. Birinci izolasyon işlemleri.....	18
3.6.3. İkinci izolasyon işlemleri	20
3.6.4. Enzim inhibisyon çalışmaları	20
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM.....	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	24
4.1. Saflaştırılan Metabolitlere Ait Spektroskopik Bulgular	24
4.1.1. İG-1 (β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit)	25
4.1.2. İG-2 (Tetratriakontan)	28
4.1.3. İG-3 (Flavonoit karışımı)	30
4.1.4. İG-4 (Luteolin 7-O-glukozit).....	32
4.2. Saf Maddelerin Enzim İnhibisyonu Çalışma Bulguları	42
4.2.1. Karbonik anhidraz enzim inhibisyonu sonuçları	42
4.2.2. Kolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçları	47
4.2.3. Saf maddelerin α -glukozidaz enzimi inhibisyonu sonuçları	56
BEŞİNCİ BÖLÜM.....	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	57
6. KAYNAKÇA	61
ÖZGEÇMİŞ.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	Asetilkolinesteraz
BChE	Butirilkolinesteraz
2-D	2 boyutlu
¹³ C-NMR	Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans
COSY	İki Boyutlu ¹ H Korelasyon Spektroskopisi
<i>d</i>	Dublet
<i>dd</i>	Dubletin dubleti
DMSO-d ₆	Dötöro dimetilsülfoksit
<i>g</i>	Gram
hCA	Karbonikanhidraz
H	Hidrojen
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
Hz	Hertz
IR	İnfrared
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	Etkileşim sabiti
KK	Kolon Kromatografisi
M ⁺	Moleküler iyon
<i>m</i>	Multiplet
MA	Molekül Kütlesi
mg	Miligram
MHz	Mega Hertz
ml	Mililitre
MS	Kütle Spektroskopisi
m/z	Kütle/iyon
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ppm	Milyonda bir (NMR spekturumlarında ölçü)
s.	Sayfa
sec-	Sekonder
SKK	Silikajel Kolon Kromatografisi
subs.	Alt tür
UV	Ultraviyole

ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Isatis glauca</i> Aucher ex Boiss. glauca'nın fotoğrafları	5
Şekil 2.2. <i>Isatis glauca</i> Aucher ex Boiss.'in Türkiye'deki alt türlerinin yayılış alanları.	5
Şekil 2.3. <i>Isatis tinctoria</i> 'dan saflaştırılan bileşiklerin kimyasal yapıları	8
Şekil 3.1. Farklı çözücü sistemlerinde <i>Isatis glauca</i> ekstraktlarının İTK görüntüleri	17
Şekil 3.2. Ana kolon ve alt fraksiyonların şeması.....	18
Şekil 3.3. Karbonik anhidraz substratı p-nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması.....	21
Şekil 4.1. İG-1'in (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) ^1H -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz) spektrumu.....	26
Şekil 4.2. İG-1'in (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz) spektrumu.....	27
Şekil 4.3. İG-2'nin (Tetratriakontan) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu.....	29
Şekil 4.4. İG-2'nin (Tetratriakontan) ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu	29
Şekil 4.5. İG-3'ün (Karışım) ^1H NMR (dmso-d_6 , 400 MHz) spektrumu.....	30
Şekil 4.6. İG-3'ün (Tetratriakontan) ^{13}C NMR (dmso-d_6 , 100 MHz) spektrumu.....	31
Şekil 4.7. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ^1H NMR (dmso-d_6 , 400 MHz) spektrumu.....	33
Şekil 4.8. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ^{13}C NMR (dmso-d_6 , 100 MHz) spektrumu.....	33
Şekil 4.9. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) DEPT spektrumu (dmso-d_6 , 400 Mz)	34
Şekil 4.10. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ^1H - ^1H COSY spektrumu (dmso-d_6 , 400 Mz) ...	34
Şekil 4.11. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ^1H - ^1H COSY spektrumu (dmso-d_6 , 400 Mz)...	35
Şekil 4.12. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMQC spektrumu (dmso-d_6 , 400 Mz).....	35
Şekil 4.13. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMQC spektrumu (dmso-d_6 , 400Mz)	36
Şekil 4.14. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMQC spektrumu (dmso-d_6 , 400Mz)	36
Şekil 4.15. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMBC spektrumu (dmso-d_6 , 400Mz).....	37
Şekil 4.16. İG-1 için hCA-I %aktivite ölçüm sonuçları	39
Şekil 4.17. İG-4 için hCA-I %aktivite ölçüm sonuçları	40
Şekil 4.18. İG-4 için hCA-I %aktivite ölçüm sonuçları	41
Şekil 4.19. İG-4 için hCA-II %aktivite ölçüm sonuçları.....	42
Şekil 4.20. İG-1 için AChE %aktivite ölçüm sonuçları	44

Şekil 4.21. İG-2 için AChE %aktivite ölçüm sonuçları	45
Şekil 4.23. İG-4 için AChE %aktivite ölçüm sonuçları	46
Şekil 4.24. İG-1 için BChE %aktivite ölçüm sonuçları	47
Şekil 4.25. İG-2 için BChE %aktivite ölçüm sonuçları	48
Şekil 4.26. İG-3 için BChE %aktivite ölçüm sonuçları	49
Şekil 4.27. İG-4 için BChE %aktivite ölçüm sonuçları	51
Çizelge 3.1. Esteraz aktivitesi için kullanılan kontrol ve numune küvet içeriği	22
Çizelge 4.1. Saflaştırılan maddelerin farklı çözücü sistemlerindeki R_f değerleri.....	24
Çizelge 4.2 Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri	38
Çizelge 4.3. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri.....	43

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ

Bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanımı, tarih boyunca tüm farklı tıp sistemlerinde yer almıştır. Örneğin Mezopotamya, Mısır, Yunani (İslam), Ayurveda (Hindu) ve Çin tıp sistemlerinde bitkiler kullanılmıştır. Şifalı bitkilerin ilk kez nasıl ve ne zaman kullanıldığı, birçok durumda tarih öncesinde kaybolmuştur. Tıbbi bitkilere ait bilgilerin sözlü olarak iletilmesi dışında günümüze kadar ulaşan birçok yazılı kayıtlar mevcuttur. Örneğin en eski kaynaklar çivi yazılı tabletler ve parşömenler, sonrasında farmakopeler ve en son günümüzde elektronik depolama teknolojileri mevcuttur (Evans, 2009).

Doğal kaynaklı ilaçlar, özellikle son yüzyılda analitik kimya tekniklerinin gelişmesiyle birlikte birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmıştır. Örneğin 1950'lerde kınakına, yüksükotu, ipeka ve afyon gibi bitkisel ilaçların yerini bu bitkilerden izole edilmiş aktif bileşenler almıştır. Kısmen o günün analitik tekniklerinden dolayı aktif bileşikleri saflaştırılamayan birçok şifalı bitki de klinik olarak geçerliliğini yitirmiştir. Farmasötik endüstrisi amfetaminler, barbitüratlar, sülfonamidler ve sakinleştiriciler gibi klinik olarak oldukça etkili ilaçları sentezlemiş ve pazarlamıştır. O dönemlerde antibiyotikler ve reserpin, doğal kaynaklardan elde edilen birkaç yeni klinik ilaç arasında olmuştur (Phillipson, 2007). İlaç endüstrisinin çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni ve oldukça etkili sentetik türevli ilaç geliştirilmesinde kaydettiği tüm ilerlemelere rağmen, dünyada bitkisel ilaçların kullanımı günümüzde de devam etmektedir.

Isatis türleri, Brassicaceae familyasına ait, Orta Doğu ve Orta Asya gibi ılıman ve güneşli iklimlerden Akdeniz'e kadar uzanan bölgelerde yetişen otsu bitkilerdir (Speranza *et al.* 2020). Tıbbi özellikleri ve çivit mavisini renginden dolayı çok uzun yıllardır kullanılan bir bitkidir. Ülkemizde çivit otu olarak bilinen bu bitkinin, literatürde yara, ülser, tümör, hemoroid, yılan ısırıkları, iltihap ve grip gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Gai *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2020). Bitkinin fitokimyasal ve biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı birçok çalışmada, ekstrelerinde bulunan biyoaktif bileşenlerinin sinerjistik etkisine

atfedilen antiinflamatuvar, anti-viral, anti-oksidan ve anti-tümör gibi etkileri saptanmıştır (Mohn *et al.* 2009).

Karbonik anhidraz enzimleri insanlar da dahil olmak üzere yüksek omurgalılarda yaygın olarak bulunmaktadır. Büyük bir metalloenzim ailesinin en çok çalışılan üyeleridir. Bu metaloenzim ailesi, glukoneojenez, lipid ve üre sentezi ve kalsifikasyon gibi fizyolojik süreçler ile epilepsi, glokom, obezite, tümör oluşumu, çeşitli patojenlerin büyümesi ve virülansı gibi biyosentetik reaksiyonlar da dahil olmak üzere farklı doku ve organlarda çok sayıda patolojik süreçlerde yer alırlar (Supuran *et al.* 2003; Capasso and Supuran 2014) .

AChE (EC 3.1.1.7) enzimi, asetilkolin hidrolizinden sorumlu olup, kolinerjik sinapslarda ve nöromüsküler kavşakta nörotransmitter asetilkolinin etkisini sonlandırarak impuls iletiminde temel rol oynar (Sussman *et al.* 1991). Birçok klinik ve nöropatolojik çalışmada kolinerjik iletimin bozulduğu saptanmıştır (Srividhya *et al.* 2012).

α -Glukozidaz, esas olarak bağırsak epitel hücrelerinde bulunan ve polisakkaritlerin glikozidik bağlarını hidrolize ederek kan glukoz seviyelerinin artmasına neden olan, zara bağlı bir enzim türüdür (Wang *et al.* 2010; Ying *et al.* 2014). Bu enzimin inhibisyonu antihiperglisemik etki gösterebilmektedir. Bunun sonucu olarak Tip 2 diyabet tedavisinde günümüzde kullanılan akarboz, miglitol ve vogliboz gibi α -glukosidaz inhibitörleri ortaya çıkmıştır. Ancak bu ilaçlar karın ağrısı başta olmak üzere yan etkileri nedeniyle sınırlı kullanım alanı bulmaktadırlar. Bu nedenle daha az yan etkileri olan α -glukozidaz inhibitörlerinin saptanması, ilgi duyulan bir alan olmuştur (Wei *et al.* 2017; Rizvi *et al.* 2019).

Bu yüksek lisans tezinde Ağrı merkezinde kendiliğinden yetişen *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* bitkisinden saflaştırılan sekonder metabolitlerin yeni biyoaktiviteleri araştırılmıştır. Literatürde bu bitkiye ait ekstraktların insan karbonik anhidraz (hCA), asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BChE) ve α -glukozidaz enzimleri üzerine aktiviteyi araştırılmış ancak bitkiden saflaştırılan kimyasalların bu enzimler üzerine etkilerini ortaya çıkaran bir çalışma mevcut olmadığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* bitkisinin diklorometan-metanol (50:50) ekstresinden hCA-I, hCA-II, AChE, BChE ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon gösterebilecek sekonder metabolitlerin izole edilmesi amaçlanmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

2. KURUMSAL TEMELLER

2.1. Genel Bilgiler ve Tarihçe

Isatis türlerinden *I. tinctoria* tıbbi özellikleri ve çivit mavisi rengi açısından çok uzun yıllardır tanınan bir bitkidir. Bitkinin cins ismi *Isatis*, Latince “Isazein” ve Yunanca eskiden yaraları tedavi etmek anlamına gelen “Isadso” kelimelerinden türetilmiştir (Speranza *et al.* 2020). Bitkinin tür ismi olan “*tinctoria*” terimi ise boyahanelerde yapılan kullanımı ifade etmektedir (Marchese, 1991).

İndigo, dünyada bilinen en eski tekstil boyalarından biri olup, günümüzde de çok önemli endüstriyel kimyasal olarak kullanılan kot mavisi rengidir (Blackburn *et al.* 2009). Milattan önce ve sonra indigo boyar madde olarak kullanılmaya başlamadan önce tek mavi renk elde etmek üzere boyar madde olarak *I. tinctoria* kullanılmıştır. Eski Mısırlılar, mumyalamada uygulanan kumaş sargılarını boyamak için *I. tinctoria*'yı indigo kaynağı olarak kullanmışlardır (de Melo *et al.* 2006). Neolitik, tunç ve demir çağlarına ait maviye boyanmış tekstil kalıntıları, Avrupa'da çivit otunun kullanıldığını göstermiştir. Tarihsel kaynaklar ayrıca, Kelt ve Cermen halkının profilaktik veya ritüel amaçlarla vücutlarını ve saçlarını boyamak için çivit otunun kullandığını bildirmektedir. Julius Caesar, De Bello Gallico adlı kitabında "mavi bir dövme yapmak için derilerini deldiler ve üzerine çivit otu sürdüler" ifadeleri kullanılmaktadır. Romalılar bu insanlara “boyanmış insanlar” anlamına gelen Picti adını verdiler. Bu, *I. tinctoria* 'nın hem tekstil hem de dövme sanatı için kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir (Zech-Matterne and Leconte, 2010). İtalya'da 12. yüzyılda, Fransa'da ve İngiltere'de 13. yüzyılda, Almanya'da 16. yüzyıla kadar çivit otu mavi boyar madde olarak kullanılmış ve bu yüzyıllardan sonra mavi boyamada indigo hakim olunca çivit otu kullanımı azalmıştır (Harvey, 1996). Osmanlıların saray boyahanelerinde Hindistan'dan gelen indigo kullanıldığı tahmin edilse de, Anadolu köylerinde 19. yüzyılın sonuna kadar mavi boya için çivit otunun kullanıldığı bilinmektedir (Enez, 1987).

2.2. *Isatis* Türleri

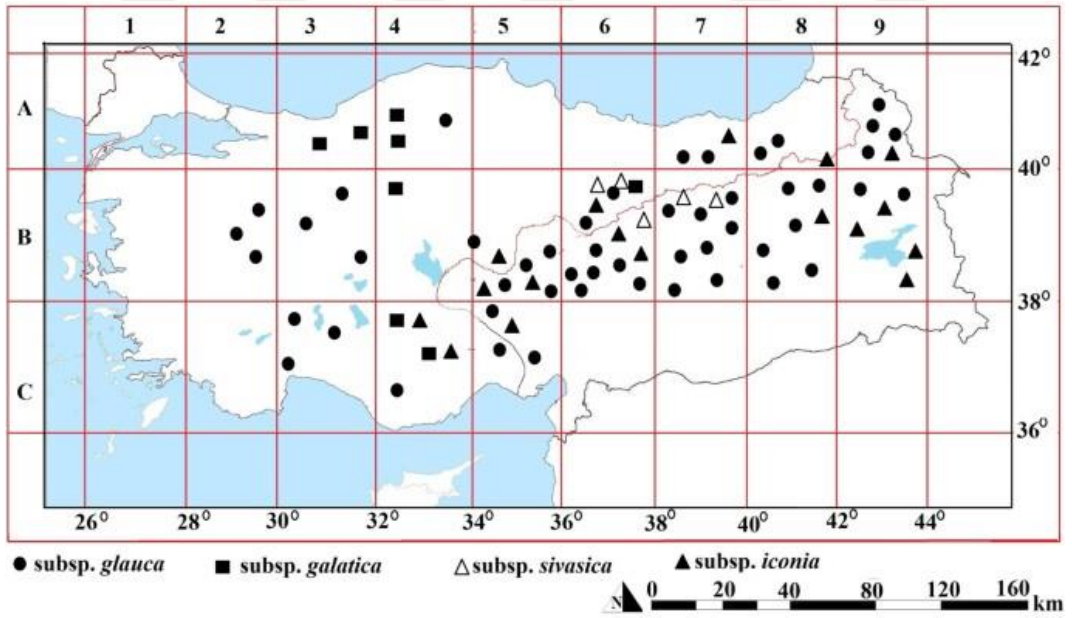
Brassicaceae familyasına ait olan *Isatis* L. cinsi Orta Doğu, Orta Asya ve Akdeniz Bölgesi'nde yayılış gösteren, yaklaşık 80 türe sahiptir (Ball, 1964; Akeroid, 2002; Al-Shehbaz *et al.* 2006). *I. tinctoria*, ülkemizde halk arasında "çivit otu" anlamına gelir ve literatürde "woad" olarak bilinmektedir. *Isatis* türleri, otsu ve iki yıllık veya kısa ömürlü çok yıllık bitki türleridir (Ball, 1964; Akeroid, 2002). Bazı yazarların Güneydoğu Rusya'dan Güneybatı Asya'ya ve belki de Güneydoğu Avrupa'nın bazı bölgelerine özgü olduğunu bildirmesine rağmen, bu türün genetik analizlerle doğrulandığı üzere Orta Asya'ya özgü olduğu düşünülmektedir (Akeroid, 2002; Hamburger, 2002; Spataro *et al.*, 2007; Spataro and Negri, 2008). Kaba görünümlü bitki, kuru ve güneşli yerlerde yaygın olarak yetişmektedir. Kayalık alt tabakalarda, terk edilmiş ekinlerde, açık ormanlarda ve yol kenarlarında kendiliğinden yetişir. Deniz seviyesinden maksimum 1900 metre yüksekliğe kadar çok yaygındır ve genellikle sıcak noktaları ve azotça zengin kireçtaşı toprakları tercih eder (Aichele, 1987; Marchese, 1991).

***Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*:** Türkiye'de yaygın olarak İç Anadolu bölgesinde yayılım gösrerir. *I. glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*'nın dört alt türü vardır. Bunlar *Isatis glauca* subsp. *glauca*, *I. glauca* subsp. *galatica*, *I. glauca* subsp. *iconia* ve *I. glauca* subsp. *sivasica* (Özbek *et al.* 2013, Yıldırım, 1988). *I. glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* çok yıllık otsu bir bitkidir. Gövde enine kesitinde köşeli ya da çemberimsi, morumsu, tüylü ya da tüysüzdür (Şekil 2.1).

Şekil 2.2'de *I. glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*'nın Türkiye'deki alt türlerinin yayılış alanları gösterilmiştir.



Şekil 2.1. *I. glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*'nın fotoğrafları (Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi kampüs girişi, Erzurum yolu)



Şekil 2.2. *I. glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca*'nın Türkiye'deki alt türlerinin yayılış alanları. Diyagonal çizginin sağ tarafındaki alt tür Mısırdalı (1985), sol tarafındaki alt tür ise Yıldırımılı (1988) tarafından belirlenmiştir.

2.3. *Isatis* Türlerinin Etnobotanik Kullanımı

Isatis türlerinden yaygın olarak kullanılan *I. tinctoria*, hem doğu hem de batı kültürlerinde tıbbi bitki olarak kullanılmıştır. Avrupa'da ve geleneksel Çin tıbbında bu türün terapötik özellikleri, yüzyıllardır ilgi görmektedir. Avrupa'da bu bitkinin tıbbi kullanımları hakkında ilk yazılı kayıtlar yara, ülser ve hemoroid tedavisinde kullanımını destekleyen Hipokrat'a (MÖ 460) aittir. Ayrıca Galen (MÖ 129–216) ve Pliny (MÖ 23–79) tarafından da bitkinin kullanımı tavsiye edilmiştir (Hamburger, 2002; Buhner, 2013).

I. tinctoria 12. yüzyıldan 17. yüzyıla kadar Avrupa'da indigo boya üretimi için tarımı yapılmıştır. Ayrıca yılan ısırıkları, yara ve diğer iltihabi rahatsızlıkları tedavi etmek için tıbbi amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Hamburger, 2002). Rönesans ve Barok bitki metinlerinde bu bitkinin hemoroid, ülser ve tümörleri tedavi etmek için kullanımını öneren bilgiler tespit edilmiştir (Hamburger, 2002). Bitkinin yaprakları ve köklerinin tifo, kızamık ve grip tedavisinde de kullanıldığı rapor edilmiştir (Perry, 1980; Garland, 1988). Orta Çağ'da yaygın olarak görülen bir korku hastalığı Aziz Antoni Ateşi (St. Anthony's fire = Ergotizm) nedeniyle derinin aşırı iltihaplanmasına karşı çivit otunun kullanıldığı bildirilmiştir. Hiposideremik anemi, iskorbit ve A hipovitaminoz gibi hastalıkların tedavisinde bitkinin yapraklarının kullanıldığı bildirilmiştir. Bitki ekstrelerinin akrodermatit, hemorajik diyatez, egzema, çiban, zehirlenmeler, sarılık, gastrik nevroz, kurdeşen, bacak yaraları, sıraca, mide ekşimesi ve sebore tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Palma, 1964). Bitkinin acı köklerinin kızıl hastalığını azaltmak için kullanıldığı da bildirilmiştir (Monograph, 2002).

I. tinctoria bir indigo kaynağı olarak önemini yitirdikten sonra, Avrupa'da tedavi edici özelliği de unutulmaya yüz tutmuştur. Çoğunlukla antiviral özelliklerinden dolayı batıda tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır (Buhner, 2013). *I. tinctoria* kökleri (*Isatis Radix*) Avrupa Farmakopesinde yer almış ve resmi Avrupa fitoterapisinde kabul edilmiştir (European Pharmacopoeia, 2017). Çin'de boya ve şifalı bir bitki olarak eşit derecede zengin bir tarihe sahiptir. Çin Farmakopesi, *I. tinctoria*'nın üç monografını kabul etmiştir: Banlangen (*Isatidis radix*), Daqingye (*Isatidis folium*) ve Qing Dai (*Indigo naturalis*) (Monograph. 2002; Mohn *et al.* 2009).

Bu bitkisel müstahzarlar biraz farklı ilaçlar olarak kabul edilir. Banlangen (*Isatidis Radix*), Çin'in bazı illerinde hasat edilen *I. tinctoria*'nın kurutulmuş köküdür. Sonbaharda güneşte kurutulur ve granül haline getirilir (Banlangen Keli). Ürün Çin'de çok popülerdir ve

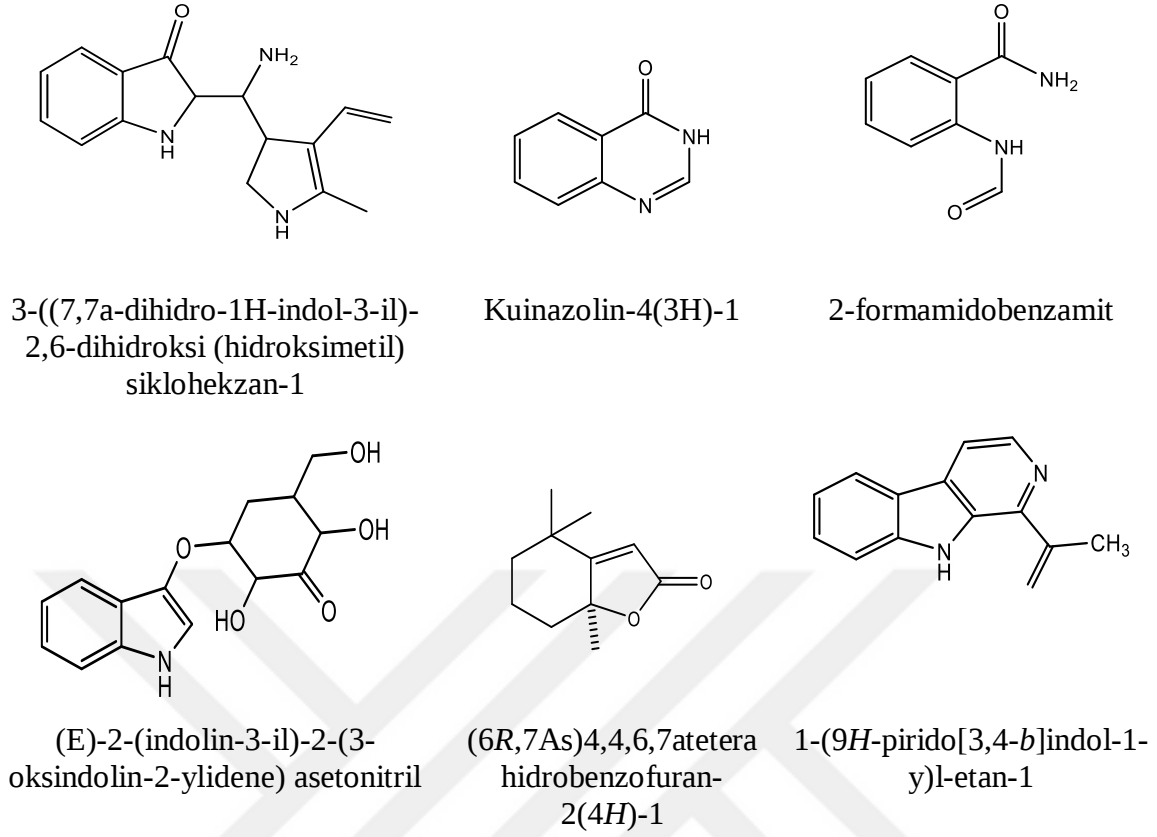
sıcak suda veya çayda eritilerek tüketilir (Han *et al.* 2011). Vücut ısısını düşürür ve boğaz ağrısını yatıştırır. Erüpsiyonel salgın hastalıklar, farenjit, larenjit, kızıl, erizipel ve karbonkül için endikedir. Hepatit, kabakulak, grip, mononükleoz, herpes simpleks, herpes zoster ve pitriazis rosea gibi viral deri hastalıkları, epidemik serebrospinal menenjit ve difteri tedavisinde kullanılmıştır (Han, *et al.* 2011; Duke ve Ayensu, 1985; Zhu, 1998; Zhang, *et al.* 2020).

Banlangen (Isatidis Radix), Çin hükümeti tarafından ölümcül şiddetli akut solunum sendromunu (SARS) önlemek ve kontrol etmek için önerilen sekiz ana ilaçtan biri olmuştur (Ke *et al.* 2012). Daqingye (Isatis Folium), Çin'in farklı illerinden yazın toplanan ve sonbaharda güneşte kurutulan *I. tinctoria* yapraklarından oluşur (Huang, 1993).

Daqingye (Isatidis Folium) ensefalit virüsü, kabakulak, grip ve leptospirozu tedavi etmek için de kullanılmıştır (Zhu, 1998). Qing Dai, *I. tinctoria*, *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek., *Indigofera suffruticosa* Mill., *Indigofera tinctoria* L. veya *Polygonum tinctorium* gibi çeşitli bitkilerin yapraklarından hazırlanan koyu mavi bir tozdur. Geleneksel Çin Tıbbında hemostatik, antipiretik, antiinflamatuvar olarak ve ayrıca bakteriyel ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Tang and Eisenbrand, 1992; Kim *et al.* 2012). *I. tinctoria* geleneksel Çin Tıbbında kronik miyelositik lösemi dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıklara çare olarak kullanılmıştır (Meijer *et al.* 2007). Klinik deneyler, *I. tinctoria* yaprak veya kök preparatlarının güvenliğini değerlendirmemiştir. Ancak Geleneksel Çin Tıbbından elde edilen bitkisel monograflar, bazı hastalarda mide bulantısı ve kusma gibi midebağırsak bozuklukları dışında olumsuz etkileri listelememiştir (Zhu, 1998; Yeung, 1985).

2.4. Isatis Türleri Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Literatürde *Isatis* cinsleri üzerine yapılan araştırmalarda özellikle *I. tinctoria* türü üzerine izolasyon çalışmalarının yapıldığı tespit edilmiştir. Tez kapsamında bitki materyali olarak kullanılan *I. glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* bitkisi üzerine herhangi bir izolasyon çalışması olmadığı tespit edilmiştir. *I. tinctoria* bitkisi üzerine yapılan fitokimya çalışmalarında bitkinin yapraklarından alkaloid ve monotерpenler saflaştırılmıştır (Şekil 2) (Xu *et al.* 2020).



Şekil 2.3. *I. tinctoria*'dan saflaştırılan bileşiklerin kimyasal yapıları

I. tinctoria'nın triptantrin, indirubin, indolinon, fenolik bileşikler, polisakkaritler, alkaloidler, glukozinolatlar, karotenoidler, uçucu bileşenler ve yağ asitleri içerdiği bildirilmiştir (Nguyen *et al.* 2017). Ayrıca *I. tinctoria* 'nın toprak üstü kısımlarından triptantrin, indol-3-asetonitril, p-kumarik asit ve p-kumarik asitin metilesteri izole edilmiştir (Seifert and Unger, 1994). Bileşikler, termitlere (*Reticulitermis santonensis*) karşı böcek öldürücü ve beslenme önleyici aktivite, uzun boynuzlu ev böceğinin (*Hylotrupes bajulus*) larvalarına karşı insektisit aktivite ve kahverengi çürüklük mantarına (*Coniophora puteana*) karşı antifungal aktivite göstermiştir (Seifert and Unger, 1994)

2.5. *Isatis* Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Literatürde *I. tinctoria* ekstrelerinin antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antitümör, analjezik ve antioksidan aktivite gibi çok çeşitli farmakolojik özellikleri araştırılmış ve bunlar *in vitro* ve *in vivo* olarak bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır (Speranza *et al.* 2020). Aşağıda *I. tinctoria* üzerine yapılan çeşitli biyoaktivite çalışmaları ayrı başlıklar halinde açıklanmıştır.

2.5.1. Anti-inflamatuar aktivite

I. tinctoria, Avrupa'da ve geleneksel Çin tıbbında antiinflamatuar özellikleri nedeniyle yüzyıllardır kullanılmaktadır. *I. glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* 'nın yaprak ekstresi, anti-enflamatuar ve anti-alerjik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu bitkinin rozet yapraklarında antioksidan ve bir UV-B kalkanı görevi gören çeşitli fenilpropanoidleri biriktirdiği bilinmektedir (Heinemann *et al.* 2004). Bu bileşikler genellikle farklı farmakolojik potansiyele sahip moleküllerdir. Ayrıca *I. tinctoria* ekstrelerinden elde edilen farklı kimyasal sınıflara ait çeşitli lipofilik bileşenler, alkaloidler, triptantrin, indirubin, indolinon ve linolenik asit gibi yağ asitlerinin anti-inflamatuar aktivitede önemli bir rol oynadığı iddia edilmiştir (Danz *et al.* 2002).

2.5.2. Antimikrobiyal ve antiviral aktivite

Geleneksel Çin tıbbında Ban Lan Gen (*Isatidis radix*), mevsimsel grip, SARS, viral pnömoni, kabakulak, farenjit ve hepatit dahil olmak üzere çok çeşitli viral enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Li *et al.* 2017). *I. tinctoria* 'da bulunan fitokimyasallar arasında alkaloid triptantrin'in antimikrobiyal etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca *Isadis Radix*'ten izole edilen indirubinin ve polisakkarid bileşiklerin influenza virüslerine karşı etkili olduğu da gösterilmiştir. (Mak *et al.* 2004; Wang *et al.* 2018)

2.5.3. Anti-tümör aktivite

I. tinctoria, Çin'de solid organ tümörleri ve lösemili hastaları tedavi etmek için kullanılmıştır (Monograph, 2002). Faz I ve faz II klinik deneyleri, *I. tinctoria* 'nın kronik miyelositik lösemi tedavisinde çok güçlü terapötik etkilerini göstermiştir (Xiao *et al.* 2002). Bu türün anti-kanser özellikleri, esas olarak, *in vivo* ve *in vitro* deneysel modellerle gösterilen alkaloidlerden indirubin ve triptantrine atfedilmiştir. Çok sayıda çalışma, bu bileşiklerin çok çeşitli tümör tiplerine karşı potansiyel etkinliğini göstermiştir ve aktivitelerinin altında yatan etki mekanizmaları aydınlatılmıştır.

Bisindol indirubinin, yaklaşık 40 yıl önce insan kronik miyelositik lösemi tedavisinde etkisi tanımlanmıştır. Çin'de yayınlanan birkaç çalışma, günde 150-200 mg dozunda oral olarak uygulanan indirubinin hastaların %60'ında remisyona yol açtığını göstermiştir (Monograph, 2002). Düşük toksisite ve sınırlı yan etkilerle, kronik miyelositik ve kronik

granülositik lösemiden muzdarip 314 hastanın %26'sında tam remisyonu ve %33'ünde kısmi remisyonu indüklediği de bildirilmiştir (Cooperative Group of Clinical Therapy of Indirubin, 1980). İndirubin ve türevlerinin anti-tümör özellikleri, antimitotik potansiyelleri ve hücre proliferasyonu, transkripsiyonu ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan sikline bağımlı kinazların (CDK'ler) ve hücre döngüsü düzenleyici moleküllerin inhibisyonu ile ilişkili görünmektedir (Marko, 2001; Eisenbrand *et al.*, 2004). Marko ve arkadaşları indirubin ve analoglarının, insan büyük hücreli akciğer karsinomu LXFL529L ve insan meme karsinomu MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini gösterdiler. Bu çalışmada daha çözünür analog indirubin-3'-monoksim, nokodazole geçici bir maruz kalma ile G2/M fazında senkronize edilen MCF-7 hücrelerinde, G2/M duraklamayı indüklemiştir. Bu etkiye CDK1 ve CDK1/siklin B aktivitesinin inhibisyonu aracılık ettiğini bulmuşlardır. Yazarlar bu etkinin, indirubin türevlerinin güçlü anti-tümör etkinliklerini uyguladıkları ana mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir (Marko *et al.* 2001). İndirubinler aynı zamanda etkili CDK2 ve CDK5/p35 inhibitörleridir ve kinaz katalitik alt birimine bağlanmak için ATP ile yarışır (Hoessel *et al.* 1999; Leclerc *et al.* 2001). Kompleks CDK2/indirubin türevlerinin kristal yapısı, indirubinin van der Waals etkileşimleri ve üç hidrojen bağı yoluyla kinazın ATP-bağlanma bölgesi ile etkileşime girdiğini göstermiştir (Hoessel *et al.* 1999).

Triptantrin, F344 sıçanlarında azoksimetanın neden olduğu bağırsak tümörü oluşumunda kanseri önleyici etki göstermiştir (Koya-Miyata *et al.* 2001). Ayrıca tümör taşıyan BALB/c farelerinde aynı molekülün kemirgen miyeloid lösemi WEHI-3B JCS hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Chan *et al.* 2009). Triptantrinin, İsviçre albino farelerinde cilt karsinogenezi modeli üzerinde melanom dışı cilt kanserinin etkili bir baskılayıcısı olduğu gösterilmiştir (Shankar *et al.* 2020). Ayrıca triptantrinin insan mide, akciğer kanseri ve promyelositik lösemi hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Kimoto *et al.* 1999). Triptantrin akciğer kanseri NCI-H460, insan glioblastoma SF-268 ve insan meme kanseri MCF-7 hücre hatlarına karşı 8.5–22.6 μ M arasındaki IC₅₀ değerleri ile önemli sitotoksikite göstermiştir (Chang *et al.* 2015). Miao ve arkadaşları (2011) triptantrinin, 48 saatlik tedaviden sonra 8.8 μ g/mL'lik bir IC₅₀ değeri ile insan kronik miyeloid lösemi K562 hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (Miao *et al.* 2011).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *I. tinctoria* yaprak ve çiçeklerinden elde edilen polar ekstraktların, anti-proliferatif özellikleri değerlendirilmiştir (Taviano *et al.* 2018). Bu çalışmada

polar bileşiklerin lipofilik olanlardan ayrılmasını sağlamak için donmuş ve liyofilize edilmiş bitki materyali sırasıyla diklorometan ve %70 metanol ile ekstrakte edilmiştir. *I. tinctoria* polar ekstraktları insan anaplastik tiroid kanseri ATC hücre hatları CAL-62, 8505C ve C-643'e karşı anti-proliferatif etki göstermiştir. HPLC-PDA/ESI-MS ile ekstraktlarda flavonoid ve fenolik asitlerin etkiden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Aynı yazarlar tarafından yayınlanan başka bir çalışmada, gözlemlenen aktiviteden esas olarak fenoliklerin sorumlu olduğunu doğrulanmıştır (Miceli *et al.* 2017).

I. tinctoria ekstraktları üzerine yapılan farmakolojik çalışma verileri bitkinin güçlü biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, ekstraktların çoğunda daha yüksek sitotoksikite gözlemlenmiştir. Bu çalışmalara ek olarak, ekstrakttaki moleküllerin gerçek ilaç etkinliğini ortaya çıkarmak için *in vivo* testler yapılmalıdır. Yapı-aktivite ilişkisi, stereokimyanın da aktivitede önemli bir rol oynadığı anlamına gelir. Yapılacak yeni çalışmalarda bitkinin fitokimyasalları üzerine daha fazla *in vitro* ve *in vivo* araştırmalara odaklanılmalıdır. Ayrıca bitkinin molekül kütüphanesi hazırlanarak farmakolojik özelliklerin geliştirilmesi sağlanabilir (Speranza *et al.* 2020).

2.5.6. Karbonik anhidraz enzimleri

Karbonik anhidraz enzimi (CA, E.C.4.2.1.1) yaygın bir metalloenzim ailesindendir ve tüm organizmalarda, türlerde, yüksek omurgalılarda ve tüm bitki alemlerinde yaygın olarak bulunur. Karbonik anhidraz enzimlerinin organizmadaki temel rolü, karbondioksit (CO₂) ve su (H₂O) arasındaki tersinir ve karşılıklı dönüşüm reaksiyonlarını proton (H⁺) ve bikarbonat iyonlarına (HCO₃⁻) katalize etmektir (Akıncıoğlu *et al.* 2021; Gul *et al.* 2016, Ozgun *et al.* 2016). CO₂ hidrasyon reaksiyonu, iyon taşınımı, asit-baz dengesi ve gaz değişimine dayalı çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik işlemlerde temel öneme sahiptir (Hisar *et al.* 2005; D' Ambrosio *et al.* 2020; Nar *et al.* 2013). Ayrıca, CA'ların epilepsi, ödem, obezite, osteoporoz, glokom ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar üzerinde etkili olan ilaçlar için önemli terapötik hedefler olduğu bilinmektedir (Supuran *et al.* 2003; Kazancıoğlu and Senturk 2020). Ayrıca, bazı CA izoenzimlerinin, kanser hücrelerinin hipoksik durumda canlılıklarını ve metabolik aktivitelerini sürdürmelerine ve metastaz yapmalarına ve klasik antikanser tedavisine yanıtı azaltmalarına yol açan anjiyogenez mekanizmalarını aktive ettiği tespit edilmiştir (Küçük and Gülçin 2016; Supuran *et al.* 2003). CA'lar, α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve t -

CA aileleri dahil olmak üzere sekiz farklı alt bölüme ayrılmıştır (Bilginer *et al.* 2021). α -CA'lar ailesi öncelikle insan dahil tüm memelilerde bulunur.

Enzimin üç korunmuş histidin kalıntısı tarafından koordine edilen aktif bölgesinde bir katalitik çinko iyonu (Zn^{2+}) ve bozuk bir tetrahedral geometride bir H_2O/OH^- dahil olmak üzere on altı farklı α -CA izoformuna sahiptirler. Hücrel lokalizasyonları ve inhibisyon afiniteleri ve katalitik aktiviteleri bakımından farklılık gösterirler (Supuran *and* Özzafara 2007). Zn^{2+} iyonu kataliz için çok önemli bir etkiye sahiptir ve bu boşluğun tabanında yer alır (Özgeris *et al.* 2016; Garibov *et al.* 2016). hCA'ların anormal seviyeleri veya aktiviteleri, CA'nın çeşitli fonksiyonları nedeniyle glokom, dağ hastalığı, epilepsi, ülserler, obezite, osteoporoz ve kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla CA'lar, belirtilen hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar için potansiyel bir hedeftir (Taslimi *et al.* 2016).

Karbonik anhidraz inhibitörleri, karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitesini baskırlar. Klinik olarak kanıtlanmış olanları antiepileptikler, antiglokom, diüretikler ve antienfektif (anti-fungal ve anti-bakteriyel ajanlar) ilaçlardır. CA'lar başlıca iki ana bileşik sınıfı tarafından inhibe edilir: Metal kompleks oluşturan inorganik anyonlar (örn. siyanür, siyanat, tiyosiyanat, azit, hidrojen Sülfid vb.) ve Sülfonamidler. Sülfonamidler ve izosterleri (Sülfamatlar/Sülfamidler), enzimin aktif bölgesinden metal iyonuna bağlanan karbonik anhidraz inhibitörlerinin ana sınıfını oluşturur (Supuran 2012; Demirci *et al.* 2014). Sülfonamid karbonik anhidraz inhibitörleri, karbonik anhidraz I (CAI) ve karbonik anhidraz II (CAII) inhibisyonu ile glokom, epilepsi, konjestif kalp yetmezliği, dağ hastalığı, mide ve duodenal ülserler, nörolojik bozukluklar ve osteoporoz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde yararlıdır (Yakan *et al.* 2023). Karbonik anhidraz inhibitörleri, diüretik ilaç sınıfının bir parçası olarak kabul edilir ve çok çeşitli FDA onaylı uygulamalara sahip diüretik ilaçlardır (Aslam *and* Gupta, 2022). CAII esas olarak gözlerdeki bikarbonat konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. CAII inhibitörleri, genellikle glokom ile ilişkili göz içi basıncını azaltmak için kullanılabilir. Ayrıca, habis beyin tümörleri ile de ilişkilendirilir (Parkkila *et al.* 1995). Bundan dolayı CAII inhibitörleri kanser kemoterapisinde bir yardımcı olarak kullanılmaktadır (Zaraei *et al.* 2019).

2.5.7. Asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri

İnsan beyinde hidrolitik enzimler, özellikle hafızadaki bilişsel işlevlerde anahtar rol oynayan asetilkolini, asetat ve bütirat gibi diğer molekülleri hidrolize ederler. (Erurygur *et al.* 2019). Bu enzimler başlıca asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesterazdır (BChE). Her iki enzim de yaygın olarak dağılmış olmasına rağmen, AChE beyinde BChE'den nispeten daha fazladır. Alzheimer hastalığı, ilerleyici ve karmaşık nöron fonksiyonlarında meydana gelen yapısal bir hastalık olarak kabul edilmektedir. (Kausar *et al.* 2021). Birçok nöropatolojik belirteçleri vardır. Tau proteininin hiper fosforilasyonu ve amiloid β (A β) proteininin birikmesi ile oluşan senil plaklar bunların başlıcalarıdır (Gülçin *et al.* 2016). Başka bir belirteç, her iki kolinerjik enzimin aşırı ekspresyonu olarak bulunmuştur (Taha *et al.* 2021). Bu nedenle, AChE ve BChE'nin inhibisyonu gibi çoklu aktiviteye sahip anti-Alzheimer ajanları olarak ilaçların bulunmasına yardımcı olmuştur (Turkan *et al.* 2019). Asetilkolin (ACh), bir nörondan salınan ve diğerinin postsinaptik zardaki reseptöre bağlanarak sinyal iletimini sağlayan moleküldür. Bir nörotransmitter olan asetilkolinin (ACh) hızlı hidrolizi normal kolinerjik kontrole tabi tutulur ve bu kolinesterazlar tarafından yapılır. Bir tür serin proteaz olan AChE, nöromusküler kavşaklarda ve kolinerjik beyin sinapslarında bulunur ve ACh'yi asetil ve koline parçalayarak sinyal iletimini durdurur (Bayrak *et al.* 2019; Kazancı *et al.* 2021). Asetilkolinin insan vücudunda AChE tarafından aşırı hidrolizi muhtemelen sinir sistemi işlev bozukluğuna neden olarak Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi durumlara yol açmaktadır. Bu nedenle her iki kolinerjik enzim de önemli bir yere sahiptir. Enzimlerin Alzheimer hastalığı tedavisinde ve tedavinin başlangıcındaki potansiyel rolleri giderek artmıştır (Yamali *et al.* 2018). Aşırı AChE salgılanmasının neden olduğu bu bozuklukların tedavisinde günümüzde donepezil ve takrin gibi sentetik ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların istenmeyen yan etkilere neden olduğu da bilinmektedir (Bal *et al.* 2020). Son yıllarda araştırmalar birçok yeni potansiyel ve aday ilaca odaklanmıştır.

Kolinesteraz inhibitörleri: Alzheimer hastalığı, miyastenia gravis, glokom, düz kas atonisi ve çeşitli otonom sinir sistemi fonksiyon bozukluklarının tedavisinde kullanılırlar. Amerikan İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan kolinesteraz inhibitörleri, Rivastigmin (Exelon®), Takrin (Cognex®), Donepezil (Aricept®) ve Galantamin (Razadyne™)'dir (Koçancı and Aslım 2016).

2.5.8. α -Glukozidaz enzimi

α -glukosidaz, ince bağırsak mukozasının fırçamsı kenarında bulunur ve oligosakkarid ve disakkaridleri ince bağırsak tarafından emilebilen glukoza hidrolize eder ve böylece kan glukoz düzeylerinde artışa yol açar (Han *et al.* 2017).

α -Glukosidaz inhibitörleri: Karbonhidratların sindirimini geciktirerek ve glukoz emilimini azaltarak tokluk kan glukoz düzeylerinin kontrolünde önemli rol oynarlar (Han *et al.* 2017). Şu anda, üç α -glukosidaz inhibitörü ilaç, akarboz, vogliboz ve miglitol klinikte T2DM tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. α -Glukosidaz inhibitörleri, 1970'lerin sonunda geliştirilen yeni bir antidiyabetik ilaç türüdür. Postprandiyal (tokluk) kan şekeri konsantrasyonunu azaltarak, kan şekeri seviyelerini etkili bir şekilde kontrol eder. Ancak bu ilaçların uzun süreli kullanımı karın ağrısı, karında şişkinlik, artan gaz, ishal ve kramp gibi yan etkilere neden olur (Josse *et al.* 2023; Goke *et al.* 1995; Sels *et al.* 1999).

Bu nedenle araştırmacılar, etkinliği yüksek ve yan etkileri düşük yeni α -glukosidaz inhibitör ilaçları peşindedirler.

Tüm bu literatür ışığında CA, kolinesteraz ve alfa-glikosidaz enzim inhibisyonunun potansiyel tıbbi faydaları günümüzde güncel araştırma konusu olmuştur. Her üç enzimi inhibe edebilecek potansiyel ajanlarla ilgili son zamanlarda yapılan bir çalışmada yeni sentezlenen bifenil ikameli kalkon türevlerinin, insan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II (hCA-I ve hCA-II), asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Burmaoglu *et al.* 2022).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

I. glauca Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* bitkisinin toprak üstü kısımları Ağrı İl merkezinden toplandı (Haziran, 2022). Toplanan bölgenin tam adresi ve koordinatları Erzurum Ağrı Yolu, Çukurçayır/Ağrı Merkez/Ağrı, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi kampüs girişi, GPS: 39°43'12.5"N 42°59'12.0"E, yükseklik: 1626 m olarak belirlendi.

Bitkinin tür teşhisini Prof. Dr. Fevzi ÖZGÖKÇE (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) gerçekleştirdi. Bitki **VANF 20512** koduyla Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Herbaryumu'na kaydedildi. Bitki örneği Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi MERLAB (Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı)'da muhafaza edildi. Bu tez çalışması kapsamında, bitkinin toprak üstü kısımları kullanıldı.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler

Çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasal maddeler İsolab ile Tekkim'den temin edildi. Çalışmalarda sülfürik asit (%98), vanilin, metanol, etanol, aseton, etil asetat, kloroform, diklorometan, *n*-hekzan, dötero kloroform ve dötero piridin kullanıldı.

3.3. Enzim Materyalleri

Çalışmada kullanılan asetil kolinesteraz, butiril kolinesteraz ve α -glukozidaz enzimleri Sigma-Aldrich'ten ticari olarak satın alınmıştır. Karbonik anhidraz enzimleri insan kanından saflaştırıldı.

3.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

NMR Spektrometre	Bruker 400 MHz
Rotary Evaporatör	Stuart RE300OB
UV Lambası	Camag UV Bethrachter
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucu (- 80°C)	Sanyo, Japan
pH metre	Hanna Instrument
Hassas terazi	Scaltec SBA 41
İnkübatör	Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipet	Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Vorteks	Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	1 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.5. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar

Kromatografik yöntemlerle yapılan fraksiyonlama, izolasyon ve saflaştırma işlemlerinde aşağıda belirtilen adsorbanlar kullanıldı:

Silika Jel Kolon Kromatografisi (SKK) için; Silika jel (Kieselgel 60, 70-230 ve 200-400 mesh, Merck) kullanıldı.

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) için; Silika jel (Hazır Plaka, Kieselgel 60 F₂₅₇, 0,2 mm, Merck) kullanıldı.

İTK ile ayrılan maddelere ait lekeler UV₂₅₄, UV₃₆₅ nm'de ve H₂SO₄-vanilin (%1) reaktifi püskürtüldükten sonra ısıtma yoluyla tespit edildi.

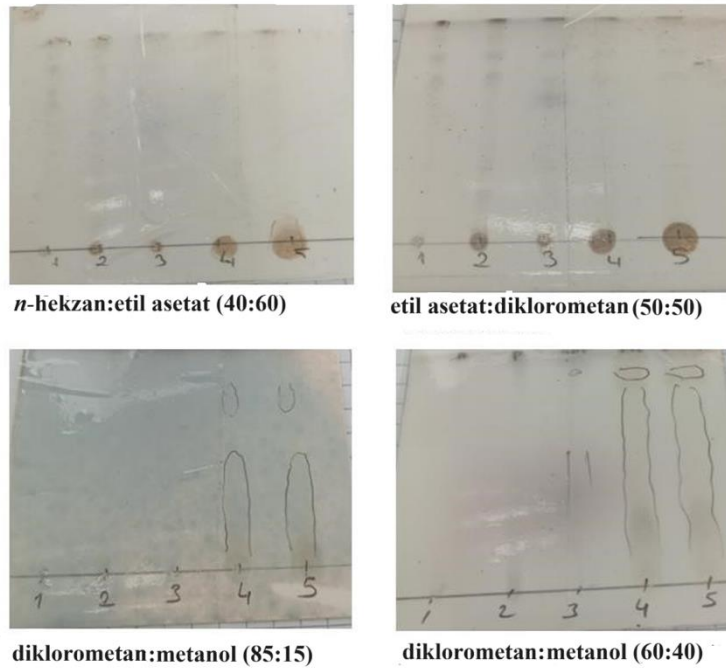
3.6. Yöntem

3.6.1. Ekstraksiyon

Uygun ekstrenin hazırlanmasına karar vermek için öncelikle onar gram *I. glauca* bitkisinin toprak üstü kısımları kurutulup öğütüldükten sonra oda sıcaklığında *n*-hekzan (1), diklorometan (2), aseton (3), diklorometan:metanol (4) ve metanol (5) ile ayrı ayrı maserasyona bırakıldı ve süzüldü. Süzüntüler birleştirildikten sonra çözücüler uzaklaştırıldı. Ekstreler *n*-hekzan:etil asetat (40:60), etil asetat:diklorometan

(50:50), diklorometan:metanol (85:15) ve diklorometan:metanol (60:40) çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra İTK ile kontrol edildi. İTK görüntüleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

İTK sonuçlarına göre bitkinin hem polar hem de apolar bileşenleri içermesi nedeniyle diklorometan:metanol (50:50) ile ekstraksiyonunun yapılmasına ve hazırlanan bu ekstreden sekonder metabolitlerin izole edilmesine karar verildi.



Şekil 3.1. Farklı çözücü sistemlerinde yürütülen *I. glauca* ekstrelerinin İTK görüntüleri. 1) *n*-hekzan, 2) diklorometan, 3) aseton, 4) diklorometan:metanol, 5) metanol.

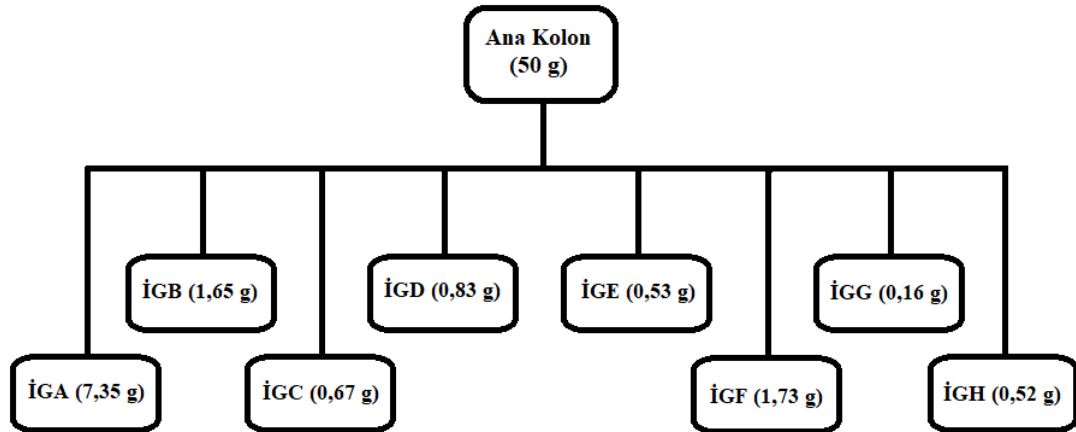
Diklorometan:metanol (50:50) ekstresinin hazırlanması: Kurutulmuş ve öğütülmüş bitki materyali (1 kg) diklorometan:metanol (50:50) çözücü sisteminde oda sıcaklığında 24 saat maserasyona bırakıldıktan sonra süzüldü. Bu işlem beş defa tekrarlandıktan sonra süzüntüler birleştirdi ve çözücü bir rotary evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı. Ekstre miktarı 118,77 g olarak belirlendi. Kuru bitki üzerinden verim ise %11,9 olarak hesaplandı.

Ana ekstre iki farklı yöntemle izole edildi. Bu yöntemler aşağıda birinci izolasyon ve ikinci izolasyon işlemleri olarak ayrı ayrı açıklanmıştır.

3.6.2. Birinci izolasyon işlemleri

I. glauca'nın diklorometan:metanol (50:50) ekstresini fraksiyonlamak üzere İTK ve SKK yöntemleri kullanıldı. Bu amaçla ana kolon için 50 gr ekstre kullanıldı ve kuru tatbikle 90 gr silika jele emdirildi. 300 g silika jel 60 (70:230 mesh) diklorometan:metanol (80:20) çözücü sistemi kullanılarak süspanse edildi. Sonra süspansiyon kolona (4x72 cm) dolduruldu ve ekstre kolona tatbik edildi. SKK ile elüe etme işlemleri diklorometan:metanol (80:20) çözücü sistemi kullanılarak sürdürüldü. Elüentler 50 ml hacimlerle toplandı ve İTK ile benzer lekeleri içeren fraksiyonlar kendi aralarında birleştirildi. *I. glauca*'nın diklorometan:metanol (50:50) ekstresinin ana kolonunun fraksiyonlaması sonucunda elde edilen alt fraksiyonlar aşağıdaki gibi kodlandı:

3-9. fraksiyonlar **İGA**, 10-17. fraksiyonlar **İGB**, 18-27. fraksiyonlar **İGC**, 28-36. fraksiyonlar **İGD**, 36-39. fraksiyonlar **İGE**, 40-41. fraksiyonlar **İGF**, 42-49. fraksiyonlar **İGG** ve 50-61. fraksiyonlar **İGH** olarak kodlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Ana kolon ve alt fraksiyonların şeması

İGA fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: İGA fraksiyonuna aseton eklendiğinde kristallenme olduğu tespit edildi. Bu nedenle öncelikle ekstrenin 2 g'ı ayrıldı ve asetonla iyice yıkandıktan sonra İTK'da kontrol edildi. Tek bir lekenin gözlemlenmesi üzerine bu maddenin saf olduğu tespit edildi ve **İG-1** (95 mg) olarak kodlandı. Kalan İGA fraksiyonunun (5,35 g) içerdiği metabolitleri saflaştırmak için yeniden SKK yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 150 gram silika jel 60 (70-230 mesh) *n*-hekzan:etil asetat (30:70) hareketli faz sistemi kullanılarak kolon (2,5x44 cm)

hazırlandı ve bu sistemle elüsyona devam edildi. Fraksiyonlar 30 ml hacimlerle toplandı ve İTK ile benzer lekeleri içerenler birleştirildi. İTK ile yapılan kontroller neticesinde 5-6. fraksiyonların az bir safsızlıkla birlikte major bir leke içerdiği gözlemlendi. Bu safsızlığı uzaklaştırmak için 5-6. fraksiyonlar (0,51 g) yeniden SKK ile fraksiyonlandı. Bu amaçla 20 g silika jel 60 (70:230 mesh) 100 ml etil asetat ile süspansiyon haline getirildi ve kolona yüklendi. Ekstre aynı sistemle fraksiyonlandı ve 7-10. fraksiyonlarda yapılan kontrolde İTK’da saf bir maddeye ait tek bir leke tespit edildi ve **İG-2** (60 mg) olarak kodlandı.

İGB fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: Bu fraksiyon üzerine yapılan kromatografik işlemlerde madde saflaştırılamamıştır.

İGC fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: Bu fraksiyon üzerine yapılan kromatografik işlemlerde madde saflaştırılamamıştır.

İGD fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: Bu fraksiyon üzerine yapılan kromatografik işlemlerde madde saflaştırılamamıştır.

İGE fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: Bu fraksiyon üzerine yapılan kromatografik işlemlerde madde saflaştırılamamıştır.

İGF fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: İGF fraksiyonunu alt fraksiyonlarına ayırmak için SKK yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 100 gram silika jel 60 (70-230 mesh) diklorometan:metanol (80:20) hareketli faz sistemi kullanılarak kolon (2,5x54 cm) hazırlandı ve bu sistemle elüsyona devam edildi. Fraksiyonlar 20 ml hacimlerle toplandı ve İTK ile benzer lekeleri içerenler birleştirildi. İTK ile yapılan kontroller neticesinde 17-22. fraksiyonların major bir leke içerdiği gözlemlendi ve bu alt fraksiyona yeniden aynı şartlarda SKK uygulandı. Bu amaçla 25 g silika jel (200:400 mesh) ile 5 g aktif karbon homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra diklorometan:metanol (80:20) hareketli faz sistemiyle hazırlanan kolona (2,5x22 cm) dolduruldu ve 17-22. fraksiyonlar (0,43 g) aynı sistemde çözülerek kolona tatbik edildi. Bu sistemle elüsyona devam edildi. Fraksiyonlar 10 ml hacimlerle toplandı ve İTK ile benzer lekeleri içerenler birleştirildi. İTK ile yapılan kontroller neticesinde 12-14. fraksiyonların tek leke veren saf bir madde içerdiği belirlendi ve **İG-3** (80 mg) kodu verildi.

İGG fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: Bu fraksiyon üzerine yapılan kromatografik işlemlerde madde saflaştırılamamıştır.

İGH fraksiyonu üzerine yapılan kromatografik işlemler: Bu fraksiyon üzerine yapılan kromatografik işlemlerde madde saflaştırılamamıştır.

3.6.3. İkinci izolasyon işlemleri

Diklorometan:metanol (50:50) ekstresi (6,5 g) oda sıcaklığında saf su ile çözüldükten sonra süzüldü. Suya geçen kısım liyofilize edildikten sonra diklorometan:metanol (80:20) hareketli faz sistemiyle hazırlanan kolonda (2,5x46 cm) fraksiyonlarına ayrıldı. Bu amaçla 100 g silika jel 60 (70:230 mesh) ve diklorometan:metanol (80:20) çözücü sistemi kullanıldı. Fraksiyonlar 30 ml hacimlerle toplandı ve İTK ile benzer lekeleri içerenler birleştirildi. İTK ile yapılan kontroller neticesinde 20-23. fraksiyonların major bir sarı leke içerdiği ve saf olduğu belirlendi. Bu madde **İG-4** olarak (26 mg) olarak kodlandı.

3.6.4. Enzim inhibisyon çalışmaları

Enzim inhibisyon çalışmaları Dr. Öğr. Üyesi Rüya Sağlamtaş (Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi) ve Dr. Öğr. Üyesi Elife Kaya (Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi) tarafından gerçekleştirilmiştir. Enzim inhibisyonu ile ilgili yapılan işlemler aşağıda açıklanmıştır.

Afinite kolonun paketlenmesi: Hazırlanmış olan jel dengeleme tamponuna alınıp su trombu yardımıyla havası alındı. Hazırlanan jel soğutmalı kolona (1x10) pakettendi. Jelin çökmesi için peristaltik pompa yardımıyla yıkama tamponu ile yıkanıp dengeleme tamponuyla dengelenmesi sağlandı. Fraksiyonların ve tamponun 280 nm'de absorbansları ve pH'ları eşitlenerek kolonun dengelendi.

Afinite kolonuna numunenin tatbiki ve elüsyonların toplanması: Katı Tris ile sığır karaciğer hemojenatı (pH: 8,7) kolona tatbik edildikten sonra, kolon Tris-HCl (400 ml 25 mM) / Na₂SO₄ (22 mM; pH: 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Yıkama işlemiyle enzim kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar da uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra Na₂HPO₄ (pH 6,3) tamponu eklenerek hCAI enzimi fraksiyon toplayıcı yardımıyla 5'er mL olacak şekilde tüplere alındı. Elüatlar toplandıktan sonra yıkama tamponu ile

kolon tekrar yıkandı. Bu ikinci yıkamadan sonra NaClO₄ (pH 5,6) tamponu eklenerek hCA II enzimi fraksiyon toplayıcıyla 5'er mL olacak şekilde tüplere alındı. Toplanmış olan elüatlar için 280 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi

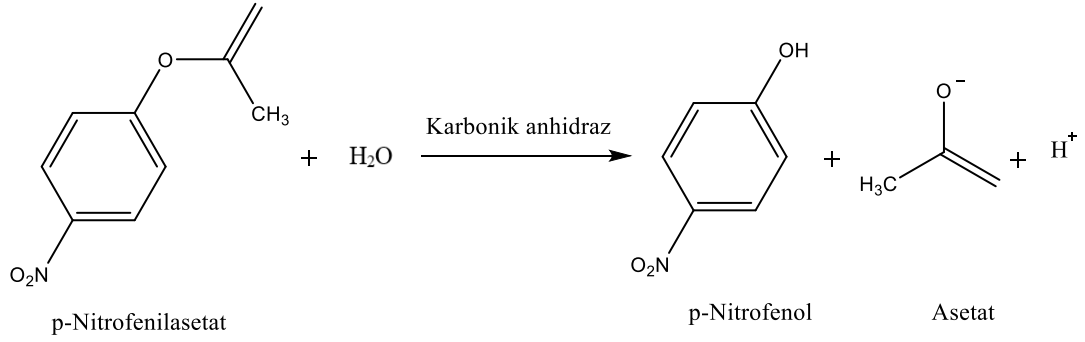
Hidrataz aktivitesi: Bu tayin Rickli ve arkadaşlarının (1964) revize ettiği Wilbur-Anderson metoduna göre yapıldı. Bu yöntem CO₂'nin hidratasyonu ile açığa çıkan H⁺ iyonundan kaynaklanan pH değişimiyle brom timol mavisi indikatörü ilave edilerek belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. Bu amaçla kör olarak hazırlanan tüpe brom timol mavisi (0,1mL %0,04'lük), veronal tamponu (1ml 0.025 M; pH:8,2), distile su (0,6 ml) ve CO₂ çözeltisi (2,5 ml) ilave edildi. Aktivite ölçüm ortamındaki toplam hacim 4,2 ml olarak belirlendi. CO₂ çözeltisinin katılmasından itibaren indikatörün maviden sarımsı yeşil rene dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre kronometreyle ölçüldü ve t₀ olarak kaydedildi. Numune tüpüne sudan 0,05 ml azaltma yapıldı ve yerine enzim çözeltisi ilave edildi. CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün maviden sarımsı yeşil rene dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre kronometreyle ölçüldü ve t_c olarak kaydedildi.

Bu yöntemde karbonik anhidraz enzim aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanır.

$$EU = (t_0 - t_c) / t_c$$

Yukarıda verilen formüle göre kullanan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1960).

Esteraz aktivitesi: Karbonik anhidraz enzim substratı *p*-nitrofenilasetatı 348 nm'de *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 3.3. Karbonik anhidrazın substratı olan *p*-nitrofenilasetattan *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması.

p-Nitrofenol ve *p*-nitrofenolat 348 nm dalga boyunda aynı absorbansı göstermektedir. Fenol gruplarındaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte *et al.* 1967). *p*-Nitrofenilasetatın absorpsiyonu bu dalga boyunda çok az olduğu için, kör olarak kullanılmıştır. Aktivite tayini işlemleri için kuvarz küvetler (1 mL'lik) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Reaksiyon karışımındaki maddelerin ortama eklenme sırası ve küvet içeriği aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Esteraz aktivitesi için kullanılan kontrol ve numune küvet içeriği

Kullanılan maddeler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Tris-SO ₄	400	400
Saf Su	240	220
<i>p</i> -Nitrofenilasetat	360	360
Enzim çözeltisi	-	20
Toplam Hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan 3 dakika sonra absorbansı 25°C ve 348 nm'de okunup, absorbans farkı belirlendi. Spektrofotometre, önceden enzim yerine saf su kullanılarak elde edilen karışımın 3 dakika sonra belirlenen absorbansıya sifıra ayarlanmış oldu.

p-Nitrofenilasetat çözeltisi çalışmalar boyunca günlük hazırlandı. 27,2 mg ester ile 1 ml aseton içinde çözüldükten sonra hızla karıştırılan distile suya (49 ml) yavaş yavaş ve dikkatlice eklendi. Esterin sınırlı çözünürlüğünden dolayı çözelti 3 mM

olarak hazırlandı. Diğer organik çözücülere kıyasla hidrolizi en az inhibe ettiği için aseton çözücü olarak seçildi. Kinetik çalışmalar esnasında aktivite ölçümleri esteraz aktivitesiyle yapıldı.

Kalitatif protein tayini: Tirozin, triptofan ve fenilalanin amino asitlerinin 280 nm dalga boyundaki maksimum absorbensı göstermesine dayanır (Chen and Segel, 1968). Bu metot ile kromatografide eşit hacimli (5mL) fraksiyonlarda kalitatif olarak protein tayini gerçekleştirildi.

Kantitatif protein tayini: Bu tayinde afinite kromatografisiyle hemolizatta ve saflaştırılmış olan enzim çözeltisinde bulunan protein miktarları belirlendi. Bu metodun prensibi, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin kompleks oluşturması ve oluşan bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorbens göstermesi esasına dayanır. Proteinlerin bu boyaya bağlanması oldukça hızlı olmaktadır. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre yapısı bozulmadan kalabilmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg'dır (Bradford, 1976).

Karbonik Anhidraz Enzimi için Yapılan Kinetik Çalışmalar

K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasıyla ilgili çalışmalar: hCA enzimi insan kanından saflaştırıldıktan sonra K_m ile V_{max} 'nin belirlenmesi amacıyla en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanıldı ve uygun şartlarda aktivite ölçüldü. Sonrasında Lineweaver-Burk grafiği çizildi, bu grafikten K_m ile V_{max} 'ın değerlerini belirlemek için hesaplama yapıldı.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforeziyle enzimin saflığının kontrol edilmesi:

Enzim saflaştırıldıktan sonra, Laemmli (1970) tarafından bulunmuş olan SDS-PAGE tekniğiyle enzim saflığı tespit edildi. Örneklerin jele yüklenmesinden önce örnekler %1'lük SDS ile %10'lük β -merkaptoetanol ilave edildi. 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletildi. Numunelere elektroforezden sonra boyama yapıldı ve bantlar belirlendi (Suzer *et al.* 2008)

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine saf metabolitlerin etkilerinin tespiti:

I. glauca bitkisinden elde edilen diklorometan:metanol (50:50) ektresinin izolasyonu ile elde edilen saf maddelerin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine etkisi araştırıldı. IC_{50} değerleri belirlendi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Saflaştırılan Metabolitlere Ait Spektroskopik Bulgular

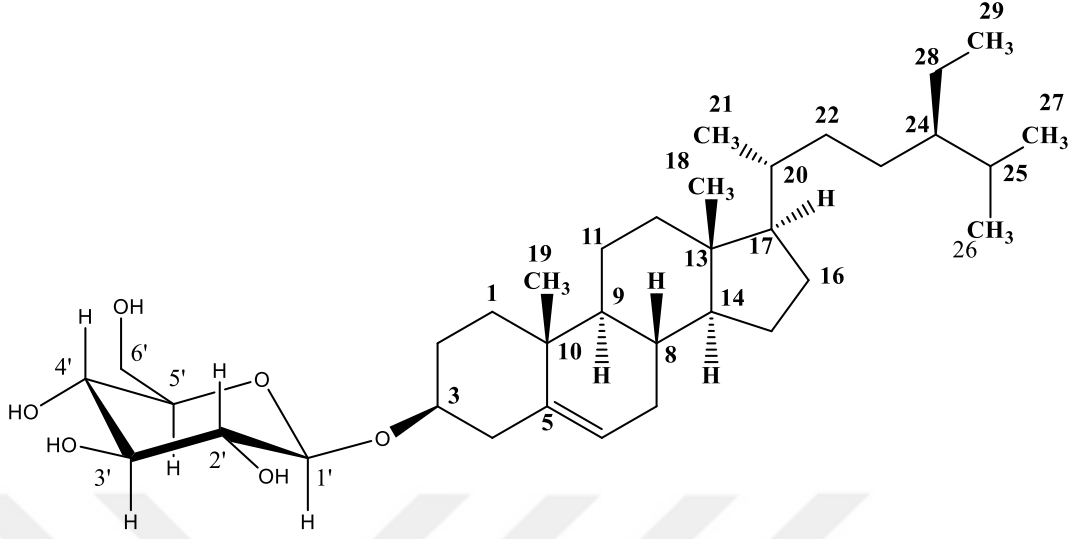
I. glauca'nın toprak üstü kısımlarının diklorometan:metanol (50:50) ekstresinden kromatografik yöntemlerle İG-1, İG-2, İG-3 ve İG-4 kodlu dört madde saflaştırıldı. Saflaştırılan maddelerin İTK'da farklı hareketli faz sistemlerindeki R_f değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.1'de sunuldu. Spektroskopik yöntemlerle elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucu İG-3 maddesinin karışım olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.1. Saflaştırılan maddelerin farklı çözücü sistemlerindeki R_f değerleri

Madde	İG-1	İG-2	İG-3	İG-4
<i>n</i> -hekzan:etil asetat (90:10)	0,8	0,3	-	-
Etil asetat:diklorometan (15:85)	-	-	0,3	0,24
Diklorometan:metanol (70:30)	-	-	1	0,74

Bu bölümde *I. glauca*'dan saflaştırılan maddelerin kimyasal yapılarını aydınlatmak amacıyla 1D-NMR (^1H -NMR ve ^{13}C -NMR) ve 2D-NMR spektroskopik yöntemleriyle elde edilen veriler değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

4.1.1. İG-1 (β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit)



Molekül ağırlığı: 576,8 g/mol

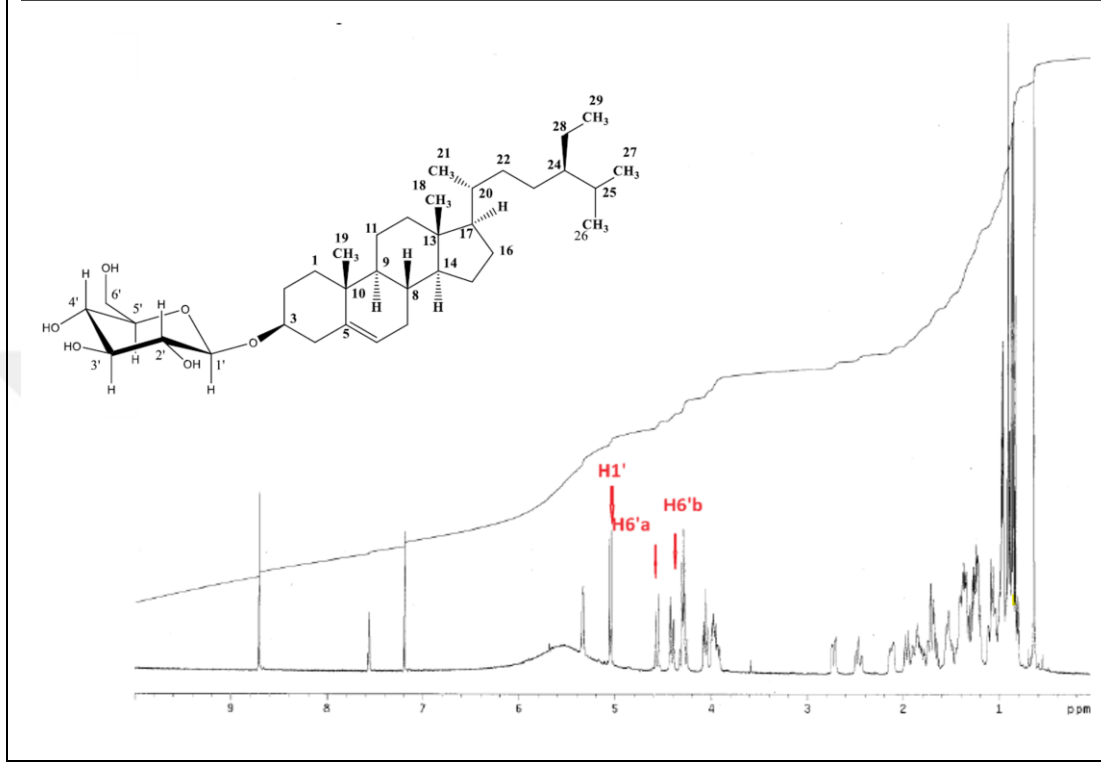
İG-1 kodlu maddenin İTK ve SKK yöntemleriyle saflaştırılma işlemleri sonrasında beyaz renkli kristal yapıda olduğu tespit edildi. Maddenin UV_{254} nm’de mor renk verdiği ve UV_{366} nm’de leke vermediği, H_2SO_4 /vanilin reaktifi püskürtüldüğünde ise pembe-mor renk verdiği gözlemlendi.

İG-1 kodlu maddenin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2) incelendiğinde kimyasal yapısının steroidal glikozit olduğu ve " β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit" maddesine ait olduğu tespit edildi (Aydin *et al.* 2014).

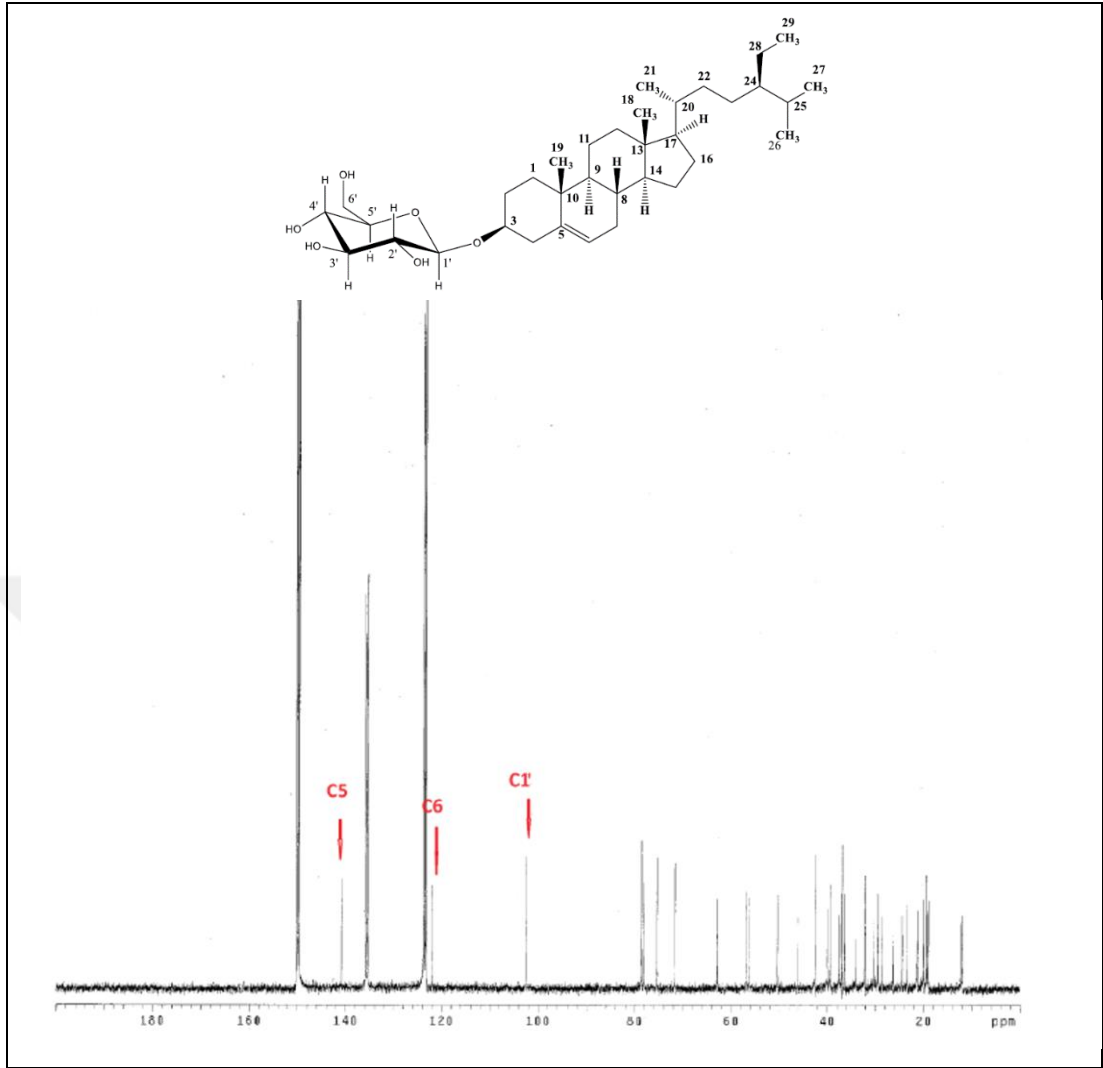
İG-1’in 1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.1), $\delta=3,90$ - $4,60$ ppm arasındaki sinyallerin bir monosakkarit birimine ait olduğu belirlendi. Ayrıca $\delta=5,05$ ppm’de gözlenen dublet sinyalin monosakkarit biriminin karakteristik olarak görülen anomerik protonuna ait olduğu tespit edildi. Bu dublet protona ait etkileşme sabitinin $J=7,69$ Hz olması monosakkaritin glikoz olduğunu ve β -glikopiranozit formunda bağlı olduğunu göstermektedir (Aydin *et al.* 2014). İG-1’in 1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.1), glikoz birimine ait diastropik H-6'a ve H-6'b protonları sırasıyla $\delta=4,57$ ppm’de dd (H-6'a, $J_1=11,73$ Hz, $J_2=2,20$ Hz) ve $\delta=4,36$ ppm’de (H-6'b, $J_1=11,73$ Hz, $J_2=5,13$ Hz) dd sinyalleri verdi.

İG-1’in ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 4.2), gözlenen karbon sinyali sayısı 35 olup, bunlardan 6 tanesi glikoz birimine ait ^{13}C sinyalleridir. Metil gruplarına ait

sinyaller (C18, C19, C21, C26, C27 ve C29), $\delta=12,0$ ppm ile $\delta=20,02$ ppm arasında gelmiştir. C5 sinyali $\delta=140,9$ ppm'de, C6 sinyali $\delta=121,9$ ppm'de ve anomerik karbon C1' sinyali $\delta=102,5$ ppm'de rezonans olmuştur. Molekölün yapısı literatürdeki verilerle de ayrıca doğrulanmıştır (Aydın *et al.* 2014).

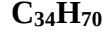
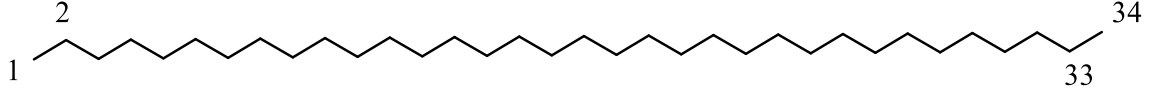


Şekil 4.1. İG-1'in (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) ^1H -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz) spektrumu



Şekil 4.2. İG-1'in (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) spektrumu

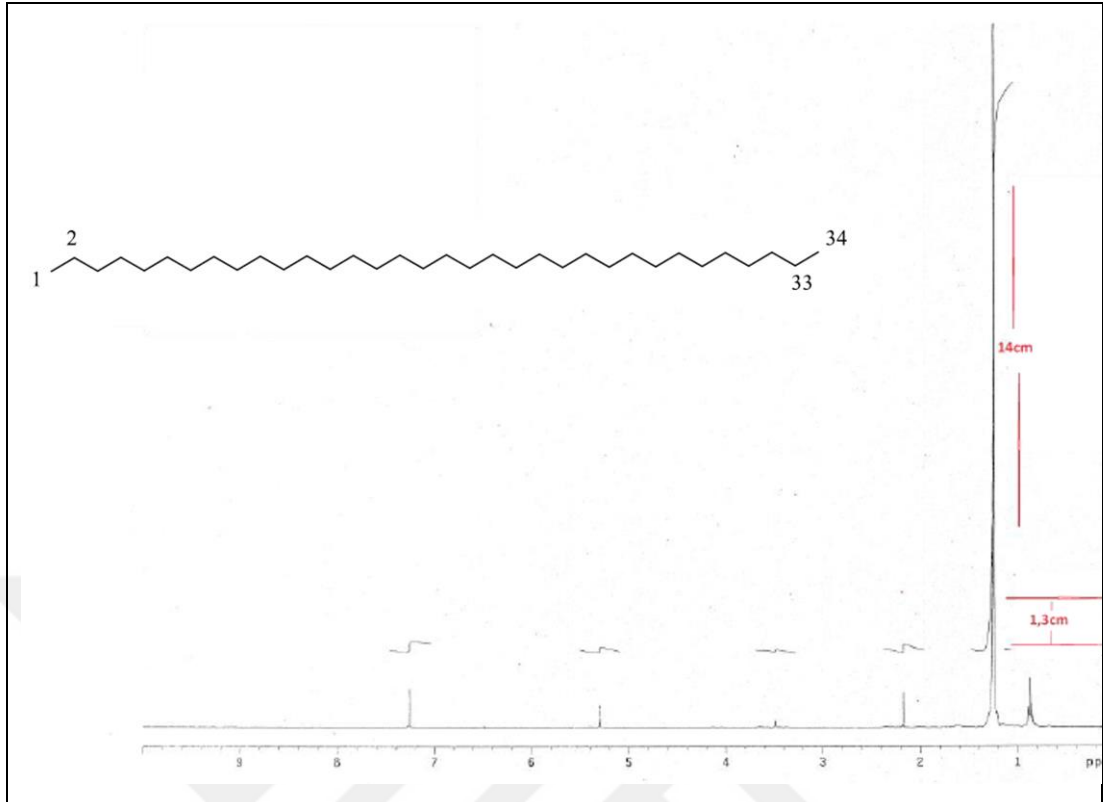
4.1.2. İG-2 (Tetratriakontan)



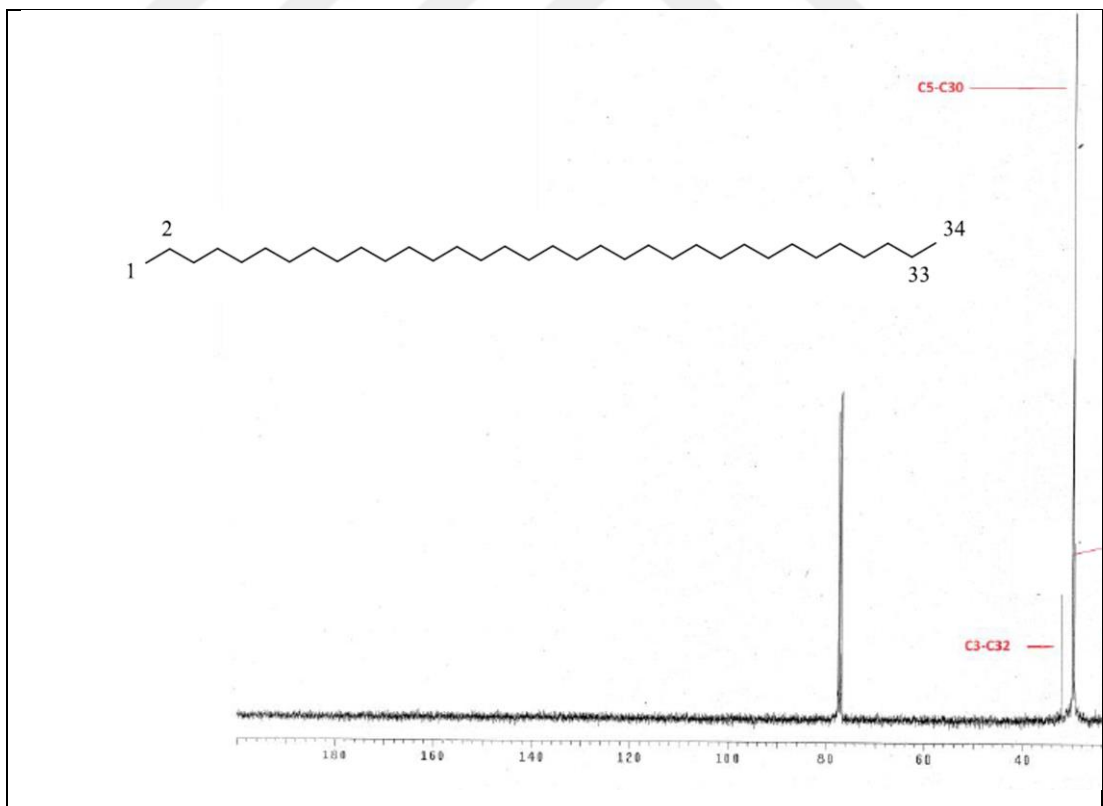
Molekül ağırlığı: 478,9

İG-2 kodlu maddenin İTK ve SKK yöntemleriyle saflaştırılma işlemleri sonrasında beyaz renkli kristal yapıda olduğu tespit edildi. Maddenin UV_{254} nm ve UV_{366} nm’de leke vermediği, H_2SO_4 /vanilin reaktifi püskürtüldüğünde ise pembe renk verdiği gözlemlendi. Bu verilerle birlikte maddenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde kimyasal yapısının bir hidrokarbona ait olduğu anlaşıldı (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Şekil 4.3’de $\delta=0,87$ ppm’de gelen triplet sinyalin hidrokarbonun iki uçtaki $-\text{CH}_3$ gruplarına ait olduğu ve integrasyon ile toplam 6 protonun $1,3$ cm olduğu hesaplandı. Diğer taraftan $\delta=1,22$ ppm’de gelen $-\text{CH}_2$ sinyallerinin integrasyonu ise 14 cm olarak ölçüldü. Bu veriler ışığında $-\text{CH}_2$ sinyallerinin toplam 64 protona ve 32 karbona karşılık geldiği ve hidrokarbonun kimyasal yapısının tetratriakontan ($\text{C}_{34}\text{H}_{70}$) olduğu tespit edildi.



Şekil 4.3. İG-2'nin (Tetratriakontan) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu

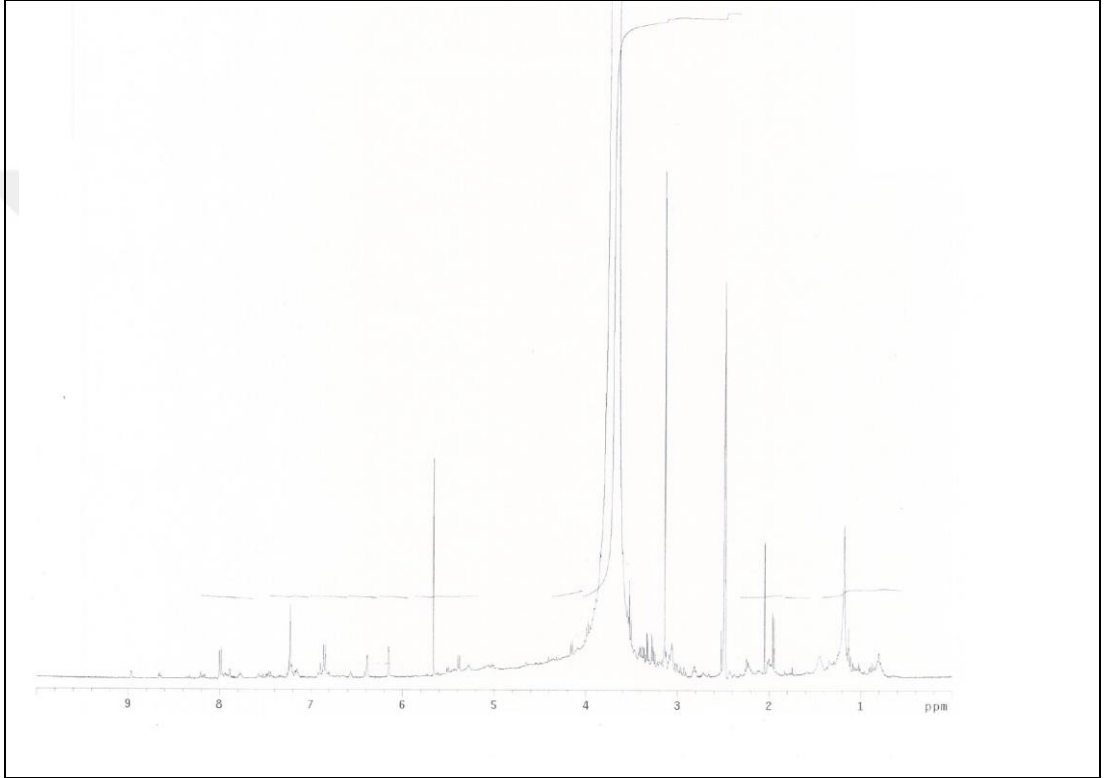


Şekil 4.4. İG-2'nin (Tetratriakontan) ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu

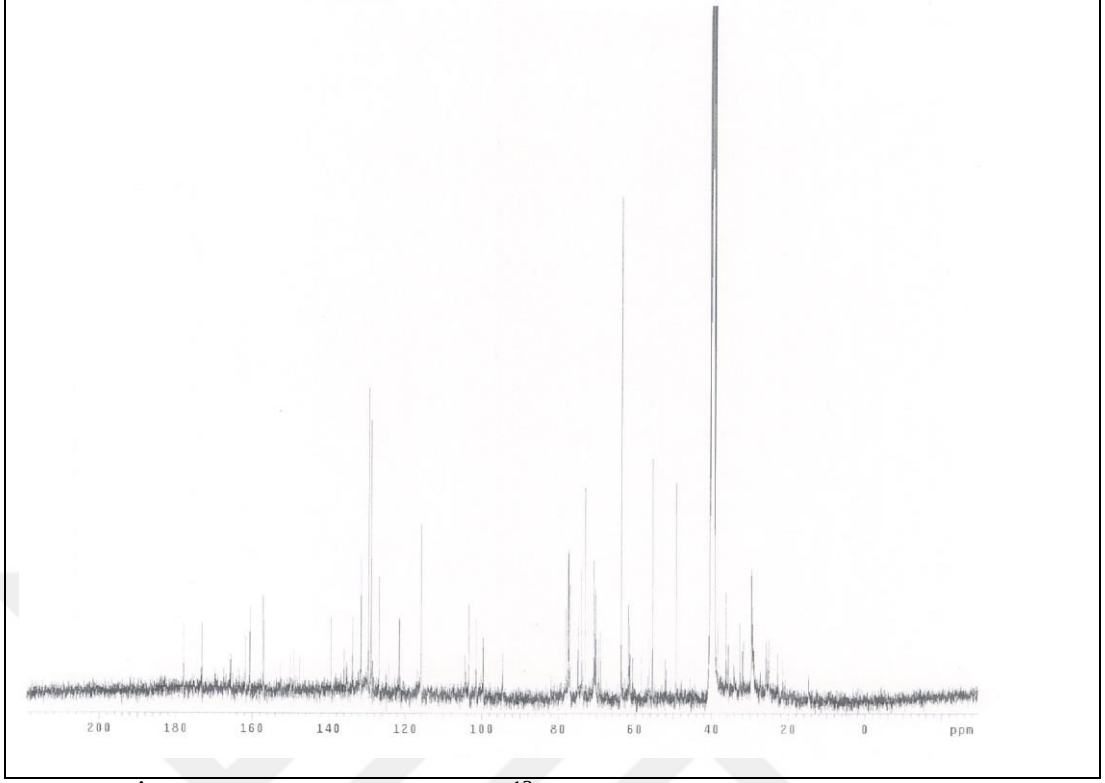
4.1.3. İG-3 (Flavonoit karışımı)

İG-3 kodlu maddenin bir karışım olduğu tespit edildi ve bu nedenle kimyasal yapısı aydınlatılamadı. Maddenin UV₂₅₄ nm ve UV₃₆₆ nm’de mor leke verdiği, H₂SO₄/vanilin reaktifi püskürtüldüğünde ise sarı renk verdiği tespit edildi. Bu verilerde karışımın 2 adet flavonoitten ibaret olduğu tespit edildi.

Karışıma ait ¹H ve ¹³C NMR spektrumları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da verilmiştir.

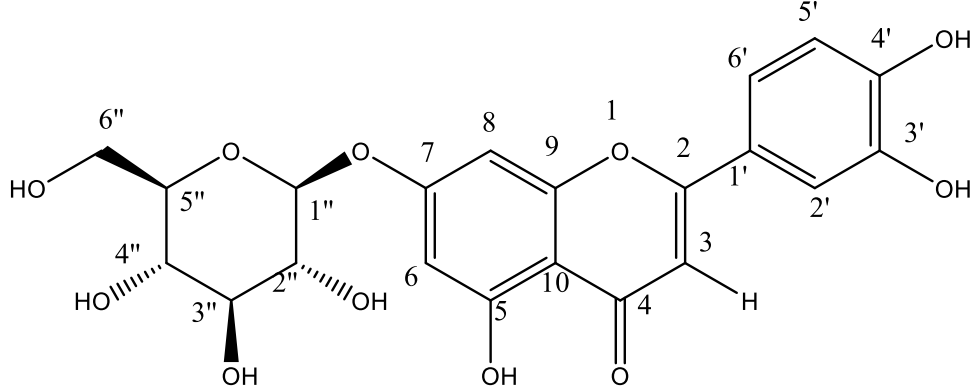


Şekil 4.5. İG-3’ün (Flavonoit karışımı) ¹H NMR (dms0-d₆, 400 MHz) spektrumu



Şekil 4.6. İG-3'ün (Flavonoit karışımı) ^{13}C NMR (dms0-d₆, 100 MHz) spektrumu

4.1.4. İG-4 (Luteolin 7-O-glukozit)



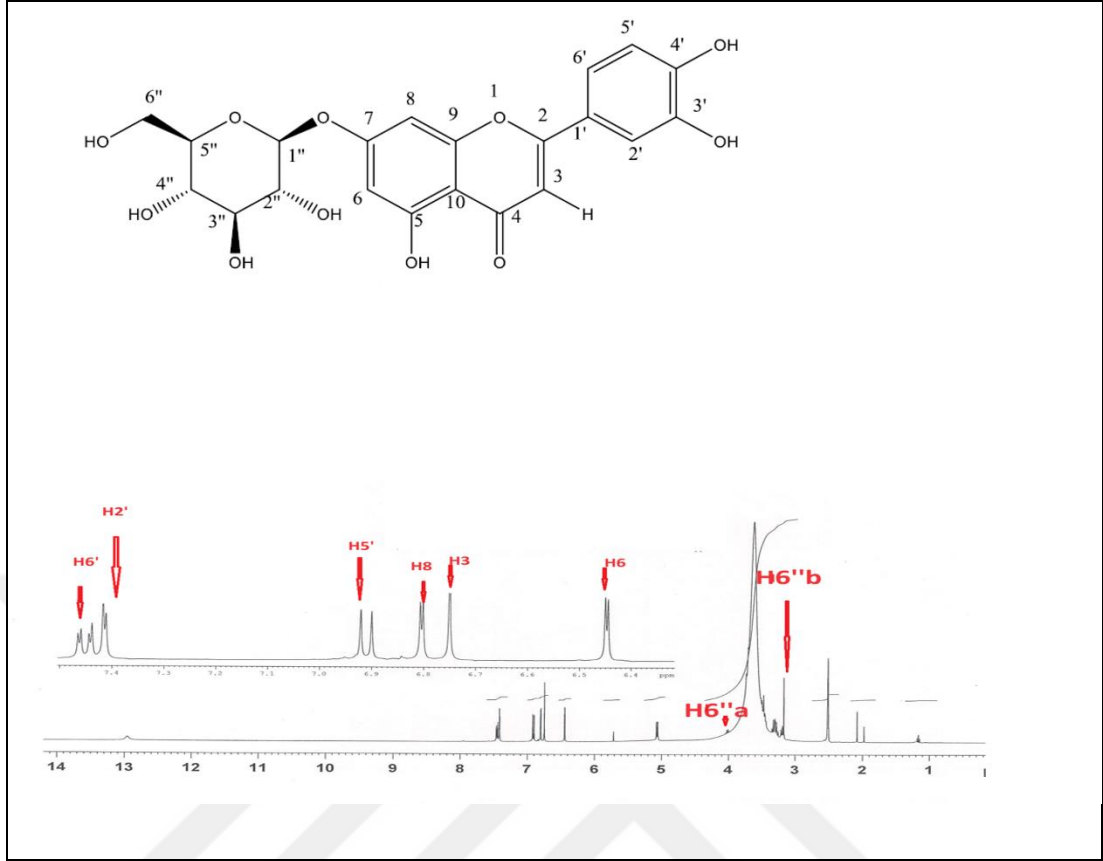
Molekül ağırlığı: 448.37

İG-4 kodlu maddenin İTK ve SKK yöntemleriyle saflaştırılma işlemleri sonrasında sarı renkli kristal yapıda olduğu tespit edildi. Maddenin UV_{254} nm ve UV_{366} nm'de mor leke verdiği, H_2SO_4 /vanilin reaktifi püskürtüldüğünde ise sarı renk verdiği gözlemlendi.

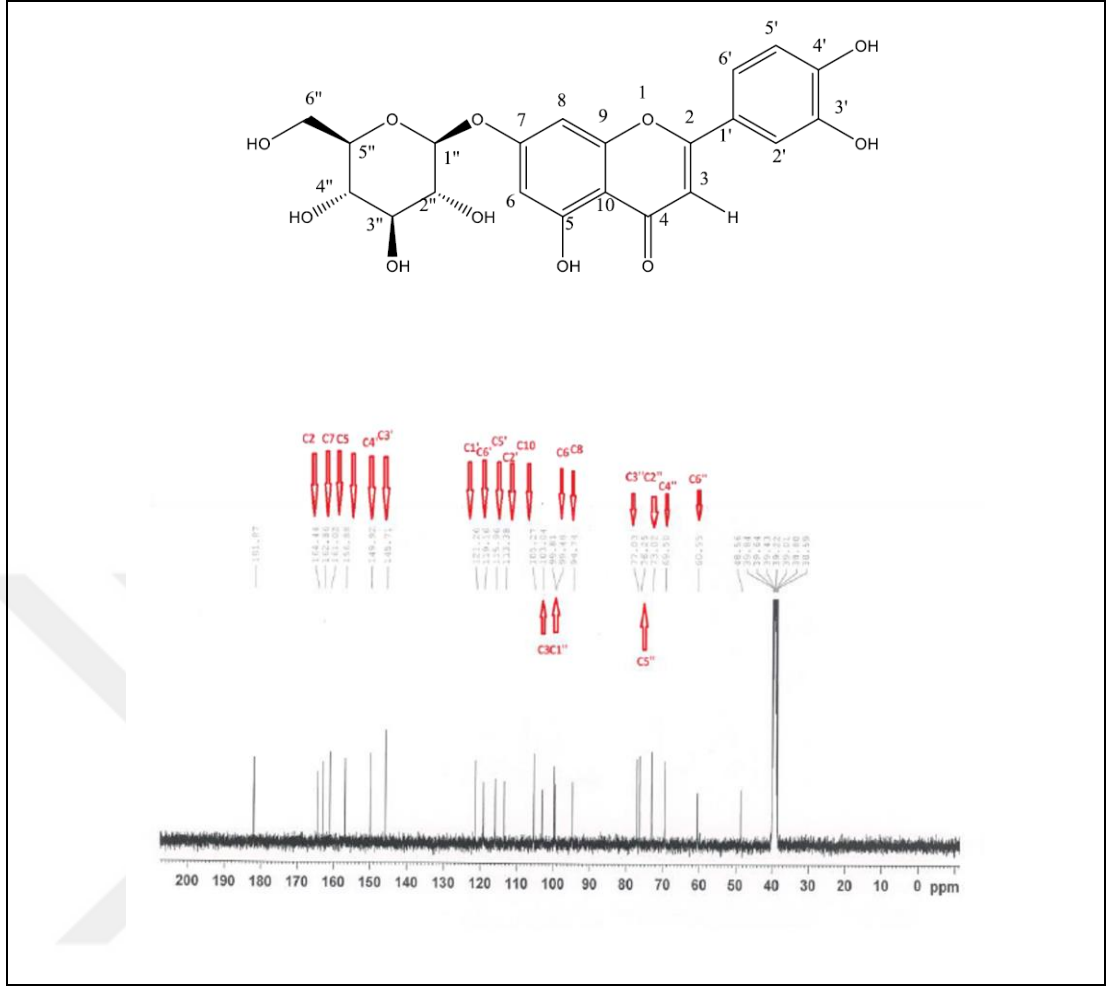
İG-4'e ait 1H ve ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7), maddenin kimyasal yapısının bir flavonoit glikoziti olduğu tespit edilmiştir. 1H NMR spektrumunda (Şekil 4.6) $\delta=6,4-7,4$ ppm arasında aromatik protonlara ait sinyaller görülmektedir. Anomerik proton H-1" e ait sinyal $\delta=5,06$ ppm'de rezonans olmuştur. Glikoz birimine ait sinyaller $\delta=3,3-3,7$ ppm arasında gözlemlendi.

İG-4'ün ^{13}C NMR spektrumu (Şekil 4.7) incelendiğinde $\delta=181,8$ ppm'de karbonil karbonuna ait C4 sinyali görülmektedir. Kuarterner karbonlara ait sinyallerden C2 $\delta=164,4$ ppm'de, C7 $\delta=162,8$ ppm'de, C5 $\delta=161,0$ ppm'de, C9 $\delta=156,8$ ppm'de ve C1' 121,2 ppm'de rezonans olmuştur. Flavonoitin B halkasındaki kuarterner karbonlar olan C3' ve C4' sinyalleri ise $\delta=149,9$ ve 145,7 ppm de rezonans olmuştur. Anomerik karbon C1" e ait sinyal $\delta=99,8$ ppm'de görülmektedir. Glikoz birimine ait karbon sinyalleri $\delta=60-70$ ppm arasında gözlenmektedir.

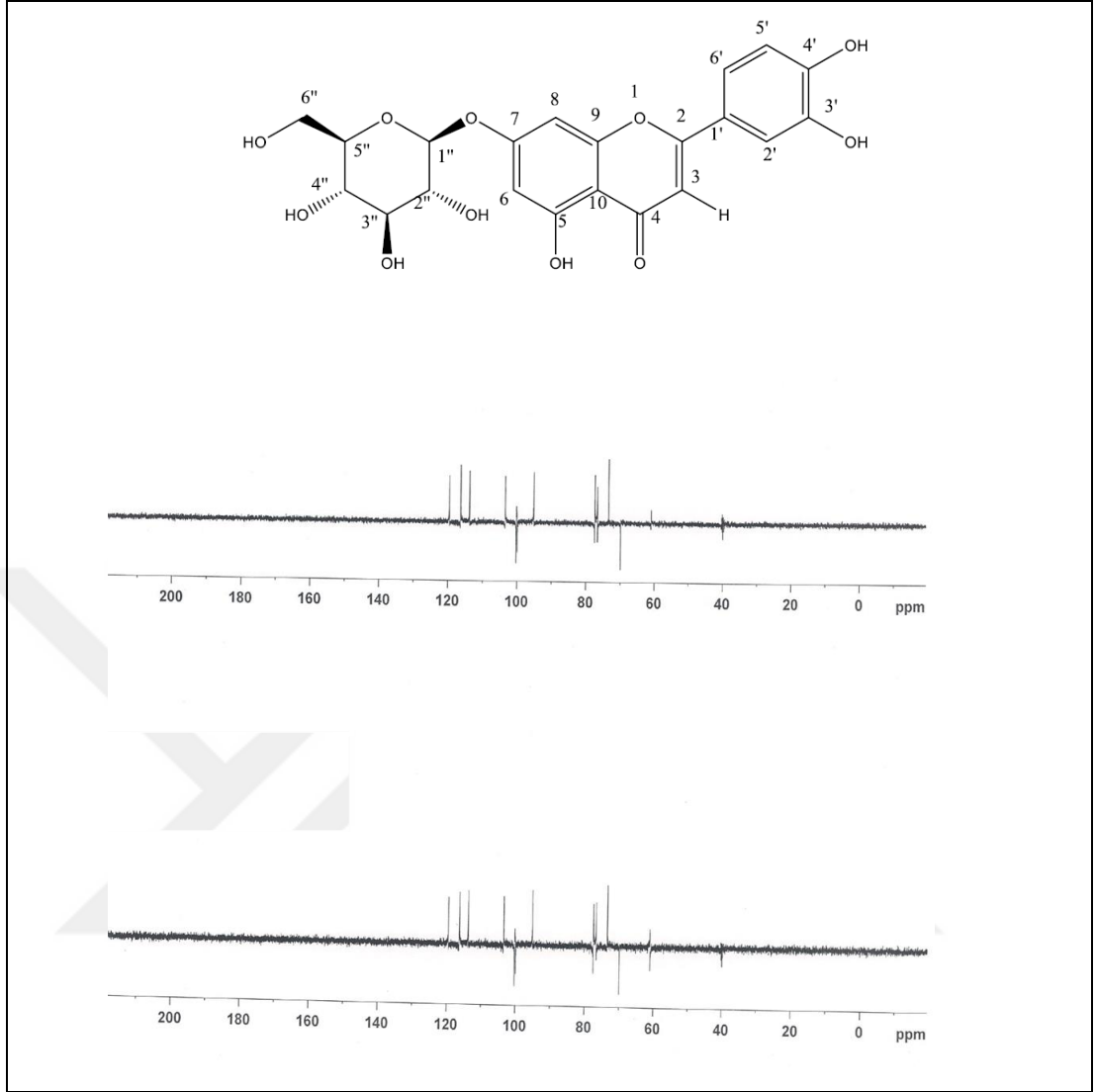
Bu veriler ışığında İG-4 kodlu maddenin kimyasal yapısının luteolin 7-O-glukozit olduğu anlaşılmıştır. Molekülün yapısı litaretür verileri ile de ayrıca doğrulanmıştır (Chiruvella *et al.* 2007).



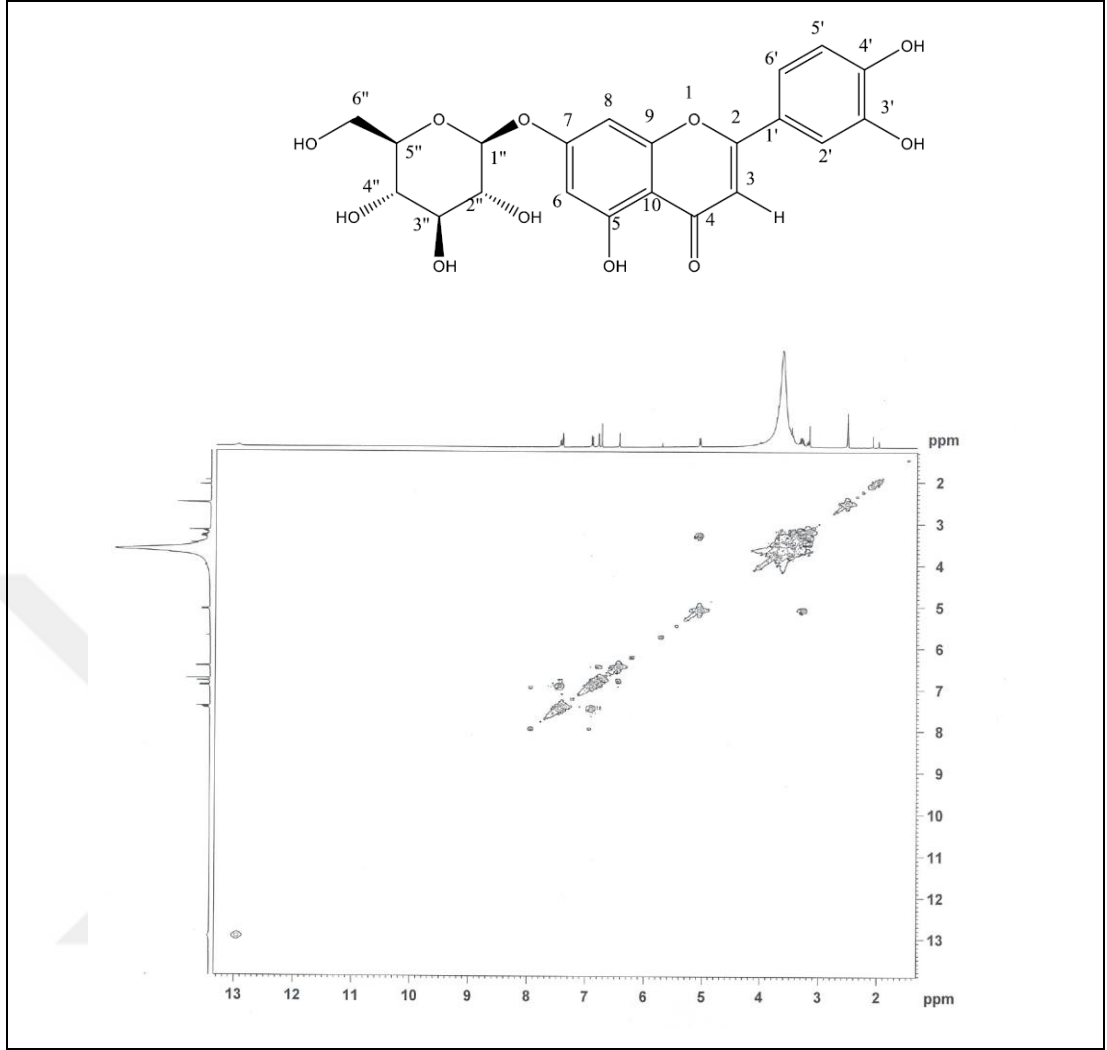
Şekil 4.7. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ¹H NMR (dms_o-d₆, 400 MHz) spektrumu



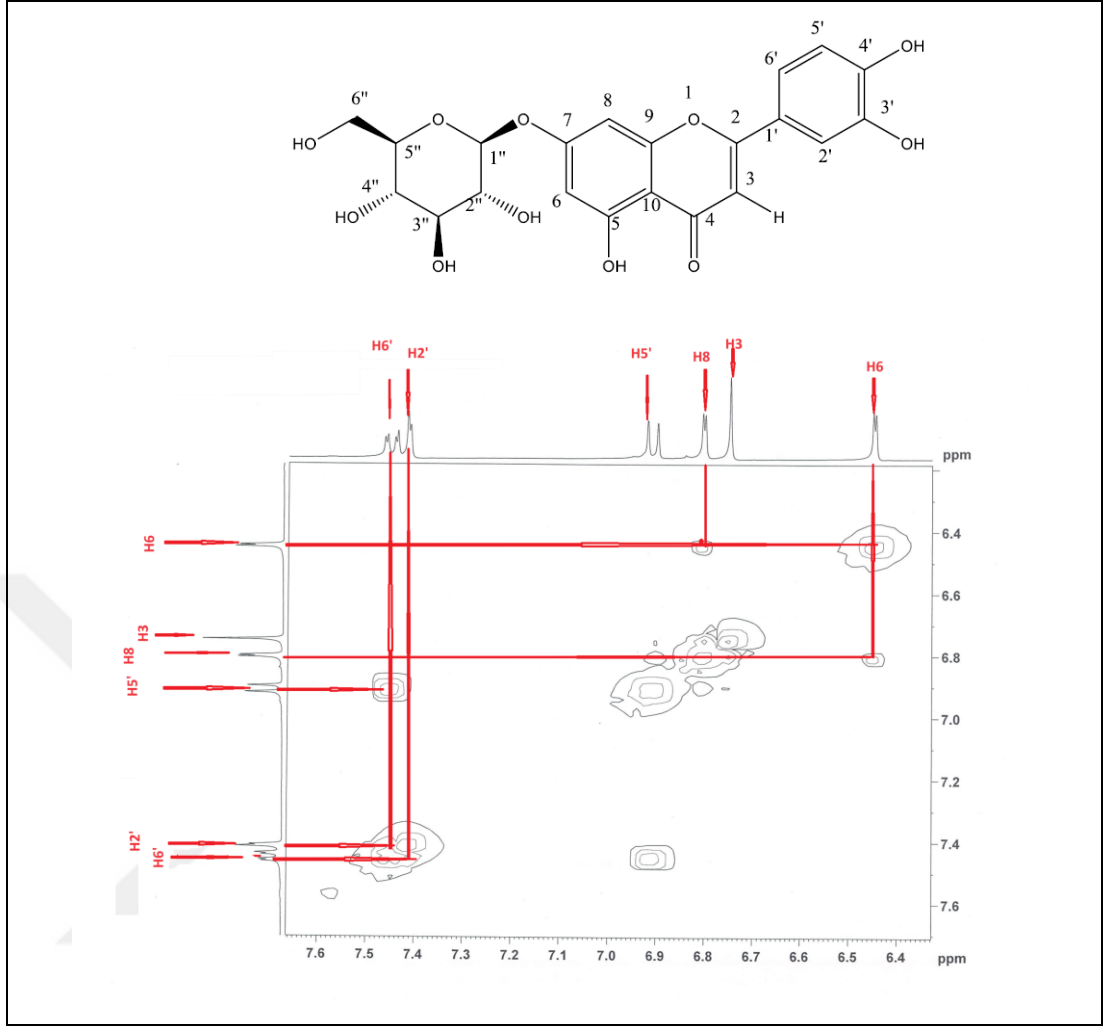
Şekil 4.8. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ^{13}C NMR (dmso- d_6 , 100 MHz) spektrumu



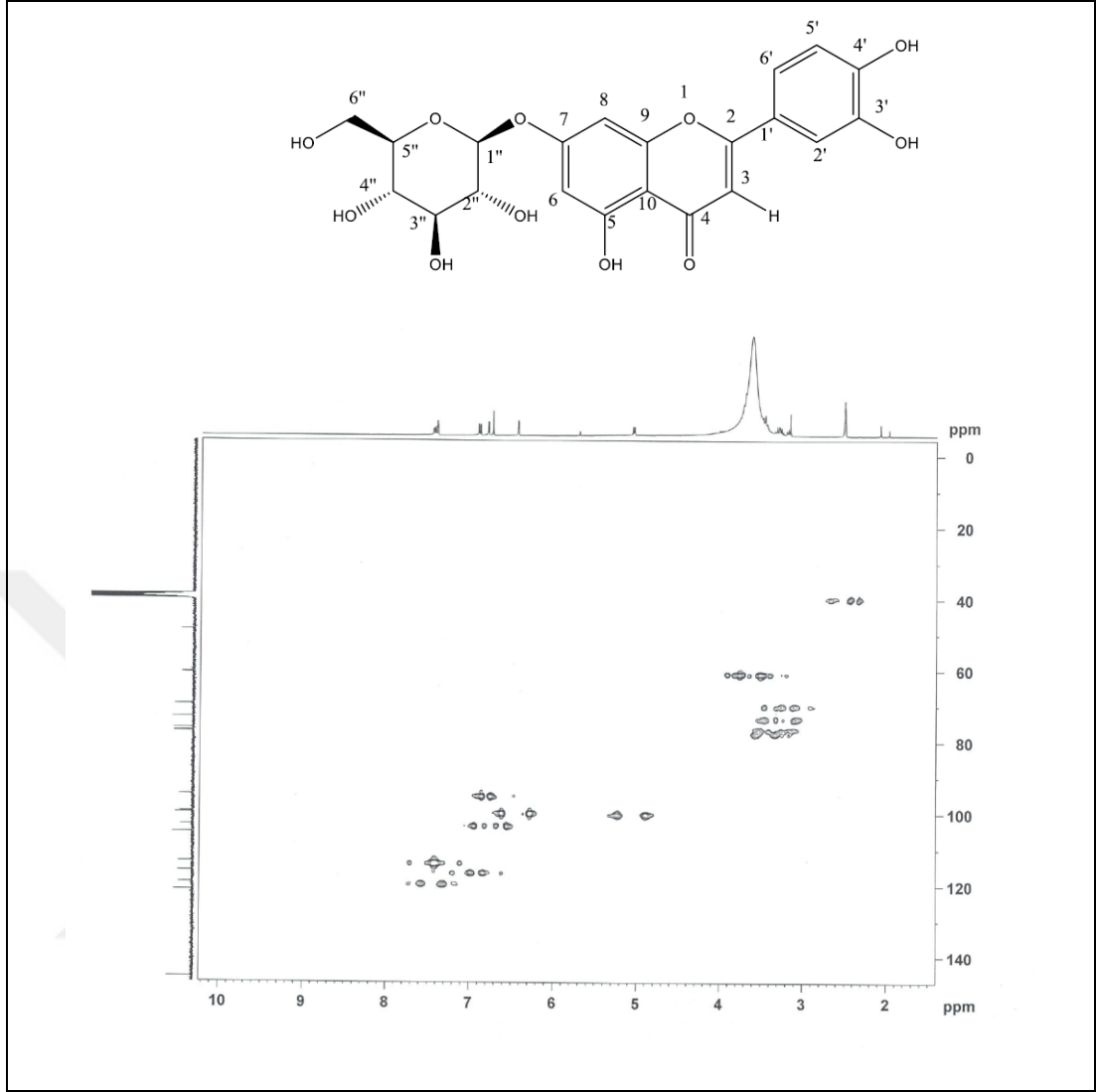
Şekil 4.9. İG-4'ün (Luteolin 7-*O*-glukozit) DEPT spektrumu (dmso-*d*₆, 400Mz)



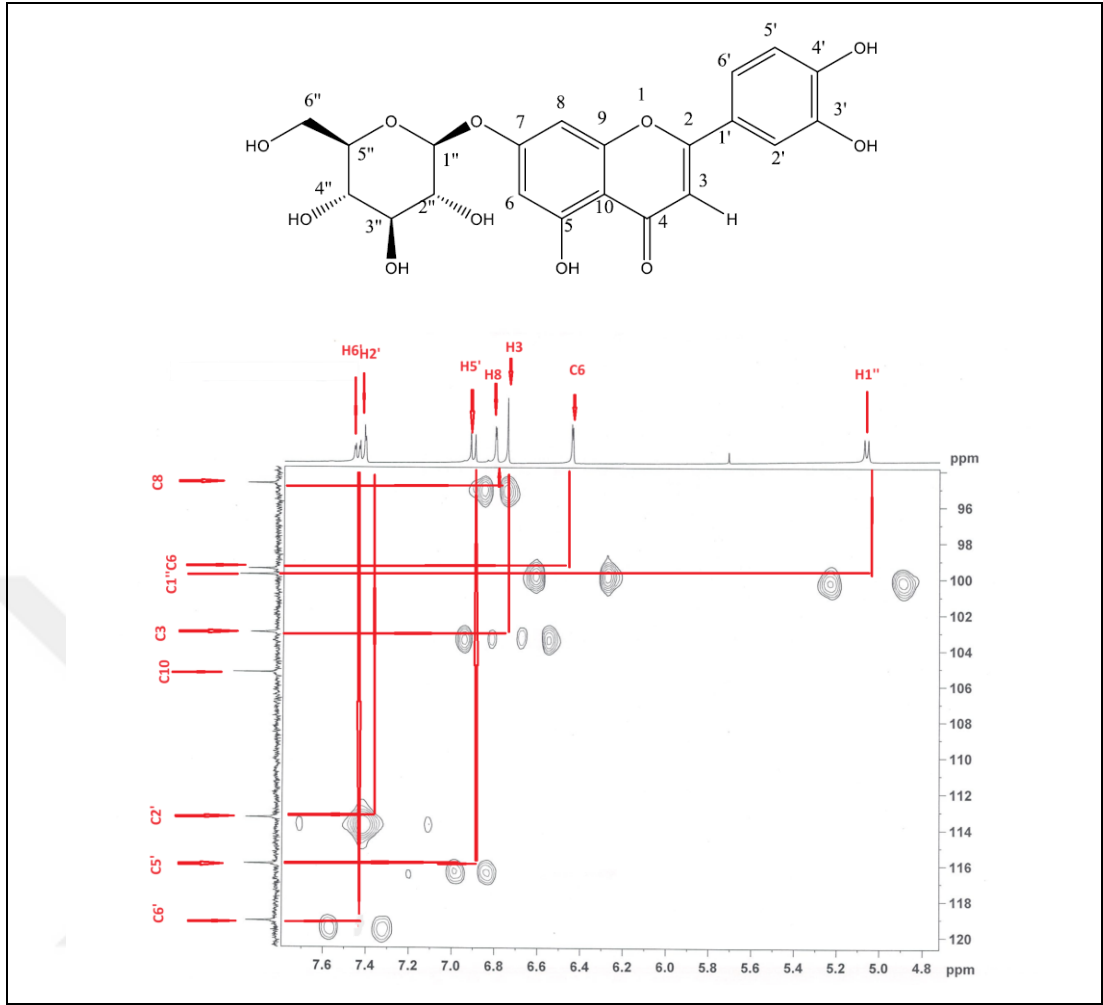
Şekil 4.10. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ^1H - ^1H COSY spektrumu (dmso- d_6 , 400 Mz)



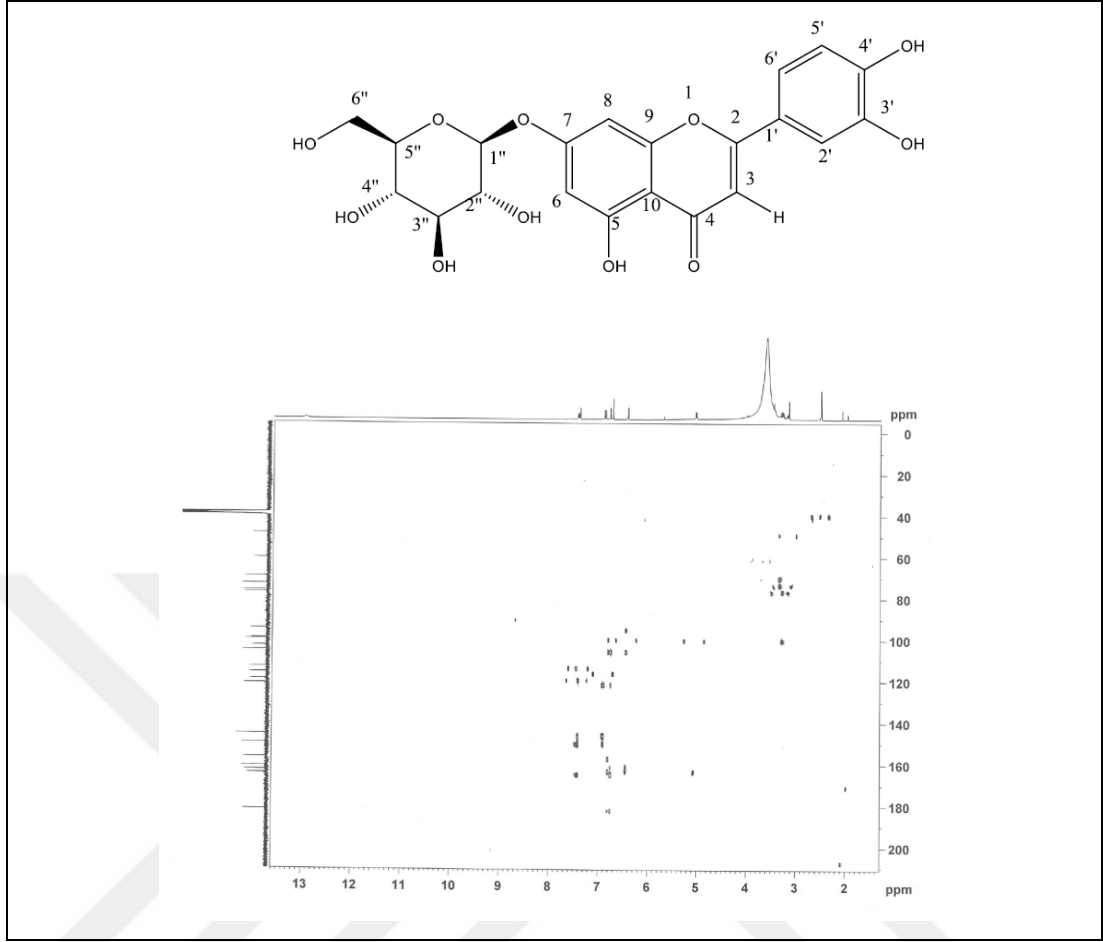
Şekil 4.11. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) ^1H - ^1H COSY spektrumu ($\text{dms}\text{-d}_6$, 400 Mz)



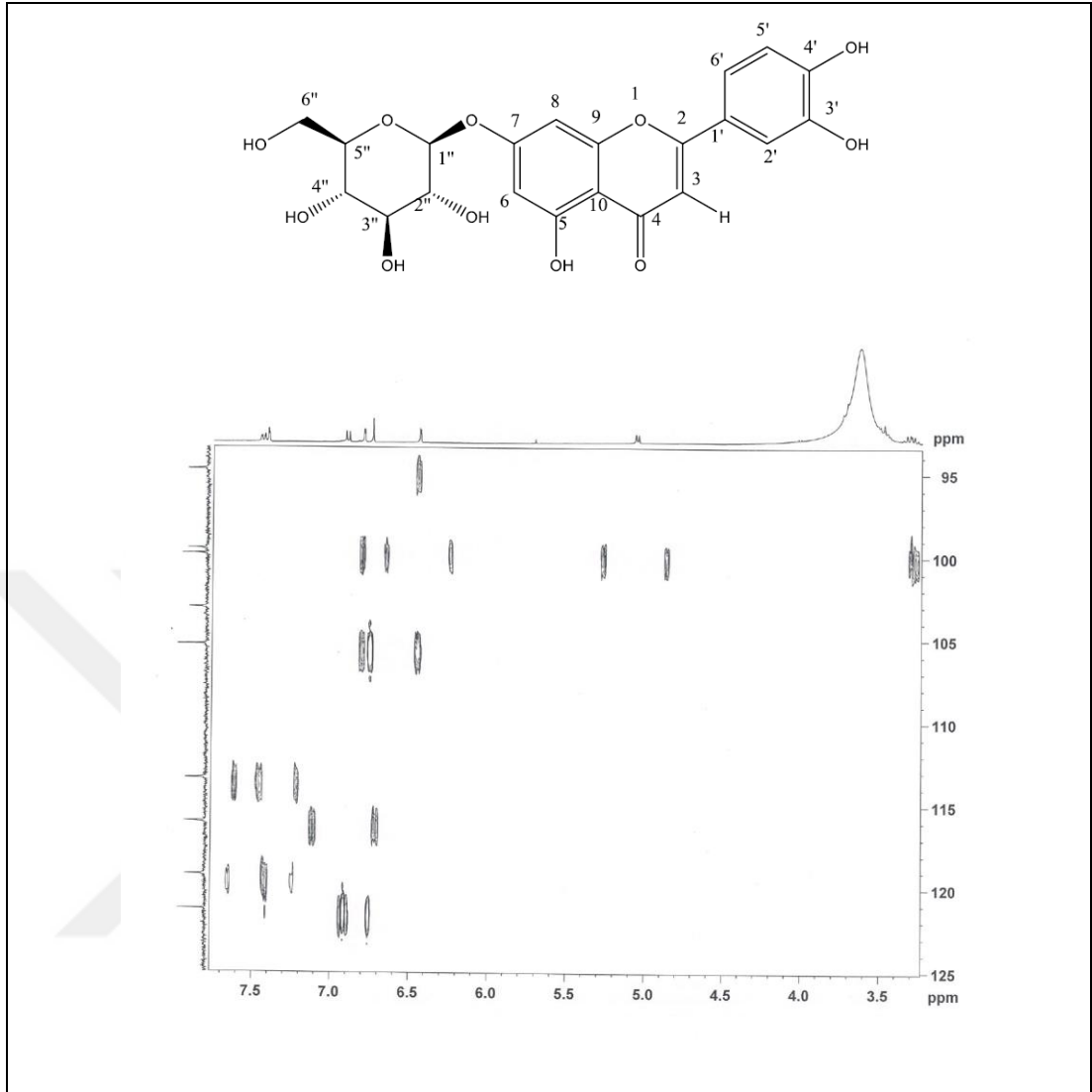
Şekil 4.12. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMQC spektrumu (dmso-d₆, 400Mz)



Şekil 4.13. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMQC spektrumu (dmso-d₆, 400Mz)



Şekil 4.14. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMQC spektrumu (dms_o-d₆, 400Mz)



Şekil 4.15. İG-4'ün (Luteolin 7-O-glukozit) HMBC spektrumu (dmso-d₆, 400Mz)

4.2. Saf Maddelerin Enzim İnhibisyonu Çalışma Bulguları

4.2.1. Karbonik anhidraz enzim inhibisyonu sonuçları

Bu bölümde *I. glauca* bitkisinin, diklorometan:metanol (50:50) ekstresinden izole edilen İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit), İG-2 (tetratriakontan), İG-3 (flavonoit karışımı) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit) maddelerinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerini gösteren çizelge ve grafikler verilmiştir.

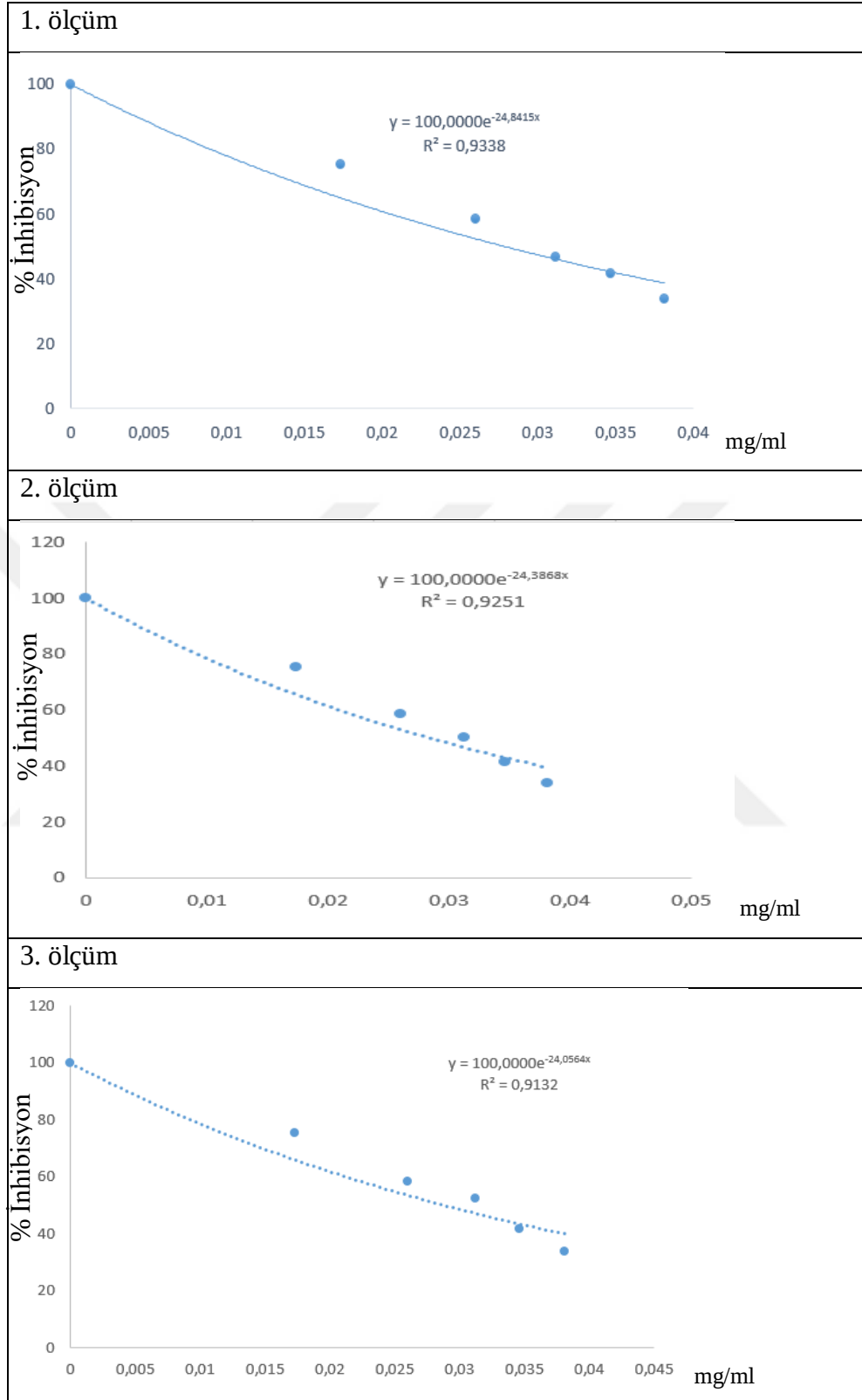
Maddelerden sadece İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit), hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi göstermiş, İG-2 (tetratriakontan) ve İG-3 (flavonoit karışımı) üzerine etki göstermemiştir. Bu nedenle grafik ve çizelgelerde sadece İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit)'e ait sonuçlar gösterilmiştir.

Çizelge 4.2'ye göre en güçlü inhibisyon etkisini İG-4 kodlu luteolin 7-O-glukozit hCA-I izoenzimi üzerinde göstermiştir. İG-4 kodlu luteolin 7-O-glukozit'in hCA-I için IC_{50} ve K_i değerleri sırasıyla $7,79 \pm 0,52$ ve $9,08 \pm 0,011$ μM olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan pozitif kontrol AZA (IC_{50} : $18,69 \pm 0,16$ nM; K_i : $9,08 \pm 0,011$) ile kıyaslandığında hem İG-1 kodlu β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit hem de İG-4 kodlu luteolin 7-O-glukozit orta düzeyde inhibisyon etkisi göstermiştir.

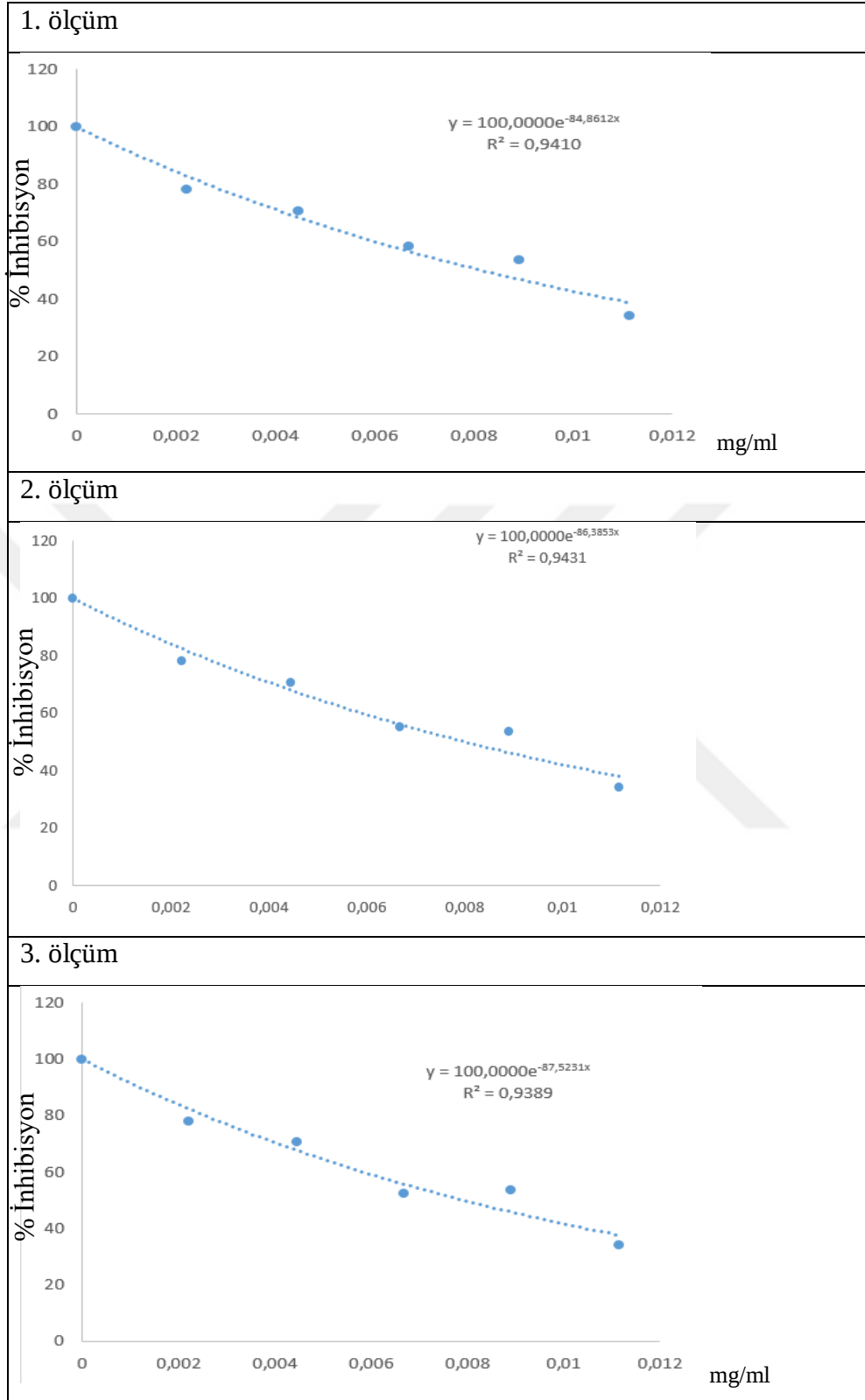
Çizelge 4.2. Aktivite grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri

Madde	hCA-I		hCA-II	
	IC_{50} (μM)	K_i	IC_{50} (μM)	K_i
İG-1 (β -sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit)	$70,93 \pm 1,14$ (r^2 : 0,9513)	$68,79 \pm 0,014$	$30,72 \pm 0,41$ (r^2 : 0,9334)	$16,06 \pm 0,03$
İG-2 (tetratriakontan)	-	-	-	-
İG-3 (flavonoit karışımı)	-	-	-	-
İG-4 (luteolin 7-O-glukozit)	$7,79 \pm 0,52$ (r^2 : 0,9618)	$4,07 \pm 0,01$	$74,68 \pm 1,04$ (r^2 : 0,9791)	$44,98 \pm 0,007$
AZA (nM)	$18,69 \pm 0,16$ (r^2 : 0,9609)	$9,08 \pm 0,011$	$5,40 \pm 0,51$ (r^2 : 0,9786)	$1,71 \pm 0,041$

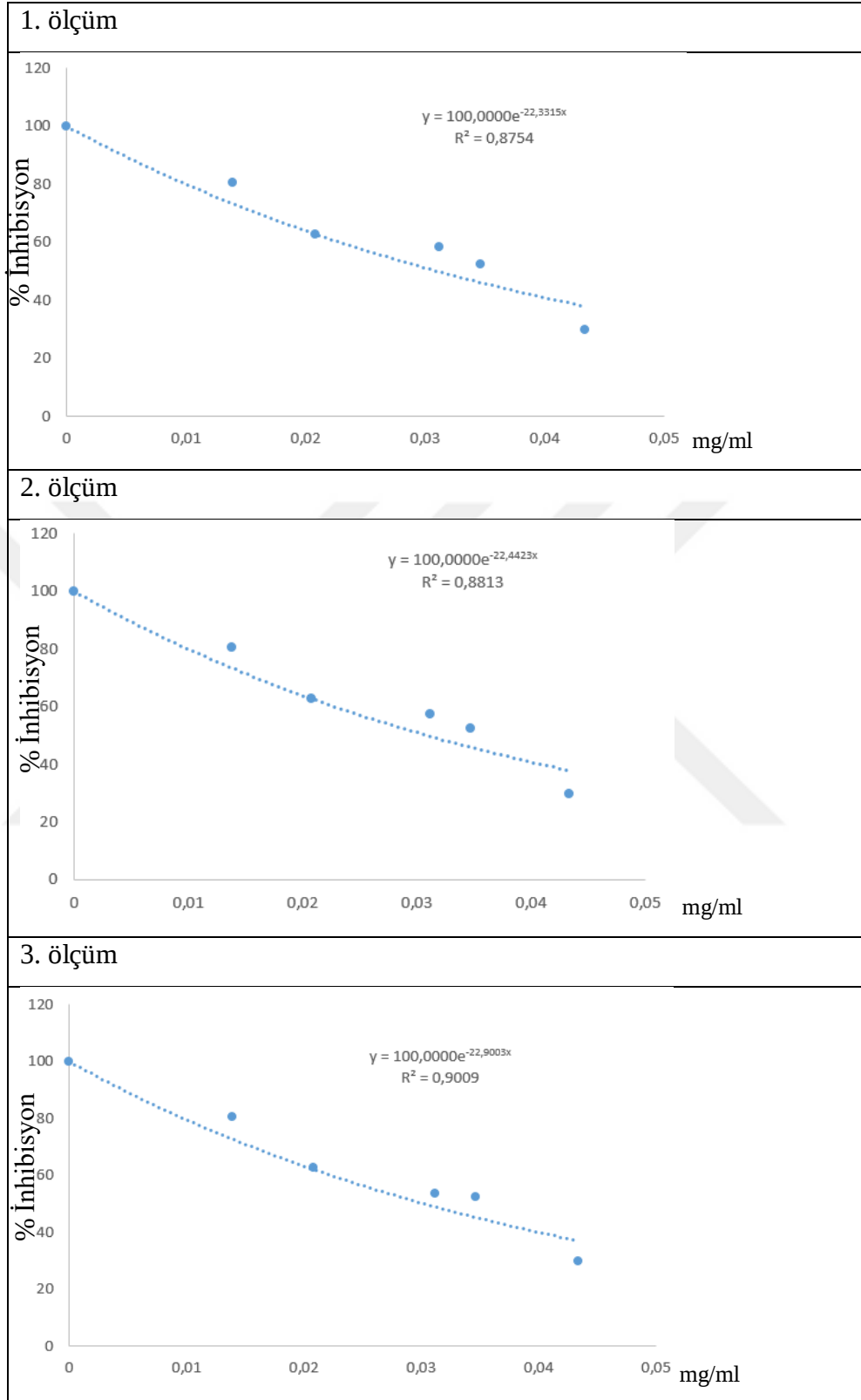
- : inhibisyon göstermedi



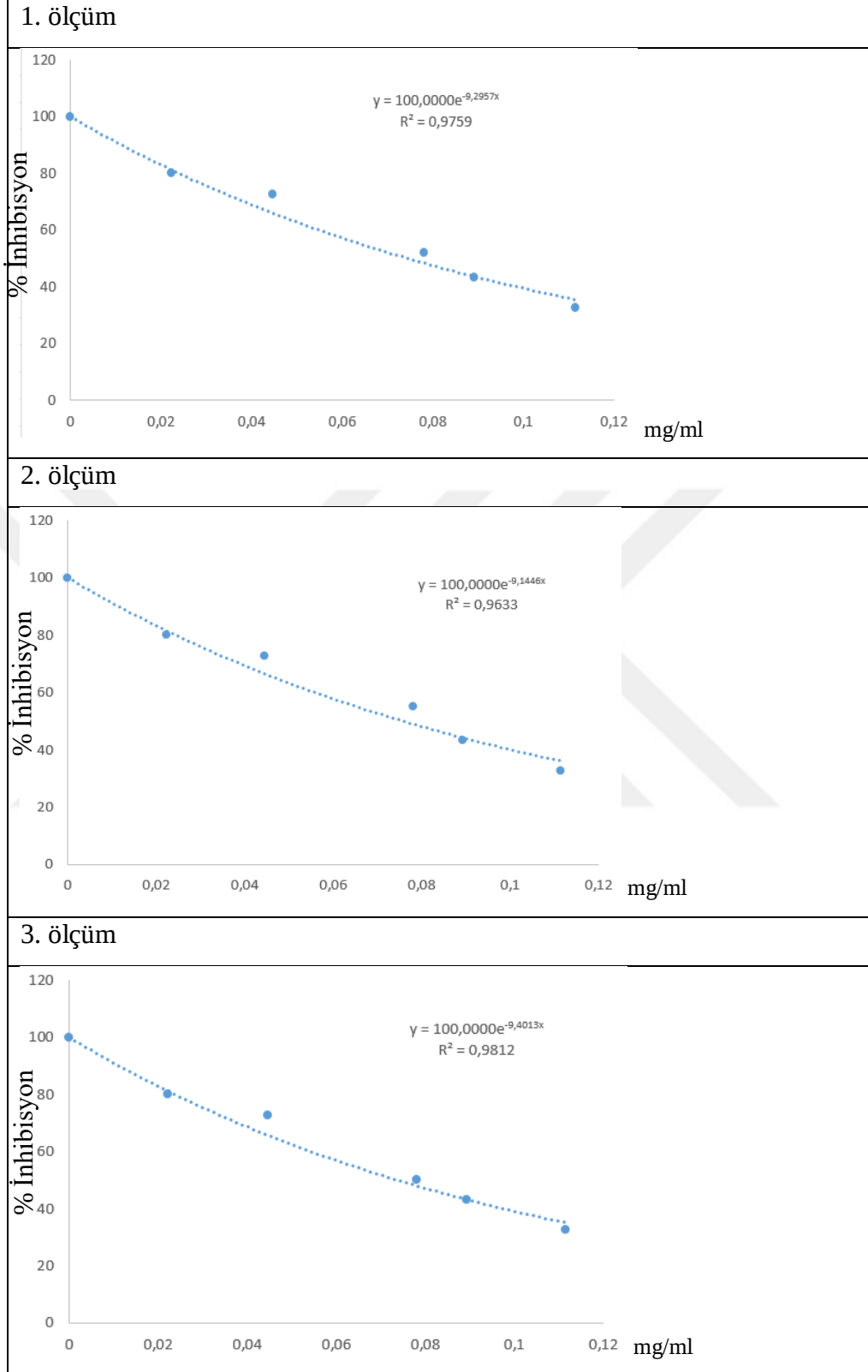
Şekil 4.16. İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) için hCA-I %aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.17. İG-4 (Luteolin 7-O-glukozit) için hCA-I %aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.18. İG-4 (Luteolin 7-O-glukozit) için hCA-I %aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.19. İG-4 (Luteolin 7-O-glukozit) için hCA-II %aktivite ölçüm sonuçları

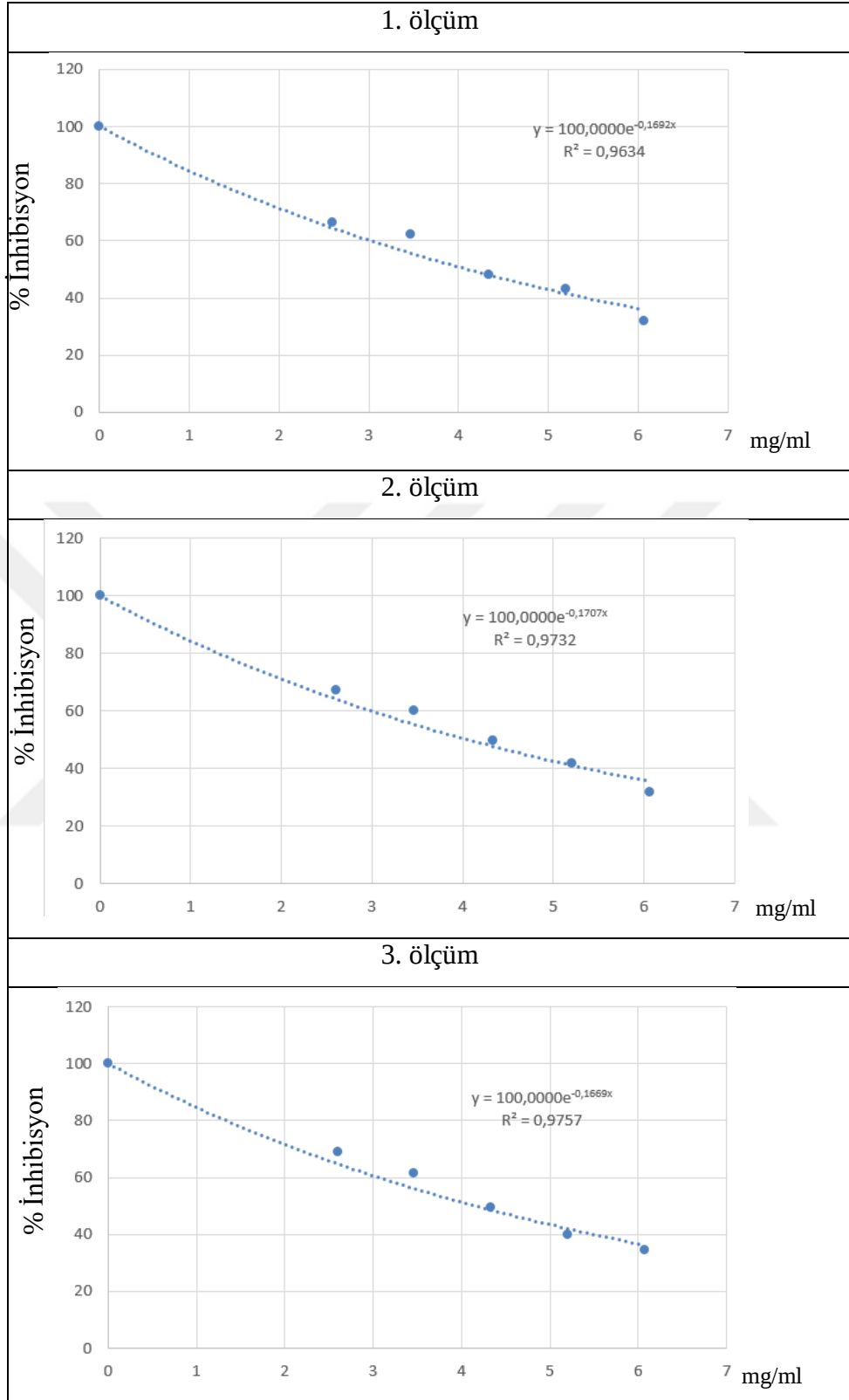
4.2.2. Kolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçları

Bu bölümde *I. glauca* bitkisinin, diklorometan:metanol (50:50) ekstresinden izole edilen İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit), İG-2 (tetratriakontan), İG-3 (flavonoit karışımı) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit)'in AChE ve BChE izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerini gösteren çizelge ve grafikler verilmiştir.

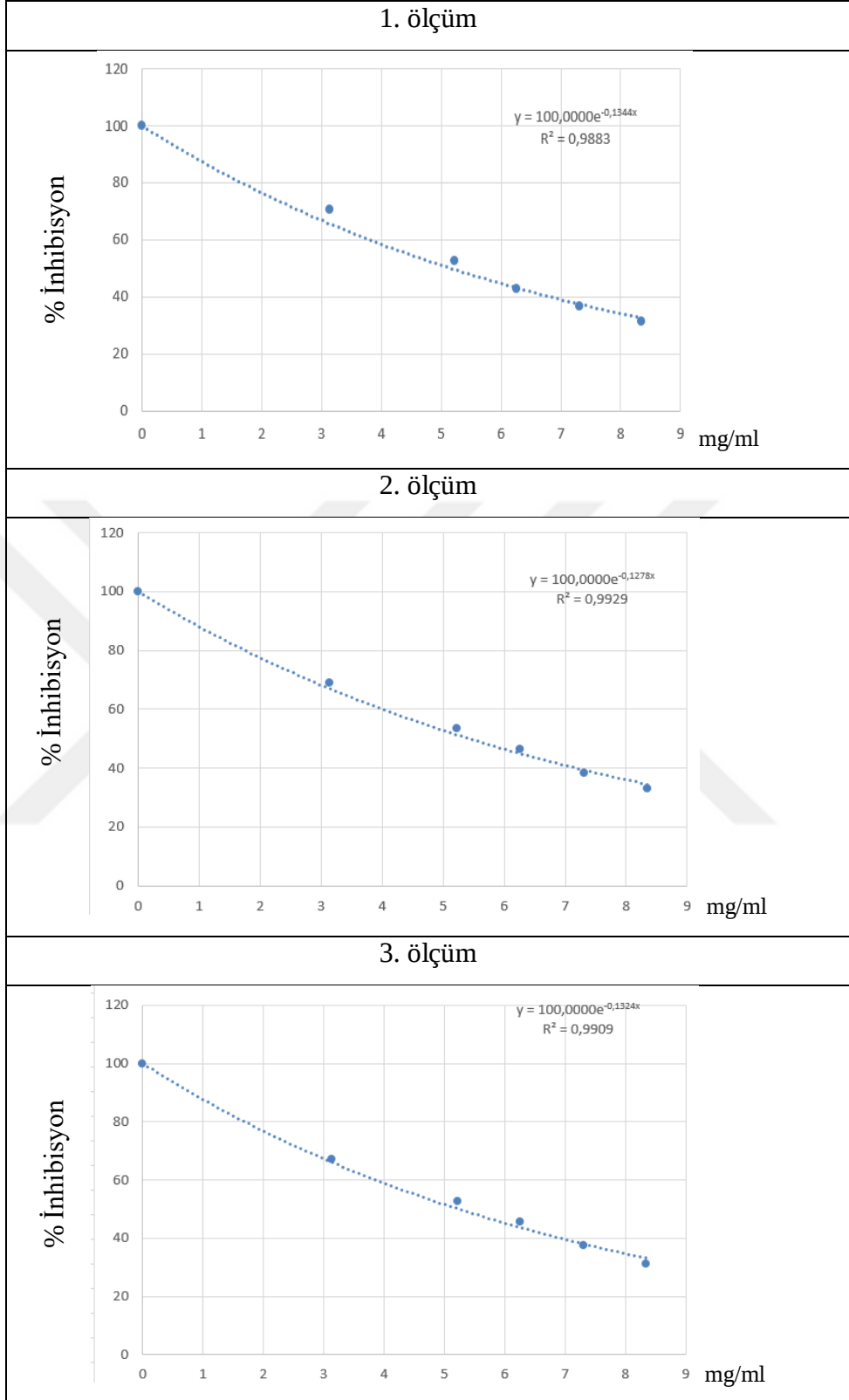
Çizelge 4.3. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC₅₀ değerleri

Madde	AChE		BChE	
	IC ₅₀ (μ M)	r ²	IC ₅₀ (μ M)	r ²
İG-1 (β -sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit)	4,102±0,038	0,9707	1,98±0,019	0,9516
İG-2 (tetratriakontan)	5,26±0,113	0,9907	1,45±0,010	0,9733
İG-3 (flavonoit karışımı)	18,56±3,48	0,9721	21,08±0,109	0,9800
İG-4 (luteolin 7-O-glukozit)	3,04±0,127	0,9949	1,58±0,021	0,9676
Takrin (nM)	3,73±0,050	0,9962	3,21±0,041	0,9906

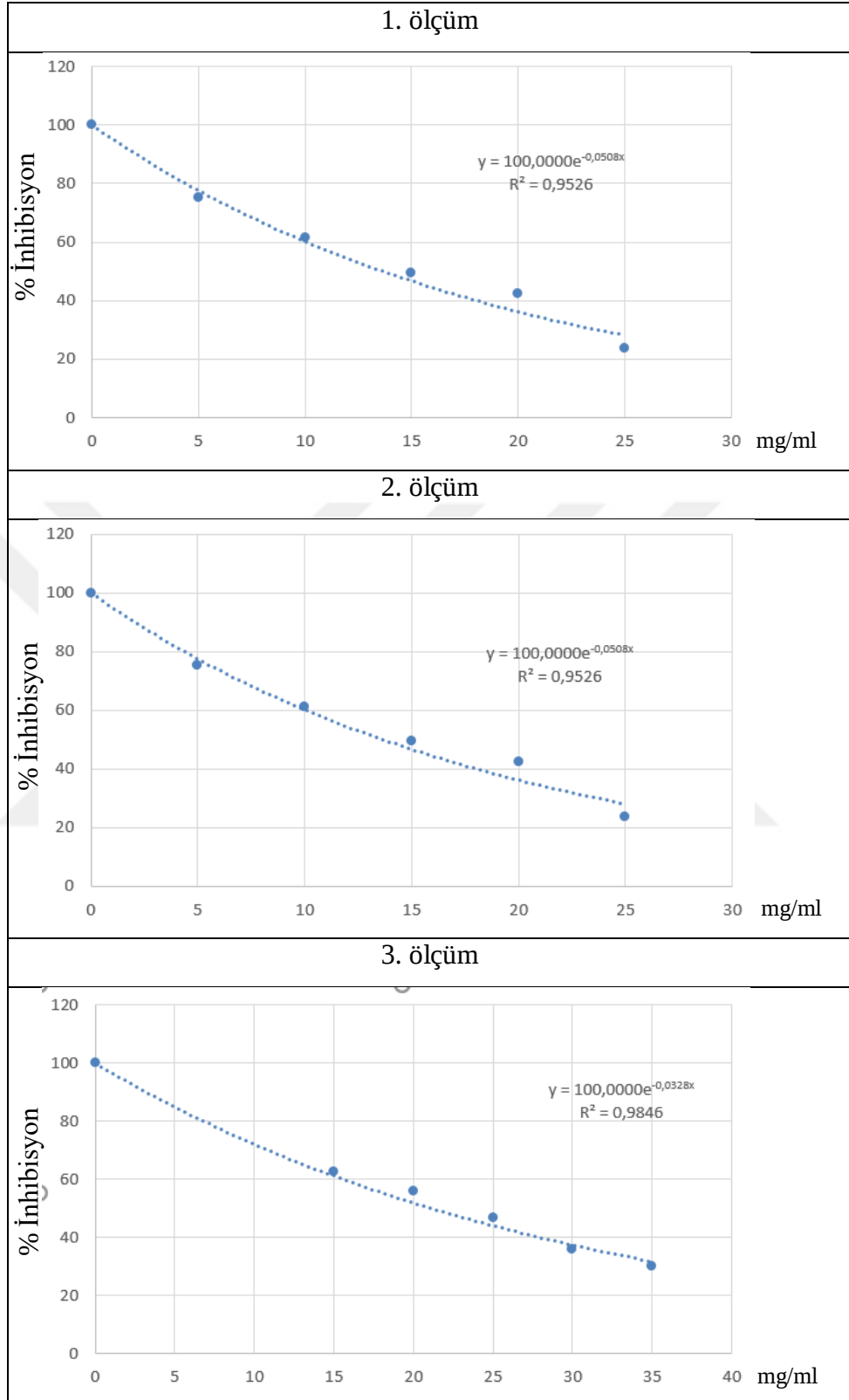
Çizelge 4.3'deki verilere göre saflaştırılan saf maddelerden İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit), İG-2 (tetratriakontan) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit)'ün BChE enzimi için IC₅₀ değerleri sırasıyla 1,98±0,019; 1,45±0,010 ve 1,58±0,021 μ M olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol takrin (IC₅₀: 3,21±0,041 nM) ile kıyaslandığında orta düzeyde inhibisyon etkiye sahip olduğu belirlenen İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit), İG-2 (tetratriakontan) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit)'ün özellikle BChE enzimi üzerinde daha güçlü olarak inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Flavonoit karışımı olan İG-3 ise BChE enzimi için IC₅₀: 21,08±0,109 değeri ile saf maddelerden daha düşük inhibisyon etkisi göstermiştir. Benzer şekilde saf maddeler İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit), İG-2 (tetratriakontan) ve İG-4 (luteolin 7-O-glukozit)'ün AChE enzimi için IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,102±0,038; 5,26±0,113 ve 3,04±0,127 μ M olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol takrin (IC₅₀: 3,73±0,050 nM) ile kıyaslandığında orta düzeyde inhibisyon etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Karışım olan İG-3 ise AChE enzimi için IC₅₀: 18,56±3,48 değeri ile saf maddelerden daha düşük inhibisyon etkisi göstermiştir.



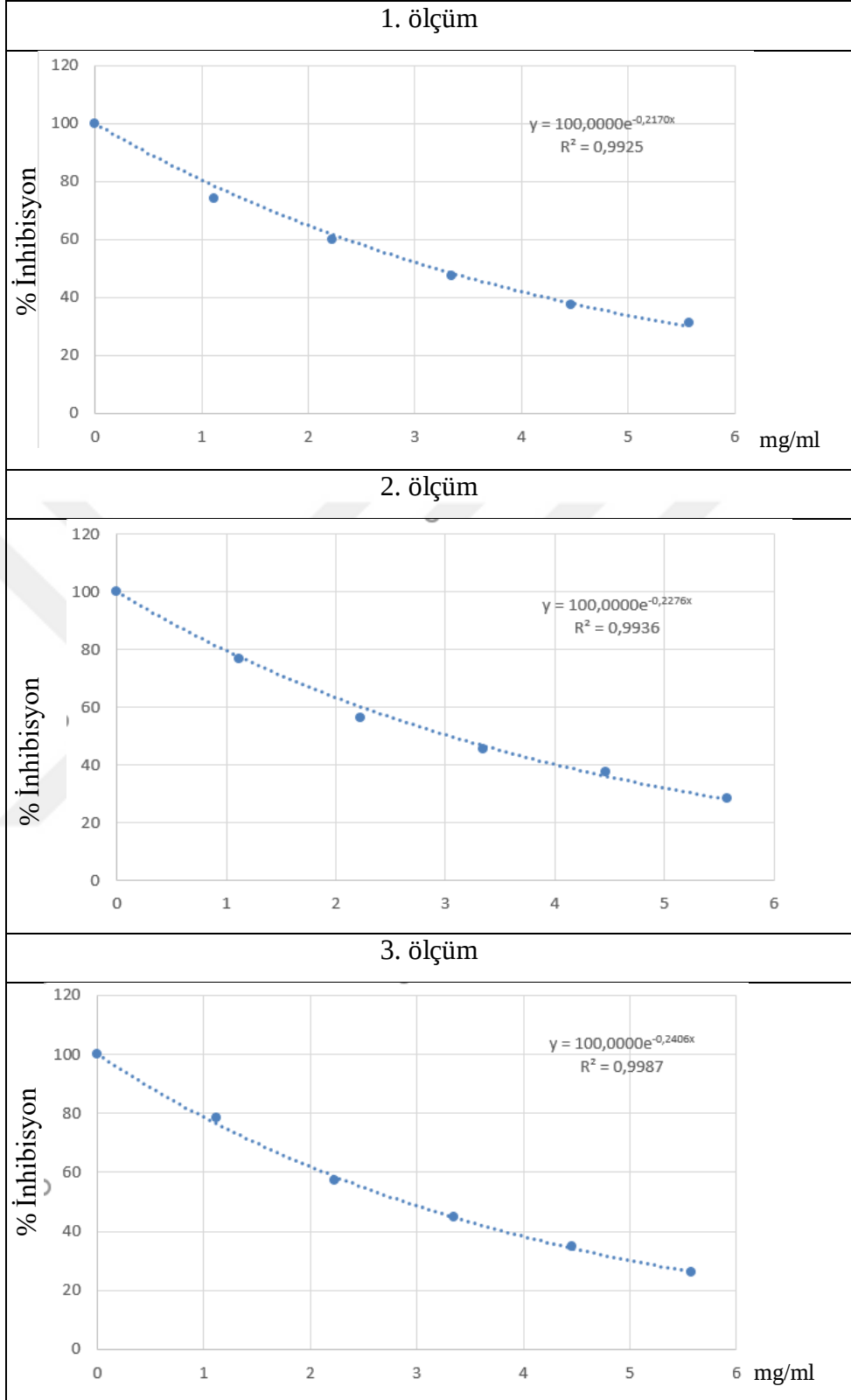
Şekil 4.20. İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) için AChE %aktivite ölçüm sonuçları



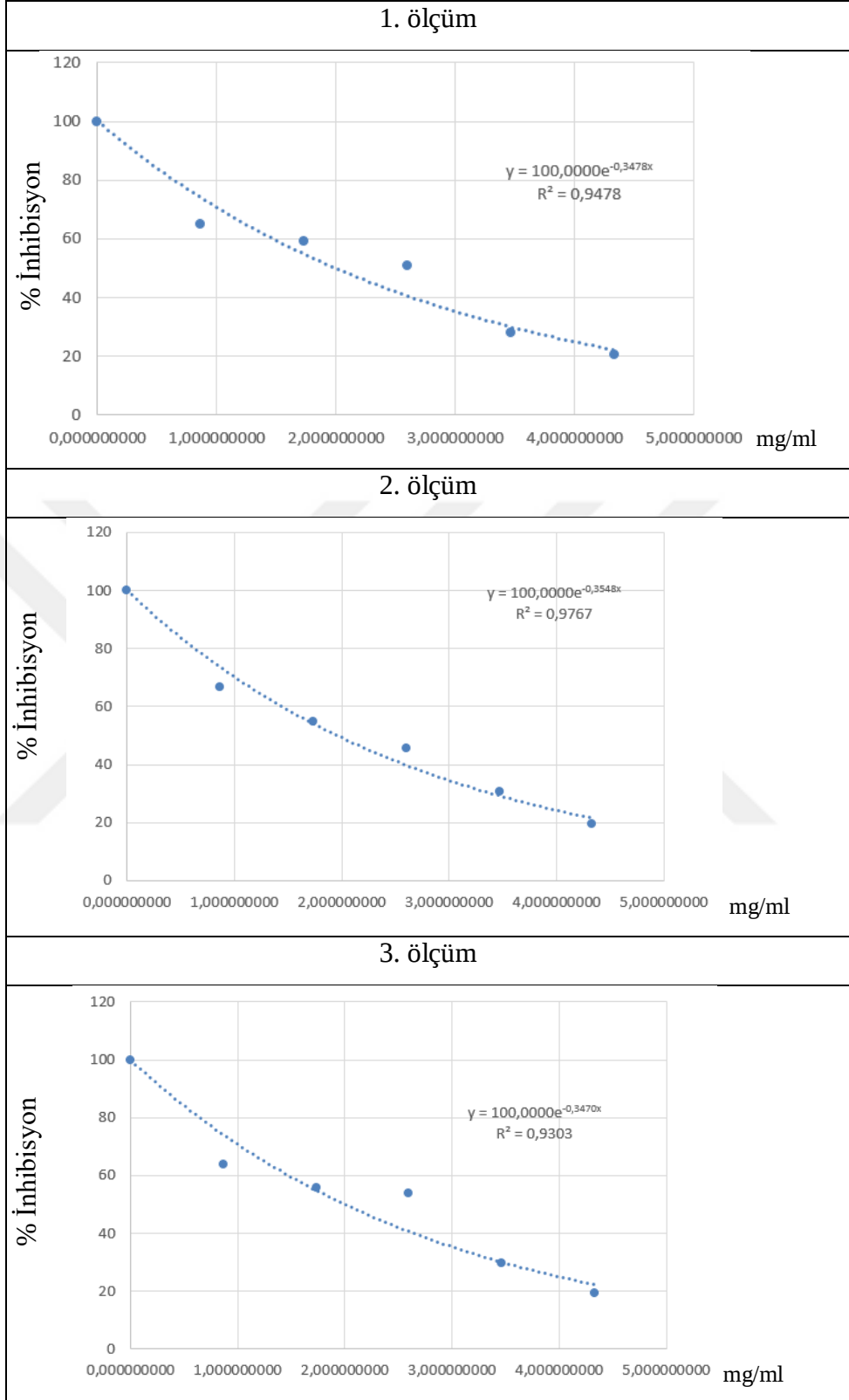
Şekil 4.21. İG-2 (Tetratriakontan) için AChE %aktivite ölçüm sonuçları



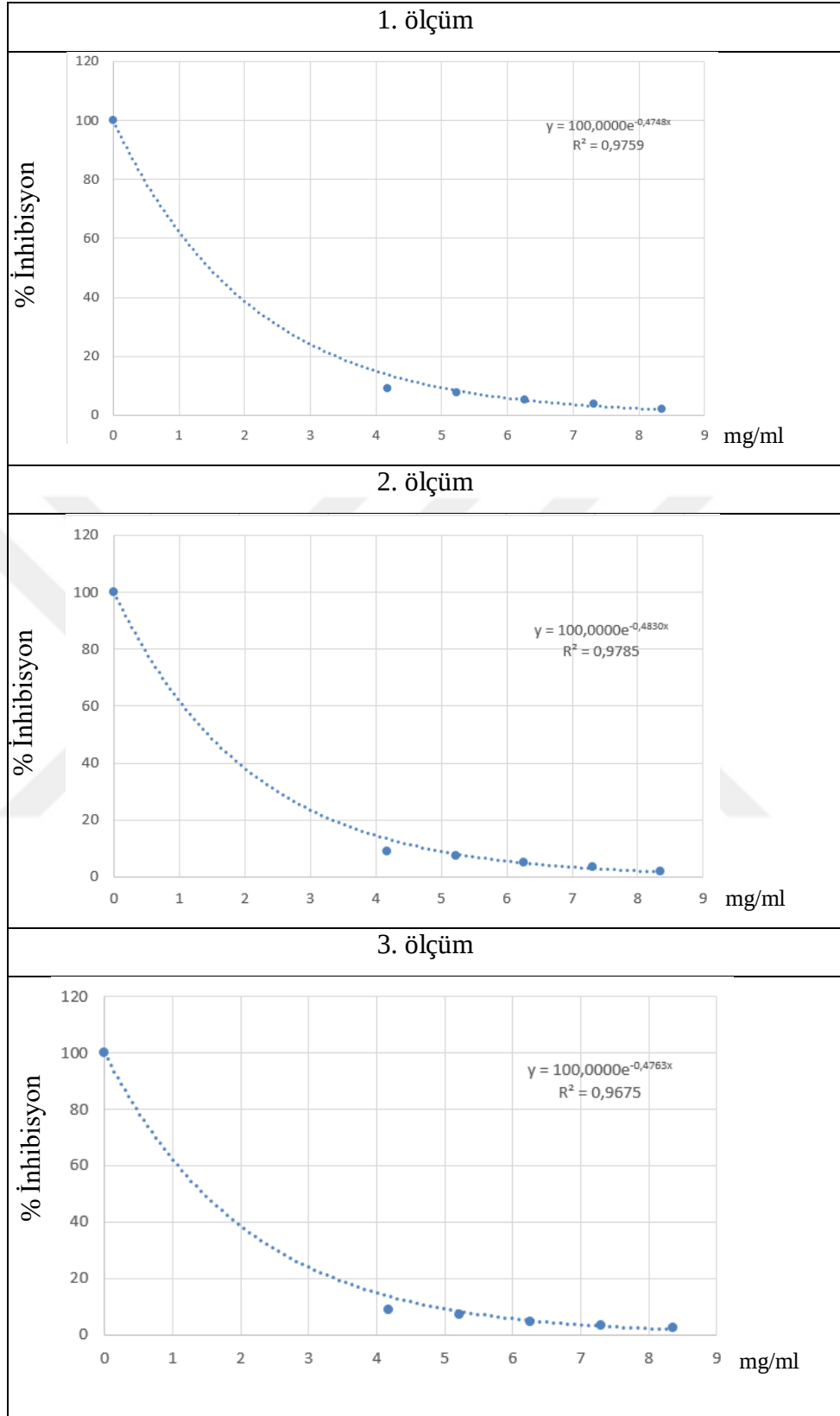
Şekil 4.22. İG-3 (flavonoit karışımı) için AChE %aktivite ölçüm sonuçları



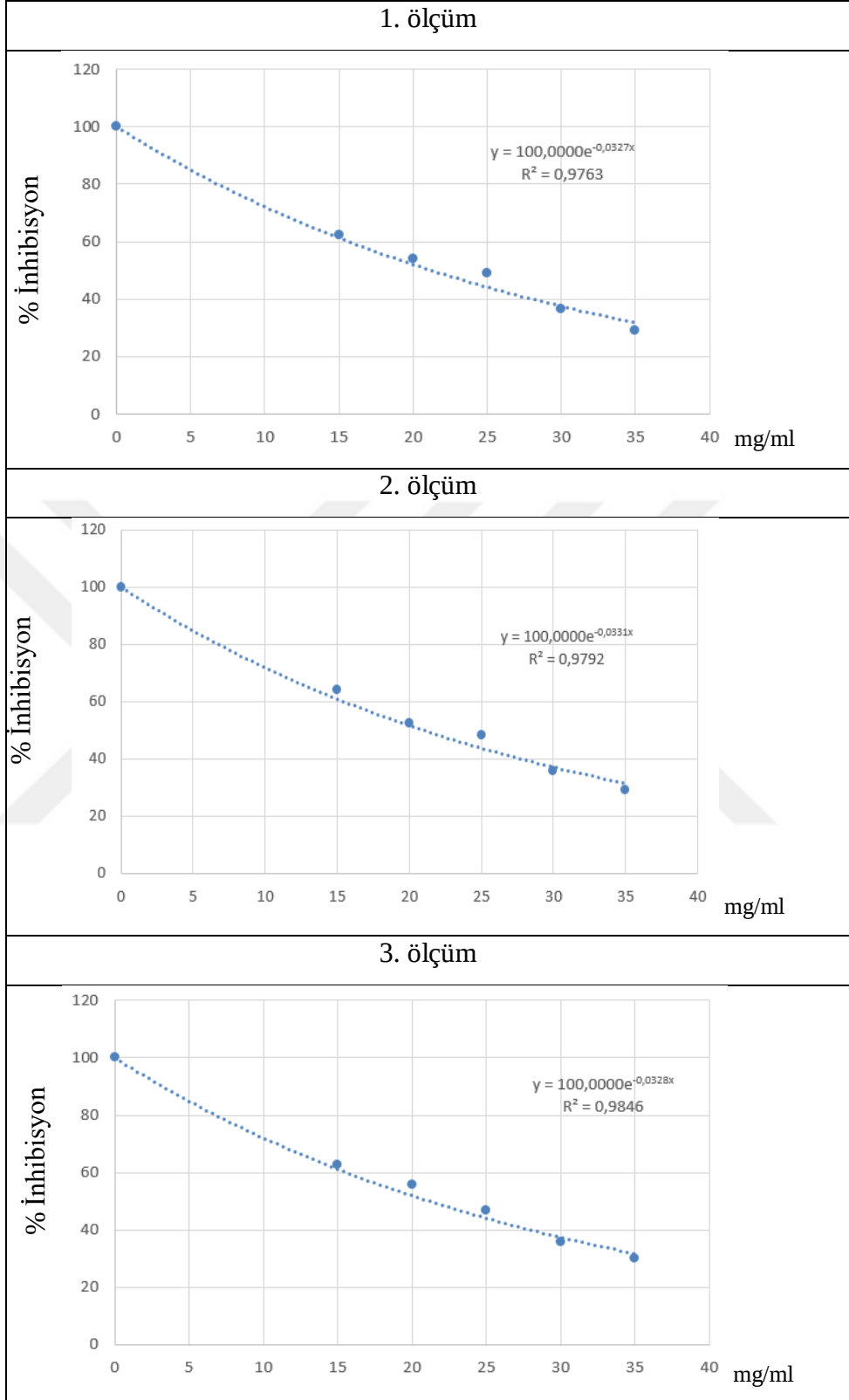
Şekil 4.23. İG-4 (Luteolin 7-O-glukozit) için AChE %aktivite ölçüm sonuçları



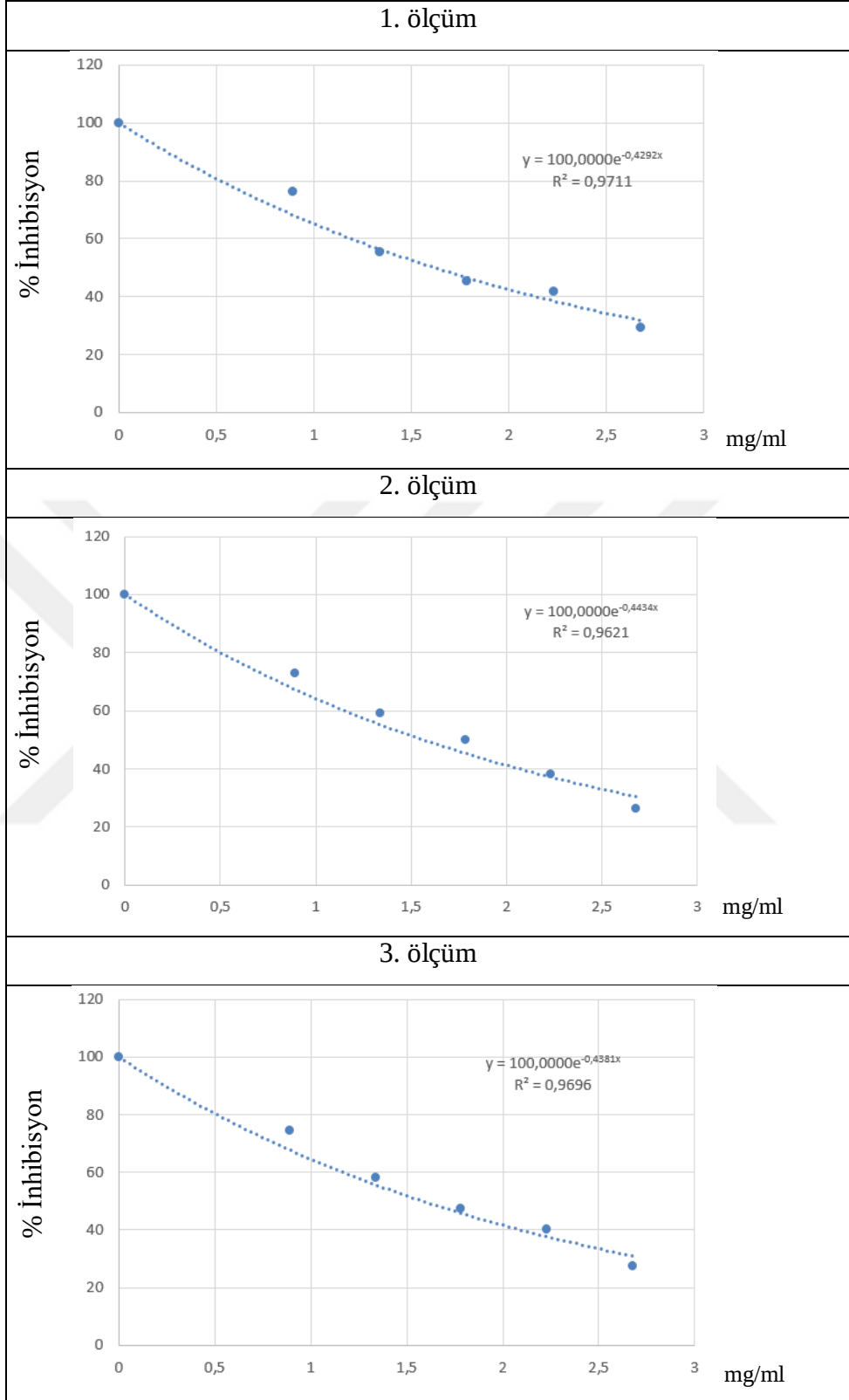
Şekil 4.24. İG-1 (β -Sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit) için BChE %aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.25. İG-2 (Tetratriakontan) için BChE %aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.26. İG-3 (flavonoit karışımı) için BChE %aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.27. İG-4 (Luteolin 7-O-glukozit) için BChE %aktivite ölçüm sonuçları

4.2.3. Saf maddelerin α -glikozidaz enzimi inhibisyonu sonuçları

Saflaştırılan maddelerin tümünün α -glikozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği tespit edildi.



BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında ilk defa *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* bitkisinden biyolojik aktivite gösterebilecek metabolitlerin izolasyonu yapıldı. Çalışmada *I. glauca*'nın diklorometan:metanol (50:50) ekstresinden İTK ve SKK yöntemleriyle İG-1, İG-2 ve İG-4 kodlu 3 saf madde izole edildi ve maddelerin kimyasal yapıları 1D ve 2D NMR spektroskopik yöntemleriyle karakterize edildi. Saflaştırılan İG-1, İG-2 ve İG-4 kodlu maddelerin kimyasal yapıları sırasıyla β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit, tetratriakontan ve luteolin-7-O-glukozit olarak karakterize edildi. Ayrıca saflaştırılan İG-3 kodlu maddenin bir flavonoit karışımı olduğu gözlemlendi.

Çalışmada izole edilen İG-1 kodlu β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit maddesi bir bitki sterolü glikozitidir. Fitosteroller olarak da adlandırılan sterollerin, çeşitli bitki ve deniz ürünlerinde 250'den fazla farklı türü olduğu rapor edilmiştir. En yaygın steroller sitosterol, stigmasterol ve kampesteroldür (4-desmetilsteroller). Stigmasterol ve β -sitosterol, yapısal olarak kolesterole benzeyen ve bitkilerde, mantarlarda ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir (Piironen *et al.* 2000; Gazzero *et al.* 2012). Literatürde β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit bileşiği çok sayıda bitkiden izole edilmiştir. *Cussonia paniculata*, *Symplocos racemosa*, *Ceratonia siliqua* L., *Liriope muscari*, *Thymelaea microphylla* bunlardan bazılarıdır (Ahmad *et al.* 2003; Dovgii *et al.* 2005; Gohar *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2012; Ghanem *et al.* 2014).

Sitosterol bitki materyallerinde bulunan temel steroldür ancak 22-dehidro analogu stigmasterol ve kampesterolün yanı sıra brassica- ve avena- sterolleri de birçok bitki materyalinde bulunur. Sterollerin sentetik türevleri statinler olarak bilinir ve kolesterol düşürücü ilaçlar olarak kullanılırlar. Kolesterol düşürücü ilaçlar kullanılarak kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan morbidite ve mortalite önemli ölçüde azaldığından, bitki sterollerine olan ilgi, bunların doğal bir koruyucu

diyet ürünü olarak hareket etme potansiyeline dayanmaktadır (Piironen *et al.* 2000; Gazzerro *et al.* 2012). Sterol glikoziti, kolesterolün kolesterol esterifikasyonuna girişini engelleyen hidrofilik glikoz grubuna sahiptir. Avrupa Gıda ve Güvenlik Otoritesi (EFSA), kan basıncını düşürmek için günde yaklaşık 1,5 ila 2-4 g fitosterol tüketilmesini önermektedir. Ayrıca Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), fitosterol esterleri içeren gıdaların ve düşük doymuş yağ ve kolesterol diyetinin kalp krizi riskini azaltmadaki rolünü onaylamıştır (FDA 2010; Gerlach *et al.* 2010; Saeidnia *et al.* 2014; Lou *et al.* 2015). β -sitosterol-3-O- β -D-glikozit, nitrik oksit in aşırı üretiminin eşlik ettiği endotoksemi ve inflamasyonu tedavi etmek için yeni ilaçların geliştirilmesinde yararlı bir aday olarak önerilmiştir. Bu bileşiğin, lipopolisakarit kaynaklı RAW 264.7 hücrelerinden nitrik oksit üretimini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca uyarılmış makrofajların interlökin 6 aktivitelerini güçlü bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Kontogiorgis *et al.* 2010; Gautam *et al.* 2012).

İG-2 olarak kodlanan tetratriakontan bileşiği bu çalışmada ilk defa *I. glauca*'dan izole edilmiştir. Aşağıda literatürde tetratriakontan ile ilgili yapılan çalışmalardan bazıları belirtilmiştir.

Bir hidrokarbon yapısına sahip olan tetratriakontanın önceki çalışmalarda *Plantago lanceolata*, *Hardwickia binata* ve *Drymaria cordata* (Linn.) Willd.'in kimyasal bileşenleri arasında bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda bileşiğin antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. (Khan and Javaid, 2021; Manimegalai *et al.* 2023; Arya *et al.* 2023). *Hedera helix*'in endofitik mantarı *Aspergillus cejpaii*'den izole edilen tetratriakontan, bu çalışmada ikinci en yüksek miktarda bulunan hidrokarbon olarak rapor edilmiştir (Osama *et al.* 2024). Tetratriakontanın ayrıca *Sansevieria zeylanica* bitkisinin yapraklarından izole edildiği rapor edilmiştir (Nambiar and Shafi, 1999). GC-MS ile yapılan analizlerde tetratriakontanın *Rhizophora x annamalayana*'da %8,43 oranında, kırmızı alg *Jania rubens*'de %5,58 oranında, *Pergularia daemia*'da %0,17 oranında bulunduğu tespit edilmiştir (Karabay-Yavasoglu *et al.* 2006; Saranya *et al.* 2015; Pallavi *et al.* 2020). *Nicotiana* türlerinden *N. rustica* and *N. tabacum*'da sırasıyla %14,5 ve %15 oranlarında tetratriakontan tespit edilmiştir (Popova *et al.* 2020).

Çalışmada luteolin-7-*O*-glukozit olarak karakterize edilen saf madde **İG-4** olarak kodlanmıştır. Luteolin, taze bitkilerde yaygın olarak bulunan ve bitki krallığında yaygın olarak görülen sarı renkli flavon tipinde bir flavonoiddir. 2-fenilbenzo- γ -piron'un diğer türevlerine benzer şekilde, temel iskeleti, iki benzen halkası ve C2-C3 çift karbon bağına ve bir oksijen atomuna sahip bir köprü içeren karakteristik bir C6-C3-C6 sistemine sahiptir (Bravo, 1998; López-Lázaro, 2009; Szultka *et al.* 2013; Nabavi *et al.* 2015; Juszczak *et al.* 2019). Luteolinin *O*-glikozitlerinin önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. Aşağıda luteolin-7-*O*-glukozitin biyolojik aktiviteleri üzerine bazı çalışmalar sıralanmıştır.

Birçok çalışmada çeşitli bitkilerden izole edilen luteolin-7-*O*-glukozitin antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. *Santolina chamaecyparissus* L., *Washingtonia filifera*, *Helichrysum compactum*, *Sonneratia caseolaris*, *Platycodon grandiflorum*, *Alchemilla mollis* (Buser), *Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvel. cv. Gongju bitkileri bunlardan bazılarıdır (Süzgeç *et al.* 2005; El-Sayed *et al.* 2006; Jeong *et al.* 2010; Limmatvapirat *et al.* 2011; Karatoprak *et al.* 2017; Boudoukha *et al.* 2018; Ma *et al.* 2021).

Hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada luteolin-7-*O*-glukozit, ağız kanseri prognozunu iyileştirmek için klinik olarak kullanılabilecek potansiyel bir anti-kanser aday olarak tanımlanmıştır (Velmurugan *et al.* 2020). Diğer bir çalışmada luteolin-7-*O*-glukozitin, inflamatuvar araçların ve faz II enzimlerinin düzenlenmesi yoluyla GalN/LPS kaynaklı hepatotoksositeye karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (Park and Song, 2019).

Luteolin-7-*O*-glukozitin ticari olarak satın alınarak kullanıldığı bir çalışmada insan nazofaringeal karsinomunda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve AKT sinyal yolağıyla apoptozu modüle ettiği rapor edilmiştir (Ho *et al.* 2021).

Bu tez çalışmanın ikinci aşamasında biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla *I. glauca* bitkisinden izole edilen **İG-1** (β -sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozit), **İG-2** (tetratriakontan) ve **İG-4** (luteolin-7-*O*-glukozit) saf maddeleri ile **İG-3** (flavonoit karışımı) karışımının hCA-I, hCA-II, AChE, BChE ve α -glikozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi, Üç defa tekrarlanarak gerçekleştirilen çalışmalarda IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı.

Karbonik anhidraz inhibisyon çalışmalarına göre en güçlü inhibisyon etkisini **İG-4** kodlu luteolin 7-O-glukozitin, hCA-I izoenzimi üzerinde gösterdiği tespit edildi. Diğer taraftan pozitif kontrol AZA ile kıyaslandığında hem **İG-1** kodlu β -sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit hem de **İG-4** kodlu luteolin 7-O-glukozit orta düzeyde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi.

İzole edilen saf maddeler **İG-1** (β -sitosterol 3-O- β -D-glikopiranozit), **İG-2** (tetratriakontan) ve **İG-4** (luteolin 7-O-glukozit)'ün kolinesteraz inhibisyon çalışmalarında pozitif kontrol takrin ile kıyaslandığında orta düzeyde inhibisyon etkiye sahip oldukları tespit edildi. Bir flavonoit karışımı olan **İG-3**'ün ise AChE enzimi için saf maddelerden daha düşük inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Diğer taraftan özellikle BChE enzimi üzerinde izole edilen dört maddenin de daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi.

Biyolojik aktivite çalışmalarında maddelerin α -glukozidaz üzerine hiçbir inhibisyon etkisi göstermediği tespit edildi.

Bu çalışmada *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. *glauca* bitkisinin ilk defa fitokimyasal içeriği belirlenmiş oldu. Bitkinin topraküstü kısımlarının özellikle flavonoitlerce zengin olduğu tespit edildi. Aynı zamanda ilk defa bitkinin fitokimyasallarının AChE, BChE, hCA-I, hCA-II ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı.

Bitki üzerinde saflaştırma ve enzim inhibisyon etki çalışmaları devam ettirilecektir.

6. KAYNAKÇA

- Ahmad, V. U., Zubair, M., Abbasi, M. A., Kousar, F., Ullah, F., Fatima, N., & Choudhary, M. I. (2005). Phenolic glycosides from *Symplocos racemosa*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 60(10), 1101-1104. of glycosides A, B 1, B 2, C, D, G 2, H 1, and H 2 from Leaves of *Cussonia paniculata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 200-204.
- Aichele, D. (1987). *Che fiore è?* Biblioteca Universale Rizzoli: Milano, Italy, p. 114.
- Akeroid, J.R. *Isatis linnaeus*. In *The European Garden Flora*; Cullen, J., Alexander, J.C.M., Brady, A., Brickell, C.D., Green, P.S., Heywood, V.H., Jørgensen, P.M., Jury, S.L., Knees, S.G., Leslie, A.C., et al., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2002; Volume IV, p. 135.
- Akıncıoğlu, A., Göksu, S., Naderi, A., Akıncıoğlu, H., Kılınç, N., & Gülçin, İ. (2021). Cholinesterases, carbonic anhydrase inhibitory properties and in silico studies of novel substituted benzylamines derived from dihydrochalcones. *Computational Biology and Chemistry*, 94, 107565.
- Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A., & Kellogg, E. A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259, 89-120.
- Armstrong, J. M., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., & Edsall, J. T. (1966). Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *Journal of Biological Chemistry*, 241(21), 5137-5149.
- Arya, A., Kumar, S., Kain, D., Ahanger, A. M., Suryavanshi, A., & Vandana. (2023). Unfolding the Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Drymaria cordata* (Linn.) Willd. against chloramphenicol-resistant *Bacillus subtilis* and β -lactams-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Vegetos*, 1-10.
- Aslam, S., & Gupta, V. (2020). Carbonic anhydrase inhibitors.
- Aydin, T., Cakir, A., Kazaz, C., Bayrak, N., Bayir, Y., & Taşkesenligil, Y. (2014). Insecticidal metabolites from the rhizomes of *Veratrum album* against adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Chemistry & Biodiversity*, 11(8), 1192-1204.
- Bal, S., Kaya, R., Gök, Y., Taslimi, P., Aktaş, A., Karaman, M., & Gülçin, İ. (2020). Novel 2-methylimidazolium salts: Synthesis, characterization, molecular docking, and carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*, 94, 103468.
- Ball, P.W. (1964). *Isatis* L. In *Flora Europaea*; Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, Volume I, pp. 268–269
- Bayrak, C., Taslimi, P., Karaman, H. S., Gulcin, I., & Menzek, A. (2019). The first synthesis, carbonic anhydrase inhibition and anticholinergic activities of some bromophenol derivatives with S including natural products. *Biorganic Chemistry*, 85, 128-139.

- Bilginer, S., Anil, B., Koca, M., Demir, Y., & Gülçin, İ. (2021). Novel Mannich bases with strong carbonic anhydrases and acetylcholinesterase inhibition effects: 3-(aminomethyl)-6-{3-[4-(trifluoromethyl) phenyl] acryloyl}-2 (3H)-benzoxazolones. *Turkish Journal of Chemistry*, 45(3), 805-818.
- Blackburn, R. S., Bechtold, T., & John, P. (2009). The development of indigo reduction methods and pre-reduced indigo products. *Coloration Technology*, 125(4), 193-207.
- Boudoukha, C., Bouriche, H., Elmastas, M., Aksit, H. Ü. S. E. Y. İ. N., Kayir, O., & Genc, N. (2018). Antioxidant activity of polyphenolic leaf extract from *Santolina chamaecyparissus* L.(Asteraceae) and the isolated luteolin-7-O-glucoside. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 22(3).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Buhner, S.H. (2013). *Herbal Antivirals: Natural Remedies for Emerging, Resistant and Epidemic Viral Infections*; Storey Publishing: North Adams, MA, USA, pp. 192–208. Buhner, S. H. (2021). *Herbal Antivirals: Natural Remedies for Emerging & Resistant Viral Infections*. Storey Publishing.
- Burmaoglu, S., Kazancioglu, E. A., Kazancioglu, M. Z., Sağlamtaş, R., Yalcin, G., Gulcin, I., & Algul, O. (2022). Synthesis, molecular docking and some metabolic enzyme inhibition properties of biphenyl-substituted chalcone derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1254, 132358.
- Capasso, C., & Supuran, C. T. (2014). Sulfa and trimethoprim-like drugs—antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(3), 379-387.
- Chan, H. L., Yip, H. Y., Mak, N. K., & Leung, K. N. (2009). Modulatory effects and action mechanisms of tryptanthrin on murine myeloid leukemia cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(5), 335–342. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.44>
- Chang, C. F., Hsu, Y. L., Lee, C. Y., Wu, C. H., Wu, Y. C., & Chuang, T. H. (2015). Isolation and cytotoxicity evaluation of the chemical constituents from *Cephalantheropsis gracilis*. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 3980–3989. <https://doi.org/10.3390/ijms16023980>
- Charles, W.. 2009. *Trease and Evans Pharmacognosy*, Toronto, Sixteenth Edition, 603.
- Chen, G. S., & Segel, I. H. (1968). Purification and properties of glycogen phosphorylase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 127, 175-186.
- Cooperative Group of Clinical Therapy of Indirubin. (1980). Clinical studies of 314 cases of CML treated with indirubin. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 1, 132–135.
- D'Ambrosio, K., Carradori, S., Cesa, S., Angeli, A., Monti, S. M., Supuran, C. T., & De Simone, G. (2020). Catechols: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications*, 56(85), 13033-13036.

- Danz, H., Stoyanova, S., Thomet, O. A., Simon, H. U., Dannhardt, G., Ulbrich, H., & Hamburger, M. (2002). Inhibitory activity of tryptanthrin on prostaglandin and leukotriene synthesis. *Planta Medica*, 68(10), 875-880.
- de Melo, J. S. S., Rondão, R., Burrows, H. D., Melo, M. J., Navaratnam, S., Edge, R., & Voss, G. (2006). Spectral and photophysical studies of substituted indigo derivatives in their keto forms. *ChemPhysChem*, 7(11), 2303-2311.
- del Castillo, M. D., Martinez-Saez, N., Amigo-Benavent, M., & Silvan, J. M. (2013). Phytochemomics and other omics for permitting health claims made on foods. *Food research international*, 54(1), 1237-1249.
- Demirci, T., Arslan, M., Bilen, Ç., Demir, D., Genç, N., & Arslan, O. (2014). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of 1, 3-dicarbonyl derivatives of methylaminobenzene-sulfonamide. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(1), 132-136.
- Dovgii, I. I., Grishkovets, V. I., Kachala, V. V., & Shashkov, A. S. (2005). Triterpene glycosides from *Cussonia paniculata*. I. Isolation and structure determination of glycosides A, B 1, B 2, C, D, G 2, H 1, and H 2 from Leaves of *Cussonia paniculata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 200-204.
- Duke, J.A., & Ayensu, E.S. (1985). *Medicinal Plants of China*; Reference Publications, Inc.: Algonac, MI, USA, p. 210. Zhu, Y.P. (1998). *Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and Applications*; Harwood Academic Publishers:Amsterdam, The Netherlands, pp. 185–189
- Eisenbrand, G., Hippe, F., Jakobs, S., & Muehlbeyer, S. (2004). Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 130, 627-635.
- El-Sayed, N. H., Ammar, N. M., Al-Okbi, S. Y., El-Kassem, L. A., & Mabry, T. J. (2006). Antioxidant activity and two new flavonoids from *Washingtonia filifera*. *Natural Product Research*, 20(1), 57-61.
- Enez, N. (1987). *Tabii Boyamacılık*, M.Ü. Güzel Sanatlar Fakültesi Yayınları, Nu: 1, İstanbul
- Erurygur, N., Koçyiğit, U. M., Taslimi, P., Ataş, M. E. H. M. E. T., Tekin, M., & Gülçin, İ. (2019). Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract. *South African Journal of Botany*, 120, 141-145.
- European Pharmacopoeia, (2017). European Directorate for the Quality of Medicines. *Isatis root (Isatidis radix)*. In *European Pharmacopoeia*, 9th ed., Strasburg, Germany, pp. 1399–1400
- Evans, W. C. (2009). *Trease and Evans' pharmacognosy*. Elsevier Health Sciences.
- Gai, Q. Y., Jiao, J., Wang, X., Zang, Y. P., Niu, L. L., & Fu, Y. J. (2019). Elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures by salicylic acid and methyl jasmonate for the enhanced production of pharmacologically active alkaloids and flavonoids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137, 77-86.

- Garibov, E., Taslimi, P., Sujayev, A., Bingol, Z., Çetinkaya, S., Gulçin, İ., Beydemir, S., Farzaliyev, V., Alwasel, S. H., Supuran, C. T. (2016). Synthesis of 4, 5-disubstituted-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidines and investigation of their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, carbonic anhydrase I/II inhibitory and antioxidant activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup3), 1-9.
- Garland, S. (1988). *Il Giardino Delle Aromatiche*. Centro botanico.
- Gautam, S. S., Navneet, & Kumar, S. (2012). The antibacterial and phytochemical aspects of *Viola odorata* Linn. extracts against respiratory tract pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 82, 567-572.
- Gazzerro, P., Proto, M. C., Gangemi, G., Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Pisanti, S., Santoro, A., Laezza, C., Bifulco, M. (2012). Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 102-146.
- Gerlach, S. L., Rathinakumar, R., Chakravarty, G., Göransson, U., Wimley, W. C., Darwin, S. P., & Mondal, D. (2010). Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin O2 from *Viola odorata* and psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. *Peptide Science*, 94(5), 617-625.
- Ghanem, H., Haba, H., Marcourt, L., Benkhalel, M., & Wolfender, J. L. (2014). Microphynolides A and B, new spiro- γ -lactone glycosides from *Thymelaea microphylla*. *Natural Product Research*, 28(20), 1732-1738.
- Gohar, A., Gedara, S. R., & Baraka, H. N. (2009). New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. *J Med Plants Res*, 3(5), 424-8.
- Göke, B., Fuder, H., Wieckhorst, G., Theiss, U., Stridde, E., Littke, T., Kleist, P., Arnold, R., Lückner, P. W. (1995). Voglibose (AO-128) is an efficient α -glucosidase inhibitor and mobilizes the endogenous GLP-1 reserve. *Digestion*, 56(6), 493-501.
- Gul, H. I., Tugrak, M., Sakagami, H., Taslimi, P., Gulcin, I., & Supuran, C. T. (2016). Synthesis and bioactivity studies on new 4-(3-(4-Substitutedphenyl)-3a, 4-dihydro-3 H-indeno [1, 2-c] pyrazol-2-yl) benzenesulfonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1619-1624.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Akıncıoğlu, H., Koksall, Z., Turkan, F., & Alwasel, S. (2016). The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, glutathione S-transferase, lactoperoxidase, and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1095-1101.
- Hamburger, M. (2002). *Isatis tinctoria*—From the rediscovery of an ancient medicinal plant towards a novel anti-inflammatory phytopharmaceutical. *Phytochemistry Reviews*, 1, 333-344.
- Han, J., Jiang, X., & Zhang, L. (2011). Optimisation of extraction conditions for polysaccharides from the roots of *Isatis tinctoria* L. by response surface methodology and their in vitro free radicals scavenging activities and effects on IL-4 and IFN- γ mRNA expression in chicken lymphocytes. *Carbohydr. Polym.*, 86, 1320–1326.

- Han, L., Fang, C., Zhu, R., Peng, Q., Li, D., & Wang, M. (2017). Inhibitory effect of phloretin on α -glucosidase: Kinetics, interaction mechanism and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 520-527.
- Harvey, J. (1996). *Traditional Textiles of Central Asia*, Thames and Hundson Ltd., London, 19, 137–142
- Heinemann, C., Schliemann-Willers, S., Oberthür, C., Hamburger, M., & Elsner, P. (2004). Prevention of experimentally induced irritant contact dermatitis by extracts of *Isatis tinctoria* compared to pure tryptanthrin and its impact on UVB-induced erythema. *Planta medica*, 70(05), 385-390.
- Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ., & Supuran, C. T. (2005). Effects of low molecular weight plasma inhibitors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity in vitro and rat erythrocytes in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(1), 35-39.
- Ho, H. Y., Chen, P. J., Lo, Y. S., Lin, C. C., Chuang, Y. C., Hsieh, M. J., & Chen, M. K. (2021). Luteolin-7-O-glucoside inhibits cell proliferation and modulates apoptosis through the AKT signaling pathway in human nasopharyngeal carcinoma. *Environmental Toxicology*, 36(10), 2013-2024.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J. A., Nobel, M. E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., & Meijer, L. (1999). Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology*, 1(1), 60–67. <https://doi.org/10.1038/9035>
- Huang, K.C. (1993). *The Pharmacology of Chinese Herbs*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 304–305
- Jiang, C., Liu, Z. H., Li, L., Lin, B. B., Yang, F., & Qin, M. J. (2012). A new eudesmane sesquiterpene glycosides from *Liriope muscari*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(5), 491-495.
- Josse, R. G., Chiasson, J. L., Ryan, E. A., Lau, D. C. W., Ross, S. A., Yale, J. F., Leiter, L.A., Maheux, P., Tessier, D., Wolever, T.M.S, Gerstein, H., Rodger, N.W., Dornan, J.M, Murphy L.J., Rabasa-Lhoret R., Meneilly, G.S.(2003). Acarbose in the treatment of elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 59(1), 37-42.
- Juszczak, A. M., Zovko-Končić, M., & Tomczyk, M. (2019). Recent trends in the application of chromatographic techniques in the analysis of luteolin and its derivatives. *Biomolecules*, 9(11), 731.
- Karabay-Yavasoglu, N. U., Sukatar, A., Ozdemir, G., & Horzum, Z. (2007). Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(2), 153-156.
- Karatoprak, Ş. G., İlgin, S., & Koşar, M. (2017). Phenolic Composition, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. *Chemistry & Biodiversity*, 14(9), e1700150.

- Kausar, N., Murtaza, S., Arshad, M. N., Munir, R., Saleem, R. S. Z., Rafique, H., & Tawab, A. (2021). Design, synthesis, structure activity relationship and molecular docking studies of thiophene-2-carboxamide Schiff base derivatives of benzohydrazide as novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1244, 130983.
- Kazancı, A., Gök, Y., Kaya, R., Aktaş, A., Taslimi, P., & Gülçin, İ. (2021). Synthesis, characterization and bioactivities of dative donor ligand N-heterocyclic carbene (NHC) precursors and their Ag (I) NHC coordination compounds. *Polyhedron*, 193, 114866.
- Kazancıoglu, E. A., & Senturk, M. (2020). Synthesis of N-phenylsulfonamide derivatives and investigation of some esterase enzymes inhibiting properties. *Biorganic Chemistry*, 104, 104279.
- Ke, L., Luo, S., Rao, P., Bradshaw, J. P., Sa'Adedin, F., Rappolt, M., & Zhou, J. (2021). An Evidence for a Novel Antiviral Mechanism: Modulating Effects of Arg-Glc Maillard Reaction Products on the Phase Transition of Multilamellar Vesicles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 629775.
- Kellogg, E.A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae(Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution* 259, 89-120
- Khan, I., & Javaid, A. (2021). Identification of biologically important compounds in neem leaves through GC-MS analysis. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3).
- Kim, K. S., Hwang, W. G., Jang, H. G., Heo, B. G., Suhaj, M., Leontowicz, H., Jastrzebski, Z., Tashma, Z., Gorinstein, S. (2012). Assessment of Indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) water extracts' bioactive compounds, and their antioxidant and antiproliferative activities. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 500-510.
- Kimoto T., Yamamoto Y., Hino K., Koay S., Aga H., Hashimoto T., & Hanaya T. (1999). Cytotoxic effects of substances in indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.) on malignant tumour cells. *Natural Medicine*, 53: 72–79.
- Koçancı, F. G. Aslım, B. (2016). Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Plants. *Manas Journal of Agriculture and Life Science* , vol.6, no.1, 19-35).
- Kontogiorgis, C. A., Bompou, E. M., Ntella, M., & Berghe, W. V. (2010). Natural products from Mediterranean diet: from anti-inflammatory agents to dietary epigenetic modulators. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 9(2), 101-124.
- Koya-Miyata, S., Kimoto, T., Micallef, M. J., Hino, K., Taniguchi, M., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, Kurimoto, M. (2001). Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors by a crude ethyl acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour. *Anticancer Research*, 21(5), 3295-3300.
- Kucuk, M., & Gulcin, İ. (2016). Purification and characterization of the carbonic anhydrase enzyme from Black Sea trout (*Salmo trutta* Labrax *Coruhensis*) kidney and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44, 134-139.

- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y. Z., Mandelkow, E. M., Eisenbrand, G., & Meijer, L. (2001). Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors?. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 251–260.
- Li, Z., Li, L., Zhou, H., Zeng, L., Chen, T., Chen, Q., Zhou, B., Wang, Y., Chen, Q., Hu, P., Yang, Z. (2017). Radix isatidis polysaccharides inhibit influenza A virus and influenza A virus-induced inflammation via suppression of host TLR3 signaling in vitro. *Molecules*, 22(1), 116.
- Limmatvapirat, C., Charoenteeraboon, J., Wetwitayaklung, P., Sukonpan, C., & Phaechamud, T. (2011). Stability and antioxidant activity of polyphenols in methanolic extracts of *Sonneratia caseolaris* seeds. *Advanced Materials Research*, 146, 1062-1065.
- López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31-59.
- Lou, T., Jiang, W., Xu, D., Chen, T., & Fu, Y. (2015). Inhibitory effects of polydatin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation*, 38, 1213-1220.
- Ma, Y. L., Sun, P., Feng, J., Yuan, J., Wang, Y., Shang, Y. F., Li, X., Yang, H. S., Wei, Z. J. (2021). Solvent effect on phenolics and antioxidant activity of Huangshan Gongju (*Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvel. cv. Gongju) extract. *Food and Chemical Toxicology*, 147, 111875.
- Mak, N.K. Leung, C.Y. Wei, X.Y. Shen, X.L. Wong, R.N.S. Leung, K.N. Fung, M.C. (2004). Inhibition of RANTES Expression by Indirubin in Influenza Virus-infected Human Bronchial Epithelial Cells. *Biochemical Pharmacology* 67(1), 167–74.
- Manimegalai, P., Selvam, K., Prakash, P., Kirubakaran, D., Shivakumar, M. S., & SenthilNathan, S. (2023). In-vitro antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory and In-silico ADMET, molecular docking study on *Hardwickia binata* phytochemicals with potential inhibitor of skin cancer protein. *In Silico Pharmacology*, 11(1), 25.
- Marchese, E. P. (1991). *Piante e fiori dell'Etna* (Vol. 2). Sellerio.
- Maren, T. H. (1960). A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130(1), 26-29.
- Marko, D., Schätzle, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zankl, H., Meijer, L., & Eisenbrand, G. (2001). Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *British Journal of Cancer*, 84(2), 283–289. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1546>
- Meijer, L., Shearer, J., Bettayeb, K., & Ferandin, Y. (2007, November). Diversity of the intracellular mechanisms underlying the anti-tumor properties of indirubins. In *International Congress Series* (Vol. 1304, pp. 60-74). Elsevier.

- Mısırdalı, H. (1985). Taxonomic and cytological investigations on the species of *Isatis* L., grown in the Eastern and South Eastern Anatolia and over the regions of Eastern Mediterranean. *TUBITAK Project No: TBAG-535, Eskisehir, Turkey*.
- Miao, S., Shi, X., Zhang, H., Wang, S., Sun, J., Hua, W., Miao, Q., Zhao, Y., & Zhang, C. (2011). Proliferation-attenuating and apoptosis-inducing effects of tryptanthrin on human chronic myeloid leukemia K562 cell line in vitro. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 3831–3845. <https://doi.org/10.3390/ijms12063831>
- Miceli, N., Filocamo, A., Ragusa, S., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., Celano, M., Maggisano, V., & Taviano, M. F. (2017). Chemical Characterization and Biological Activities of Phenolic-Rich Fraction from Cauline Leaves of *Isatis tinctoria* L. (Brassicaceae) Growing in Sicily, Italy. *Chemistry & biodiversity*, 14(8), 10.1002/cbdv.201700073.
- Mohn, T., Plitzko, I., & Hamburger, M. (2009). A comprehensive metabolite profiling of *Isatis tinctoria* leaf extracts. *Phytochemistry*, 70(7), 924–934. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.019>
- Monograph. *Isatis tinctoria*. *Altern. Med. Rev.* 2002, 7, 523–524
- Nabavi, S. F., Braid, N., Gortzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Woźniak, K., & Nabavi, S. M. (2015). Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*, 119, 1-11.
- Nambiar, M. G., & Shafi, P. M. (1999). Chemical Investigation of *Sansevieria zeylanica* leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 11(3), 1061.
- Nar, M., Çetinkaya, Y., Gülçin, İ., & Menzek, A. (2013). (3, 4-Dihydroxyphenyl)(2, 3, 4-trihydroxyphenyl) methanone and its derivatives as carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(2), 402-406.
- Nguyen T.K., Jamali A., Grand E., Morreel K., Marcelo P., Gontier E., & Dauwe R. (2017). Phenylpropanoid profiling reveals a class of hydroxycinnamoyl glucaric acid conjugates in *Isatis tinctoria* leaves. *Phytochemistry*, 144:127-140. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.09.007
- Osama, S., El Sherei, M., Al-Mahdy, D. A., Bishr, M., Salama, O., & Raafat, M. M. (2024). Antimicrobial activity of spiculisporeic acid isolated from endophytic fungus *Aspergillus cepii* of *Hedera helix* against MRSA. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(1), 515-527.
- Ozgun, D. O., Yamali, C., Gul, H. I., Taslimi, P., Gulcin, I., Yanik, T., & Supuran, C. T. (2016). Inhibitory effects of isatin Mannich bases on carbonic anhydrases, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1498-1501.
- Özbek, Ö., Görgülü, E., Yıldırım, Ş. (2013). Genetic diversity in populations of *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. ssp. from Central Anatolia in Turkey, as revealed by AFLP analysis. *Botanical Studies*, 54:48.
- Özgeriş, B., Göksu, S., Köse, L. P., Gülçin, I., Salmas, R. E., Durdagi, S., Tümer, F., Supuran, C. T. (2016). Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel urea and sulfamide derivatives incorporating dopaminergic 2-aminotetralin scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(10), 2318-2329.

- Pallavi, A., Nagababu, P., Hari, B. B., & Brahmaji, R. P. (2020). Separation and identification of new phytocomponents in methanolic extract of leaves of hairknot plant (*Pergularia daemia*) by GC-MS analysis.
- Palma, L. (1964). *Le Piante Medicinali d'Italia*; SEI: Torino, Italy, p. 226.
- Park, C. M., & Song, Y. S. (2019). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside protect against acute liver injury through regulation of inflammatory mediators and antioxidative enzymes in GalN/LPS-induced hepatitic ICR mice. *Nutrition research and practice*, 13(6), 473-479.
- Parkkila, A. K., Herva, R., Parkkila, S., & Rajaniemi, H. (1995). Immunohistochemical demonstration of human carbonic anhydrase isoenzyme II in brain tumours. *The Histochemical Journal*, 27, 974-982.
- Perry, L.M. (1980). *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*; MIT Press: Cambridge, UK, p. 111
- Perry, L. M., & Metzger, J. (1980). *Medicinal plants of east and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*. MIT press.
- Phillipson, J. D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy, *Phytochemistry* 68, 2960–2972.
- Piironen V, Lindsay D, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric*. 2000; 80:939-966.
- Popova, V., Ivanova, T., Stoyanova, A., Nikolova, V., Hristeva, T., & Zheljazkov, V. D. (2020). GC-MS Composition and Olfactory Profile of Concretes from the Flowers of Four *Nicotiana* Species. *Molecules*, 25(11), 2617.
- Rickli, E. E., Ghazantar, S. A.S., Gibbons, B.H. And Edsall, J. T., 1964. Carbonic anhydrase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 239, 1065-1078.
- Rizvi, T. S., Hussain, I., Ali, L., Mabood, F., Khan, A. L., Shujah, S., Rehman N.U., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Khan, A., Halim, S. A. (2019). New gorgonane sesquiterpenoid from *Teucrium mascatense* Boiss, as α -glucosidase inhibitor. *South African Journal of Botany*, 124, 218-222.
- Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R., & Abdollahi, M. (2014). The story of beta-sitosterol-a review.
- Saranya, J., Pious, B. R., Eganathan, P., Ramasubramanian, R., & Selvam, V. (2015). Essential oil Composition of Whole Flowers of *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata* and *Rhizophora x annamalayana* from Pichavaram, India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(3), 728-733.
- Seifert K., & Unger W. (1994). Insecticidal and fungicidal compounds from *Isatis tinctoria*. *Journal of Biosciences: Zeitschrift für Naturforschung C*. 49(1-2):44-8. doi: 10.1515/znc-1994-1-208. PMID: 8148009
- Sels, J. P. J., Huijberts, M. S., & Wolffenbuttel, B. H. (1999). Miglitol, a new α -glucosidase inhibitor. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 1(1), 149-156.
- Shankar G, M., Alex, V. V., Nisthul A, A., Bava, S. V., Sundaram, S., Retnakumari, A. P., Chittalakkottu, S., & Anto, R. J. (2020). Pre-clinical evidences for the efficacy of tryptanthrin as a potent suppressor of skin cancer. *Cell Proliferation*, 53(1), e12710. <https://doi.org/10.1111/cpr.12710>
- Spataro, G., & Negri, V. (2008). Adaptability and variation in *Isatis tinctoria* L.: a new crop for Europe. *Euphytica*, 163, 89-102.

- Spataro, G., Taviani, P., & Negri, V. (2007). Genetic variation and population structure in a Eurasian collection of *Isatis tinctoria* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 573-584.
- Speranza, J., Miceli, N., Taviano, M. F., Ragusa, S., Kwiecień, I., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). *Isatis tinctoria* L.(Woad): A review of its botany, ethnobotanical uses, phytochemistry, biological activities, and biotechnological studies. *Plants*, 9(3), 298.
- Srividhya, R., Gayathri, R., & Kalaiselvi, P. (2012). Impact of epigallo catechin-3-gallate on acetylcholine-acetylcholine esterase cycle in aged rat brain. *Neurochemistry International*, 60(5), 517-522.
- Supuran, C. T. (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(6), 759-772.
- Supuran, C. T., & Scozzafava, A. (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(13), 4336-4350.
- Supuran, C. T., Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Carta, F., Monti, S. M., & De Simone, G. (2018). Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: three for the price of one. *Medicinal Research Reviews*, 38(6), 1799-1836.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., & Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal research reviews*, 23(2), 146-189.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., & Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H. O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoglu, Ö., & Küçüksari, H. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280(1-4), 140-145.
- Süzgeç, S., Meriçli, A. H., Houghton, P. J., & Çubukçu, B. (2005). Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. *Fitoterapia*, 76(2), 269-272.
- Szultka, M., Buszewski, B., Papaj, K., Szeja, W., & Rusin, A. (2013). Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, 47-67.
- Taha, M., Rahim, F., Uddin, N., Khan, I. U., Iqbal, N., Salahuddin, M., Farooq, R. K., Gollapalli, M., Khan, K. M., Zafar, A. (2021). Exploring indole-based-thiadiazole derivatives as potent acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzyme inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 1025-1036.
- Tang, W., & Eisenbrand, G. (1992). Qingdai. In *Chinese Drugs of Plant Origin*; Springer: Berlin, Germany, pp. 805–806.
- Taslimi, P., Gülçin, İ., Öztaşkın, N., Cetinkaya, Y., Göksu, S., Alwasel, S. H., & Supuran, C. T. (2016). The effects of some bromophenols on human carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(4), 603-607.0.

- Taviano, M. F., Filocamo, A., Ragusa, S., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., Mastrazzo, G. P., Derose, R. F., Celano, M., Lombardo, G. E., Melchini, A., Miceli, N. (2018). Phenolic profile, antioxidant and cytotoxic properties of polar extracts from leaves and flowers of *Isatis tinctoria* L. (Brassicaceae) growing in Sicily. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 152(4), 795-803.
- Turkan, F., Cetin, A., Taslimi, P., Karaman, M., & Gulcin, I. (2019). Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel pyrazole derivatives as potent carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors. *Biorganic Chemistry*, 86, 420-427.
- Velmurugan, B. K., Lin, J. T., Mahalakshmi, B., Chuang, Y. C., Lin, C. C., Lo, Y. S., ... & Chen, M. K. (2020). Luteolin-7-O-glucoside inhibits oral cancer cell migration and invasion by regulating matrix metalloproteinase-2 expression and extracellular signal-regulated kinase pathway. *Biomolecules*, 10(4), 502.
- Wang, C., Ruan, S., Gu, X., & Zhu, B. (2018). Antiviral activities of Radix *Isatidis* polysaccharide against type II herpes simplex virus in vitro. *Food Science and Technology*, 38, 180-183.
- Wei, J., Zhang, X. Y., Deng, S., Cao, L., Xue, Q. H., & Gao, J. M. (2017). α -Glucosidase inhibitors and phytotoxins from *Streptomyces xanthophaeus*. *Natural Product Research*, 31(17), 2062-2066.
- Xiao, Z., Hao, Y., Liu, B., & Qian, L. (2002). Indirubin and meisoindirubin in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leukemia & Lymphoma*, 43(9), 1763-1768. <https://doi.org/10.1080/1042819021000006295>
- Xu, Z. Y., Xi Y. F., Zhou W. Y., & Lou L. L. (2020). Alkaloids and Monoterpenes from the Leaves of *Isatis tinctoria* Linnaeus and Their Chemotaxonomic Significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 92, 104089. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104089>
- Yakan, H., Muğlu, H., Türkeş, C., Demir, Y., Erdoğan, M., Çavuş, M. S., & Beydemir, Ş. (2023). A novel series of thiosemicarbazone hybrid scaffolds: Design, synthesis, DFT studies, metabolic enzyme inhibition properties, and molecular docking calculations. *Journal of Molecular Structure*, 1280, 135077.
- Yamali, C., Gul, H. I., Ece, A., Taslimi, P., & Gulcin, I. (2018). Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of 4-[5-aryl-3-(thiophen-2-yl)-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamides toward acetylcholinesterase, carbonic anhydrase I and II enzymes. *Chemical Biology & Drug Design*, 91(4), 854-866.
- Yeung, H. C. (1985). *Handbook of Chinese Herbs and Formulas*; Institute of Chinese Medicine: Los Angeles, CA, USA.
- Yıldırım, Ş. (1988). Türkiye'nin batı yarısı ve kuzeyindeki *Isatis* L. (*Cruciferae*) *Cinsinin Revizyonu*, *Doğa Türk Botanik Dergisi*, 12(3), 332-400
- Ying, Y. M., Zhang, L. Y., Zhang, X., Bai, H. B., Liang, D. E., Ma, L. F., Shan, W. G., Zhan, Z. J. (2014). Terpenoids with α -glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Phytochemistry*, 108, 171-176.

- Zaraei, S.-O., El-Gamal, M. I., Shafique, Z., Amjad, S. T., Afridi, S., Zaib, S., et al. (2019). Sulfonate and sulfamate derivatives possessing benzofuran or benzothiophene nucleus as potent carbonic anhydrase II/IX/XII inhibitors. *Biorganic Medicinal Chemistry* 27, 3889–3901. doi10.1016/j.bmc.2019.07.026
- Zech-Matterne, V., & Leconte, L. (2010). New archaeobotanical finds of *Isatis tinctoria* L. (woad) from Iron Age Gaul and a discussion of the importance of woad in ancient time. *Veg. Hist. Archaeobot*, 19, 137–142
- Zhang, D., Ruan, D., Li, J., Chen, Z., Zhu, W., Guo, F., Chen, K., Li, Y., Wang, R. (2020). Four undescribed sulfur-containing indole alkaloids with nitric oxide inhibitory activities from *Isatis tinctoria* L. roots. *Phytochemistry*, 174, 112337.
- Zhu, Y.P. (1998). *Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and Applications*; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands, pp. 185–189.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	
Doğum Yeri ve Tarihi	-
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	
Yüksek Lisans Öğrenimi	-
Bildiği Yabancı Diller	
Bilimsel Faaliyetler	-
İş Deneyimi	
Stajlar	-
Projeler	-
Çalıştığı Kurumlar	-
İletişim	
E-posta Adresi	
Mezuniyet Tarihi	