



T.C.

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı

***POLYGONATUM ORIENTALE* DESF. BİTKİ
EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

Emine ŞEN

Doktora Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Yücel YÜCEL

İstanbul, 2025

***POLYGONATUM ORIENTALE* DESF. BİTKİ EKSTRELERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

Emine ŞEN

Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı

Doktora Tezi

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ

2025

Emine ŞEN tarafından hazırlanmış ve 27/06/2025 tarihinde sunulmuş “*POLYGONATUM ORIENTALE* DESF. BİTKİ EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ” başlıklı Farmasötik Bilimler Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YÜCEL YÜCEL

Danışman

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Tuğba YILMAZ ÖZDEN	Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, İstanbul Üniversitesi	_____
Doç. Dr. Şebnem GARİP USTAOĞLU	Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Altınbaş Üniversitesi	_____
Doç. Dr. Ebru ÖZDEMİR NATH	Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Altınbaş Üniversitesi	_____
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YÜCEL YÜCEL	Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Altınbaş Üniversitesi	_____
Dr. Öğr. Üyesi Bircan DİNÇ	Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Bahçeşehir Üniversitesi	_____

Bu tezin Doktora tezi olarak bütün şartları sağladığımı beyan ederim.

Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışlara uygun olarak edinildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde, bu çalışmada, orijinal olmayan tüm materyalleri ve sonuçları tamamen alıntı yaptığımı ve referans gösterdiğimi de beyan ederim.

Emine ŞEN

İmzası

İTHAF

İşiltısıyla geleceğe dair umutlarımı çoğaltan Derin ŞEN'e ithafen.



ÖNSÖZ

Eşsiz bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak her açıdan desteğini ve anlayışını esirgemeyen ve tez çalışmamı gerçekleştirmemi sağlayan danışman hocam Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Yücel YÜCEL**'e, doktora tez konumun belirlenmesinde sağladığı yenilikçi çalışma fikri ve bilimsel destekleri için Sayın **Doç. Dr. Ebru ÖZDEMİR NATH**'a; ve tez çalışmalarım sırasında her zaman destek olan Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Bircan DİNÇ**'e;

Araştırma Görevlisi olarak çalıştığım Altınbaş Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın **Prof. Dr. Mehmet TANOL**'a, başta mensubu olduğum Biyokimya A.B.D. Öğretim Üyeleri olmak üzere Altınbaş Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde çalışmış ve çalışmakta olan akademik ve idari tüm çalışma arkadaşlarıma; akademide yer almama vesile olan bilgisi ve deneyimi ile çalışmalarına destek sağlamış Sayın **Prof. Dr. Abdullah OLGUN**'a;

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.B.D mensubu Sayın **Doç. Dr. Burçin ERGENE** ve Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Melek KARAASLAN**'a;

Hücre kültürü çalışmalarında laboratuvar imkanlarını paylaşan ve deneylerde destek olan Sayın **Doç. Dr. Gülipek GÜNDOĞAN** ve Sayın **Dr. Arş. Gör. Nur ELAGÜL**'e;

Her zaman desteğini gördüğüm ve doktora sürecimde hep yanımda olan ve yardımlarını hiç esirgemeyen sevgili arkadaşlarım **Dr. Arş. Gör. Gizem YEĞEN**, **Dr. Öğr. Üyesi Behiye ÖZTÜRK ŞEN**, **Uzman Ecz. Meltem BREEN** ve **Münevver UMAROĞLU**'na;

Her şartta yanımda olan ve öğrenim hayatım boyunca destekleri hiç eksilmeyen değerli **Aileme** teşekkür ederim.

Ayrıca, laboratuvar imkânlarından yararlandığım **Altınbaş Üniversitesi Doğal Ürünler Araştırma ve Geliştirme Merkezi (DÜAGEM)**'e teşekkür ederim. Bu tez, Altınbaş Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Dairesi Başkanlığı tarafından **TEZP2023-15** numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

***POLYGONATUM ORIENTALE* DESF. BİTKİ EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

ŞEN, Emine

Doktora, Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı, Altınbaş Üniversitesi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Yücel YÜCEL

Tarih: Haziran/2025

Sayfa: 159

Tıbbi bitkiler, geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılan ve günümüzde de önemini koruyan doğal kaynaklardır. Bitkilerde bulunan polifenoller ve flavonoidler gibi sekonder metabolitler, oksidatif stresle mücadelede etkili olup, çeşitli kronik hastalıkların önlenmesinde rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bu bileşiklerin bağışıklık sistemi ve sinir sistemi üzerinde koruyucu etkiler gösterdiğini, ayrıca bazı bitki ekstraktlarının doğurganlık üzerinde olumlu etkiler oluşturabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada, *Polygonatum orientale* Desf. (Boğumluca) bitkisinin toprak altı (rizom) ve toprak üstü (ariel) kısımlarından maserasyon yöntemi ile hazırlanan çeşitli ekstraktlarının sekonder metabolit içeriği belirlenerek, fenolik ve flavanoid bileşik miktarları ortaya konmuştur. HPLC metodu ile fenolik bileşik içeriği aydınlatılmıştır. ABTS ve DPPH radikal süpürücü aktiviteleri, total antioksidan kapasitesi belirlenmiş, FRAP ve metal şelatlama testleri yapılarak bitki ekstraktlarının antioksidan özellikleri saptanmıştır. Asetilkolinesteraz (AChE), monoamin oksidaz-A (MAO-A) ve monoamin oksidaz-B (MAO-B) enzim inhibisyon miktarları belirlenmiştir. Bitkinin sinir sistemi üzerine etkileri nöron hücreleri; üreme sistemi üzerine etkileri ise hücre canlılık testleri vasıtasıyla belirlenmiştir. Ayrıca genel toksisite düzeyleri *C. elegans* modeli kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak, *P. orientale* bitkisinin özellikle rizom kısmının zengin fitokimyasal içeriği sayesinde güçlü antioksidan, nöroprotektif ve hücre proliferasyonunu destekleyici etkilere sahip olduğu; toprak üstü kısımlarının ise seçici antimikrobiyal ve enzim inhibitör aktivitelerle tamamlayıcı biyoaktivite sunduğu ortaya konmuştur. *C. elegans* üzerindeki etkileri doz bağımlı olup,

düşük dozlarda faydalı etkiler gözlenirken, yüksek dozlarda toksisite belirtileri saptanmıştır. Bu bulgular, *P. orientale* bitkisinin biyoaktif potansiyelini ortaya koymakta ve gelecekteki farmakolojik ve nöroprotektif çalışmalar için bir temel sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Polygonatum orientale*, Antioksidan Aktivite, Asetilkolinesteraz İnhibisyonu, *Caernohobditis elegans*, Erkek Üreme Aktivitesi, Nöroprotektif Aktivite, Monoaminoksidaz.



ABSTRACT

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *POLYGONATUM ORIENTALE* DESF. PLANT EXTRACTS

ŞEN, Emine

PhD, Department of Pharmaceutical Sciences, Altınbaş University,

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Yasemin YÜCEL YÜCEL

Date: June/2025

Pages: 159

Medicinal plants have been used in traditional medicine for centuries, and they are still valuable natural resources today. Secondary metabolites found in plants, such as polyphenols and flavonoids, play effective roles in combating oxidative stress and contribute to the prevention of various chronic diseases. Recent studies have shown that these compounds exert protective effects on the immune and nervous systems, and certain plant extracts may also improve fertility. In this study, various extracts were prepared from the underground (rhizome) and aerial parts of *Polygonatum orientale* Desf. (Boğumluca) by maceration method, and their phenolic and flavonoid contents were determined as indicators of secondary metabolite composition. The phenolic profile was elucidated using HPLC analysis. The antioxidant properties of the extracts were evaluated by DPPH and ABTS radical scavenging assays, as well as by assessing total antioxidant capacity, FRAP activity, and metal chelation ability. The effects of the extract on acetylcholinesterase (AChE), monoamine oxidase-A (MAO-A), and monoamine oxidase-B (MAO-B) were also determined. The effects of the plant on the nervous system were assessed using neuronal cell lines, while its effects on the reproductive system were evaluated via cell viability assays in testicular cells. In addition, general toxicity levels of the plant were investigated using the *C. elegans* model. As a result, the extracts of the rhizome part of *P. orientale* with their rich phytochemical composition, exhibited strong antioxidant, neuroprotective, and cell proliferation-supporting effects, whereas the extracts of the aerial parts of the plant demonstrated complementary bioactivity through selective antimicrobial and enzyme

inhibitory effects. The effects observed in *C. elegans* were dose-dependent, with beneficial outcomes at low doses and signs of toxicity at higher concentrations. These findings highlight the bioactive potential of *P. orientale* and provide a valuable basis for future pharmacological and neuroprotective studies.

Keywords: *Polygonatum orientale*, Acetylcholinesterase Inhibition, Antioxidant Activity, *Caenorhabditis elegans*, Male Reproductive Health, Monoamine Oxidases, Neuroprotective Effect.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TABLO LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
KISALTMALAR.....	xx
SEMBOL LİSTESİ	xxiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 BOTANİK ÖZELLİKLER.....	5
2.1.1 Asparagaceae Familyasının Genel Özellikleri	6
2.1.2 <i>Polygonatum</i> Cinsinin Genel Özellikleri	6
2.1.3 <i>Polygonatum orientale</i> 'nin Bitki Özellikleri ve Yayılımı.....	7
2.1.4 <i>Polygonatum orientale</i> ile İlgili Çalışmalar	9
2.1.4.1 Kimyasal içerik çalışmaları	9
2.1.4.2 Farmakolojik etkileri	10
2.1.4.3 Etnobotanik kullanımı	11
2.2 ANTİOKSİDAN SİSTEM.....	13
2.2.1 Serbest Radikallerin Oluşumu.....	13
2.2.2 Reaktif Oksijen Türleri.....	13
2.2.3 Oksidatif Stres ve Etkileri	14
2.2.4 Canlılardaki Antioksidan Sistemler	16
2.3 NÖROLOJİK HASTALIKLAR.....	17
2.3.1 Alzheimer Hastalığı ve Tedavisi	17

2.3.2	Parkinson Hastalığı ve Tedavisi	19
2.3.3	Asetilkolinesteraz ve Monoamin Oksidaz Enzimlerinin Nörolojik Hastalıklardaki Rolü	20
2.4	ERKEK ÜREME SİSTEMİ GENEL BİLGİLER	22
2.4.1	Erkek Üreme Sistemi	22
2.4.1.1	Spermatogenesis	23
2.4.1.2	Sertoli hücresi	25
2.4.1.3	Leydig hücresi	26
2.5	<i>C. ELEGANS</i> GENEL ÖZELLİKLERİ	27
2.5.1	Biyolojisi ve Hayat Döngüsü	28
2.5.1.1	Model organizma olarak <i>C. elegans</i>	30
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1	KULLANILAN KİMYASAL MADDE, ARAÇ VE GEREÇLER	32
3.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.1.2	Kullanılan Araç ve Gereçler	34
3.2	YÖNTEM VE DENEYLER	34
3.2.1	Bitki Materyali	34
3.2.2	Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	34
3.2.3	Fitokimyasal İçerik Belirlenmesi	35
3.2.3.1	HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile fenolik bileşik tayini	35
3.2.3.2	Total fenolik içerik tayini	39
3.2.3.3	Total flavonoid içerik tayini	39
3.2.3.4	Total saponin taranması	40
3.2.3.5	Antrasen türevi bileşik taranması	40
3.2.3.6	Müsilaj taranması	40

3.2.3.7	Tanen türevi taranması	40
3.2.3.8	Alkoloit bileşik taranması	41
3.2.3.9	Kardiyotonik glikozit taranması	41
3.2.4	Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	41
3.2.4.1	DPPH radikali süpürücü aktivite tayini	41
3.2.4.2	FRAP (Demir II iyonu indirgeyici antioksidan potansiyeli) tayini	42
3.2.4.3	Total antioksidan kapasite tayini	43
3.2.4.4	Metal şelatlama aktivitesi	43
3.2.4.5	ABTS radikali süpürme aktivitesi	44
3.2.5	Enzim İnhibisyon Çalışmaları	44
3.2.5.1	Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu.....	45
3.2.5.2	MAO-A enzim inhibisyonu	45
3.2.5.3	MAO-B enzim inhibisyonu	45
3.2.6	Antibakteriyel Aktivite Testleri	46
3.2.6.1	Minimum inhibisyon konsatrasyonu (MİK) testi	46
3.2.6.2	İnhibisyon çapı testi.....	47
3.2.7	<i>C. elegans</i> Çalışmaları.....	47
3.2.7.1	Nematod üretim besiyeri hazırlanması	47
3.2.7.2	<i>E. coli</i> üretim Besiyeri Hazırlanması	48
3.2.7.3	Yumurta senkronizasyonu	49
3.2.7.4	Bitki maruziyeti ve deney tasarımı çalışmaları	49
3.2.7.5	Lokomotor aktivite testi	50
3.2.7.6	Üreme aktivitesi belirleme testi.....	50
3.2.8	Hücre Kültürü Çalışmaları	51
3.2.8.1	Hücre tipleri ve besi ortamlarının hazırlanması	51

3.2.8.2	Deney tasarımı ve bitki maruziyeti	51
3.2.8.3	MTT sitotoksosite testi.....	52
3.2.8.4	X-celligance testi	53
4.	BULGULAR.....	54
4.1	BİTKİ FİTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR	54
4.1.1	Ekstre Verimliliği Bulguları.....	54
4.1.2	HPLC Analizi Bulguları.....	55
4.1.3	Total Fenolik Bileşik Tayini Bulguları	68
4.1.4	Total Flavanoid Bileşik Tayini Bulguları.....	69
4.1.5	Diğer Fitokimyasal İçerik Tayini Bulguları	70
4.2	ANTİOKSİDAN AKTİVİTE BULGULARI	71
4.2.1	DPPH Bulguları.....	71
4.2.2	FRAP Bulguları.....	72
4.2.3	Total Antioksidan Kapasite Bulguları.....	74
4.2.4	Metal Şelatlama Bulguları.....	75
4.2.5	ABTS Radikali Süpürücü Bulguları.....	77
4.3	ENZİM İNHİBİSYONU ÇALIŞMALARI BULGULARI	79
4.3.1	Asetilkolinesteraz İnhibisyonu Bulguları.....	79
4.3.2	MAO-A İnhibisyonu Bulguları	80
4.3.3	MAO-B İnhibisyonu Bulguları	81
4.4	ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE BULGULARI.....	82
4.5	HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEY BULGULARI	84
4.5.1	Nöron Hücrelerine Etki Bulguları	84
4.5.2	Üreme Hücrelerine Etki Bulguları	86

4.6	<i>C. ELEGANS</i> BULGULARI.....	90
4.6.1	Nörolojik Etki Bulguları.....	90
4.6.2	Üreme Üzerine Etki Bulguları.....	91
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	94
	REFERANSLAR	116



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasal Maddeler.	32
Tablo 3.2: Kullanılan Araç ve Gereçler.....	34
Tablo 3.3: Ekstre İçinde Taranan Bileşikler.	36
Tablo 3.4: Kalitatif Analizde Kullanılan Gradient Çözücü Sistemi.	37
Tablo 3.5: Kantitatif Analizde Kullanılan Gradient Çözücü Sistemi.	37
Tablo 3.6: Kantitatif Analiz Sırasında Hazırlanan Standart Bileşik Solüsyon Konsantrasyonları.	38
Tablo 4.1: Bitki Ekstre Verimliliği.....	54
Tablo 4.2: Kantitatif Analizi Yapılan Maddelerin Retansiyon Zamanları ve Analizin Yürütüldüğü Dalga Boyu.	55
Tablo 4.3: Kantitatif Analiz Sonucunda Ekstreler İçinde Tayin Edilen Madde Miktarları.	67
Tablo 4.4: LOD ve LOQ Değerleri.	67
Tablo 4.5: Kimyasal İçerik Taranması.	70
Tablo 4.6: Metal Şelatlama Aktivitesi Miktar Tablosu.	76
Tablo 4.7: ABTS Aktivitesi.....	78
Tablo 4.8: <i>P. orientale</i> Rizom Ekstrelerinin AChE İnhibisyonları.	79
Tablo 4.9: <i>P. orientale</i> Toprak Üstü Ekstrelerinin AChE İnhibisyonları.....	80
Tablo 4.10: MAO-A İnhibisyon Oranları.....	81
Tablo 4.11: MAO-B İnhibisyon Oranları.....	82
Tablo 4.12: MİK Değerlendirmesi (Rizom).	83
Tablo 4.13: MİK Değerlendirmesi (Toprak Üstü).....	83

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: <i>Poligonatum orientale</i> Desf. Bitkisine Ait Genel Görünüm	5
Şekil 2.2: <i>Poligonatum orientale</i> Desf. Sistematiik Sınıflandırılması.	5
Şekil 2.3: <i>Polygonatum</i> Türlerinin Küresel Yayılım Haritası	8
Şekil 2.4: <i>Polygonatum orientale</i> 'nin Türkiye'deki Doğal Yayılım Bölgeleri	9
Şekil 2.5: ROS Üretimi.....	14
Şekil 2.6: Erkek Üreme Sistemi Bileşenleri.	23
Şekil 2.7: Spermatogenez.	24
Şekil 2.8: Spermiyogenez.	25
Şekil 2.9: <i>C. elegans</i> 'ın 22°C'de Yaşam Döngüsü.	29
Şekil 3.1: Teşhis Alt Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) Değerleri Sinyal/Gürültü Oranı.	38
Şekil 3.2: Hücre Kültürü Bitki Ekstresi Uygulaması.	52
Şekil 4.1: Topraküstü Kısımlardan %50 Etanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.	56
Şekil 4.2: Toprak Üstü Kısımlardan Etanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.	57
Şekil 4.3: Topraküstü Kısımlardan Metanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.	58
Şekil 4.4: Rizom Kısımlardan %50 Etanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.	59
Şekil 4.5: Rizom Kısımlardan Etanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.	60

Şekil 4.6: Rizom Kısımlardan Metanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.	61
Şekil 4.7: Vanilik Asit Standardının Kromatogramı ve UV Spektrumu.	62
Şekil 4.8: Sirinjik Asit Standardının Kromatogramı ve UV Spektrumu.	62
Şekil 4.9: Orientin Standardının Kromatogramı ve UV Spektrumu.	62
Şekil 4.10: Viteksin Asit Standardının Kromatogramı ve UV Spektrumu.....	63
Şekil 4.11: Viteksin-2-O-ramnozid Asit Standardının Kromatogramı ve UV Spektrumu. .	63
Şekil 4.12: Vanilik Asit Standart Kalibrasyon Grafiği.....	64
Şekil 4.13: Sirinjik Asit Standart Kalibrasyon Grafiği.....	64
Şekil 4.14: Orientin Standart Kalibrasyon Grafiği.	65
Şekil 4.15: Viteksin Standart Kalibrasyon Grafiği.....	65
Şekil 4.16: Viteksin-2-O-ramnozid Standart Kalibrasyon Grafiği.....	66
Şekil 4.17: Total Fenolik Bileşik Standart Grafiği.	68
Şekil 4.18: Total Fenolik Bileşik Miktarı.....	69
Şekil 4.19: Total Flavanoid Bileşik Standart Grafiği.	69
Şekil 4.20: Total Flavanoid Bileşik Miktarı.....	70
Şekil 4.21: DPPH Kalibrasyon Grafiği.	71
Şekil 4.22: Rizom Ekstreleri DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi Grafiği.	71
Şekil 4.23: Toprak Üstü Ekstreleri DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi Grafiği.....	72
Şekil 4.24: FRAP Kalibrasyon Grafiği.....	72
Şekil 4.25: Rizom Ekstreleri FRAP Aktivitesi.....	73
Şekil 4.26: Toprak Üstü Ekstreleri FRAP Aktivitesi.	73
Şekil 4.27: Total Antioksidan Kapasite Standart Grafiği.	74
Şekil 4.28: Total Antioksidan Kapasite Miktarları.....	74

Şekil 4.29: Metal Şelatlama Aktivitesi Standart Grafik.	75
Şekil 4.30: Rizom Ekstreleri Metal Şelatlama Aktivitesi.	75
Şekil 4.31: Toprak Üstü Metal Şelatlama Aktivitesi.	76
Şekil 4.32: ABTS Radikali Süpürücü Aktivite Standart Grafik.	77
Şekil 4.33: Rizom Ekstreleri ABTS Radikali Giderici Aktivite.	77
Şekil 4.34: Toprak Üstü Ekstreleri ABTS Radikali Giderici Aktivite.	78
Şekil 4.35: <i>B. subtilis</i> Plakalarında Görülen İnhibisyon Zonu.	84
Şekil 4.36: Hücre Kültüründe 96 Saatlik Takip.	85
Şekil 4.37: Hücre Kültüründe 96 Saatlik Takip.	85
Şekil 4.38: 24 Saat HUVEC Endotel Hücresi % Canlılık Oranı.	86
Şekil 4.39: 24 Saat TM3 Leydig Hücresi % Canlılık Oranı.	86
Şekil 4.40: 24 Saat TM4 Sertoli Hücresi % Canlılık Oranı.	87
Şekil 4.41: 48 Saat HUVEC Endotel Hücresi % Canlılık Oranı.	87
Şekil 4.42: 48 Saat TM3 Leydig Hücresi % Canlılık Oranı.	88
Şekil 4.43: 48 Saat TM4 Sertoli Hücresi % Canlılık Oranı.	87
Şekil 4.44: 72 Saat HUVEC Endotel Hücresi % Canlılık Oranı.	87
Şekil 4.45 72 Saat TM3 Leydig Hücresi % Canlılık Oranı.	89
Şekil 4.46: 72 Saat TM4 Sertoli Hücresi % Canlılık Oranı.	90
Şekil 4.47: <i>C. elegans</i> 'ın Deney Ortamına Alınışı	90
Şekil 4.48: <i>C. elegans</i> Yumurta Sayımı.	92
Şeki 4.49: <i>C. elegans</i> Üreme Aktivitesi Bulguları.	93

KISALTMALAR

AAE	: Askorbik Asit Eşdeğeri
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ABTS	: 2,2'-Azinobis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sülfonik Asit
AChE	: Asetilkolinesteraz
AChEI	: Asetilkolinesteraz İnhibitörü
ACN	: Asetonitril
AD	: Alzheimer Hastalığı
AH	: Alzheimer Hastalığı
AlCl ₃	: Alüminyum Klorür
ANLS	: Astrosit-nöron Laktat Şantı
BTH	: Bütilhidroksi Tolüen
ChAT	: Kolin Asetiltransferaz
DALY	: Disability Adjusted Life Year
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	: 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
EtOH	: Etanol
EUCAST	: Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
FAD	: Flavın-adenin Dinükleotid
FBS	: Fetal Bovin Serum
FRAP	: Demir İndirgeyici Antioksidan Gücü
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon

FUDR	: 5-fluoro-2'-deoxyuridine
GAE	: Gallic Asit Eşdeğerliği
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksite
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HS	: At Serumu
IC ₅₀	: %50 İnhibisyon Değeri
K ₂ S ₂ O ₈	: Potasyum Persülfat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
LH	: Lüteinleştirici Hormon
LOD	: Teşhis Alt Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
MAO	: Monoamin Oksidazlar
MAO-A	: Monoamin Oksidaz A
MAO-B	: Monoamin Oksidaz B
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MDA	: Malondialdehit
MeOH	: Metanol
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
MHA	: Muller-Hinton Agar
MHB	: Müller-Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Testi

Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaNO ₂	: Sodyum Nitrit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NGM	: Nematode Growth Medium
OH	: Hidroksil
OS	: Oksidatif Stres
PBS	: Fosfat Tamponu Tuzu
PO	: <i>Polygonatum orientale</i> Desf.
QE	: Quercetin Equivalent
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TFC	: Total Flavonoid İçeriği
TPC	: Total Fenolik İçeriği
TPTZ	: 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine
Tris-HCl	: Tris(hydroxymethyl)Aminomethane Hydrochloride

SEMBOL LİSTESİ

μg : Mikrogram

μL : Mikrolitre



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbi bitkiler, terapötik etkileri olan veya farmasötik ajan üretiminde kullanılabilen biyoaktif bileşenleri içeren bitkiler olarak tanımlanmaktadır (Sofowora ve diğ., 2013). Bu bitkilerin kullanımı, insanlık tarihinin başlangıcına kadar uzanmaktadır; zira ilk insanlar hastalıklarını içgüdüleri, tat alma duyuları ve deneyimlerine dayanarak bitkilerle tedavi etmeye çalışmışlardır (Petrovska, 2012). Günümüzde ise tıbbi bitkiler, organizmanın kendi kendini onarma süreçlerini destekleme, fiziksel ve zihinsel sağlığı iyileştirme amacıyla yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu doğrultuda, fitoterapötik etkileri nedeniyle tıbbi bitkilerin hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde tamamlayıcı/alternatif tıp uygulamalarındaki kullanımı dünya genelinde giderek artmaktadır (Hotwani ve diğ., 2014). Doğal tıbbi bitkiler son yıllarda araştırma ve ticari bakımdan giderek daha önemli bir hale gelmiştir. Bugün tıbbi olarak dünya çapında 50,000 ile 80,000 çiçekli bitki kullanılmaktadır.

Bitkilerin bazı çevresel streslere karşı savunma mekanizması olarak geliştirdikleri sekonder metabolitler, çeşitli biyolojik işlevlere ve ekolojik rollere sahiptir. Alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşikler gibi farklı çeşitleri, bitkilerin hayatta kalmasına ve çevresel streslere karşı direnç göstermesine yardımcı olmaktadır (Bennett ve Wallsgrove, 1994; Guerriero ve diğ., 2018; Pagare ve diğ., 2015). Bu metabolitler, antioksidan etkiler göstererek hücre hasarı azaltmakta ve oksidatif stresin neden olduğu birçok hastalığı önlemeye yardımcı olmaktadır (Chen ve diğ., 2022). Bitkisel sekonder metabolitlerin, serbest radikalleri doğrudan nötralize ederek oksidatif stresi azalttığı görülmüştür. Polifenoller gibi bileşikler, serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyerek hücre bileşenleri korumaktadır (Marčetić ve Arsenijević, 2023). Ayrıca, hücre içi antioksidan savunma mekanizmalarını uyararak dolaylı olarak oksidatif hasarı azaltabilmektedirler. Örneğin, Levonen ve diğerlerinin (2004) çalışmasında Nrf2 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile antioksidan enzimlerin üretiminin arttığı görülmüştür. Diğer sekonder metabolitler ise hücre içi redoks dengesini regüle ederek çeşitli sinyal yollarını düzenlemektedir. Bu bileşikler, reaktif oksijen/nitrojen türlerinin seviyelerini kontrol ederek hücresel yanıtları ve antioksidan savunma mekanizmalarını etkileyebilmektedirler (Hunyadi, 2019). Flavonoidler gibi bazı antioksidanlar ise, elektron veya hidrojen atomlarını serbest radikallere transfer ederek, oksidatif zincir reaksiyonlarını durdurmaktadır (Dorta ve diğ. 2008). Diğer bir etkili yol ise hücre içi glutatyon sistemi ile etkileşime girerek antioksidan savunmayı

artırmaktır. Bazı bileşikler, glutatyonun yeniden okside formundan indirgenmiş formuna dönüşümünü destekleyerek hücrel redoks dengesini korumaktadırlar (Jacob ve diğ., 2011).

“Boğumluca” adıyla bilinen *Polygonatum orientale* Desf., Asparagaceae familyasına ait, Türkiye florasında nadir bulunan ve genellikle yüksek rakımlarda yetişen çok yıllık bir bitkidir (WFO, 2024; Doğan, 2024). Bu bitkiye yakın ve şifalı bitkiler arasında sayılmakta olan *P. sibiricum* türü, özellikle geleneksel Çin tıbbında bitki çayı olarak kullanılmaktadır. *P. orientale*'nin kimyasal bileşenleri arasında flavonoidler (orientin, vitexin, luteolin, quercetin), fenolik asitler (protocatechuic asit, galik asit) ve steroidal saponinler bulunmaktadır (Yeşilada ve Houghton, 1991). Çin ve Irak'ta yaygın olarak kullanılan *Polygonatum* türleri, Türkiye'de ise rizomları toz haline getirilerek; hafif kabızlığın giderilmesi, romatizma ve gut ağrılarının hafifletilmesi, diyabetle mücadele, cinsel gücü artırma amaçlarıyla (Baytop 1984; 1994; Demirci 2010) ve çocuk sahibi olmakta güçlük çeken kadınlarda destekleyici olarak (Demirci 2010; Özdemir Nath, 2016) kullanılmaktadır. Topraklarımızda, Osmanlı döneminden bu yana *P. orientale* türünün rizomları, bal ve polenle karıştırılarak tüketilmekte; bu karışımın afrodizyak etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Yeşilada ve Houghton, 1991). *P. orientale* rizomlarının metanol ekstresinin diyabetli rat modellerinde hipoglisemik etkileri değerlendirilmiş ve bu bitkinin kan glukoz seviyelerini düşürücü potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur (Azari ve diğ., 2020). Ayrıca bitkinin metanol ekstrelerinin yüksek miktarda fenolik ve flavanoid bileşik içerdiği, antibakterial ve antioksidan özellikler sergilediği belirlemiştir (Hanachi ve diğ., 2019-2020). *P. orientale* rizomlarından elde edilen bioaktif polar moleküllerin fibroblast hücre hatları üzerinde düşük konsantrasyonlarda dahi yara iyileşmesini destekleyici etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Hashemi ve diğ., 2020).

Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ile vücudun doğal antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşur. OS, çeşitli mekanizmalarla hem erkek hem de kadın infertilitesine sebep olabilmektedir (Zaha ve diğ., 2023). Yüksek seviyelerde oksidatif stresin, sperm DNA'sına zarar verdiği ve bunun da sperm işlevselliğinin bozulmasına sebep olduğu bilinmektedir (Bisht ve diğ., 2017). ROS, sperm membranına zarar vererek sperm hareketliliğini azaltmakta ve oosit ile birleşme yeteneğini bozmaktadır (Tremellen, 2008). Sperm hücrelerinin plazma membranında bulunan doymamış yağ asitleri, ROS saldırısına karşı savunmasızdırlar. Lipid

peroksidasyonu, sperm hücre membranını bozarak hücre işlevini olumsuz etkilemektedir (Ritchie ve Ko, 2020). ROS, mitokondriyal DNA'ya zarar vererek enerji üretiminde azalmaya ve sperm motilitesini düşürmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon, sperm hücrelerinin genel sağlık ve işlevselliğini olumsuz etkilemektedir (Alahmar, 2019). Yüksek ROS seviyeleri, sperm hücrelerinde apoptotik yolları tetikleyerek hücre ölümüne neden olabilmektedir. Bu durum, sperm sayısının azalmasına yol açarak erkek infertilitesine zemin hazırlayabilmektedir (Agarwal ve diğ., 2007). Kadınlarda ise OS, oosit ve embriyolara zarar vererek kadın infertilitesine neden olabilmektedir. Endometriozis ve polikistik over sendromu gibi reproduktif hastalıkların oluşumunda da önemli rol oynar (Gupta ve diğ., 2014).

Antioksidan gıda takviyeleri ve tıbbi bitkiler oksidatif hasarı azaltarak, sperm kalitesini artırıp erkek infertilitesini iyileştirme amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Vitamin E, vitamin C, karnitinler, N-asetil sistein, koenzim Q10, çinko, selenyum ve folik asit gibi antioksidanların temel semen parametrelerinde (sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi) anlamlı iyileşmeler sağladığı görülmüştür (Majzoub ve Agarwal, 2018). Antioksidanlar, sperm fonksiyon testlerinde (oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve sperm DNA fragmentasyonu) anlamlı iyileşmeler sağlamaktadırlar. Bu, sperm hücrelerinin işlevselliğini ve fertilizasyon yeteneğini arttırmaktadır (Arafa ve diğ., 2020). Kersetin ve kateşin gibi flavonoidler, güçlü antioksidan özellikleriyle bilinmekte ve sperm motilitesini artırarak sperm kalitesinin iyileştirmede etkili olmaktadır (Ross ve diğ., 2010).

Yapılan literatür taramalarında, birçok farklı bitkinin antioksidan etkilerine ilişkin çalışmalara rastlanmaktadır; ancak Türkiye’de yetişen *P. orientale* türünün farmasötik etkileri halen yeterince aydınlatılmamıştır. Söz konusu bitkinin hem antioksidan özelliklerinin hem de erkek üreme hücreleri üzerindeki potansiyel etkilerinin neler olduğunun detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte, sekonder metabolitlerin üreme hücreleri üzerinde olumlu etkiler gösterdiğine dair bazı çalışmalar bulunmasına rağmen, bu bulguların pekiştirilmesi için daha kapsamlı araştırmalara, ideal dozaj aralıklarının belirlenmesine ve potansiyel fayda sağlayabilecek yeni bitkilerin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, *Polygonatum orientale*’nin rizom ve toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktların fenolik bileşik içeriğinin HPLC metodu ile belirlemek, flavonoid ve diğer

kimyasal içeriklerini belirlemek; bu ekstrelerin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek ve beyin nöron hücreleri ile Leydig-Sertoli hücreleri üzerinde hücre canlılığı analizleri ile nöroprotektif ve androprotektif etkilerini ortaya koymaktır. Ayrıca, model organizma olarak *Caenorhabditis elegans* kullanılarak bitkinin in vivo etkilerini araştırmak; bunun yanında asetilkolinesteraz, monoamin oksidaz A ve B enzimleri üzerindeki inhibisyon potansiyellerini değerlendirilerek, bitkinin sinir sistemi üzerindeki olası etkilerine ışık tutulmak amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 BOTANİK ÖZELLİKLER

Polygonatum orientale Desf., genellikle yüksek irtifalarda rastlanan ve ilkbaharın sonundan yazın ortasına kadar çiçeklenen, boyu yaklaşık 15 ila 65 cm arasında değişen nadir rastlanan çok yıllık bir bitki türüdür (Şekil 2.1). Gövdesi köşeli yapıya sahiptir ve yüzeyi tüysüzdür. Yaprakları almasıık dizilmiş, genellikle kısa saplı ya da doğrudan gövdeye oturmuş halde, 55–110 mm uzunluğunda ve 20–40 mm genişliğindedir. Yaprak yüzeyleri hafif tüylüdür. Çiçek saplarında 1 ila 3 çiçek yer alır ve bu saplar tüysüzdür. Meyveleri genellikle koyu mavi-siyaha çalan renkte olup, çapları 5 ila 10 mm arasındadır (Doğan, 2024).



Şekil 2.1: *Polygonatum orientale* Desf. Bitkisine Ait Genel Görünüm (Doğan, 2024).

Dünya genelinde 88 takson tür ile temsil edilen *Polygonatum* cinsi, Asparagaceae familyasına aittir (WFO, 2025).

Taksonomik Seviye	Latince Adı
Regnum / Alem	Plantae
Divisio / Bölüm	Magnoliophyta
Subclassis / Altsınıf	Magnoliidae
Familia / Familya	Asparagaceae (Kuşkonmazgiller)
Genus / Cins	<i>Polygonatum</i> (Mührüsüyleyman Otu)
Species / Tür	<i>Polygonatum orientale</i> (Boğumluca)

Şekil 2.2: *Polygonatum orientale* Desf. Sistematik Sınıflandırılması (Ekim, 2013).

2.1.1 Asparagaceae Familyasının Genel Özellikleri

Asparagaceae familyasına ait bitkiler çok yıllık yaşam döngüsüne sahip olup, büyüme formları dik, tırmanıcı, yarı çalı ya da tam çalı şeklinde değişkenlik gösterebilmektedir. Bitkiler rizomlu bir yapıya sahiptir ve dallanma, rizomdan büyüyen sürgünlerin simpoidal gelişimi ile gerçekleşmektedir. Rizom sistemi genellikle şişkin ve iğ şeklindedir. Bitkiler bazen diken taşır; dikenler mevcut olduğunda bunlar çoğunlukla indirgenmiş yapraklardan veya nadiren dallardan türetilmiş yapıdadır. Yapraklar, çoğunlukla küçük ve pul benzeri yapıda olup, doğrudan fotosenteze katılmaktan çok koruyucu ya da destekleyici bir rol üstlenmektedirler. Asimilasyon işlevi esas olarak “kladot” adı verilen ince, yeşil, fotosentetik dallar tarafından gerçekleştirilir. Bazı cinslerde ise bu dallar düzleşerek yaprak benzeri yapılar olan “fillokladlara” dönüşmüştür. Çiçeklenme düzeni aksiller (yaprak koltuklarında) veya terminal (dal uçlarında) olabilmekte; çiçekler tek tek bulunabileceği gibi, demetler, birleşik salkımlar ya da basit salkımlar oluşturabilmektedir. Çiçekler genellikle küçük boyutludur, çift cinsiyetli veya tek cinsiyetli olabilir ve aktinomorf (radyal simetrlili) yapı gösterirler. Çiçekler dik ya da sarkık pozisyonda olabilmektedir. Meyve tipi küre şeklinde olup, etli bir perikarpe sahiptir ve sulu yapı göstermektedir. Meyveler genellikle 1 ila 2, nadiren 3 tohum içermektedir. Tohumlar siyah renklidir; şekil olarak tamamen küresel olabileceği gibi, bir yüzü düzleşmiş diğer yüzü dışbükey şekilde de olabilmektedir (Byng, 2014; Kapoor ve diğ., 2020; Stevens, 2016).

2.1.2 *Polygonatum* Cinsinin Genel Özellikleri

Polygonatum cinsi, Asparagaceae familyasına ait, kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerine yayılmış çok yıllık rizomlu bitkilerden oluşmaktadır (Luo ve diğ., 2022; Floden, 2017; Jeffrey, 1980). Dünya genelinde yaklaşık 88 tür tanımlanmıştır ve bunların 39'u Çin'de doğal olarak bulunmaktadır (Luo ve diğ., 2022, WFO, 2025). Türkiye'de ise Karadeniz ve Marmara bölgelerinde doğal yayılım gösteren türleri görülmüştür (Jeffrey, 1980).

Morfolojik açıdan *Polygonatum* türleri, yeraltında yatay şekilde büyüyen kalın rizomlara sahiptirler (Luo ve diğ., 2022). Gövdeleri genellikle dik veya üst kısımlarda kavisli olup, yapraklar alternatif, karşılıklı veya vertisillat (halka şeklinde) diziliş gösterebilmektedir (Meng ve diğ., 2014; Jeffrey, 1980). Çiçekler aksiller yerleşimli olup, boru formunda,

beyazdan yeşilimsi krem renklere kadar değişen tonlarda, bazen de sarkık bir şekilde açılmaktadır (Jeffrey, 1980).

Filogenetik çalışmalar, *Polygonatum* cinsinin monofiletik bir grup oluşturduğunu ve yakın akrabaları olan *Disporopsis* ve *HeteroPolygonatum* cinslerinden genetik olarak ayrıldığını göstermektedir (Floden, 2017). Ayrıca yapılan moleküler analizler, yaprak dizilişi ile kromozom sayısındaki çeşitliliğin evrimsel süreçlerde belirleyici faktörler arasında yer aldığını ortaya koymuştur (Meng ve diğ., 2014).

Kimyasal içerik açısından, *Polygonatum* türleri zengin bir fitokimyasal bileşime sahiptir. Steroidal saponinler, polisakkaritler, flavonoidler, alkaloidler ve kumarinler gibi 233'ten fazla aktif bileşik tespit edilmiştir. Rizomları geleneksel Çin tıbbında anti-aging, antioksidan, anti-inflamatuvar, immün düzenleyici ve antitümör etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (Luo ve diğ., 2022).

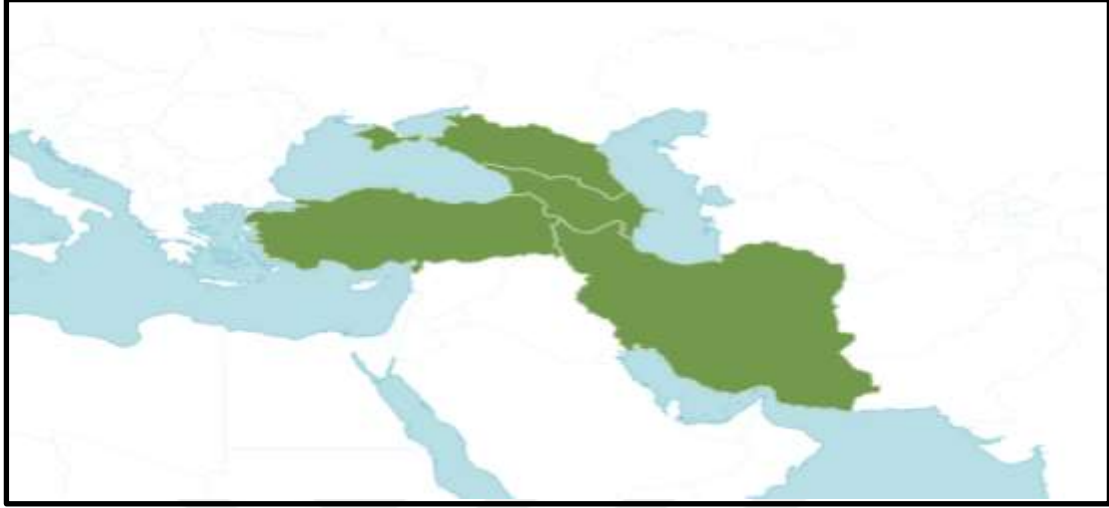
Ekolojik olarak, *Polygonatum* türleri nemli, gölgeli orman altı ekosistemlerinde, dere kenarlarında ve serin dağlık bölgelerde yetişmektedir (Jeffrey, 1980). Çoğunlukla toprak üzerinde gelişen bu bitkiler, özellikle nemli ve humusça zengin toprakları tercih ederken, birkaç türün de epifitik yaşam formuna sahip olduğu belirlenmiştir (Floden, 2017).

Türkiye’de *Polygonatum* cinsine ait 6 tür bulunmaktadır. *Polygonatum* türleri, özellikle nemli orman altı, dere kenarları ve gölgeli habitatlarda yayılış göstermektedir. Türkiye Florası’na göre, *Polygonatum* türlerinin birkaç varyasyonu da Türkiye’de bulunmaktadır. Bu türler arasında *P. orientale* en yaygın olanlardan biridir ve Doğu Karadeniz bölgesinde doğal yayılım göstermektedir. Ayrıca morfolojik çeşitlilik bakımından farklı yaprak dizilişi, çiçek tipi ve rizom özellikleri gösteren türler mevcuttur. Bu türler; genellikle gölge seven, rizomlarıyla yayılım gösteren ve mevsimsel gelişim ritimleriyle çevresel faktörlere uyum sağlayan bitkilerdir (Sezer ve diğ., 2017; Tunçkol ve Aksoy, 2022, Ekim, 2013).

2.1.3 *Polygonatum orientale*’nin Bitki Özellikleri ve Yayılımı

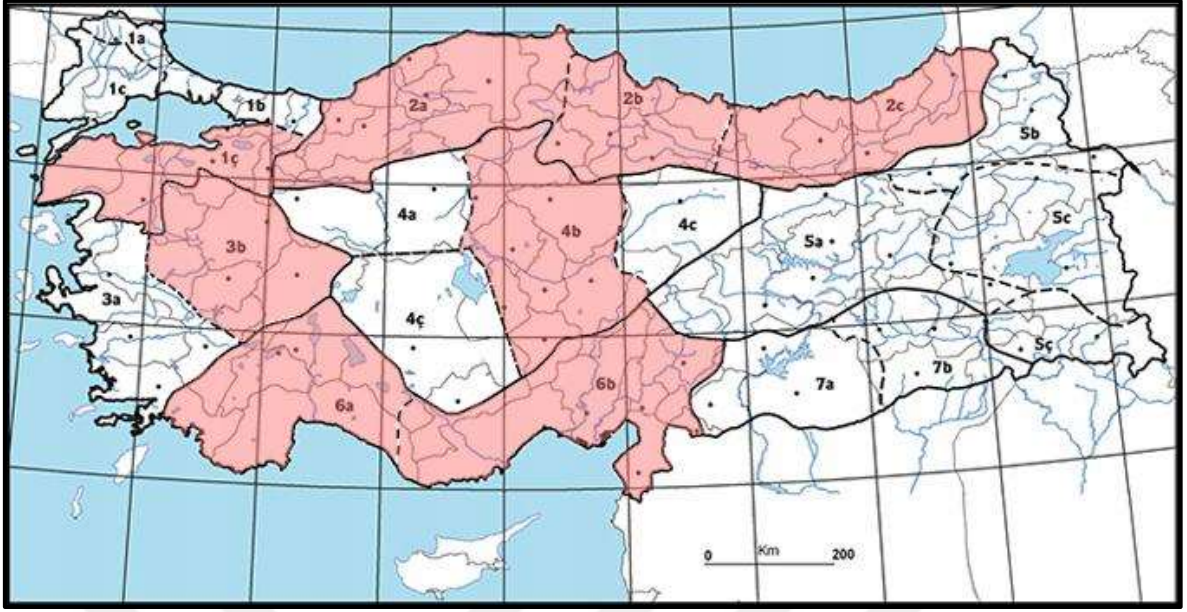
Polygonatum cinsinin genel evrimsel tarihçesinde türler, özellikle Doğu Asya bölgesinde çeşitlenmiştir. Kuzeydeki türlerin ayrılmasıyla kuzey ve güney gruplarının oluştuğu ve türlerin büyük ölçüde Güney Çin, Himalayalar ve çevresinde yoğunlaştığı anlaşılmaktadır (Şekil 2.3). *P. orientale* türü de diğer türlere benzer olarak, Asya kıtasında Güneydoğu

Çin'den Himalaya'lara kadar uzanan bölge içerisinde yayılım göstermektedir. Ancak *P. orientale* esas olarak Asya kıtasının güney bölgelerinde kalmış ve geniş bir coğrafi adaptasyon sergilemiştir (Wang ve diğ., 2016).



Şekil 2.3: *Polygonatum* Türlerinin Küresel Yayılım Haritası (WFO 2025).

Boğumluca (*P. orientale*), Kuşkonmazgiller (*Asparagaceae*) familyasına ait bir bitki türüdür. Türkiye’de doğal olarak Güney Marmara, Batı, Orta ve Doğu Karadeniz bölgelerinde; ayrıca İç Batı Anadolu, Orta Kızılırmak havzası, Antalya ve Adana çevresinde görülmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: *Polygonatum orientale*'nin Türkiye'deki Doğal Yayılım Bölgeleri (Ekim, 2013).
(1c) Güney Marmara Bölümü, (2a) Batı Karadeniz Bölümü, (2b) Orta Karadeniz Bölümü, (2c) Doğu Karadeniz Bölümü, (3b) İç Batı Anadolu Bölümü, (4b) Orta Kızılırmak Bölümü, (6a) Antalya Bölümü, (6b) Adana Bölümü

2.1.4 *Polygonatum orientale* ile İlgili Çalışmalar

2.1.4.1 Kimyasal içerik çalışmaları

Polygonatum cinsi bitkiler, sekonder metabolitler açısından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Özellikle şekerler, tanenler, saponinler ve müsilaj gibi bileşikler bu cinsin farklı türlerinde yaygın olarak tespit edilmiştir (Baytop, 1984). *P. verticillatum* rizomlarında spinostenol ve furostanol türevli glikozitler saptanmış; otsu kısımlarında ise az miktarda kardiyotonik glikozitlere rastlanmıştır (Pandey, 2006).

Bu türün kurutulmuş rizomları incelendiğinde, yaklaşık %1,5 oranında steroidal saponin yapısında diosgenin elde edilmiştir. Saponin içeriği, bitkinin gelişim evresine göre değişkenlik göstermekte olup; çiçekli dönemde %9 civarında iken, meyve döneminde bu oran %6,2'ye kadar düşmektedir (Yeşilada, 1987).

Diğer türlerde de benzer bileşikler tanımlanmıştır. Örneğin, *P. latifolium* ve *P. multiflorum* türlerinde diosgenin glikoziti bulunurken (Yeşilada ve Houghton, 1991; Pandey, 2006; Singh ve Kaushal, 2007), *P. multiflorum* türünde tigogenin saptanmıştır (Yeşilada ve

Houghton, 1991). Ayrıca *P. multiflorum*'un taze yapraklarından hazırlanan ekstraktlardan, C-galaktosiloflavon yapısında flavonoidler elde edilmiştir (Chopin ve diğ., 1977). *P. orientale* türü ise smilagenin glikoziti ile dikkat çekerken, *P. officinale*'in olgun meyvelerinden tiramin bileşiği izole edilmiştir. Aynı türün tohumları yüksek miktarda saponin içermektedir. Rizomlarından elde edilen saponinler hidroliz edildiğinde sapogenin formu temin edilmiştir (Pandey, 2006).

P. polyanthemum türünde hem smilagenin hem de tigogenin belirlenmiş, *P. officinale*'den ise diosgenin ve 25R-furost-5-en-3,22,26-triol gibi bileşikler ayrıştırılmıştır. *P. orientale*'nin taze rizomlarından ise iki önemli steroidal bileşik izole edilmiştir: skeptrumgenin glikozit ve akrojenin glikozit (Yeşilada ve Houghton, 1991).

2.1.4.2 Farmakolojik etkileri

Polygonatum türleri üzerine yapılan farmakolojik araştırmalar, bu bitkilerin antihiperglisemik, antikanser, analjezik, antipiretik, diüretik, antimalaryal, antioksidan, antimikrobiyal ve fitotoksik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (Khan ve diğ., 2012). *P. odoratum*'dan izole edilen steroidal glikozitlerin, glikoz kullanımını artırarak ve insülin direncini azaltarak antihiperglisemik potansiyel sergilediği, ancak doğrudan insülin salgısını etkilemediği tespit edilmiştir (Choi ve Park, 2002). Aynı bitkinin toplam flavonoid içeriğinin antidiyabetik özellik taşıdığı hayvan deneyleriyle gösterilmiştir (Shu ve diğ., 2009). Ayrıca, *P. sibiricum* Rizomlarının α -glukozidaz enzimini inhibe etme kapasitesi nedeniyle, geleneksel Çin tıbbında antidiyabetik etki mekanizması tanımlanmıştır (Gao ve diğ., 2008). *Polygonatum* türlerinden izole edilen saponinlerin, hücrel ölüm mekanizmalarını destekleyerek antikanser özellikler taşıdığı bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2005); ve bu türlerden türeyen birçok saponinin sitotoksik etkiler gösterdiği raporlanmıştır (Jin ve diğ., 2004; Ahn ve diğ., 2006). *P. verticillatum* türü ise hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiler sergilemiş, özellikle gram negatif suşlara karşı daha belirgin bir hassasiyet göstermiştir (Khan ve diğ., 2012). Bu bitkinin sulu ekstraktlarının *S. typhi*, *S. aureus* ve *M. tuberculosis* gibi insan patojenlerine karşı etkili olduğu da gösterilmiştir (Hou ve Jin, 2005).

Antioksidan etkinlik açısından bakıldığında, *Polygonatum* türlerinin ekstraktlarının E vitamini ile karşılaştırıldığında hiperkolesterolemik tavşanlardaki savunma

mekanizmalarına olumlu müdahalelerde bulunduğu ve düşük dozda E vitamini ilavesiyle antioksidan potansiyelin daha da artırıldığı bildirilmiştir (Jeon ve diğ., 2004).

Etanolik ekstraktlarının analjezik ve antipiretik etkileri hayvan modellerinde gösterilmiş; özellikle toprak üstü kısımların antipiretik aktivitesi daha güçlü bulunmuştur (Khan ve diğ., 2010; 2011). Yine aynı türün toprak üstü ve rizom kısımlarından elde edilen ekstraktların hipertermi gösteren sıçanlarda belirgin antipiretik aktivite sergilediği, özellikle toprak üstü kısımların daha etkili olduğu bulunmuştur (Khan ve diğ., 2012). Bununla birlikte, antiparazitik etki gözlemlense de *P. verticillatum* rizom ekstraktlarının antimalaryal bir etki göstermediği bildirilmiştir (Khan ve diğ., 2012; 2013).

Besin analizlerinde, *P. verticillatum* ekstraktlarının Zn, Fe, Cu, Cr, Mn ve Ni gibi mikrobisiner bakımından zengin olduğu, makro besinlerin ise rizomlarda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır (Khan ve diğ., 2012; Saeed ve diğ., 2010).

Afrodizyak potansiyel açısından yapılan bir çalışmada, *P. verticillatum* yaprak ekstraktlarının seksüel aktivitesi olmayan erkek sıçanlarda belirgin etkiler oluşturduğu tespit edilmiştir (Kazmi ve diğ., 2012). Ayrıca, *P. sibiricum* rizomlarından elde edilen ekstraktların sıçanlarda kardiyotonik aktivite gösterdiği deneysel olarak doğrulanmıştır (Hirai ve diğ., 1997).

2.1.4.3 Etnobotanik kullanımı

Polygonatum türleri, halk tıbbında çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. İlk yazılı bilgiler M.S. 220 yılında Çin'de derlenen *Mingyi Bie* adlı eserde kaydedilmiştir. 1590 tarihli *Bencao Gangmu*'da, Li Shizhen *Polygonatum* türlerini "toprağın özünü alan ilk tonik" olarak tanımlamıştır. Ayrıca bu türlerin gıda amaçlı kullanıldığı bildirilmiştir (Jiang, 1977; 1986; Xinqi ve Tamura, 2000).

Geleneksel Çin tıbbında *Polygonatum* türleri ateş düşürücü, öksürük giderici, kalp güçlendirici, diüretik, enerji artırıcı, hipoglisemik olarak ve akciğer hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Jiang, 1977; 1986; Xinqi ve Tamura, 2000). Ayrıca antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri de gösterilmiştir (Alluri ve diğ., 2006). *P. verticillatum* rizomlarından hazırlanan şuruplar humma, tüberküloz ve yanık tedavisinde; bazı karışımları ise diüretik ve üriner sistem rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Amrit, 2006; Ballabh ve diğ., 2008). Ancak analjezik etkisi bulunmadığı gösterilmiştir (Khan ve diğ., 2010).

Çin'de yapılan etnobotanik araştırmalarda, *Polygonatum* türlerinin çoğunlukla rizomlarının sebze, içecek, kuru gıda veya baharat olarak kullanıldığı ve bu şekilde bağışıklığı güçlendirdiği, yaşam süresini uzattığı düşünülmektedir (Wujisguleng ve diğ., 2012). Rizomlardan yapılan pirinç şaraplarının saç sağlığına olumlu etkileri olduğu, bitki ile yapılan likörün yorgunluk ve cilt sağlığına katkı sağlandığı kaydedilmiştir (Wujisguleng ve diğ., 2012; Khasbagan ve Sheng, 2000).

Pakistan'da *P. multiflorum* ve *P. verticillatum* "Saat Ashee" adıyla bilinmekte ve rizomları menstrüasyon ağrıları, rahim tümörleri ve şişkinlik gibi durumlarda kullanılmaktadır (Khan ve Khaton, 2008). Hindistan'da ise *P. verticillatum* "Mahamaida" olarak üriner ve sinirsel rahatsızlıklarda tonik olarak değerlendirilmektedir (Bisht ve Badoni, 2009; Shankar ve Rawat, 2006).

Çin'de *P. sibiricum* rizomlarının yüksek nişasta içerdiği ve antibakteriyel, antifungal, antiromatizmal etkiler gösterdiği bilinmektedir (Duke, 1985). Ayurveda tıbbında ise *P. verticillatum* "Salam-misri" olarak gençleştirici ve kuvvet verici bitkiler arasında yer almaktadır (Pandey ve diğ., 2006).

Meyvelerinin tüketimi konusunda doğrudan bilgi bulunmamakla birlikte, *P. sibiricum*'un tüm kısımlarının yenilebilir olduğu eski kaynaklardan aktarılmış ve son çalışmalarda tohumlarının da tüketilebileceği belirtilmiştir (Li ve diğ., 2009).

Batıda *Polygonatum* bitkileri genellikle "Solomon's Seal" (Süleyman'ın Mührü) adıyla bilinir. Bu adın çiçeklerin yıldız biçimli görünümü veya rizomlardaki boğumların mühür şekline benzemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Tamura, 1998).

Türkiye'de *Polygonatum* türleri "Mühürotu", "Kurtpençesi", "Dolamotu", "Mührüsüleyman" gibi isimlerle tanınmakta, rizomları kabızlık, romatizma, gut hastalıkları, cinsel güç artırımı ve doğurganlık sorunlarında kullanılmaktadır (Baytop, 1984; 1994; Tuzlacı, 2006; Demirci, 2010; Eminağaoğlu, 2012; Güner ve diğ., 2012). Rizomlarının ezilerek elde edilen lapası çıban olgunlaştırmak için pansuman amacıyla da uygulanmaktadır (Baytop, 1984; 1994). Ayrıca Osmanlı döneminde *P. orientale* rizomları bal ve polenle karıştırılarak afrodizyak olarak kullanılmıştır (Yeşilada ve Houghton, 1991). Günümüzde de bu kullanımının süre geldiği bölgeler bulunmaktadır. *P. orientale* rizomları Balıkesir'in

Serçeören köyünde bal ile karıştırılarak afrodizyak ve kısırlık tedavisinde kullanılmaktadır (Özdemir Nath, 2016, 86).

2.2 ANTİOKSİDAN SİSTEM

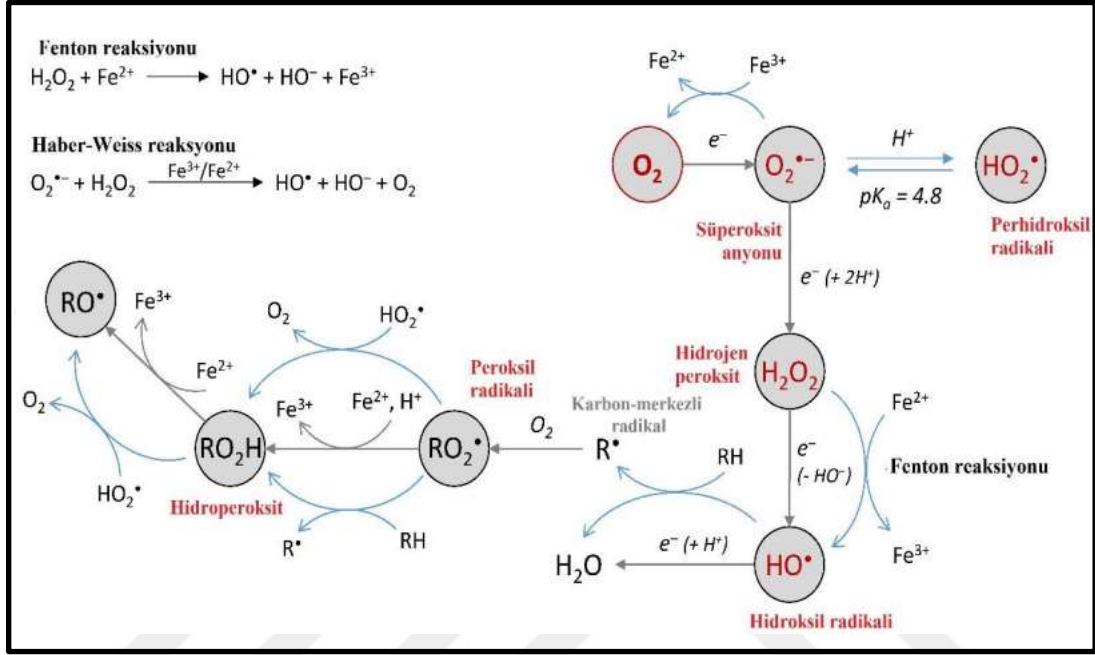
2.2.1 Serbest Radikallerin Oluşumu

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş en az bir elektrona sahip olan nötr ya da iyon formundaki atomlar ve moleküller, “serbest radikaller” olarak tanımlanır (Dökmeci, 2000). Bu radikaller arasında hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit gibi çeşitli yapılar yer almaktadır (Çavdar ve diğ., 1997). Canlı organizmalarda özellikle oksijen molekülünün yapısında meydana gelen değişimlerle ortaya çıkan ve “reaktif oksijen türleri” (ROS) ya da “serbest oksijen radikalleri” olarak adlandırılan moleküller en kritik serbest radikal çeşitleridir (Halliwell, 1991). Bu türler oldukça yüksek reaktiviteye sahiptir ve yüksek konsantrasyonlarda lipidler, DNA, proteinler gibi biyolojik makromoleküllerle etkileşime girerek hücre ve dokularda zarara yol açabilmektedirler (Dökmeci, 2000).

2.2.2 Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijenin yapısında yer alan çift eşleşmemiş elektron, onu biyolojik ortamlar açısından önemli bir serbest radikal kaynağı haline getirmektedir. Oksijen kökenli bu serbest radikaller, genellikle prooksidan olarak bilinen “reaktif oksijen türleri” (ROS) başlığı altında toplanmaktadır (Bayr, 2005; Scheibmeir ve diğ., 2005). Hücresel metabolizma süreci boyunca ortaya çıkan ROS çeşitleri arasında süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$), peroksil radikali ($ROO\bullet$), alkoksil radikali ($RO\bullet$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit ($NO\bullet$) yer almaktadır (Collin, 2019; Kohen ve Nyska, 2002). Şekil 2.5’te bu türlerin oluşumuna dair görsel bir açıklama sunulmuştur. ROS oluşumu hem hücre içi (endojen) hem de dış kaynaklı (eksojen) uyaranlarla tetiklenebilmektedir. Endojen üretim kaynakları arasında mitokondrideki elektron taşıma zinciri, lipoksigenaz ve peroksidaz gibi enzimatik süreçler ile sitokrom P450 sistemine dayalı reaksiyonlar yer almaktadır (Aslani ve Ghobadi, 2016; Buonocore ve diğ., 2010). Öte yandan, dış çevresel faktörler arasında ultraviyole ışınım, sigara ve alkol kullanımı, çevre kirliliği, ağır metal maruziyeti ve pestisitlere maruz kalma gibi etkenler ROS oluşumunu artıran başlıca unsurlardır (Phaniendra ve diğ., 2015; Ziech ve diğ., 2010). Sağlıklı hücre metabolizmasında, reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidan sistemler arasında bir denge bulunmaktadır. Ancak bazı içsel biyokimyasal

uyarılar ve çevresel kirletici faktörler, hücre içindeki ROS üretimini artırabilmektedir. Eğer bu serbest radikallerin düzeyi yükselir ya da antioksidan savunma mekanizmaları yetersiz kalırsa, hücreler oksidatif stres adı verilen duruma maruz kalınmaktadır (Adwas ve diğ., 2019).



Şekil 2.5: ROS Üretimi.

2.2.3 Oksidatif Stres ve Etkileri

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif süreçler sonucunda maruz kaldığı lipit peroksidasyonu, hücre içinde toksik etkiler gösteren çeşitli aldehitlerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu zararlı bileşikler arasında özellikle malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal öne çıkmaktadır. Oksidatif stres koşullarında oluşan bu bileşikler, hücre zarlarının yapısını bozmakta; zardaki yağ moleküllerinin yapısını değiştirerek membran akışkanlığını azaltmakta ve bütünlüğünü tehdit etmektedir. Bu süreç yalnızca lipitlere değil, aynı zamanda zar proteinlerine de zarar verebilmektedir (Paloma ve diğ., 2004). Lipit peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan bu toksik aldehitler, hücre zarında protein agregatlarının birikmesine neden olabilmektedir. Bu durum, zar üzerinde yer alan reseptörlerin ve enzimlerin işlevini olumsuz etkileyerek aktivite kayıplarına yol açmaktadır. Ayrıca, bu aldehitlerin DNA bazları ile etkileşime girerek mutasyon oluşumunu tetikleyebildiği de bildirilmektedir (Beckman ve diğ., 1998; Çırak ve diğ., 2003).

Testis dokusu, sperm üretimi ve steroid hormon sentezinin devamlılığı için özel koruma mekanizmalarına sahip olsa da bazı çevresel toksinler bu savunma sınırlarını aşarak testiste oksidatif stres oluşturabilmektedir. Bu durumun sonucunda, erkek üreme hücrelerinde DNA hasarı meydana gelebilir; sperm yapısında bozulmalar, lipid peroksidasyonunun artışı ve antioksidan sistemde dengesizlikler gözlemlenebilmektedir. Özellikle SOD ve katalaz gibi temel antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalma söz konusu olabilmektedir (İkeda ve diğ., 1999).

Oksidatif stres, hücre düzeyinde pro-oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki redoks dengesinin, pro-oksidanların lehine bozulmasıyla ortaya çıkan bir durumdur. Bu denge kaybı, hücresel yapılar üzerinde hasar oluşturabilecek süreçleri tetikleyebilmektedir. Normal koşullarda, ROS üretimi ile yok edilmesi arasında denge sağlayan sistemler mevcuttur ve bu süreç “redoks düzenleme” olarak bilinmektedir. Ancak bu karmaşık mekanizmalardan birinde meydana gelen aksaklık, hücre içi redoks dengesini bozmakta ve oksidatif stresin gelişimine zemin hazırlamaktadır (Pagan ve diğ., 2022; Sanchez-Valle ve diğ., 2012).

Oksidatif hasar hipotezine göre, organizmanın iç savunma sistemlerini aktive ederek ya da dışarıdan antioksidan desteği sağlayarak yaşlanma süreci geciktirilebilmekte ve yaşam süresi uzatılabilmektedir (Vaiserman ve diğ., 2016). Nitekim bazı araştırmalar, kalori kısıtlaması ve çeşitli besin destekleri gibi beslenme stratejilerinin hem yaşa bağlı hastalıkların hafifletilmesinde hem de yaşam süresinin uzatılmasında etkili olduğunu göstermiştir (Peng ve diğ., 2012).

Bununla birlikte, tüm doğal veya sentetik antioksidan takviyeleri için aynı olumlu sonuçların elde edildiği söylenememektedir. Deneysel modeller üzerinde yapılan araştırmalar, bazı antioksidanların yaşam süresini uzattığını, stres toleransını ve üreme potansiyelini artırdığını gösterirken; kimi durumlarda bu etkilerin gözlenmediği, hatta bazı örneklerde yaşam süresinin kısaldığı ya da doğurganlıkta azalma görüldüğü belirtilmiştir (Vaiserman ve diğ., 2016).

Oksidatif stresin biyolojik göstergeleri arasında; okside olmuş glutatyonun toplam glutatyon düzeyine oranındaki artış, Bcl-2 proteininin artmasına bağlı olarak lipofuksin birikimi, membran lipidlerinin peroksidasyonu, glutamin sentaz düzeyinin azalması, redoks aktif demirin indirgenmesi ve hücre zarındaki lipid yapısında meydana gelen değişiklikler

sayılabilmektedir. Bu tür değişimlerin yaşlanma ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir (Joseph ve diğ., 2005).

Yaşın ilerlemesiyle birlikte oksidatif stres seviyelerinde belirgin bir artış olduğu gözlenmektedir (Asthana ve diğ., 2015; Wen ve diğ., 2014). Genetik yapı kadar çevresel faktörler —beslenme alışkanlıkları, sigara kullanımı, alkol tüketimi ve çevre kirliliği gibi— yaşlanma sürecinde belirleyici rol oynamaktadır (Collins ve diğ., 2006; Getoff, 2007).

Kronik oksidatif stres koşullarında, vücudun kendi antioksidan sistemleri yetersiz kalabileceğinden; ROS'la mücadelede etkili olan vitaminler, doğal kökenli maddeler, polifenoller ve polisakkaritler gibi bileşenler ön plana çıkmaktadır (Xu ve diğ., 2016). Harman'ın görüşüne göre, bu durumlarda E ve C vitaminleri, beta-karoten, lipoik asit, koenzim Q10, glutatyon, fitoöstrojenler, polifenoller ve çinko, selenyum, manganez gibi mineraller ile yapılan takviyeler, redoks dengesinin korunmasına yardımcı olabilmektedir (Vaiserman ve diğ., 2016).

2.2.4 Canlılardaki Antioksidan Sistemler

Organizmalarda, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücresel hasarı önlemek amacıyla görev yapan bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Bu sistem; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler ile E vitamini, glutatyon, ürat ve bilirubin gibi endojen ve ekzojen kaynaklı bileşenlerden oluşmaktadır. Süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz enziminin yardımıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir. Oluşan H_2O_2 , süperoksit kiyasla daha az toksik olsa da katalaz, peroksidaz ve GPx gibi enzimler tarafından su ve oksijene ayrıştırılarak etkisiz hale getirilmektedir. Ancak H_2O_2 , eğer Fe^{2+} veya Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{2+} , Zn^{2+} gibi geçiş metalleriyle etkileşirse, oldukça agresif bir serbest radikal olan hidroksil ($\bullet OH$) radikalini oluşturabilmektedir (Çavdar ve diğ., 1997). Glutatyon (GSH), GPx enzimi aracılığıyla hidrojen peroksidi ortadan kaldırırken okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. Glutatyon, karaciğerde glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden sentezlenen bir tripeptittir ve en etkili hücre içi antioksidanlardan biridir. Reaktif oksijen türleriyle doğrudan reaksiyona girerek hücreleri oksidatif zararlardan korumaktadır (Akkuş, 1995). Normal fizyolojik koşullarda, oksidanlar ile antioksidanlar arasında denge söz konusudur. Fakat antioksidan kapasite yetersiz kaldığında ROS düzeyleri yükselmekte ve hücresel

düzeyde hasar oluşturmaktadır. Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin neden olduğu bu yapısal bozulmalara “oksidatif stres” adı verilmektedir (Beckman ve diğ., 1998).

2.3 NÖROLOJİK HASTALIKLAR

Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) katkısıyla 2021 yılında gerçekleştirilen geniş çaplı bir araştırmaya göre, dünya genelinde 3 milyardan fazla kişi—yaklaşık her üç bireyden biri—nörolojik bir sağlık problemi yaşamaktadır. Bu durum, nörolojik hastalıkları hem küresel sağlık sorunlarının hem de iş gücü kaybının başlıca sebeplerinden biri haline getirmiştir. 1990’dan 2021 yılına kadar geçen sürede, bu hastalıkların neden olduğu toplam hastalık yükü, erken ölüm oranı, sakatlık ve buna bağlı olarak hesaplanan iş göremez yaşam yılı (Disability Adjusted Life Year- DALY) %18 oranında artış göstermiştir. En yüksek DALY oranlarına sahip nörolojik bozukluklar arasında felç, neonatal ensefalopati, Alzheimer ve diğer demans türleri, diyabetik nöropati, menenjit, prematüre doğuma bağlı sinir sistemi komplikasyonları, otizm spektrum bozuklukları ve sinir sistemi kanserleri yer almaktadır (DSÖ, 2024; Steinmetz ve diğ., 2024).

2.3.1 Alzheimer Hastalığı ve Tedavisi

Bilişsel ve davranışsal belirtilerin altında yatan nöropatolojik süreçler, doğrudan insan sağlığı ve yaşam kalitesini etkilediği için, son yıllarda nöro bilim araştırmalarının en öncelikli alanlarından biri haline gelmiştir. Bu kapsamda Alzheimer hastalığı, demansla ilişkili davranışsal değişimlerin en temel patolojik sebebi olarak değerlendirilmektedir. Hastalık ilk kez 1907 yılında Almanya’nın Frankfurt kentinde, Alois Alzheimer tarafından 51 yaşındaki bir kadın hastanın klinik semptomları üzerinden tanımlanmıştır. Bu hastada gözlenen hafıza kaybı, konuşma ve okuma güçlükleri, Alzheimer’ın dikkatini çekmiş ve hastanın ölümünden sonra yapılan histolojik incelemede nevroitik plaklar, nörofibriler yapı değişiklikleri ve amiloid anjiyopatiler saptanmıştır (Bondi ve diğ., 2017). Günümüzde Alzheimer hastalığı, dünya genelinde milyonlarca bireyi etkileyen hem hasta hem de yakın çevresi üzerinde büyük psikososyal ve ekonomik yük oluşturan, ilerleyici ve tedavisi olmayan nörodejeneratif bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır.

Alzheimer hastalığının karakteristik özelliği, beyinde anormal protein yapılarının birikimidir. Bu bağlamda iki temel patolojik protein; beta-amiloid (A β) plakları ve tau proteinlerinden oluşan nörofibriler yumaklardır. Beta-amiloid, amiloid öncü proteininden

(APP) türeyen ve normalden sapmış işlenme süreciyle çözünmez birikimlere dönüşen bir peptittir. Bu plaklar, nöronlar arası iletişimi bozarak hücre ölümüne zemin hazırlamaktadır. Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonuna bağlı olarak oluşan nörofibriler yumaklar ise nöronal mikrotübül yapısının bozulmasına yol açmakta, hücre içi taşımayı aksatmakta ve hücre dejenerasyonunu tetiklemektedir (Tiwari ve diğ., 2019).

Alzheimer hastalığı, görülme yaşı ve genetik özelliklerine göre farklı alt tiplere ayrılmaktadır. 65 yaşından önce başlayan erken başlangıçlı Alzheimer, genellikle PSEN1 ve PSEN2 gibi genlerdeki mutasyonlarla ilişkili olup güçlü bir genetik yatkınlığa sahiptir. Buna karşın, 65 yaş sonrası başlayan geç başlangıçlı Alzheimer, genetik faktörlerin yanı sıra çevresel etkiler ve yaşam tarzı ile şekillenmekte ve en yaygın görülen form olarak karşımıza çıkmaktadır (Tellechea ve diğ., 2018). Ailesel ve sporadik olmak üzere iki farklı kalıtsal biçimi bulunan Alzheimer'da, ailesel tip kuşaklar boyunca aynı ailede görülürken; sporadik form, açık bir kalıtım modeli göstermemektedir (Andrade-Guerrero ve diğ., 2023).

Son yıllarda hastalığın ortaya çıkışında yalnızca genetik yatkınlıkların değil, aynı zamanda metabolik süreçlerin de etkili olabileceği öne sürülmektedir. Özellikle glukoz metabolizmasındaki bozulmalar Alzheimer'ın patogenezi ile ilişkilendirilmiş ve bu hastalık, kimi zaman “Tip 3 diyabet” olarak da anılmıştır. Beyindeki nöronlar ve glial hücreler arasında glikozun kullanımı, enerji dengesinin sürdürülmesinde kritik rol oynamaktadır. GLUT3 gibi glikoz taşıyıcı proteinler aracılığıyla glikoz nöronlara taşınmakta; burada glikoz, önce glikoz-6-fosfata sonra piruvata dönüştürülmekte ve ardından TCA döngüsüne girerek enerji üretiminde kullanılmaktadır. Astrosit-nöron laktat şantı (ANLS) modeli, glikozun astrositler aracılığıyla laktata çevrilip nöronlara taşındığı ve burada tekrar piruvata dönüştürülerek oksidatif fosforilasyonda kullanıldığı metabolik etkileşimi açıklamaktadır (Wang ve diğ., 2022; Simpson ve diğ., 2008). Yaşla birlikte bu sistemin işleyişinde bozulmalar gözlenmekte; glikoz taşınımı ve mitokondriyal fonksiyonlar Alzheimer hastalarında daha belirgin olarak bozulmaktadır (Butterfield ve Halliwell, 2019).

Amino asit metabolizmasındaki değişimlerin Alzheimer patofizyolojisinde nasıl bir rol oynadığı henüz tam olarak netleşmemiştir. Ancak amino asitlerin nörotransmitter sentezi, hücre içi protein agregasyonu, beyin enerji metabolizması, inflamasyon yanıtları ve hücreler arası iletişim gibi pek çok süreci etkilediği bilinmektedir. Özellikle bazı amino asitlerin birikimiyle oluşan anormal protein agregatlarının, Alzheimer hastalığının gelişimiyle

bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Kölker, 2018; Shimomura ve Kitaura, 2018; Xie ve diğ., 2015).

Kolinerjik sistemin bozulması da Alzheimer hastalığının temel mekanizmalarından biri olarak değerlendirilmiştir. Erken dönem çalışmalardan itibaren kolinerjik nöronlarda asetilkolin üretimini sağlayan kolin asetiltransferaz (ChAT) düzeylerinde azalma ve asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinde düşüş olduğu ortaya konmuştur (Davies ve Maloney, 1976; Hampel ve diğ., 2018; Ballinger ve diğ., 2016; Ferreira-Vieira ve diğ., 2016). Otopsi çalışmaları, Alzheimer hastalarının korteks, hipokampus ve bazal ön beyindeki kolinerjik reseptörlerde —özellikle nikotinik ve muskarinik alt tiplerde— anlamlı yoğunluk kaybı olduğunu göstermektedir (Bekdash, 2021; Nyakas ve diğ., 2011). Ayrıca, biriken amiloid plakların kolinerjik sinyali taşıyan mAChR reseptörlerinin işlevini azaltarak hafıza, sinaptik plastisite ve nöronal uyarılabilirlik gibi bilişsel süreçleri olumsuz etkilediği düşünülmektedir (Jiang ve diğ., 2014; Kar ve diğ., 2004). Bu nedenle mevcut tedaviler arasında yer alan donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolin düzeyini artırarak kolinerjik fonksiyonları desteklemeyi hedeflemektedir (Lamprey ve diğ., 2022).

2.3.2 Parkinson Hastalığı ve Tedavisi

Parkinson hastalığı, dünya genelinde 6 milyondan fazla bireyi etkileyen ve en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. 2040 yılına kadar bu sayının iki katına çıkarak 12 milyonu aşması öngörülmektedir (Dorsey ve diğ., 2018; Feigin ve diğ., 2019). Hastalık, istemsiz kas hareketleriyle karakterize olup, titreme, kaslarda sertlik ve koordinasyon bozuklukları gibi motor semptomlarla kendini göstermektedir. Klinik tablo genellikle yavaş seyirli bir başlangıçla ilerler ve zamanla hastaların yürüme ve konuşma gibi temel işlevlerinde belirgin zorluklar oluşturmaktadır. Bu motor belirtilerin yanı sıra, hastalığın ileri evrelerinde bilişsel yavaşlama, depresyon, uyku düzensizlikleri, duygudurum değişiklikleri ve kronik yorgunluk gibi motor olmayan belirtiler de sıkça gözlenmektedir (NIH, 2023).

Hastalığın patofizyolojisinde, hareket kontrolünden sorumlu beynin bölgesi bir bölgesi olan substantia nigra'daki dopamin üreten (dopaminergik) nöronların işlev kaybı ya da ölümü temel rol oynamaktadır. Bu nöronlar, motor işlevlerin düzenlenmesinde kritik bir görev üstlenen dopamin adlı nörotransmitterin sentez ve salımından sorumludur. Bu hücrelerin

azalması dopamin eksikliğine neden olmakta ve Parkinson hastalığına özgü motor bozuklukların temelini oluşturmaktadır (Surmeier, 2018).

Parkinson hastalığında ayrıca yalnızca hücre kaybı değil, substantia nigra ve diğer bazı beyin bölgelerinde Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri gibi yapısal anomaliler de gözlenmektedir. Bu yapılarda, α -sinüklein adlı proteinin hatalı katlanarak birikmesi, hastalığın karakteristik patolojik bulguları arasında yer almaktadır. Bu nedenle Parkinson hastalığı, α -sinüklein proteinine bağlı bozuklukları içeren “sinükleinopatiler” sınıfında değerlendirilmektedir (Tolosa ve diğ., 2021). Yanlış katlanmış α -sinüklein formları, putresin, spermin ve spermidin gibi poliaminlerle etkileşerek fibril yapılar oluşturmaktadır. Bu tür birikimlerin sinir hücrelerinde (nöronlarda) birikmesi, Parkinson hastalığının gelişiminde önemli bir etken olarak kabul edilmektedir (Chang ve diğ., 2022; Ghosh ve diğ., 2017).

2.3.3 Asetilkolinesteraz ve Monoamin Oksidaz Enzimlerinin Nörolojik Hastalılardaki Rolü

Asetilkolinesteraz (AChE), kolinerjik sistemin temel enzimlerinden biridir ve sinaptik iletimi sonlandırarak asetilkolin (ACh) adlı nörotransmitterin kolinerjik sinapslarda hidrolizini sağlamaktadır. Bu hızlı parçalanma süreci, postsinaptik reseptörlerin sürekli uyarılmasını engelleyerek düzgün sinir iletimi ve nöromüsküler işlevlerin korunmasını sağlamaktadır (Patočka ve diğ., 2004). AChE inhibitörleri, Alzheimer hastalığı (AH) ve myasthenia gravis gibi kolinerjik işlevin bozulduğu nörolojik hastalıkların tedavisinde terapötik hedef olarak kullanılmaktadırlar. Edrofonyum ve takrin gibi ajanlar, sinaptik aralıkta asetilkolin düzeylerini artırarak kolinerjik iletimi güçlendirmekte ve hastalık semptomlarını hafifletmektedir (Tougu, 2001). AChE, aynı zamanda çevresel ve mesleki toksikoloji alanında, özellikle organofosfat ve karbamat türü pestisitlere maruziyetin değerlendirilmesinde önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu tür maddelerin neden olduğu AChE inhibisyonu, nörotoksisite göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Jameson ve diğ., 2007). Son dönemdeki çalışmalarda, AChE’nin alternatif eksonlarından türeyen izoformlarının enzimatik olmayan işlevlere sahip olabileceği ve bu varyantların gelişimsel nörotoksisite ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayabileceği ortaya konmuştur (Pahdi, 2020).

AChE'nin asetilkolini hidrolize etme görevi, motor kontrol ve duyu iletiminin düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Sinaptik aktivitenin sürekli olmasını engelleyerek, özellikle nöromusküler kavşakta fizyolojik işlevlerin sürdürülmesini sağlamaktadır. AChE işlevinin bozulması ya da inhibisyonu, özellikle Alzheimer hastalığı gibi kolinerjik iletimin azaldığı durumlarla ilişkilidir (Mukherjee ve diğ., 2007). AChE inhibitörleri, sinaptik aralıkta asetilkolin düzeylerini artırarak kolinerjik iletimi güçlendirmekte ve bilişsel işlevlerin korunmasına katkı sağlamaktadır. Donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi ajanlar bu amaçla klinikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Ibach & Haen, 2004). Son yıllarda bitkisel kökenli asetilkolinesteraz inhibitörleri üzerine yapılan araştırmalar artmış, bazı bitki ekstraktlarının %80'in üzerinde inhibisyon oranlarına ulaştığı gösterilmiştir. Bu bulgular, doğal kökenli tedavi seçeneklerinin nörodejeneratif hastalıklarda kullanılabileceğine dair umut vermektedir (Mukherjee ve diğ., 2007; Can ve diğ., 2023).

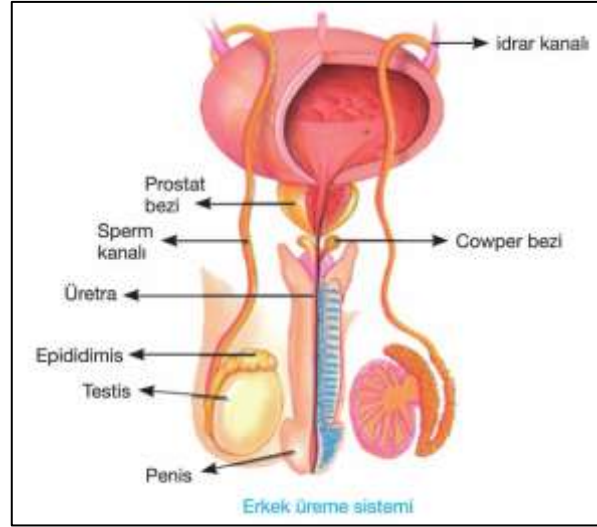
Monoamin oksidazlar (MAO), mitokondriyal dış membranda lokalize olmuş ve biyojenik aminlerin oksidatif yıkımından sorumlu flavin-adenin dinükleotid (FAD)-bağımlı enzimlerdir. İki ana izoformu bulunan bu enzimlerden MAO-A, başta serotonin (5-HT), noradrenalin ve adrenalin gibi monoaminlerin yıkımında görev alırken; MAO-B daha çok dopamin ve feniletilamin gibi nörotransmitterlerin metabolizmasında etkilidir (Youdim ve Bakhle, 2006). MAO-A ve MAO-B'nin beyin dokusundaki ekspresyon düzeyleri, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimiyle birlikte değişmektedir. Alzheimer hastalarında hem MAO-A hem de MAO-B aktivitesinde artış raporlanmış; bu durum oksidatif stres düzeyinin artmasına, nörotransmitter dengesizliklerine ve nörodejenerasyona sebep olmaktadır (Saura ve diğ., 1994; Grimsby ve diğ., 1997). Parkinson hastalığında ise özellikle MAO-B, dopaminin yıkımında görev alması nedeniyle patofizyolojik sürecin merkezinde yer almaktadır. Dopamin yıkımı sırasında oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS), substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronlara toksik etki göstererek hücre ölümünü hızlandırmaktadır (Riederer ve Lachenmayer, 2003). Bu nedenle MAO inhibitörleri, nöroprotektif etkiler sağlayarak tedaviye destek olmaktadır. Selegilin ve rasagilin gibi selektif MAO-B inhibitörleri, Parkinson hastalarında dopaminin yıkımını azaltarak semptomları hafifletmekte ve motor fonksiyonların korunmasına yardımcı olmaktadır. Alzheimer tedavisinde de MAO-A ve MAO-B inhibitörlerinin sinaptik monoamin düzeylerini artırarak kognitif işlevler üzerinde olumlu etkiler sağlayabileceği öne sürülmektedir (Bortolato ve diğ., 2008).

Bitkisel kaynaklı doğal MAO inhibitörleri üzerine yapılan araştırmalar, bu enzimlerin aktivitesini selektif şekilde baskılayabilen fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin bulunabileceğini göstermektedir. *Polygonatum orientale* gibi bitkilerin ekstraktlarının MAO enzimleri üzerinde inhibitör etki göstermesi, bu türlerin fitoterapötik potansiyelini güçlendirmektedir (Wang ve diğ., 2018).

2.4 ERKEK ÜREME SİSTEMİ GENEL BİLGİLER

2.4.1 Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; sperm üretimi ve androjen hormonlarının salgılanmasından sorumlu testisler ile spermin taşındığı kanallar olan epididimis, ductus deferens ve ejakülatör kanalların yanı sıra seminal sıvıyı oluşturan yardımcı bezler olan seminal vezikül, prostat ve bulbouretral bezler ile dış genital organ olan penis gibi yapılardan oluşmaktadır (Şekil 2.6) (Kiersenbaum, 2006). Testisler, skrotum içinde yer alan çift yapılı erkek gonadlarıdır. Skrotumun vücut dışına doğru yerleşmiş olması, testislerin daha düşük sıcaklıkta korunmasına imkân tanıyarak spermatogenezin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesini mümkün kılar (Junqueira ve diğ., 1992). Testis, üç kat bağ doku tabakasıyla çevrilidir. En dışta yer alan tunica vaginalis, skrotumun iç yüzeyini döşer ve testis, epididimis ile vas deferens'in başlangıç bölümünü kapsar. Ortada bulunan tunica albuginea, testisin kapsülünü oluşturur ve rete testis'in bulunduğu alanda kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir. Bu mediastinumdan testis içine doğru uzanan bağ doku bölmeleri, organı 250 ila 300 lobül şeklinde ayırır. En içte ise tunica vasculosa adı verilen, bağ dokusu, fibroblastlar ve damar yapılarından oluşan gevşek bir tabaka yer alır (Sadler ve Langman, 2000; Kiersenbaum, 2006; Knobil ve Neill, 2006). Testis kapsülünün kasılma özelliği sayesinde, sperm taşıma kanallarında bir pompalama etkisi oluşur ve sperm hücrelerinin taşınması kolaylaşır (Solomon ve diğ., 1997). Seminifer tübüller, uzun ve kıvrımlı tüpler olup, birkaç kat fibroblast içeren fibröz bir dış kılıf, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir seminifer epitelden oluşur. Bu bazal lamina üzerine yerleşmiş, düz kas benzeri özellikler taşıyan düzleşmiş miyoepitelyal hücreler de tübül yapısında yer alır (Junqueira ve diğ., 1992).



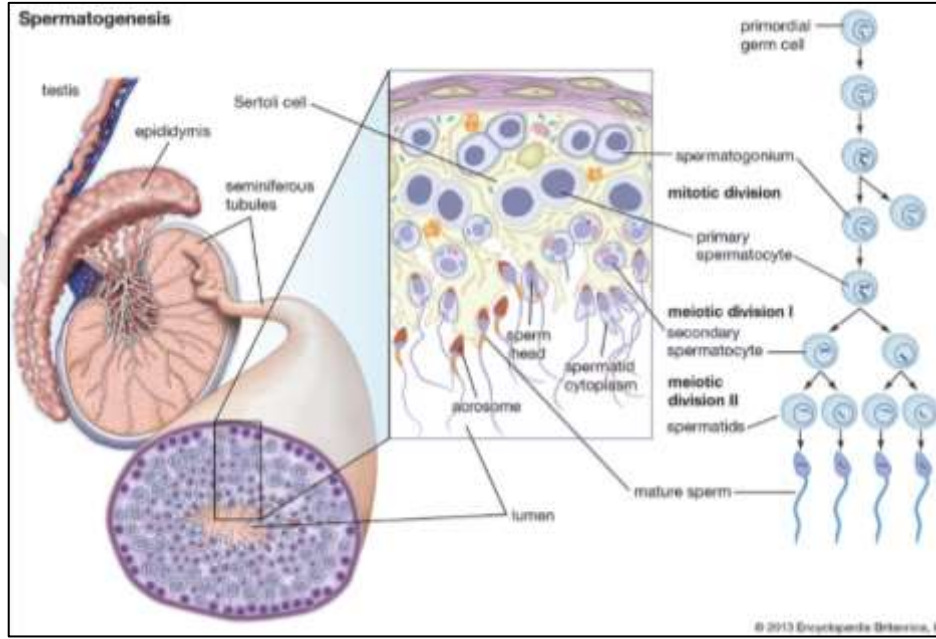
Şekil 2.6: Erkek Üreme Sistemi Bileşenleri.

2.4.1.1 Spermatogenesis

Primer spermatositler, çekirdeklerindeki kromatin organizasyonu nedeniyle mikroskopik olarak farklı bir görünüm sergilemektedirler. Hücre ve çekirdek hacimlerinde, özellikle profaz evresinde olmak üzere, mayotik bölünme sürecinde belirgin bir artış gözlemlenmektedir (Russell ve diğ., 1990; Junqueira ve diğ., 1992; Sadler ve Langman, 2000). Seminifer tübüllerde yer alan en iri ve dikkat çekici germ hücreleri olan primer spermatositler, genellikle germinal epitelin orta tabakalarında konumlanmaktadır. Mayoz I tamamlandıktan sonra bu hücreler, daha küçük boyutta ve daha yoğun kromatin yapısına sahip sekonder spermatositleri meydana getirmektedirler. Sekonder spermatositler ise kısa sürede mayoz II'yi tamamlayarak spermatidleri oluşturmaktadırlar. Spermatidler, sekonder spermatositlerden daha küçük olup, iri kromatin granülleri ile ayırt edilmekte ve Sertoli hücreleriyle yakın temas halinde, seminifer tübül lümenine yakın bölgelerde gruplaşmış halde bulunmaktadır. Primer spermatositlerden spermatit oluşumuna kadar olan süreç spermatogenez olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.7). Bu aşamadan sonra spermiogenez süreciyle spermatidler, olgun spermatozoonlara dönüşmektedirler. Spermatidlerin baş kısımları Sertoli hücresinin sitoplazmasına gömülürken, kuyruk kısımları serbest şekilde lümeneye doğru uzanmaktadır (Russell ve diğ., 1990; Knobil ve Neill, 2006; Sadler ve Langman, 2000).

Spermiogenez Şekil 2.8'de özetlenmiştir. Spermiogenez, spermatogenezin son aşamasını temsil etmekte ve dört temel evreden oluşmaktadır: Golgi, şapka, akrozomal ve olgunlaşma

evreleri. Golgi evresinde akrozom granülleri belirlemekte, enzimler Golgi aygıtından akrozomal keseye taşınmaktadır. Şapka evresinde akrozom düzleşerek çekirdek üzerinde kask benzeri bir yapı oluşturmaktadır. Akrozomal evrede, akrozom çekirdeği sarmakta ve aksonem yapısı geliştirmektedir. Son aşama olan olgunlaşma evresinde spermatidler morfolojik değişimlerle serbest haldeki sperm hücrelerine dönüşmektedirler (Leblond ve diğ., 1952).



Şekil 2.7: Spermatogenez.

Spermatogenezin sağlıklı işleyişi, hipofizin ön lobundan salgılanan FSH (folikül uyarıcı hormon) ve LH (luteinleştirici hormon) tarafından düzenlenmektedir. LH, testislerde bulunan Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretimini başlatırken, FSH Sertoli hücrelerinden ABP (androjen bağlayıcı protein) salgılatmakta ve böylece spermatogenez desteklemektedir. LH salınımı, kandaki testosteron düzeyine bağlı negatif geri bildirim mekanizmasıyla düzenlenirken, FSH salınımı Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin ve aktivin proteinleriyle kontrol altına alınmaktadır (Sadler ve Langman, 2000).

dağınık kromatin ve bir ya da birkaç adet belirgin nükleolus içermektedir. Boyuna kesitlerde oval veya yuvarlak görünüme sahip bu hücrelerin sitoplazmalarında, iyi gelişmiş düz ve granüllü endoplazmik retikulum, bol miktarda mitokondri, lizozomlar, lipid damlacıkları, yaygın Golgi aygıtı ve zengin bir hücre iskeleti yapısı bulunmaktadır (Russell ve diğ., 1990; Knobil ve Neill, 2006). Sertoli hücreleri gelişen spermatogenik hücrelere fiziksel destek sağlamak, spermatidlerdeki artık sitoplazmayı fagosite etmek, olgun spermatozoaları seminifer tübül lümenine aktarmak ve testiküler sıvı salgılayarak spermin taşınmasını sağlamak gibi çeşitli görevler üstlenmektedir (Kiersenbaum, 2006). Bu hücreler arasında yer alan sıkı bağlantılar, kan-testis bariyerini oluşturarak seminifer tübül yapısını bazal ve adluminal (lümen altı) bölgelere ayırmaktadır. Böylece zararlı maddelerin germinal dokuya geçişi engellenirken, gelişmekte olan spermatositlerin yüzey antijenlerinin dolaşıma karışması da önlenmektedir (Russell ve diğ., 1990; Kiersenbaum, 2006). FSH (folikül stimüle edici hormon) etkisiyle Sertoli hücreleri androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemektedir. ABP, testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenlere yüksek bağlanma kapasitesi göstererek, seminifer tübül ortamında bu hormonların yeterli düzeyde bulunmasını sağlamakta ve böylece spermatogenezi desteklemektedir. Aynı zamanda, aktivin ve inhibin salgılayarak FSH'nin salınımını geri bildirim mekanizmasıyla düzenlemektedir (Kiersenbaum, 2006). Yapılan çalışmalar, Sertoli hücrelerinin sayısının günlük spermatid üretimiyle doğru orantılı olduğunu ortaya koymuştur (Berndtson ve diğ., 1990).

2.4.1.3 Leydig hücresi

Leydig hücreleri, testiste yer alan ve ilk olarak 1850 yılında Franz Leydig tarafından tanımlanan endokrin hücrelerdir (Kuehnell, 2003). Bu hücreler, seminifer tübüller arasında yer alan interstisyel bağ doku bölgelerinde, makrofajlar, fibroblastlar, miyoid hücreler, lenfositler, sinir uzantıları ve kan damarlarıyla birlikte bulunmaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2003). Morfolojik olarak iri ve çokgen yapıda olan Leydig hücreleri, oval şekilli çekirdeklere ve tanecikli sitoplazmaya sahiptirler. Genellikle kapiller damarların çevresinde kümelenmiş halde gözlemlenmektedirler ve sitoplazmaları eozinofilik özellik gösterdiğinden histolojik boyamalarda ayırt edilebilir durumdadırlar (Junqueira ve Carneiro, 2003).

Bu hücreler, lipid damlacıkları ve lipofuskin pigmentleri içermeleriyle karakterize edilirken, yalnızca Leydig hücrelerine özgü yapılar olan Reinke kristalleriyle de tanımlanabilmektedirler. Mitokondrileri, düz tübüler krista yapısında olup enerji üretimi açısından yüksek kapasite göstermektedir. Ayrıca sitoplazmalarında oldukça gelişmiş düz endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Bu organeller, hücrenin temel fonksiyonu olan testosteron sentezinde görev almaktadır (Sadler ve Langman, 2000; Kierszenbaum, 2006; Knobil ve Neill, 2006). Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, spermatogenezin devamı ve erkek ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimi için vazgeçilmez bir hormondur. Embriyogenez sürecinde gonadal farklılaşmada etkin rol oynayan bu hücreler, ergenlikte ise erkek üreme sistemine ait yapısal ve fonksiyonel gelişimlerin düzenlenmesinde görev üstlenmektedir. Ayrıca seminal vezikül, prostat gibi yardımcı bezlerin olgunlaşmasına katkıda bulunarak erkek fertilesinin korunmasına da destek sağlamaktadırlar (Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2011; Potter ve Defalco, 2017).

2.5 C. ELEGANS GENEL ÖZELLİKLERİ

Toprakta serbestçe yaşayan ve biyolojisinin pek çok yönü ayrıntılı şekilde incelenmiş olan *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), yalnızca sentetik kimyasalların değil, aynı zamanda doğal kaynaklı çeşitli bileşiklerin faydalı, zararlı ya da toksik etkilerinin araştırılmasında etkili bir model organizma olarak öne çıkmaktadır (Ruan ve diğ., 2016).

Son dönemlerde yaşlanma karşıtı araştırmalarda sıkça kullanılan bu nematod, yaşlanma süreci, yaşam süresi ve stres yanıtı gibi fizyolojik süreçleri düzenleyen yeni genetik yapıların belirlenmesinde önemli katkılar sunmaktadır (Jin ve diğ., 2019; Wang ve diğ., 2019). *C. elegans*, dünya genelinde yaygın olarak kullanılan, parazit olmayan bir toprak solucanı türüdür ve yaklaşık yarım asırdır bilimsel çalışmalarda deneysel model olarak değerlendirilmektedir (Meneely ve diğ., 2019).

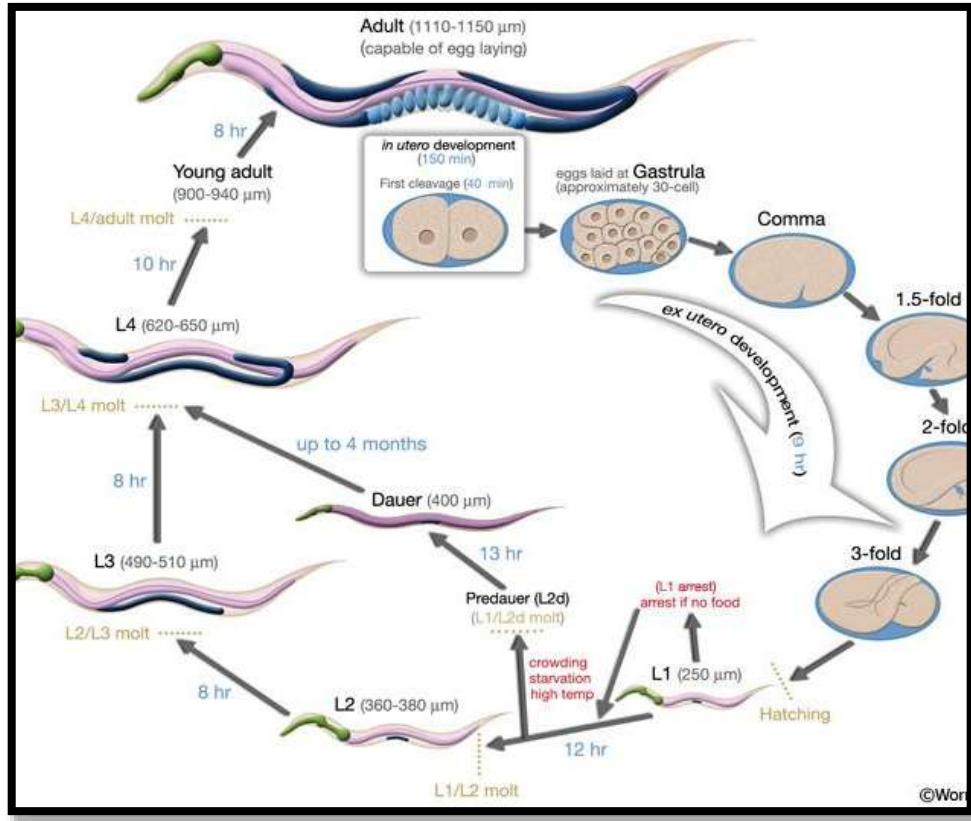
Hızlı yaşam döngüsü (yaklaşık 2–3 hafta ömür) ve laboratuvar koşullarında kolayca çoğaltılabilmesi nedeniyle, bu organizma deneysel çalışmalarda oldukça pratiktir. Ayrıca çok sayıda transgenik suşunun mevcut olması, araştırmacılara genetik manipülasyon ve gözlem konusunda büyük avantaj sağlamaktadır. İlginç bir şekilde, insan genomunun yaklaşık üçte ikisi bu organizmada korunmuş olduğundan, *C. elegans*'tan elde edilen

bulgular insan biyolojisine dair çıkarımlar yapmaya olanak tanımaktadır (Feng ve diğ., 2015; Wen ve diğ., 2014).

Bunun yanında, *C. elegans*, organizmalarda antioksidan etkilerin araştırılması için de elverişli bir canlıdır. Bu özellik, onu oksidatif stres kaynaklı hastalıkların önlenmesinde, bitkisel ya da doğal çözüm yollarını test etmede ideal hale getirmektedir. Pek çok çalışma, tıbbi bitkilerden elde edilen çeşitli aktif bileşenlerin; yaşlanmayı geciktirme, yaşam süresini artırma ve stresle başa çıkma potansiyelini ortaya koymuştur (Asthana ve diğ., 2015). Bu testler aracılığıyla yalnızca ömür uzunluğu değil, aynı zamanda stres dayanıklılığı da değerlendirilebilmektedir. Özellikle sıcaklık artışı ya da UV ışınına maruz kalma gibi çevresel stres faktörleri karşısında organizmanın hayatta kalma oranının artışı, yaşam süresindeki potansiyel uzamanın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Feng ve diğ., 2015).

2.5.1 Biyolojisi ve Hayat Döngüsü

Diğer nematod türlerinde olduğu gibi, *C. elegans*'ın yaşam döngüsü de embriyonik dönem, dört larva evresi (L1–L4) ve erişkinlik aşamalarını içermektedir. Uygun çevresel koşullar altında bu yaşam döngüsünü yaklaşık üç gün içinde tamamlamaktadırlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: *C. elegans*'ın 22°C'de Yaşam Döngüsü.

Sıfırıncı dakika döllenme anıdır. Oklar boyunca mavi ile gösterilen sayılar, canlının belirli bir evrede geçirdiği süreyi göstermektedir. İlk hücre bölünmesi, döllenmeden yaklaşık 40 dakika sonra gerçekleşmektedir. Yumurtalar, yaklaşık 150. dakikada ve gastrula evresi sırasında dış ortama bırakılmaktadır. Her bir evrede hayvanın boyu mikrometre (μm) cinsinden evre isminin yanında belirtilmiştir.

Yeni yumurtadan çıkan *C. elegans* larvaları yaklaşık 0,25 mm uzunluğundayken, erişkin bireyler 1 mm'ye kadar ulaşabilmektedir. Bu boyut artışı, L4 evresine dek düzenli bir şekilde devam etmektedir. Bu döneme kadar bireylerin cinsiyetini ayırt etmek oldukça zordur. Ancak L4 aşamasında hermafroditler belirgin konik kuyruklara ve geniş bir arka yapıya sahipken, erkek bireyler daha geniş kuyruklara fakat daha dar vücut yapısına sahiptir. Üreme sisteminde, hermafrodit bireylerin dişi germ hücreleri ya kendi ürettikleri spermle ya da erkek bireyden gelen spermle döllenebilmektedir. Larval gelişimin alternatif bir yolu olan dauer formunda, bireyler diğer larva evrelerine kıyasla daha ince bir yapıya sahip olmaktadır. Döllenme sonrasında gelişim, anne vücudundan bağımsız bir şekilde, geçirimsiz yumurtalar içinde başlamaktadır. 20°C'de embriyonik gelişim yaklaşık 16 saat sürmektedir. Hermafrodit bireylerde, yumurtalar 24 hücreli aşamaya ulaşana kadar vücut içinde

kalmaktadır. Yumurtadan çıkan bireyler, gelişimlerine L1 evresiyle başlamaktadır. Uygun şartlarda ve *E. coli* ile beslenerek L4 evresine kadar ilerlemektedirler. L1 dönemi yaklaşık 16 saat sürerken, L2, L3 ve L4 evrelerinin her biri ortalama 12 saatlik süreçleri kapsamaktadır. Her evre sonunda kütikül olarak bilinen dış kolajen yapısı yenilenmektedir. Bu süreçte, hayvanlar “lethargus” olarak adlandırılan, uyku benzeri kısa bir durgunluk dönemine girmektedirler. L4 evresinden sonra 12 saat içinde olgunlaşan hermafroditler, ürettikleri spermli bitene dek her 2-3 günde yeni dölleri meydana getirebilmektedirler. Spermli tükendiğinde ise, üremeye devam edebilmeleri için bir erkek bireyle çiftleşmeleri gerekir. Üreme süreci sona erdikten sonra, hermafroditler beslenmeden birkaç hafta daha yaşamlarını sürdürebilmektedirler.

Besin eksikliği durumlarında, L2 evresi sonrasında bireyler gelişim yolunu değiştirerek “dauer” olarak bilinen bir form oluşturmaktadırlar. Bu evrede kalın bir kütikül yapısı hayvanın vücudunu tamamen sarar, ağız kısmını kapatarak besin alımını engellemektedirler. Dauer formu, fiziksel baskı, toksinler ve açlık gibi zorlayıcı koşullara karşı yüksek direnç göstermektedir. Bu formda bir birey, besin olmadan bir aya kadar hayatta kalabilmektedir. Uygun koşullar sağlandığında, ağız kısmındaki kapalı yapı çözülür, birey tekrar beslenmeye başlamakta ve gelişimine kaldığı yerden L4 evresiyle devam etmektedir. Mikroskop altında incelendiğinde, erkek ve hermafrodit bireylerin yapısal farklılıkları açıkça gözlemlenebilmektedir. Dorsal ve ventral sinir kordonları, sinir halkasından başlayarak vücudun önünden arkasına doğru uzanmaktadır (Altun ve Hall, 2009; Brenner, 1974).

2.5.1.1 Model organizma olarak *C. elegans*

Doğal ortamda çürümekte olan bitki materyalinden izole edilebilen bu organizmalar, laboratuvar koşullarında oldukça kolay çoğaltılabilmektedir. Tek bir hermafrodit birey, uygun koşullarda kısa sürede bir petri kabını dolduracak kadar yavru üretebilmektedir. *C. elegans*’lar dondurulmuş olarak yıllarca saklanabilmeleri ve 12–25°C arasındaki sıcaklıklarda kültürlenebilme özellikleri sayesinde sıcaklığa duyarlı mutasyonların oluşturulmasında da kullanılabilmektedirler. *C. elegans* çalışmaları, sahip olduğu pratik özellikler sayesinde laboratuvar ortamında kolayca yürütülebilmektedir. Patojenik olmaması, kendi kendini dölleyebilen hermafrodit yapısı sayesinde tek bir bireyden kolayca koloni oluşturulabilmesi, küçük boyutları nedeniyle az yer kaplaması, 12–25°C arası sıcaklıklarda yetiştirilebilmesi, yıllarca dondurularak saklanabilmesi ve kolay senkronize

edilebilmesi bu avantajlar arasındadır. Ayrıca hipoklorit muamelesiyle yumurtaların izole edilebilmesi ve sıvı kültürde kitlesel olarak çoğaltılabilmesi de biyokimyasal araştırmalarda verim sağlamaktadır (Stiernagle, 2006). Yaşam süresi analizleri çoğunlukla L1 veya L4 evresinden başlamakta ve basit bir canlı/ölü sayımıyla genel yaşam fonksiyonları değerlendirilebilmektedir. Ancak bu ölçümler gelişim, erişkinlik ve fonksiyonel gerileme dönemlerinin tamamını kapsadığı için dikkatli yorumlanmalıdır. Fizyolojik süreçlerin daha ayrıntılı takibi için üreme kapasitesi, hareket kabiliyeti ve farinks kasılma hızı gibi parametreler de ölçülmektedir. Genellikle *E. coli* ile beslenen bu nematodlar, kullanılan ilaçların bakterilere etkisi üzerinden dolaylı olarak da etkilenebilmekte; bu durum, beslenmenin yaşlanma üzerinde önemli bir rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Bileşikler ortama doğrudan katılırken, hidrofobik maddeler DMSO veya etanol gibi çözücülerle uygulanabilmektedir (Collins ve diğ., 2006). Genetik açıdan incelendiğinde, yaşlanmayı etkileyen bazı genlerin evrimsel olarak korunduğu ve insanlarla ortak olduğu görülmektedir. Örneğin, insülin-IGF-1 yoluyla ilişkili daf-2 geni, aktivitesi azaldığında yaşam süresini iki katına çıkarabilmektedir. Ayrıca daf-16 (FOXO homologu) geni, uzun ömür, stres toleransı, lipid metabolizması ve oksidatif stres yanıtları gibi süreçleri düzenleyerek insülin sinyal yolunu baskılayabilmektedir. Bu nedenle yaşlanma üzerine yapılan deneylerde hem yabancıl tip bireyler hem de daf-16 mutantları kullanılmaktadır. Günümüzde anti-aging ajanların geliştirilmesinde doğal bileşiklere yönelim artmıştır; bunun nedeni bu maddelerin düşük toksisiteye sahip olması ve klinikte daha güvenli sonuçlar vermesidir (Kenyon ve diğ., 1993; Kenyon, 2010; Zheng ve diğ., 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDE, ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan ana kimyasal maddeler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasal Maddeler.

Malzeme	Üretici
3,5-dinitrobenzoik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoikasit) (DTNB)	Sigma-Aldrich, Almanya
ABTS	Sigma Aldrich, Almanya
Agar	Merck, Almanya
Alüminyum klorür ($AlCl_3$)	Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum molibdat	Merck, Almanya
Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi	Sigma-Aldrich, Almanya
Asetiltiyokolin iyodür (AChI)	Sigma-Aldrich, Almanya
Aseton	Sigma Aldrich, Almanya
Asetonitril (ACN)	Merck, Almanya
Askorbik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
At serumu	Pan Biotech
Civa klorür	Merck, Almanya
Demir (III) klorür ($FeCl_3$)	Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Almanya
DMSO	Sigma-Aldrich, Almanya
DPPH	Sigma Aldrich, Almanya
Dulbecco’s Modified Eagle Medium besiyeri	Pan Biotech
EDTA	Merck, Almanya
Etanol	Sigma Aldrich, ABD
Etil Asetat	Sigma Aldrich, Almanya
$FeCl_2$	Merck, Almanya
Ferrozin	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal bovin serumu (FBS)	Pan Biotech

Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasal Maddeler (Devamı).

Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich, Almanya
FUDR (5-fluoro-2'-deoxyuridine)	Sigma-Aldrich, Almanya
Galik asidin	Merck, Almanya
Glasiyel asetik a	Sigma-Aldrich, Almanya
H ₂ SO ₄	Merck, Almanya
Ham's F-12 medyum	ATCC
HCl	Sigma-Aldrich, Almanya
Jelatin	Sigma-Aldrich, Almanya
Kinuramin	Sigma-Aldrich, Almanya
Kloroformla	Sigma-Aldrich, Almanya
Kolesterol	Sigma-Aldrich, Almanya
Kuersetin	Sigma-Aldrich, Almanya
L-Broth	Sigma-Aldrich, Almanya
Luria Bertani (LB) agar besiyeri	Sigma-Aldrich, Almanya
MAO-A enzimi	Sigma-Aldrich, Almanya
MAO-B enzimi	Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	Merck, Almanya
MgSO ₄	Merck, Almanya
MTT (Cell Proliferation Kit)	Sigma-Aldrich, Almanya
Muller-Hinton agar (MHA)	Merck, Almanya
Müller-Hinton Broth (MHB)	Merck, Almanya
o-Fosforik asitli	Merck, Almanya
Penicillin-Streptomycin antibiyotik	Pan Biotech
Pepton	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum iyodür	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum persülfat (K ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Sodyum nitrit (NaNO ₂)	Merck, Almanya
TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)	Sigma-Aldrich, Almanya
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Almanya

3.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Kullanılan araç ve gereçler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan Araç ve Gereçler.

Alet ve Malzeme	Firma, Ülke
Analitik terazi	Sartorius, Almanya
HPLC	HPLC-PDA/PERKIN ELMER- FLEXAR PDA Plus Dedector, ABD
İnkübatör	Memmert Incubator, Almanya
Mikropipette	Sartorius, Almanya
pH ölçer	Table top pH meter, ISOLAB, Almanya
Sıcak plaka karıştırıcı	Benchmark, ABD
Su arıtma sistemleri	Sartorius Arium Pro, Almanya
UV-Vis Spektrofotometre	UV-1800, SHIMADZU, Japonya
Mikroplaka okuyucusu	Synergy H1, Biotek, Almanya

3.2 YÖNTEM VE DENEYLER

3.2.1 Bitki Materyali

Bitki materyalleri Balıkesir ili Kepsut ilçesinin Serçeören Köyü’den 720 m yükseklikten 07.06.2019 tarihinde, Doç. Dr. Ebru ÖZDEMİR NATH tarafından toplanmış ve teşhis edilerek HERA1023 kodu ile Altınbaş Üniversitesi Herbaryumuna kaydedilmiştir.

3.2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

100’er g toz haline getirilmiş *P. orientale* rizomu ve 30’ar g toprak üstü 500 mL ya da 150 mL %50 alkol, %100 alkol, metanol, etil asetat ve aseton ile oda ısısında maserasyona bırakılmıştır. 24 saat sonrasında maserat ayrı bir şişeye alınmıştır. Bu işlem aynı örnekler ile 3 defa daha tekrar edilmiştir. Maserat 45°C’yi geçmeyen ısıda rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış ekstreler daha önce darası alınmış beherlere konularak, -80°C’de dondurulup, liyofilize edilmiştir. Sonrasında ekstreli beher ağırlıkları ölçülerek, bitki/ekstre verimliliği hesaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan ekstreler yapılacak deneylere kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3 Fitokimyasal İçerik Belirlenmesi

3.2.3.1 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile fenolik bileşik tayini

Hazırlanmış ekstrelerin fenolik bileşik içerikleri öncelikle kalitatif analiz ile belirlenmiştir. Daha sonrasında bitki içeriğinde olduğu belirlenen bileşiklerin miktarı kantitatif analizlerle belirlenmiştir.

Kalitatif Analiz

Bitkisel materyalin toprak üstü kısımları ve rizomlarından metanol, etanol ve %50 etanol ile hazırlanan toplam 6 total ekstrenin HPLC cihazı ile kalitatif analizi yapılmıştır. Total ekstrelerin 10 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmış ve her biri ayrı ayrı 0,45 µm'lik filtrelerden süzülerek ekstrelerin HPLC numuneleri hazırlanmıştır. Analiz sırasında her bir ekstre içerisinde Tablo 3.3'te verilen bileşikler aranmıştır.

HPLC ile gerçekleştirilen kalitatif analiz koşulları aşağıda yer almaktadır.

HPLC cihazı	: Agilent 1260 Infinity Series
Kolon Özellikleri	: ACE 5 C18 (250 mm×4,6 mm; 5 µm)
Dedektör Tipi	: Diode Array Dedector
Dalga Boyları	: 210, 254, 270, 330, 360 nm
Akış Hızı	: 1 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	: 10 µL (topraküstü); 50 µL (rizom); 10 µL (standart madde)
Çözücü sistemi	: % 0,2 o-fosforik asitli su- asetronitril

Tablo 3.3: Ekstre İçinde Taranan Bileşikler.

1. Metil kumarin	16. Kersitrozit	31. Amentoflavon
2. Ononin	17. Kersetin-3-O-arabinozit	32. 4,5 dikafeoilkinik asit
3. Viteksin	18. Kersetin	33. 3,5 dikafeoilkinik asit
4. γ -hidroksi benzoik asit	19. Kemferol	34. Sinapik asit
5. 3,4 dihidroksi benzoik asit	20. Kateşin	35. Svertisin
6. 2,4 dihidroksi benzoik asit	21. Kafeik asit	36. Sirinjik asit
7. Taksifolin	22. İzoorientin	37. Protokateşik asit
8. Rutin	23. Hiperozit	38. Vanilik asit
9. Rosmarinik asit	24. Hesperidin	39. 5,7 dihidroksi flavon (Krisin)
10. Orientin	25. Gallik asit	40. Formononetin
11. Mirsetin	26. Ferulik asit	41. Partenolit
12. Luteolin	27. Fenilefrin	42. Madikarpin
13. p-kumarik asit	28. Ekinokozit	43. Trifolirhizin
14. Klorojenik asit	29. Apigenin	44. Naringenin
15. Kikorik asit	30. Apigenin-7-O-glikozit	45. Viteksin-2-O-ramnozit

HPLC ile yapılan kalitatif analizde kullanılan gradient çözücü sistemleri ve kolon sıcaklığı Tablo 3.4'te yer almaktadır.

Tablo 3.4: Kalitatif Analizde Kullanılan Gradient Çözücü Sistemi.

Kolon sıcaklığı	Zaman	Asetonitril (%)	%0,2 o-fosforik asitli su (%)
40°C	0	5	95
	14	26,2	73,8
	25	27,7	72,3
	30	32,3	67,7
	30,01	90	10
	33	90	10

Kantitatif Analiz

Kalitatif analizde kullanılan yöntem, ekstrelerin içeriğinde tespit edilen bileşiklerin miktar tayinine olanak sağlayacak şekilde modifiye edilmiştir. HPLC ile yapılan kantitatif analizde kullanılan gradient çözücü sistemi ve kolon sıcaklığı Tablo 3.5'te yer almaktadır.

Tablo 3.5: Kantitatif Analizde Kullanılan Gradient Çözücü Sistemi.

Kolon sıcaklığı	Zaman	Asetonitril (%)	%0,2 o-fosforik asitli su (%)
40°C	0	5	95
	10	20,1	79,9
	19	26,2	73,8
	25	27	73
	25,01	90	10
	30	90	10

Standart Serilerinin Hazırlanması

Kalitatif analizde ekstrede varlığı tespit edilen maddelerin miktar tayini için eksternal standart yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla her standarttan doğrusallık aralığı içinde kalan konsantrasyonlardan oluşan birer seri çözelti hazırlanarak analizi yapılmıştır. Her konsantrasyon için üçer analiz yapılarak maddeye ait pikin eğri altı alanlarının ortalaması kullanılarak kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur. Ekstre içinde, söz konusu maddeye ait

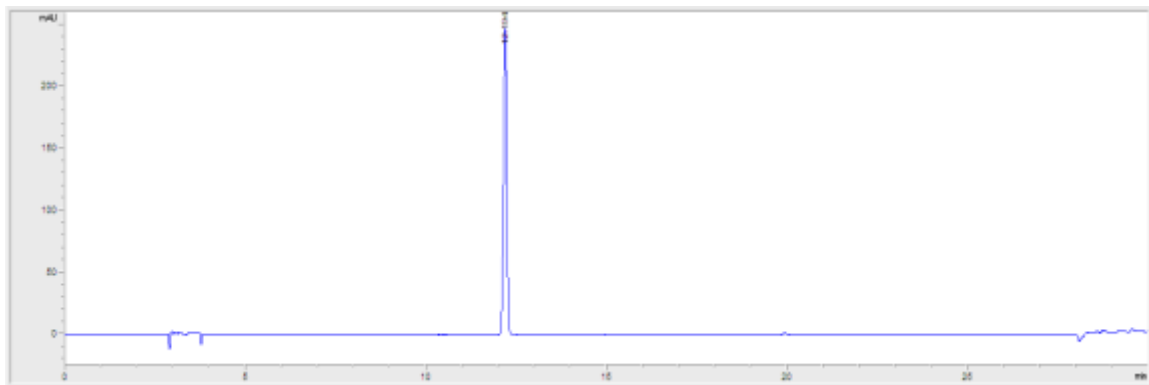
olduğu tespit edilen pikin alanı bu denklemde yerine konarak madde miktarı hesaplanmıştır. Bileşiklerin miktarını tayin etmek amacıyla analizi yapılan konsantrasyonlar aşağıda Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6: Kantitatif Analiz Sırasında Hazırlanan Standart Bileşik Solüsyon Konsantrasyonları.

Bileşikler	Vanilik Asit	Sirinjik Asit	Orientin	Viteksin	Viteksin-2-O-ramnozit
Konsantrasyonlar (mg/mL)	0,001	0,00005	0,5	0,05	0,08
	0,002	0,0001	1	0,10	0,16
	0,004	0,0002	2	0,20	0,20
	0,005	0,0004	2,5	0,25	0,24
	0,006	0,0008	3	0,30	0,32
	0,010	0,0010	5	0,40	0,40
		0,0012		0,50	
		0,0016			
		0,0020			

Teşhis ve Tayin Alt Sınırının Belirlenmesi

Analizi yapılan maddelerin teşhis alt sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri sinyal/gürültü oranı göz önünde bulundurularak (Şekil 3.1) hesaplanmış ve bu konsantrasyonda hazırlanan numunelerin analizi 6 tekrarlı yapılmıştır.



Şekil 3.1: Teşhis Alt Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) Değerleri Sinyal/Gürültü Oranı.

3.2.3.2 Total fenolik içerik tayini

Total Fenolik Madde İçeriği tayini, Slinkard ve Singleton (1977) tarafından tanımlanan yöntem üzerinde küçük değişikliklerle yapılarak uygulanmıştır. %2'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi hazırlamak için, 1 g sodyum karbonat (Sigma-Aldrich, Pcode: 101812416) 50 mL saf suda çözülmüştür. Standart galik asit stok çözeltisi (5 mg/mL) ise, 52 mg galik asidin (Mercek, Pcode: S6997049) 10,4 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Her mikrokuyuya 5 μL bitki ekstraktı ya da Standart galik asit eklenmiş, ardından 225 μL saf su ve 5 μL Folin-Ciocalteu reaktifi (Sigma-Aldrich) ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin ardından, her kuyucuğa 15 μL Na_2CO_3 çözeltisi eklenmiştir. Wellplateler sonrasında karanlık koşullarda 2 saat bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından, absorban değerleri 760 nm dalga boyunda, mikropilaka okuyucusu (Synergy H1) kullanılarak ölçülmüştür. Toplam fenolik madde miktarı, galik asit standard eğrisi ile hesaplanarak, sonuçlar ekstraktın gramı başına miligram galik asit eşdeğeri (mg GAE/g) cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.3.3 Total flavonoid içerik tayini

Toplam Flavonoid İçeriği (TFC) tayini, referans standart olarak 5 mg/mL konsantrasyonda kuersetin (Sigma, Pcode: 1002018301) kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlenmiştir. Analizde %5 sodyum nitrit (NaNO_2), %10 alüminyum klorür (AlCl_3) ve 1 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltileri kullanılmıştır (Sakanaka ve diğ., 2005)

Deneyin uygulanması için wellplatein her bir kuyusuna 25 μL ekstrakt veya kuersetin standart çözeltisi eklenmiştir. Ardından 125 μL saf su ilave edilmiştir. Daha sonra 7,5 μL sodyum nitrit çözeltisi eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında 6 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin ardından, 15 μL alüminyum klorür çözeltisi eklenmiş ve 5 dakika daha oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında, 50 μL sodyum hidroksit çözeltisi ve 27,5 μL saf su ilave edilerek toplam hacim 250 μL 'ye tamamlanmıştır. Tepkimenin absorbansı 510 nm dalga boyunda, mikropilaka okuyucusu kullanılarak ölçülmüştür. Toplam flavonoid içeriği, kuersetin standart eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar ekstraktın miligramı başına kuersetin eşdeğeri (mg QE/mg) olarak ifade edilmiştir.

3.2.3.4 Total saponin taranması

Toz halindeki 5 g bitki materyali (rizom ve toprak üstü) üzerine 100 mL sıcak su ilave edilerek hazırlanan karışım, yaklaşık 30 dakika boyunca sıcak su banyosunda tutulmuştur. Soğumasının ardından filtre kağıdı yardımıyla süzülen süzüntü, fitokimyasal ön tarama testlerine tabi tutulmuştur.

10 mL infüzyon deney tüpüne konulmuştur. Tüp sıkıca kapatılarak, yatay şekilde 30 saniye boyunca kuvvetlice çalkalanmıştır. Sonrasında benç üzerinde 15 dakika bekletilmiştir. Tüplerde en az 1 cm yüksekliğinde kalıcı köpük gözlenip gözlenmediği kaydedilmiştir.

3.2.3.5 Antrasen türevi bileşik taranması

Antrasen türevi bileşik taranmasında kullanılan süzüntüler total saponin taraması kısmında behsedildiği şekilde hazırlanmıştır. Antrasen türevlerinin tespiti için, 5 mL infüzyon numunesine aynı miktarda derişik sülfürik asit eklenmiş ve karışım 15 dakika süreyle sıcak su banyosunda tutulmuştur. Hidroliz işlemi sonrasında karışım soğutulmuş, üzerine 4 mL tolüen eklenerek çalkalanmış ve tolüenli faz ayrılıp başka bir tüpe aktarılmıştır. Bu faza 3 mL %10'luk amonyak çözeltisi ilave edilerek pembe-kırmızı renk oluşumu gözlenmiş, böylece Borntrager reaksiyonu ile antrasen glikozitlerinin varlığı araştırılmıştır.

3.2.3.6 Müsilaj taranması

Müsilaj belirlemesi amacıyla, 1 g toz rizom numunesi 20 ml su ile karıştırılıp ve 0,5 toz toprak üstü numunesi tüpte şişme endeksi belirlenmiş, 15–20°C'de 2 saat bekletildikten sonra numunenin kapladığı hacim ölçülerek değerlendirme yapılmıştır.

3.2.3.7 Tanen türevi taranması

Tanenlerin varlığı için saponin taranmasında açıklandığı şekilde hazırlanmış 10 mL süzüntüye sodyum klorürle doyunlaştırılmış %1'lik jelatin çözeltisinden 2 mL eklenmiş, krem renkli çökelek oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca, 5 mL infüzyona 3 damla %5'lik demir (III) klorür çözeltisi eklenerek gallik tanen varlığı için mavi-siyah, kateşik tanenler için ise zeytin yeşili renk oluşumu kontrol edilmiştir.

3.2.3.8 Alkaloit bileşik taranması

Alkaloitlerin araştırılmasında saponin taranması bölümünde açıklandığı gibi hazırlanmış, 5 mL süzüntü üzerine %3'lük sülfürik asit ve birkaç damla Mayer belirteci ilave edilerek süt renginde çökelek oluşumu izlenmiştir. Mayer Belirteci 1.36 g civa klorür ve 5 g potasyum iyodür karışımının 100 mL suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

3.2.3.9 Kardiyotonik glikozit taranması

Kardiyotonik glikozitlerin tayininde, 1 g toz rizom ya da toprak üstü numunesi %70'lik etanolle kaynatılmış, süzildükten sonra distile suyla seyreltilmiş ve üzerine kurşun subasetat çözeltisi eklenerek oluşan çökelek süzülüp uzaklaştırılmıştır. Süzüntü kloroformla ekstrakte edilmiş, elde edilen ekstre iki kapsüle ayrılıp kloroformu buharlaştırılarak iki klasik glikozit testi uygulanmıştır. İlk kapsülde Keller–Kiliani reaksiyonu ile %5 glasiyel asetik asitli FeCl_3 çözeltisi (2-3 damla) ve derişik H_2SO_4 ile esmer kırmızı halkalar aranmıştır. İkinci kapsülde ise Kedde reaksiyonu uygulanmış, 3,5-dinitrobenzoik asit ile etanol ve %6 NaOH çözeltisi eklenerek erguvan rengi oluşumu değerlendirilmiştir.

3.2.4 Antioksidan Aktivite Çalışmaları

3.2.4.1 DPPH radikali süpürücü aktivite tayini

DPPH yöntemi, serbest radikal olan DPPH'nin bitki ekstraktları tarafından indirgenmesi sonucunda 517 nm dalga boyunda ölçülen absorbans azalmasına dayalı olarak antioksidan etkinliğin değerlendirilmesini sağlamaktadır (Brand-Williams ve diğ., 1995). Bu amaçla, 3,9 mg DPPH (Aldrich) metanol (Merck, EMSURE) içerisinde çözülerek 1 mM konsantrasyonunda bir stok çözelti hazırlanmıştır. Deneysel uygulama 96 kuyucuklu mikrotipler formatında gerçekleştirilmiş olup, her kuyucuğa 10 μL bitki ekstraktı ya da %100 etanol (ISOLAB) içerisinde hazırlanan 2,5 mg/mL kuersetin standart çözeltisi pipetle eklenmiştir. Üzerine 240 μL DPPH çözeltisi ilave edildikten sonra, karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örneklerin absorbans değerleri 517 nm'de mikrotipler okuyucu cihazı (Synergy H1) ile ölçülerek sonuçlar elde edilmiştir. % DPPH radikali süpürücü etki ise Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon}(\%) = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.4.2 FRAP (Demir II iyonu indirgeyici antioksidan potansiyeli) tayini

FRAP (Ferrik Redüksiyon Antioksidan Gücü) yöntemi, asidik ortamda örneklerdeki antioksidanların Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} formuna indirgeme kapasitesini ölçmeye dayanmaktadır. İndirgenen Fe^{2+} iyonları, TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) ile mavi-mor renkte bir kompleks oluşturur ve bu renk değişimi 593 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Bu yöntem, Benzie ve Strain (1996) ile Sachett ve diğerleri (2021) tarafından tanımlanan protokole göre uygulanmıştır. Analiz için gerekli tampon ve çözeltiler deney öncesinde hazırlanmıştır. Asetat tamponu (300 mM, pH 3.6), 3.1 g sodyum asetatın 800 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmış ve pH değeri 16 mL asetik asit eklenerek ayarlanmıştır; son hacim 1 litreye tamamlanmıştır. TPTZ çözeltisi, 15.6 mg TPTZ'nin 5 mL %40'lık HCl içinde çözülmesiyle elde edilmiştir. Demir (III) klorür (FeCl_3) çözeltisi için 27 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mL saf suda çözülmüştür. Standart çözüm olarak kullanılan demir (II) sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.02 g madde 50 mL saf suda çözülerek 1.5 mM'lik bir standart hazırlanmıştır. FRAP reaktifi, 20 mL asetat tamponu, 2 mL TPTZ çözeltisi ve 2 mL FeCl_3 çözeltisinin taze karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Deney sırasında iki farklı kuyu tipi kullanılmıştır: TPTZ içeren kuyucuklar reaksiyonun gerçekleştiği test ortamı olurken, TPTZ içermeyenler kontrol olarak işlev görmüş ve arka plan absorbansını değerlendirmek için kullanılmıştır. Uygulama sırasında, her bir Eppendorf tüpüne 10 μL bitki ekstraktı ya da standart çözeltilerden pipetle eklenmiş, ardından 300 μL FRAP reaktifi ilave edilmiştir. Bu karışımlar 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiş, ardından 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından her tüpten 250 μL karışım 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarılmış ve absorbans değerleri Synergy H1 mikropalaka okuyucusu (BioTek) kullanılarak 593 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Tüm örnek ve standartlar en az üç kez çalışılmıştır. Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin antioksidanlarla indirgenerek Fe^{2+} -TPTZ'ye dönüşmesi sonucunda ortaya çıkan mavi-mor renk şiddeti, örneğin indirgeme gücü ile orantılıdır. Renk yoğunluğu arttıkça, numunenin antioksidan kapasitesinin daha yüksek olduğu kabul edilmektedir. Ölçülen absorbans değerleri, FeSO_4 standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla değerlendirilmiş ve sonuçlar ekstrakt başına Fe^{2+} eşdeğerleri cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.4.3 Total antioksidan kapasite tayini

Bitkilerde bulunan indirgeme kapasitesi yüksek bileşikler, molibdat (Mo^{6+}) iyonlarını indirgemekte ve sonuçta mavi-yeşil renkte bir fosfomolibdat kompleksi oluşturmaktadır. Oluşan kompleksin yoğunluğu 695 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi bitki örneklerinin toplam antioksidan gücü belirlemektedir. Deneyde kullanılan çalışma reaktifi; 0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat ile hazırlanmıştır. 100 mL çalışma reaktifi hazırlamak amacıyla sırasıyla 3.33 mL %98'lik sülfürik asit, 0.78 g sodyum fosfat ve 0.49 g amonyum molibdat tartılarak balon joje içerisinde karıştırılır. Sonrasında karışım saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak homojen bir çözelti elde edilmektedir. Hazırlanan reaktif, analiz öncesinde taze olarak kullanılmalıdır. Çalışmada 0–100 μM arasında farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış askorbik asit standart olarak kullanılmıştır. Mikroplaka kuyucuklarına her bitki ekstresi ya da standart konsantrasyonundan 50 μL eklenerek üzerine 150 μL çalışma reaktif ilave edilmiştir. Hazırlanan wellplateler 95°C 'de 90 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğutulur ve absorbans değerleri mikropilaka okuyucusu ile 695 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart çözeltilerin absorbansları kullanılarak konsantrasyon-absorbans doğrusal regresyon grafiği oluşturulmuştur ve örneklerin antioksidan kapasiteleri askorbik asit eşdeğeri (AAE) cinsinden hesaplanmıştır (Phatak ve Hendre, 2014).

3.2.4.4 Metal şelatlama aktivitesi

Metal şelatlama kapasitesi, Decker ve Welch (1990) tarafından bildirilen yöntemle uygun olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemin temelinde, 562 nm dalga boyunda karakteristik bir absorbans gösteren kırmızı renkli Ferrozin- Fe^{2+} kompleksinin oluşumunun, test edilen maddeler tarafından engellenme oranı esas alınmaktadır. Deneysel uygulamada, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış örnek çözeltilerden 1 mL alınmış ve üzerine 3,7 mL saf su ve 0,1 mL 2 mM FeCl_2 çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 0,2 mL 5 mM Ferrozin çözeltisi eklenmiş ve homojen karıştırıldıktan sonra tekrar 10 dakika beklenmiştir. Herbir tüpten 250 μL reaksiyon karışımının karışımı wellplate aktarılarak absorbanslar 562 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Şelatlayıcı etkinliğin referans standardı olarak 0,1 mM EDTA çözeltisi kullanılmıştır. Ferrozin ve demir (II) iyonları arasındaki kompleksleşmenin engellenme yüzdesi, Eşitlik 3.2'de verilen formül üzerinden hesaplanmıştır:

$$\% \text{Şelatlama Etkinliği} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

Burada;

A₀: Sadece demir ve Ferrozin içeren kontrol grubunun absorbansı,
A₁: Test edilen örnek veya standardın dahil olduğu reaksiyonun absorbansdır.

3.2.4.5 ABTS radikali süpürme aktivitesi

ABTS^{•+} radikal katyonunun üretimi için 7 mM ABTS çözeltisi, 2.45 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) ile reaksiyona sokularak oksidasyona uğratılmaktadır. Bu işlem sonucunda karakteristik olarak mavi-yeşil renkli bir çözelti elde edilmektedir. Oluşan radikal katyon çözeltisi, oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak, ağzı kapalı bir kap içerisinde, ölçümden yaklaşık 12–16 saat önce hazırlanmıştır. Bekleme süresinin ardından, radikal çözeltisi etanol ile seyreltilerek 734 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri (A₀) 0.7–0.8 aralığına getirilmiştir. Deneyin son aşamasında, her bir örnekten 250 µL alınarak 2750 µL seyreltilmiş ABTS^{•+} çözeltisi ile deney tüpünde karıştırılır ve karışım oda sıcaklığında, karanlık ortamda 6 dakika bekletilmektedir. Her bir reaksiyon karışımından 250 µL wellplate aktararak, mikroparka okuyucu yardımı ile 734 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Örneklerin serbest radikal süpürücü etkileri, kontrol absorbansı (A₀) ve örnek absorbansı (A) değerleri kullanılarak hesaplanan % inhibisyon (I%) ile değerlendirilmektedir (Eşitlik 3.1).

3.2.5 Enzim İnhibisyon Çalışmaları

Enzim inhibisyonu aktivitesi deneylerinde bitkinin hazırlanmış rizom ve toprak üstü ekstrelerinden yalnızca %50 etanol, etanol ve metanol ekstreleri değerlendirilmiştir. Etil asetat ve aseton gibi daha apolar çözücülerle hazırlanan ekstreler, enzimlerin bulunduğu sulu biyolojik sistemlerle düşük uyumluluk göstermeleri, enzim yapısını bozma potansiyelleri ve çözünürlük problemleri nedeniyle bu aşamada tercih edilmemiştir (Chemat ve diğ., 2012). Bu nedenle enzimatik çalışmalar, biyolojik ortamlara daha uygun olan ve enzim yapısını denatüre etmeyen polar çözücülerle elde edilen ekstraktlarla yürütülmüştür.

3.2.5.1 Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu

Bitki ekstralarının asetilkolinesteraz (AChE) enzimine karşı inhibitör etkisi, Ellman ve diğerlerinin (1961) geliştirdiği yöntem esas alınarak değerlendirilmiştir. Reaksiyon karışımı; 240 µL 1.25 mM 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 192 µL asetiltiyokolin iyodür (AChI) ve 1200 µL pH 8.0'de hazırlanmış 100 mM Tris-HCl tamponundan oluşmuştur. Bitki ekstralarından her reaksiyona 10 µL eklenmiştir. Kontrol grubu için aynı hacimde bitki ekstresi yerine tampon çözeltisi kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyon, karışıma ≈ 0.05 U/mL AChE enzimi ilavesiyle başlatılmış ve reaksiyon süreci 2 dakika boyunca 412 nm dalga boyunda spektrofotometre (Cary 60, Agilent Technologies, ABD) ile izlenmiştir. Enzim aktivitesi, ilk 60 saniyelik doğrusal bölgeden elde edilen veriler kullanılarak hesaplanmış ve test örneğinin aktivitesinin kontrol grubuna oranı alınarak yüzde inhibisyon değeri belirlenmiştir. Enzim aktivitesindeki azalma, Eşitlik 3.1 ile ifade edilmiştir. Deney sonuçları, üç paralel ölçümün ortalaması $\pm$ standart sapma şeklinde raporlanmıştır.

3.2.5.2 MAO-A enzim inhibisyonu

Bitki ekstralarının MAO-A enzimine karşı inhibitör etkisi, Krajil ve diğerlerinin (1965) geliştirdiği yöntem esas alınarak değerlendirilmiştir. Reaksiyon karışımı; 5 µL kinuramin, 5 µL MAO-A enzimi ve 490 µL pH 7.4'te hazırlanmış 100 mM potasyum tamponundan oluşmuştur. İnhibisyon çalışmaları için, bitki ekstralarının değişik konsantrasyonları denenmiştir. Kontrol grubu için aynı hacimde bitki ekstresi yerine tampon çözeltisi kullanılmıştır. Öncelikle kinuramin, bitki ekstresi ve tampon çözelti 37°C su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında enzim eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 20 dk 37°C su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 400 µL 2N NaOH eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 1 mL distile su eklenmiştir. Son olarak wellplatelere 320 µL reaksiyon karışımı eklenerek 310 nm eksitasyon, 400 nm de emisyon olarak wellplate florimetrik olarak okunmuştur. Enzim aktivitesindeki azalma Eşitlik 3.1 ile hesaplanmıştır. Deney sonuçları, üç paralel ölçümün ortalaması $\pm$ standart sapma şeklinde raporlanmıştır.

3.2.5.3 MAO-B enzim inhibisyonu

Bitki ekstralarının MAO-B enzimine karşı inhibitör etkisi, Krajil ve diğerlerinin (1965) geliştirdiği yöntem esas alınarak değerlendirilmiştir. Reaksiyon karışımı; 5 µL kinuramin, 4 µL MAO-B enzimi ve 491 µL pH 7.4'te hazırlanmış 100 mM KP tamponundan oluşmuştur.

İnhibisyon çalışmaları için, bitki ekstralarının değişik konsantrasyonları denenmiştir. Kontrol grubu için aynı hacimde bitki ekstresi yerine tampon çözeltisi kullanılmıştır. Öncelikle kinuramin, bitki ekstresi ve tampon çözelti 37°C su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında enzim eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 20 dk 37°C su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 400µL 2N NaOH eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 1 mL distile su eklenmiştir. Son olarak wellplatelere 320 µL reaksiyon karışımı eklenerek 310 nm eksitasyon, 400 nm de emisyon olarak wellplate florimetrik olarak okunmuştur. Enzim aktivitesindeki azalma, Eşitlik 3.1 ile hesaplanarak ifade edilmiştir. Deney sonuçları, üç paralel ölçümün ortalaması $\pm$ standart sapma şeklinde raporlanmıştır.

3.2.6 Antibakteriyel Aktivite Testleri

3.2.6.1 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testi

Bitki ekstralarının antimikrobiyal etkileri, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (EUCAST) tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi temel alınarak değerlendirilmiş, çalışmada Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenmiştir. Kalite kontrolü sağlamak amacıyla *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşunun ampisiline karşı MİK değeri ayrıca hesaplanmıştır. Bu işlemde bakteri suşlarının taze kültürlerinden, 0.5 McFarland standart 5'e uygun bakteri süspansiyonları hazırlanarak, bu süspansiyonlar 1/100 oranında seyreltilip mikrodilüsyon plaklarına uygulanmıştır. U tabanlı, 96 kuyucuklu steril mikropalakalardaki her kuyucuğa 50 µL Müller-Hinton Broth (MHB) eklendikten sonra, ilk kuyucuklara sterilize edilmiş bitki ekstralarının başlangıç konsantrasyonları ilave edilerek seri dilüsyon yapılmış ve son kuyucuktan 50 µL dışarı alınmıştır. 11. ve 12. kuyucuklar sırasıyla üreme kontrolü (ekstraksız) ve besiyeri kontrolü (bakterisiz) olarak değerlendirilmiştir. Her kuyucuğa 50 µL bakteri süspansiyonu eklenerek, ekstraktların son konsantrasyon aralığı 12,5–0,012 mg/mL olacak şekilde düzenlenmiştir. İnkübasyon 35 °C'de 18–24 saat gerçekleştirilmiş; her testte çözücü karışım (%1 DMSO) kontrol grubu olarak ayrı kuyucuklarda değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonunda, gözle görülür bakteri çoğalmasının olmadığı en düşük ekstrakt konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Bu işlemler her suş için üç kez tekrar edilerek ortalama değerler hesaplanmıştır. MİK değeri belirlenen kuyucuklardan alınan örnekler, belirli oranlarda seyreltilerek yeniden MHB içeren tüplere ekilmiş ve 35 °C'de 24 saatlik ikinci bir inkübasyondan sonra, üreme kontrolüne göre $\geq$ %99

oranında bakteri azalması saptanan konsantrasyon MBK olarak raporlanmıştır. Pozitif kontrol olarak 1 mg/mL stok konsantrasyonlu antibiyotik çözeltisi kullanılmıştır (Yiğit ve Yiğit, 2008).

3.2.6.2 İnhibisyon çapı testi

Bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için öncelikle disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bitki ekstralarının stok çözeltileri uygun çözücüler (DMSO + ultra saf su) kullanılarak hazırlanmış ve membran filtrasyonla steril edilmiştir. Tüm bakteri suşlarının taze kültürlerinden öze ile birkaç koloni alınarak 3 ml steril serum fizyolojik içeren cam tüplerde, bulanıklık değeri 0.5 McFarland (yaklaşık 1.5×10^8 koloni oluşturan birim-(KOB)/mL) olacak şekilde mikroorganizma süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 100 µL alınarak, Muller-Hinton agar (MHA) besiyerlerinin yüzeyine steril eküvyon yardımı ile yayılmıştır. Daha sonra, petrilerin üzerine 6 mm çapında steril boş diskler yerleştirilerek disklerle 20 µL bitki ekstresi emdirilmiştir. Besiyerleri 18-24 saat 35 °C’de inkübe edildikten sonra, disklerin çevresinde oluşan zon çapları ölçülmüştür. Kontrol amacıyla sadece çözücü (%1’lik DMSO) eklenmiş diskler ve antibiyotik emdirilmiş diskler kullanılarak, bitki ekstralarının olası kontaminasyonunu kontrol etmek için de mikroorganizma inoküle edilmeyen besiyerlerine de aynı prosedür izlenerek diskler yerleştirilerek inkübe edilmiştir (Yiğit ve Yiğit, 2008). Tüm bakteri suşları için işlemler üç kez tekrarlanarak, sonuçların ortalaması alınmıştır.

3.2.7 *C. elegans* Çalışmaları

C. elegans deneylerinde yalnızca %50 etanol ile hazırlanmış rizom ve toprak üstü bitki ekstraları kullanılmıştır. Bunun nedeni, bu model organizmanın sulu ve hassas bir biyolojik ortamda yaşaması ve organik çözücülere karşı oldukça duyarlı olmasıdır. Etil asetat, aseton veya yüksek oranda etanol gibi çözücüler solucanlarda toksisiteye yol açabileceği için tercih edilmemiştir. %50 etanol ise hem aktif bileşenleri çözebilecek kapasitede hem de *C. elegans* için tolere edilebilir niteliktedir (Stiernagle, 2006; Hunt, 2017). Bu nedenle, çalışmalarda biyolojik uyum açısından en uygun çözücü olarak %50 etanol seçilmiştir.

3.2.7.1 Nematod üretim besiyeri hazırlanması

C. elegans popülasyonlarının geniş ölçekte üretimi hem katı hem de sıvı ortamlarda gerçekleştirilmekte olup, sıklıkla Nematode Growth Medium (NGM) adı verilen katı besi

yerleri tercih edilmektedir. NGM besiyerinin hazırlanması için sırasıyla 3 g NaCl, 17 g agar ve 2,5 g pepton tartılmış, ardından 975 mL ultra saf su ile hacim tamamlanarak içerisinde manyetik karıştırıcı (manyetik balık) eklenmiştir. Karışım otoklavlanabilir cam şişeye alınıp kapağı gevşek bırakılarak otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası, ortam yaklaşık 55 °C'ye kadar soğutulduğunda, aseptik koşullar altında sırasıyla 1 mL 1M CaCl₂, 1 mL 1M MgSO₄, 25 mL 1M KPO₄ tamponu ve 1 mL kolesterol çözeltisi (5 mg/mL etanol içinde hazırlanmış) ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri, steril pipetler yardımıyla 60 mm çapındaki petri kutularının yaklaşık üçte ikisini dolduracak şekilde eşit olarak dağıtılmıştır. Besiyerlerinin kontaminasyon açısından değerlendirilmesi için petriler 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.

Gliserol stok kültüründen elde edilen *E. coli* OP50 suşu, katı ortamda saf koloni eldesi sağlandıktan sonra L-Broth sıvı ortamına eklenmiş ve 37 °C'de bir gece kültüre alınmıştır. Daha sonra, steril mikropipet kullanılarak, besiyerlerinin tam ortasına uygun hacimlerde ekim yapılmıştır. Bakteri damlasının merkezde konumlandırılması, *C. elegans* bireylerinin petri kenarlarına ilerleyerek kuruma riskini azaltmakta ve sayım işlemlerinde kolaylık sağlamaktadır. Bakterilerin agar yüzeyine yayılması ve agar tarafından emilimi için besiyerleri bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan bu ortamlar, +4 °C'de kapakları kapalı olarak saklandığında yaklaşık bir ay süreyle kullanılabilirliğini korumaktadır (Porta-de-la-Riva ve diğ., 2012).

3.2.7.2 *E. coli* üretim Besiyeri Hazırlanması

Escherichia coli OP50 suşunun üretilmesinde kullanılacak Luria Bertani (LB) agar besiyeri, standart içeriklere göre hazırlanmıştır. Bu amaçla, 5 g Bacto-tryptone, 2,5 g Bacto-yeast extract, 2,5 g NaCl ve 7,5 g agar tartılarak uygun hacimdeki cam şişeye alınmış ve distile su ile 500 mililitrelik son hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan ortamın pH'ı 7,5'e ulaşınca kadar 1 M NaOH çözeltisi ilavesiyle ayarlanmış ve ardından tüm içerik otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Steril ortam koşullarında petri kaplarına dökülen besi yerleri, kontaminasyon kontrolü için 37 °C sıcaklıktaki etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kontaminasyon izlenmeyen plaklar parafilm ile kapatılarak, +4 °C'de ters çevrilmiş biçimde birkaç aya kadar kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir (Lionaki ve Tavernarakis, 2013; Stiernagle, 2006).

L-Broth sıvı besiyerinin hazırlanmasında, 5 g Bacto-tryptone, 2,5 g Bacto-yeast extract ve 2,5 g sodyum klorür (NaCl) uygun hacimde bir şişeye alınarak, ultra saf su ile toplam hacim 500 mililitreye tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyerinin pH değeri 7,5'e ulaşıncaya kadar 1 M NaOH çözeltisi eklenerek ayarlanmış, ardından 10 ml'lik steril Falcon tüplerine paylaştırılarak otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyonun etkinliğini kontrol etmek amacıyla, besiyeri tüpleri 37 °C'de bir gece inkübe edilmiş ve herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı değerlendirilmiştir (Lionaki ve Tavernarakis, 2013; Stiernagle, 2006).

3.2.7.3 Yumurta senkronizasyonu

Farklı gelişim evrelerindeki *C. elegans* bireylerinin senkronizasyon için özellikle yumurta evresinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, içerisinde hem yetişkin hem de yumurta evresinde bireylerin bulunduğu kültür plakaları öncelikle M9 tamponu ile yıkanmıştır. Takiben, yumurtaların dayanıklı yapısından faydalanılarak, çamaşır suyu bazlı bir lizis solüsyonu ile muamele edilmiştir. Bu çözelti, 40 mL distile su, 40 mL çamaşır suyu ve 20 mL 5N Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin karışımı ile hazırlanmıştır. Kimyasal işleme maruz kalan plakalar, birkaç defa yıkandıktan sonra elde edilen senkronize yumurtalar, gelişimlerini eşzamanlı sürdürebilmeleri amacıyla taze hazırlanmış NGM (Nematode Growth Medium) petri kaplarına aktarılmıştır (Porta-de-la-Riva ve diğ. 2012).

M9 tampon çözeltisinin hazırlanması için 5 g sodyum klorür (NaCl), 6 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve 3 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), yaklaşık 800 mL ultra saf su içinde çözülmüştür. Çözelti, ısıya dayanıklı bir cam şişe içerisinde hazırlanarak hacmi 1000 mL'ye tamamlanmış ve ardından standart otoklav koşullarında sterilizasyonu sağlanmıştır. Otoklavdan çıkan şişe, el temasına uygun sıcaklığa soğuduğunda, 1 mL 1M magnezyum sülfat (MgSO_4) steril teknikler çerçevesinde ilave edilerek çözeltinin kullanıma hazır hâle gelmesi sağlanmıştır (Hope, 1999).

3.2.7.4 Bitki maruziyeti ve deney tasarımı çalışmaları

Stok çözeltileri hazırlanmış bitki ekstraktları ile 24 saat muamele edilen *C. elegans*lar yaşam süresi, lokomotor aktivite, üreme aktivitesi, kemotaksis aktivitesi, kısa dönem hafıza testi analizleri gerçekleştirilmiştir. Deney ortamı olarak, 1 litre hacminde hazırlanmış Nematod Büyüme Ortamı (NGM), otoklavda sterilize edildikten sonra yaklaşık 55 °C'ye kadar

soğutulmuş ve ardından, her litrede 1 mL olacak şekilde 40 mM FUDR (5-fluoro-2'-deoxyuridine) çözeltisi eklenmiştir (Ergen ve diğ., 2018; Lionaki ve Tavernarakis, 2013). Hazırlanan bu ortam, 60 mm çapında petri kaplarına her biri 10 mL olacak şekilde aseptik koşullarda dağıtılmıştır. Petriler, bozulmadan kuruması için üzerleri kapalı şekilde bir gece boyunca oda sıcaklığında sabit bir yüzeyde bekletilmiştir. Ertesi gün, deneysel gruplara uygun konsantrasyonlarda bitki ekstraktı içeren *E. coli* OP50 suşu (100 ve 300 mg/mL) ile hazırlanmış sıvı besi ortamı petri kaplarındaki NGM yüzeyine uygulanmıştır. Bu uygulamanın ardından, NGM'nin bakteriyel sıvı ortamı yeterince absorbe edebilmesi için kaplar yine bir gece süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir (Ergen ve diğ., 2018).

3.2.7.5 Lokomotor aktivite testi

Bu çalışmada *C. elegans* bireylerinin lokomotor aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla, genç erişkin evredeki solucanlar kullanılarak hareket analizi gerçekleştirilmiştir. Deneyden bir gün önce, NGM agar plakları üzerine *E. coli* OP50 kültürü eklenmiş ve 37 °C'de inkübe edilerek bakteriyel besi tabakası oluşturulmuştur. Platin tel yardımıyla her bir agar plakasına bir solucan, merkeze dikkatlice yerleştirilmiş ve yeni ortama adaptasyon sağlamaları için 1–2 dakikalık bir bekleme süresi tanınmıştır. Bu sürenin ardından, bireylerin 1 dakika boyunca gerçekleştirdiği hareketler gözlemlenmiş; alınan mesafe, yön değiştirme sayısı, vücut bükülme frekansı, dalga genliği ve frekansı gibi parametreler manuel ya da video kayıtları üzerinden yazılım destekli olarak kaydedilmiştir. Hareket verileri, deney ve kontrol grupları arasında karşılaştırılarak ortalama hız, standart sapma miktarları analiz edilmiştir. Deney boyunca ortam sıcaklığı 20 °C 'de sabit tutulmuş ve solucanların stres faktörlerinden arındırılmış, yeterli beslenmiş olmalarına dikkat edilmiştir. Sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.7.6 Üreme aktivitesi belirleme testi

C. elegans'ta üreme kapasitesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen bu deneyde, birey başına düşen yumurta ve gelişen yavru sayısı ölçülerek çevresel faktörlerin, genetik varyasyonların ya da kimyasal maddelerin reproduktif fonksiyonlara etkisi incelenmiştir. Deney öncesinde, NGM agar plakalarına OP50 *E. coli* ekilerek 37 °C'de inkübe edilmiş ve bakteriyel besi yüzeyi hazırlanmıştır. Deneyde L4 evresindeki genç erişkin solucanlar seçilmiş ve her biri tek tek bakterili yeni plaklara aktarılmıştır. Deney süresince her gün aynı saatte bireyler yeni bir plakaya transfer edilerek, önceki plakadaki yumurtalardan gelişen

yavrular 2 gün sonra mikroskop altında sayılmıştır. Bu şekilde toplanan günlük yavru sayıları, bireysel toplam yavru sayısı ve üreme süresi (ilk ve son yumurtlama arası) gibi parametrelerle üreme kapasitesi analiz edilmiştir (Lee ve Kang, 2017).

3.2.8 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü deneylerinde elde edilen bitki rizom ve toprak üstü ekstrelerinden yalnızca %50 etanol, etanol ve metanol ekstraktları kullanılmıştır. %50 etanol, etanol ve metanol gibi çözücüler hücrelerle daha uyumludur ve biyolojik geçerliliği yüksek sonuçlar elde edilmesini sağlaması nedeniyle tercih edilmiştir. Etil asetat ve aseton gibi apolar çözücüler, sulu ortamlarda düşük çözünürlük göstermeleri ve hücre zarını bozarak toksisiteye yol açabilmeleri nedeniyle tercih edilmemiştir (Saldanha ve diğ., 2015; Santos ve diğ., 2018).

3.2.8.1 Hücre tipleri ve besi ortamlarının hazırlanması

DeneySEL sürecin başlangıcında, normal fare nöron hücreleri olan SYHY5 ve insan endotel hücreleri olan HUVEC'e uygun hücre büyüme ortamı hazırlanmıştır. Bu hücreler, yüzeye yapışarak çoğalan adherent özellikte olduklarından, 73 cm² yüzey alanına sahip kültür flaskları tercih edilmiştir. Kültür ortamı, Dulbecco's Modified Eagle Medium besiyerine %5 oranında fetal bovin serumu (FBS) ve %1 oranında Penicillin-Streptomycin antibiyotik karışımı ilave edilerek hazırlanmıştır. Fare üreme hücreleri Leydig (TM3) ve Sertoli (TM4) hücreleri için ise Dulbecco's Modified Eagle Medium ve Ham's F-12 medyumlarının eşit karışımından oluşan DMEM/F-12 besiyerine %20 oranında fetal bovin serumu (FBS), %10 at serumu (HS) ve %1 oranında Penicillin-Streptomycin antibiyotik karışımı büyüme ortamı hazırlanmıştır. Bu "tam büyüme ortamı (complete medium)" hücre flasklarına ilave edilerek, hücrelerin yeterli sayıya ulaşmaları için 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğalmalarına olanak tanınmıştır.

3.2.8.2 Deney tasarımı ve bitki maruziyeti

Bitki ekstraktlarının hem nöron hem de üreme hücrelerine etkilerini araştırmak için öncelikle nöron hücreleri üzerinde düşük dozlar denenmiştir. Düşük doz kullanımında IC₅₀ değerine ulaşılamamasından dolayı hem nöron hem üreme hücrelerinde yüksek dozlar 24,48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Ekstre uygulaması örnek tablosu Şekil 3.2'de verilmiştir.

MTT - POLYGONATUM ORIENTALE												
TM3/TM4/HUVEC - 24 / 48 / 72H	TA-%50			TA-%100			TÜ-%50			TÜ-%100		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	B	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	D	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	E	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	F	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
	H	DMEM-F12			%1 DMSOlu DMEM-F12			Cell free DMEM-F12			Cell free %1 DMSOlu DMEM-F12	

TA %50: Rizom %50 Etanol ekstresi TA%100: Rizom Etanol Ekstresi TÜ%50: Toprak üstü %50 Etanol Eksresi TÜ%100: Toprak üstü etanol ekstresi

Şekil 3.2: Hücre Kültürü Bitki Ekstresi Uygulaması.

3.2.8.3 MTT sitotoksosite testi

Sitotoksik etkinin değerlendirilmesinde, canlı hücrelerin mitokondriyal metabolik aktivitesine dayanan kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi kullanılmıştır. Bu test, canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimlerinin tetrazolium tuzu olan MTT'yi çözünmeyen mor renkli formazana indirgemesi prensibine dayanmaktadır. Elde edilen formazan kristali miktarı, hücre canlılığı ile doğru orantılı olup spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.

Deneyde sağlıklı insan deri fibroblast hücre hattı olan CCD-1079Sk (pasaj 29), her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde süspanse edilerek 96 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Hücreler, %5 CO₂ içeren ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, bitki ekstreleri 6 farklı derişimde (15.625–500 µg/mL aralığında) hazırlanarak, her biri en az üç biyolojik tekrarlar uygulanmış ve hücrelerle birlikte yeniden 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, ortamdan sıvı uzaklaştırılarak her kuyucuğa 0,5 mg/mL MTT içeren DMEM-F12 ortamı (içeriğinde %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin) ilave edilmiş, hücreler bu yeni ortamda 3 saat daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO kullanılarak çözündürülmüş ve absorpsiyon değerleri 540 nm dalga boyunda BioTek Synergy H1 mikropilaka okuyucusu ile ölçülmüştür. Her bir test grubu için hücre canlılığı yüzdesi, eşzamanlı olarak çalışılan besiyeri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri, GraphPad Prism 5 yazılımı ile yapılan probit analiz yöntemiyle belirlenmiştir. Deney boyunca negatif kontrol olarak yalnızca besiyeri içeren kuyucuklar kullanılmıştır.

3.2.8.4 X-celligance testi

Canlı hücrelerde toksik etkilerin daha hassas ve zaman içinde dinamik olarak takip edilebilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (GZHA) tekniğidir. Bu yöntem, MTT testi gibi son noktaya dayalı (end-point) biyokimyasal analizlerle elde edilen sonuçları tamamlayıcı niteliktedir ve karşılaştırmalı değerlendirme imkanı sunmaktadır. GZHA sistemi, her kuyucuğun tabanına entegre edilmiş altın mikro elektrotlardan oluşan hassas bir biyosensör dizisini içermektedir. Bu sensörler üzerinden hücrelere zarar vermeyecek düzeyde alternatif akım uygulanmaktadır. Hücrelerin elektrotlara yapışması veya yüzeyden ayrılması, sistemde ölçülen elektriksel empedans değerinde değişikliklere yol açmaktadır. Hücre yoğunluğunun artması, empedansın da artmasına neden olurken; hücre ölümünün veya morfolojik değişikliklerin başlaması empedansın düşmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu empedans değişiklikleri, sistemle entegre yazılım aracılığıyla dijital olarak analiz edilmekte ve zamana bağlı olarak grafiksel çıktılar elde edilmektedir. Hücrelerin yüzey örtücülüğü (cell index) üzerinden hesaplanan bu veriler, bitki ekstresi uygulamalarının sitotoksik etkilerini anlık olarak ortaya koymaktadır. Çalışmada kullanılan çeşitli konsantrasyonlarda bitki ekstresi uygulanmış ve elde edilen verilerle bitki ekstrelerinin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 BİTKİ FİTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR

4.1.1 Ekstre Verimliliği Bulguları

Ekstraksiyon işlemi sonrasında liyofilizasyon ile kurutulan ekstrele ait verimlilik oranlarına ait veriler Tablo 4.1 de gösterildiği gibidir. Tablo 4.1’de verilen % verimlilik değerlerine göre en yüksek ekstre miktarına rizomun %50 etanol ile ekstraksiyonu ile ulaşılmıştır.

Farklı çözücülerle yapılan ekstraksiyon işlemlerinde elde edilen verimlilik, çözücünün polaritesi ve kullanılan bitki kısmına göre değişiklik göstermiştir. Rizomdan en yüksek verim, %50 etanol kullanılarak yapılan ekstraksiyonda %39,98 olarak elde edilmiştir. Bu değer, saf metanol (%29,94) ve saf etanol (%6,56) ile elde edilen verimlerin oldukça üzerindedir. Düşük polariteli çözücüler olan etil asetat (%0,813) ve aseton (%0,542) ise oldukça düşük verim sunmuştur. Toprak üstü kısımlarda da benzer olarak %50 etanol, %27,87 ile en yüksek verimliliği sağlamıştır; bunu sırasıyla metanol (%16,47), etanol (%5,90), aseton (%1,70) ve etil asetat (%1,65) takip etmiştir.

Tablo 4.1: Bitki Ekstre Verimliliği.

Ekstre adı	Ekstre miktarı (g)	% Verimlilik
%50 Etanol Rizom	39,981	39,981
Etanol Rizom	6,560	6,560
Metanol Rizom	29,935	29,935
Etil asetat Rizom	0,813	0,813
Aseton Rizom	0,542	0,542
%50 Etanol Toprak üstü	8,3605	27.868
Etanol Toprak üstü	1,771	5,903
Metanol Toprak üstü	4,941	16,469
Etil asetat Toprak üstü	0,496	1,652
Aseton Toprak üstü	0,511	1,703

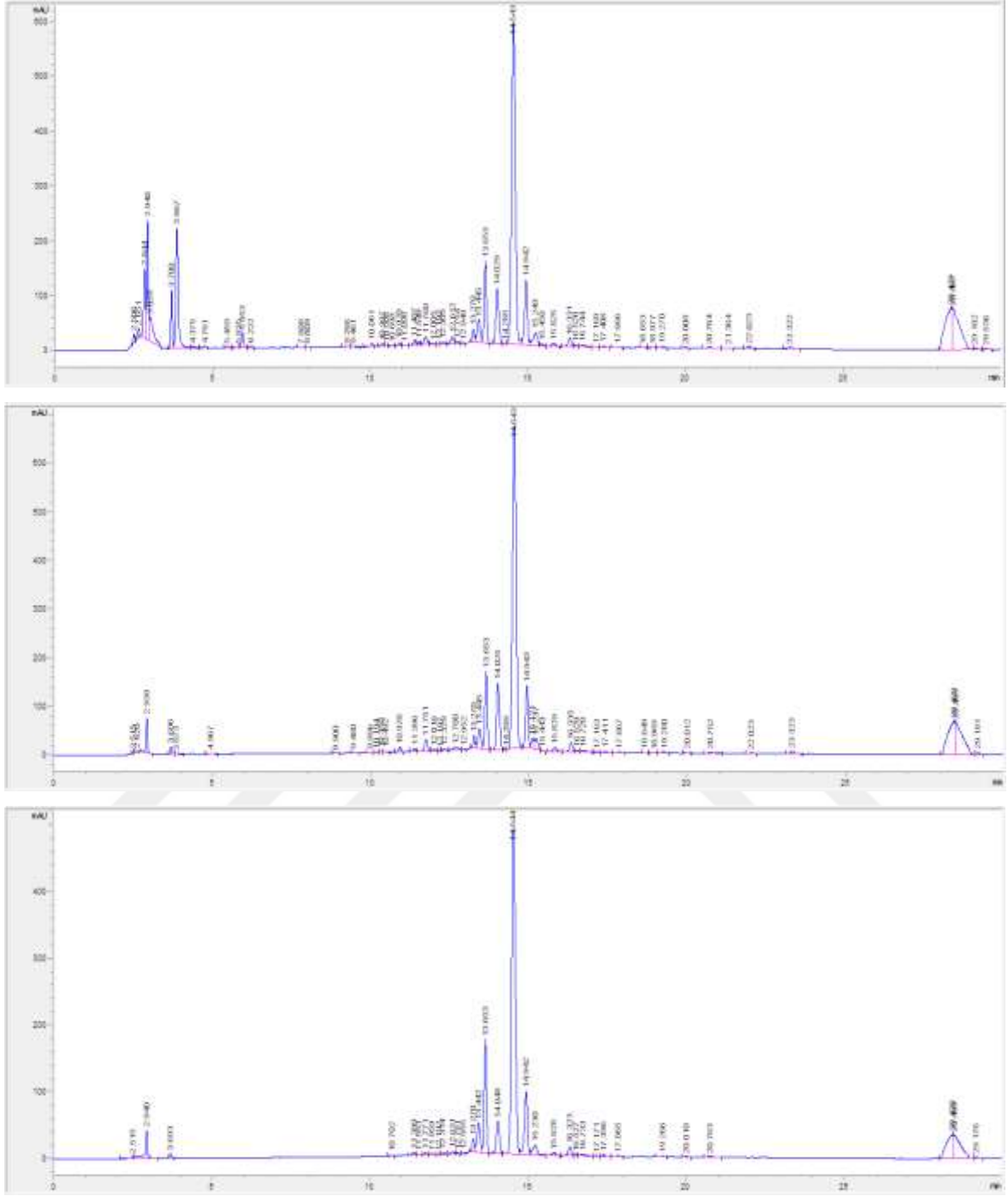
4.1.2 HPLC Analizi Bulguları

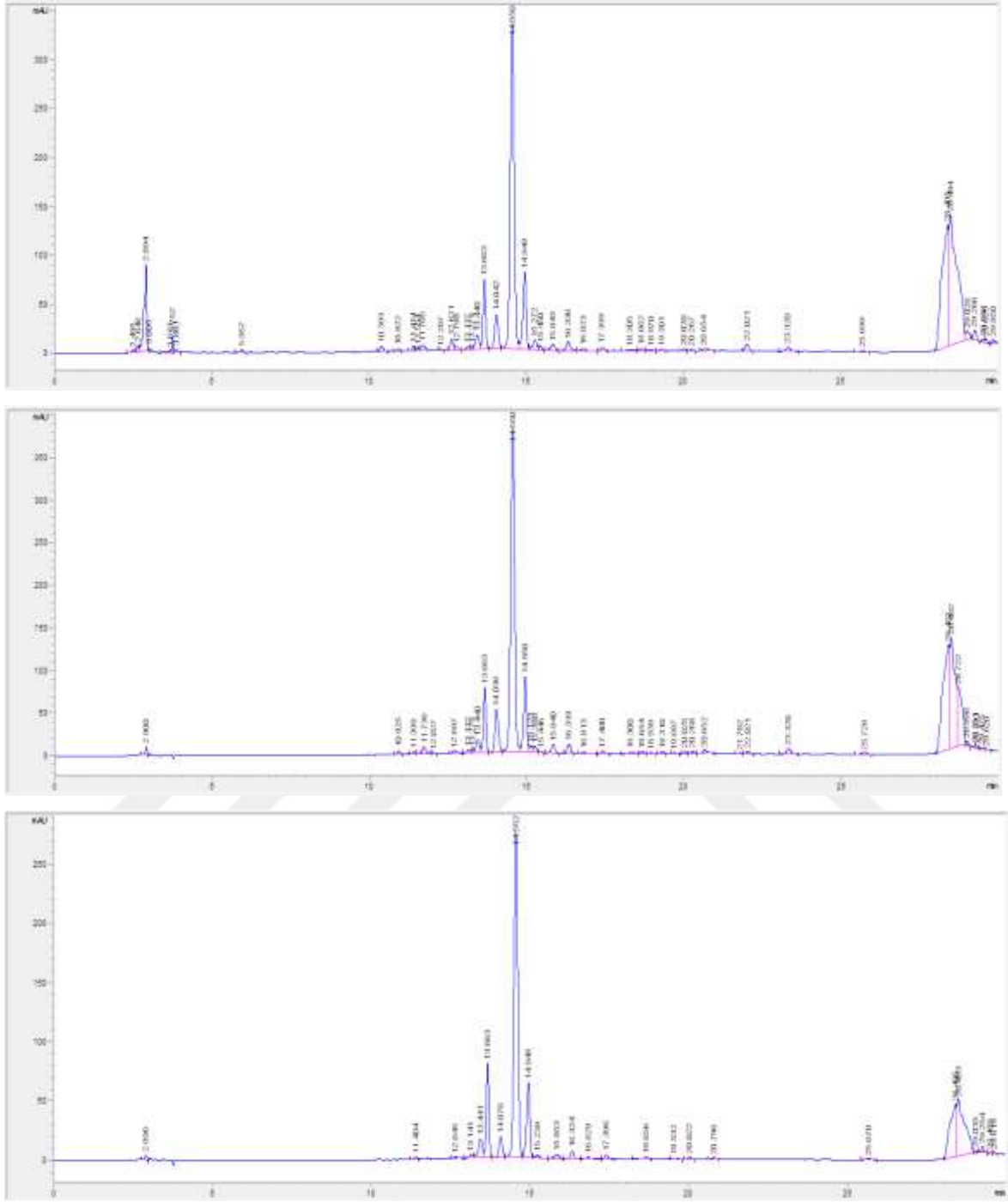
Rizom ekstralarında vanilik asit ve sirinjik asit; topraküstü ekstralarında ise viteksin, viteksin-2-*O*-ramnozit ve orientin bileşikler miktarı tespit edilebilir oranda saptanmış olup, miktar tayini için çalışılan dalga boyu, söz konusu maddenin maksimum UV absorpsiyonuna göre değerlendirilmiştir. Tespit edilen bileşiklerin tespit edilen retansiyon zamanları ve çalışılan dalga boyları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: Kantitatif Analizi Yapılan Maddelerin Retansiyon Zamanları ve Analizin Yürütüldüğü Dalga Boyu.

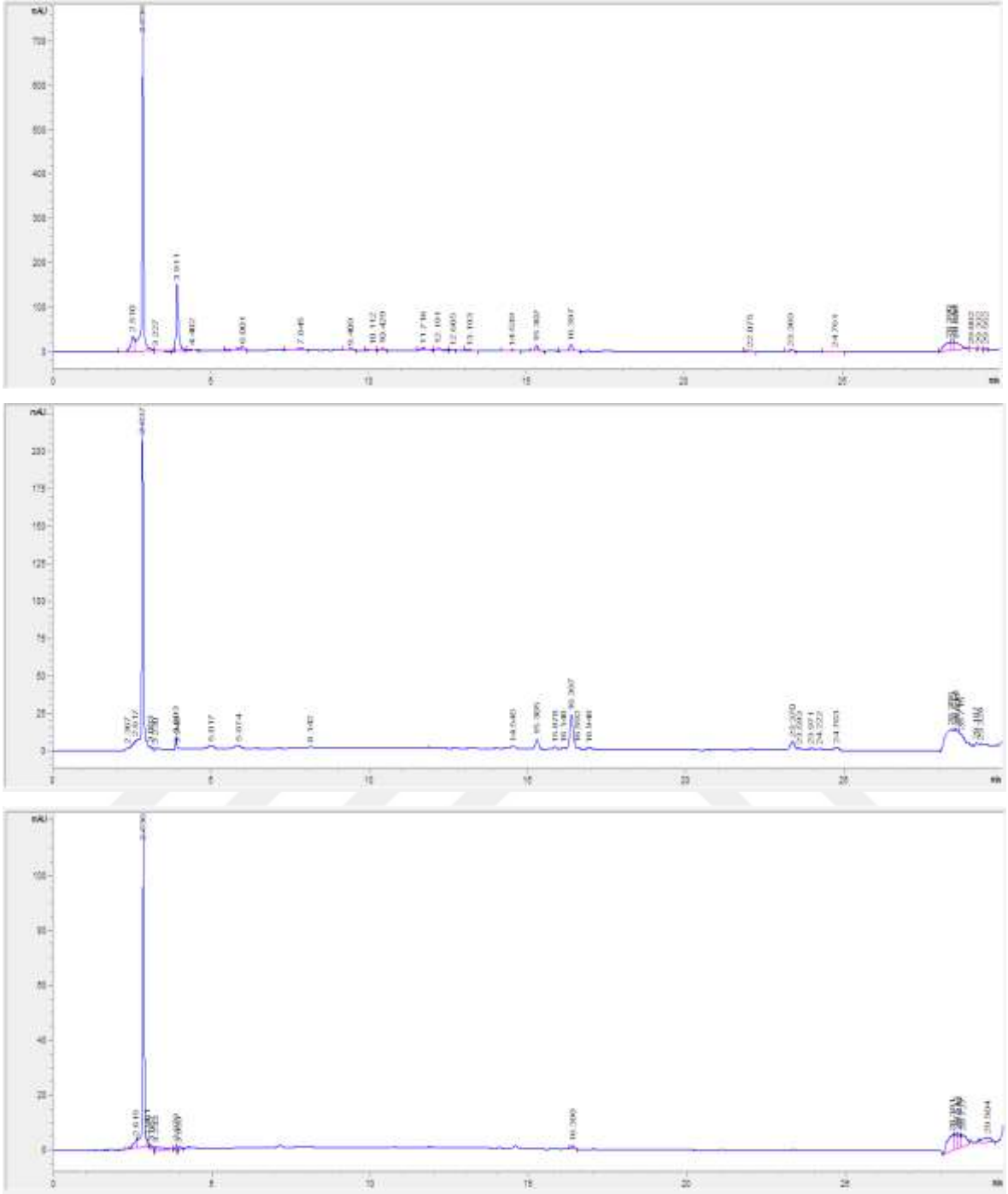
Bileşiğin Adı	Retansiyon zamanı (dakika)	Çalışılan dalga boyu (nm)
Vanilik asit	11,66	270
Sirinjik asit	12,19	270
Orientin	13,6	360
Viteksin	14,55	330
Viteksin-2- <i>O</i> -ramnozit	14,93	330

Bitkinin topraküstü kısımlarından %50 etanol, etanol ve metanol ile hazırlanan ekstraların HPLC kromatogramları Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

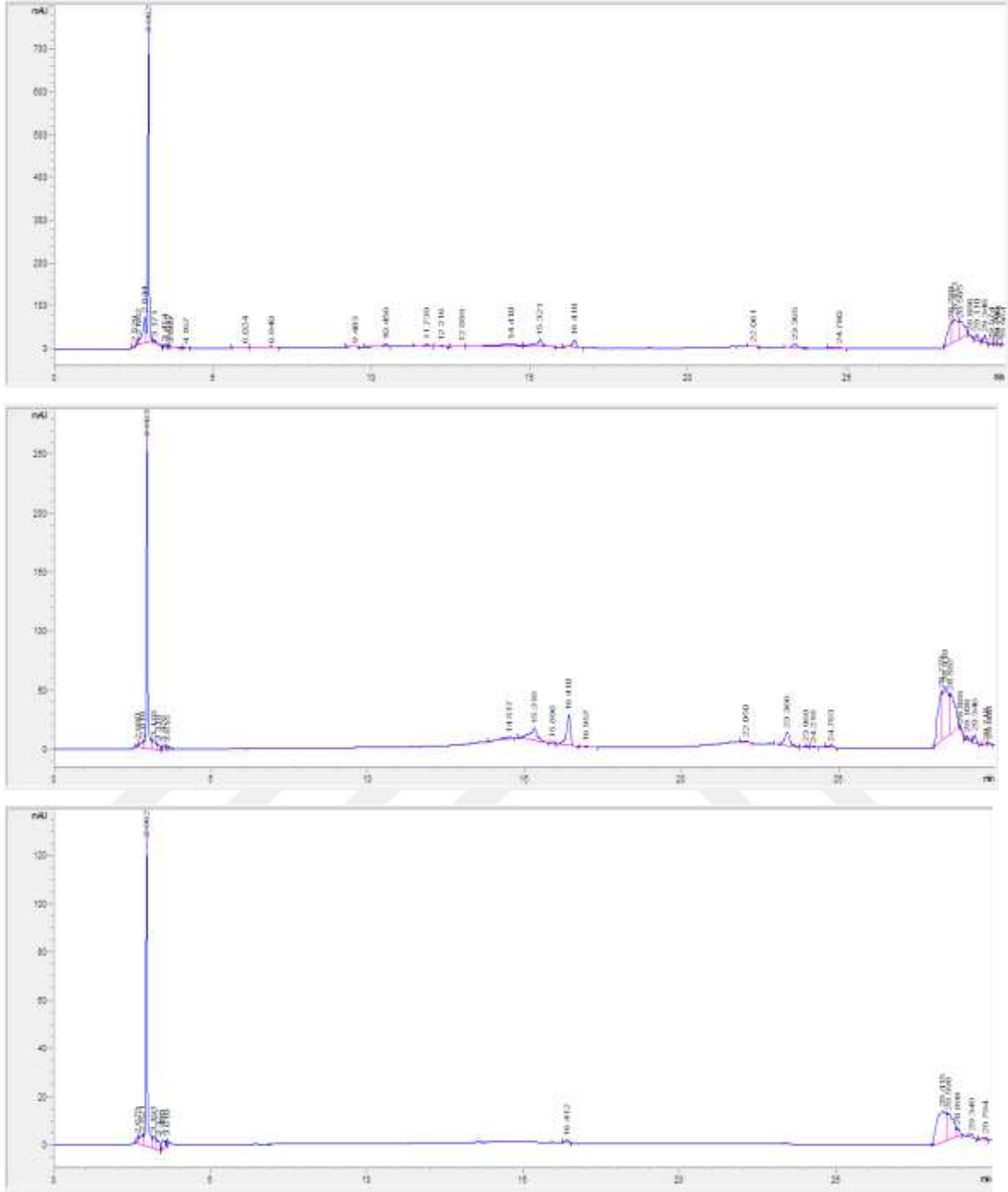




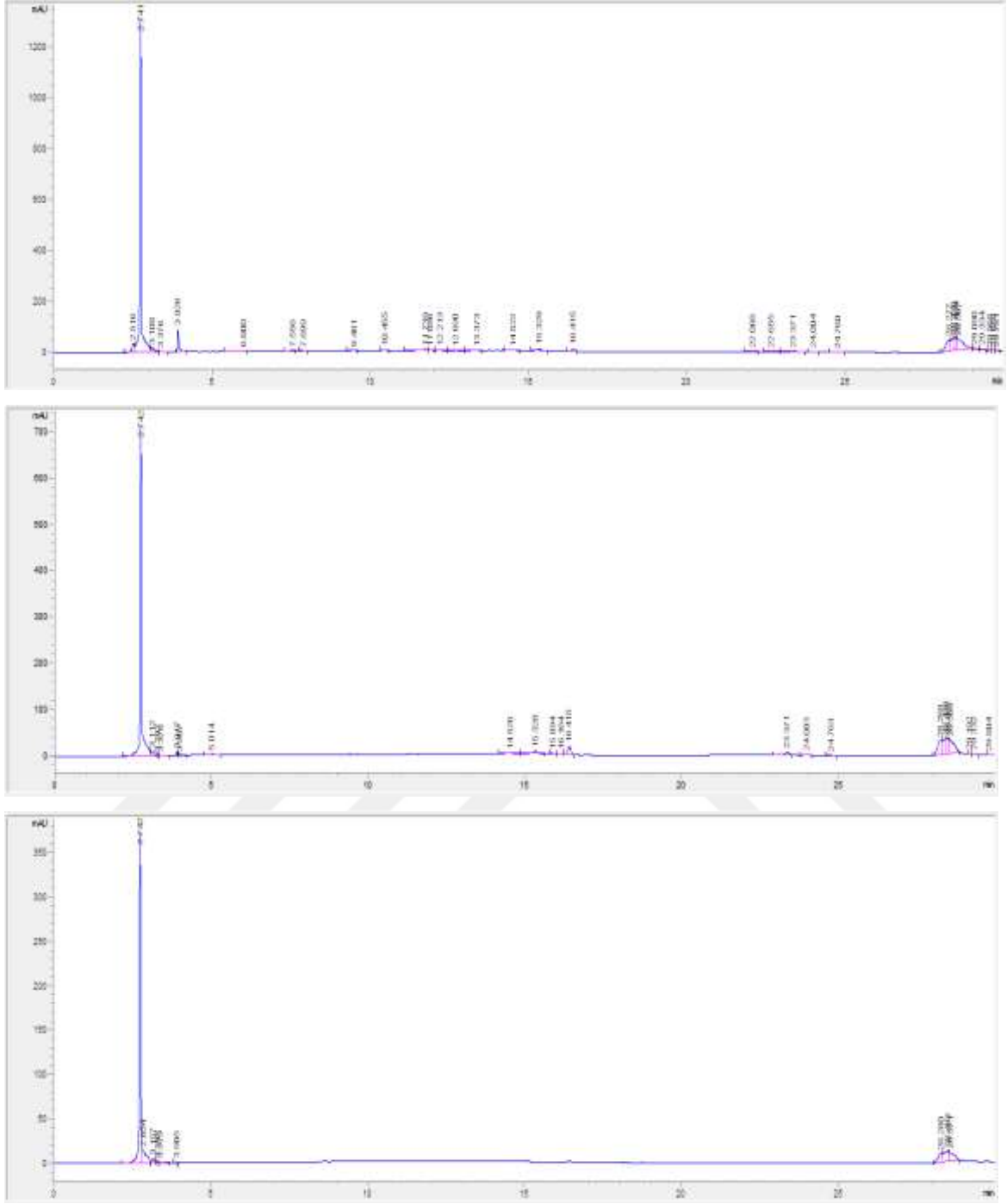
Şekil 4.2: Toprak Üstü Kısımlardan Etanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.



Şekil 4.4: Rizom Kısımlardan %50 Etanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.

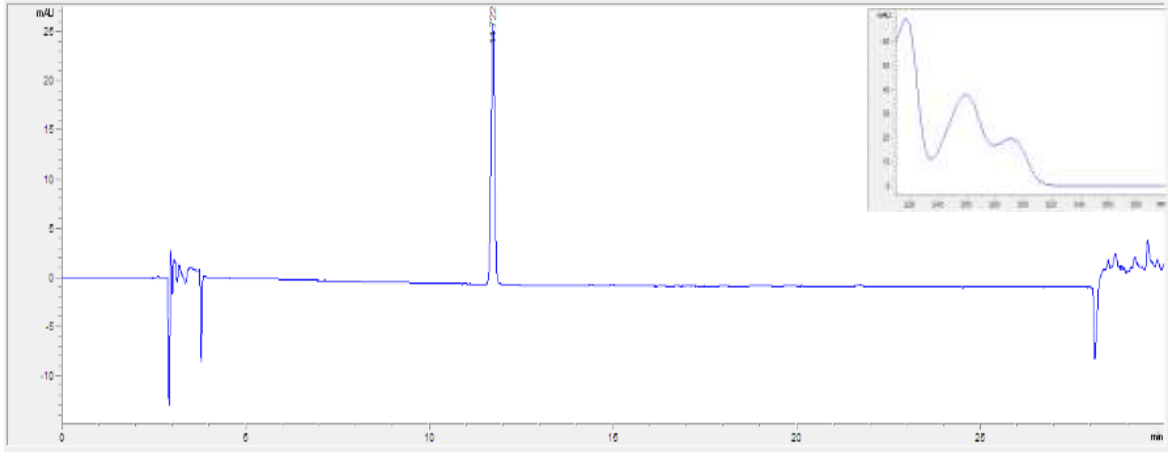


Şekil 4.5: Rizom Kısımlardan Etanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.

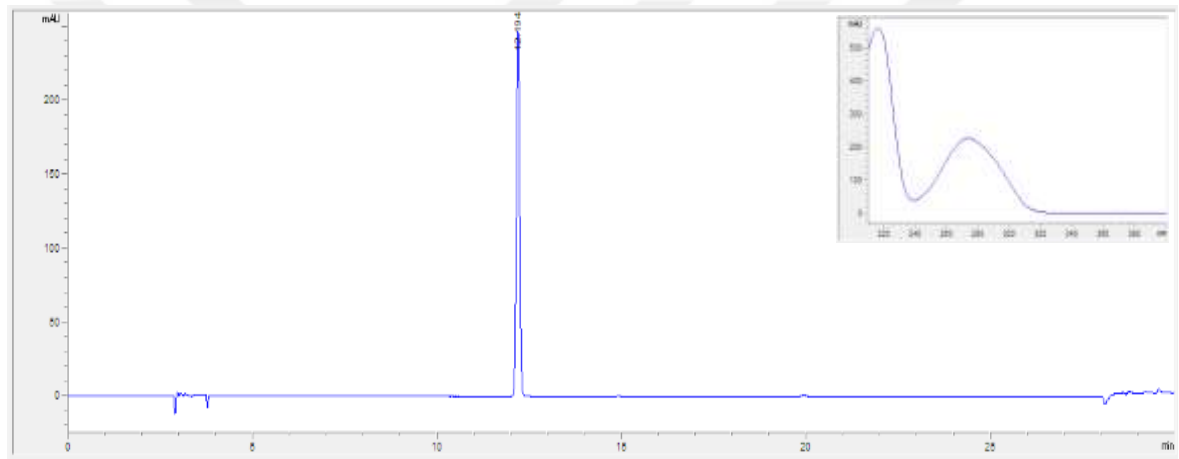


Şekil 4.6: Rizom Kısımlardan Metanol ile Hazırlanan Ekstrelerinin Sırasıyla 270, 330 ve 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramları.

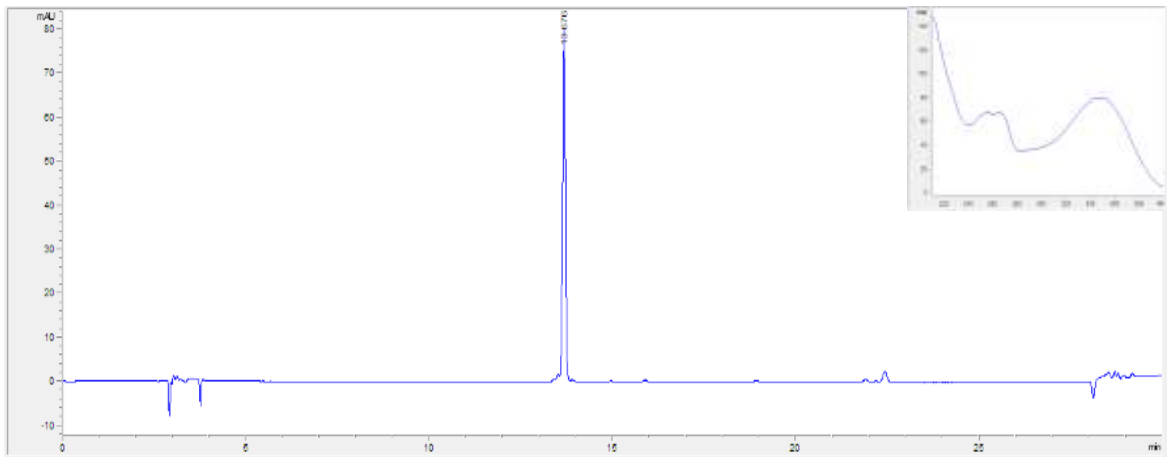
Ekstrelerin içindeki miktarları tayin edilen bileşiklerin, çalışılan dalga boylarındaki HPLC kromatogramları ve UV spektrumları Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.



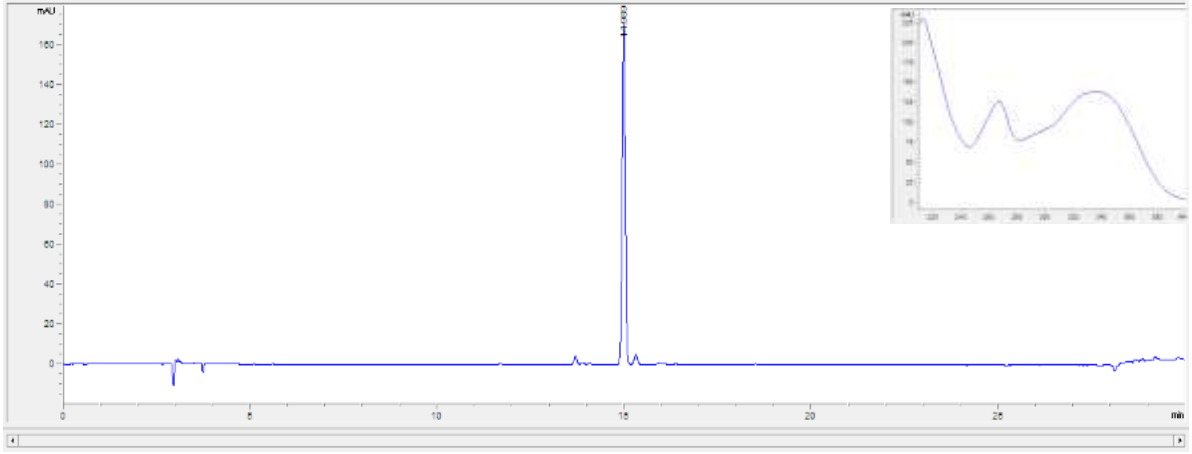
Şekil 4.7: Vanilik Asit Standardının 270 nm Dalga Boyundaki Kromatogramı ve UV Spektrumu.



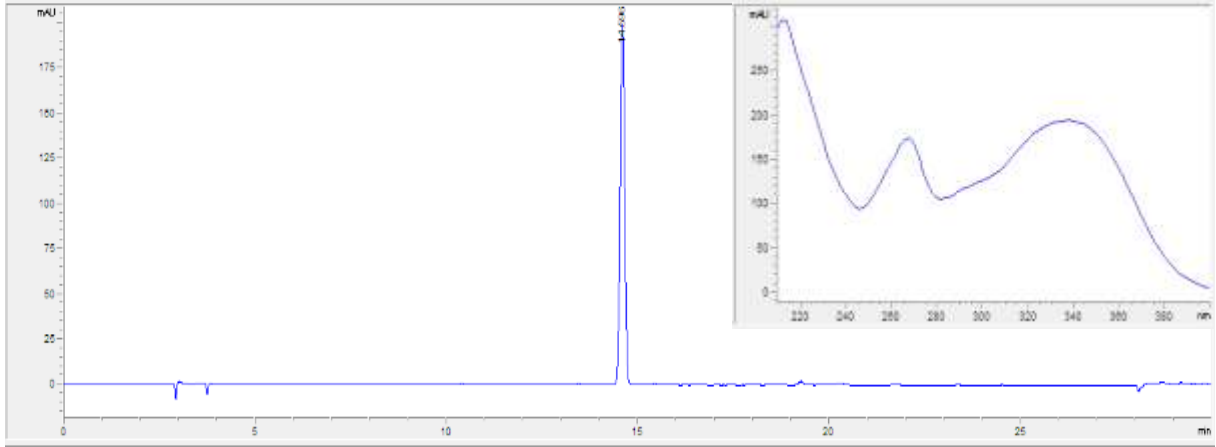
Şekil 4.8: Sirinjik Asit Standardının 270 nm Dalga Boyundaki Kromatogramı ve UV Spektrumu.



Şekil 4.9: Orientin Standardının 360 nm Dalga Boyundaki Kromatogramı ve UV Spektrumu.

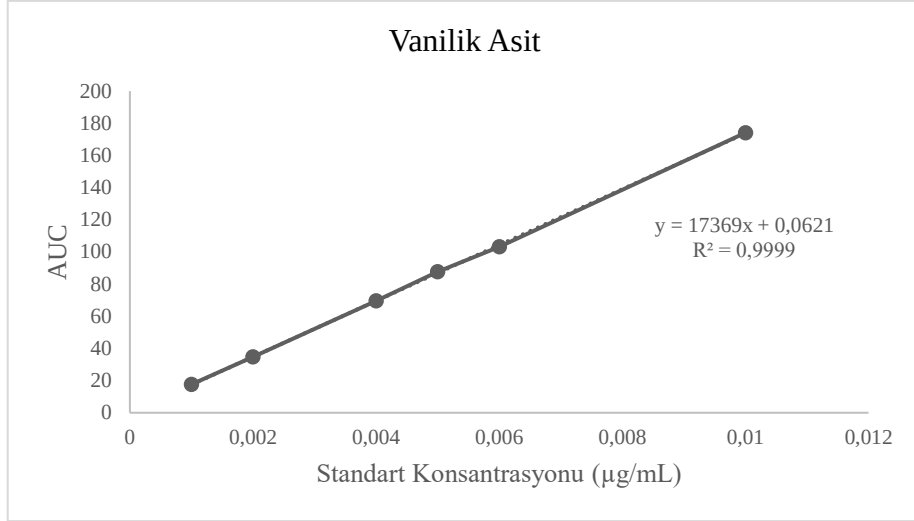


Şekil 4.10: Viteksin Asit Standardının 330 nm Dalga Boyundaki Kromatogramı ve UV Spektrumu.



Şekil 4.11: Viteksin-2-O-ramnozid Asit Standardının 330 nm Dalga Boyundaki Kromatogramı ve UV Spektrumu.

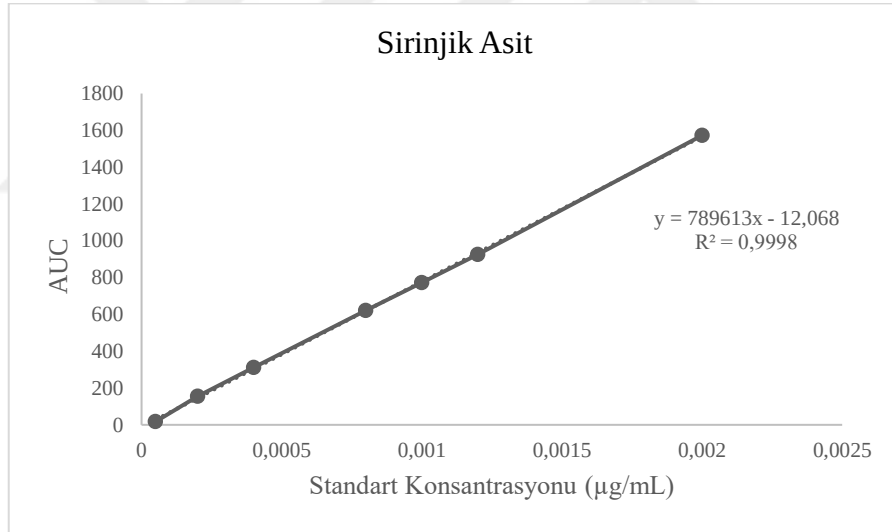
Standart serilerinin kromatogramlarında tespit edilen eğri altı alanları ve konsantrasyon verileri kullanılarak her standart için kalibrasyon denklemi elde edildi. Vanilik asit için çizilen kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 4.12’de verilmiştir.



* AUC: Area Under the Curve.

Şekil 4.12: Vanilik Asit Standart Kalibrasyon Grafiği.

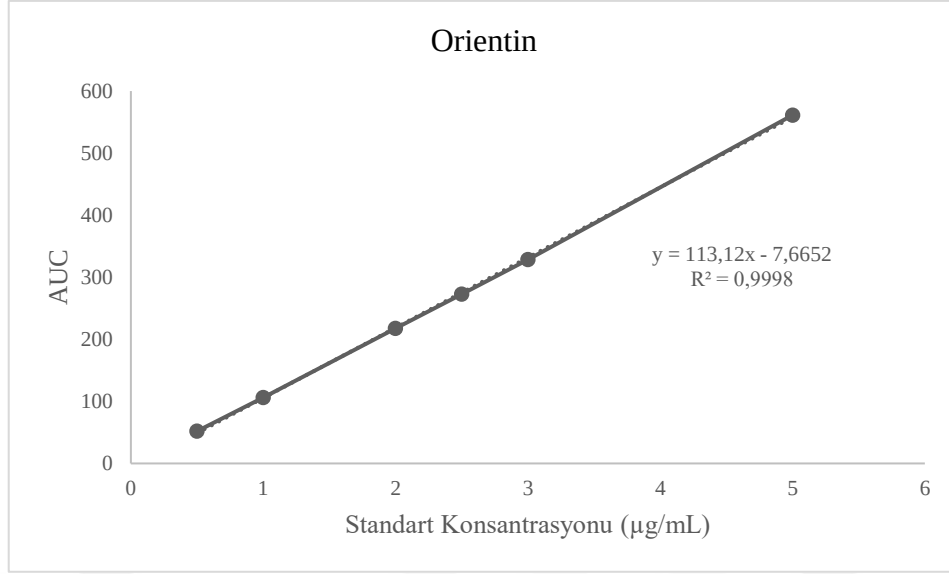
Sirinjik asit için çizilen kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 4. 13'te verilmiştir.



* AUC: Area Under the Curve.

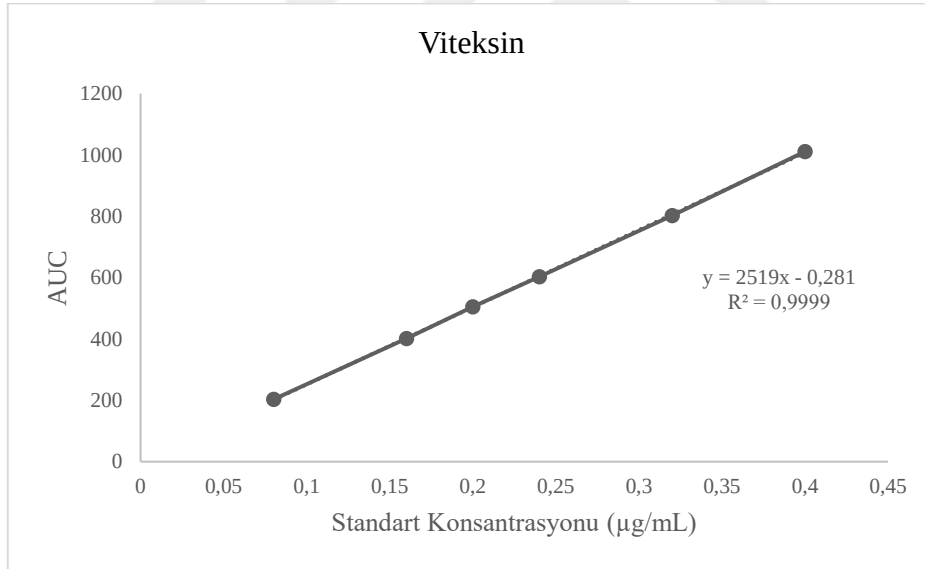
Şekil 4.13: Sirinjik Asit Standart Kalibrasyon Grafiği.

Orientin için çizilen kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 4.14'te verilmiştir.



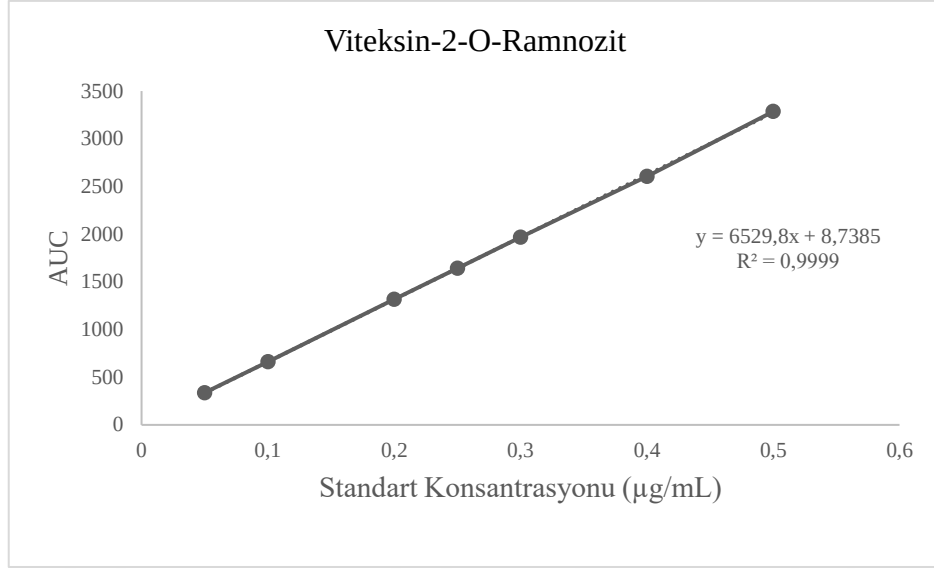
Şekil 4.14: Orientin Standart Kalibrasyon Grafiği.

Viteksin için çizilen kalibrasyon grafiği ve denklemini Şekil 4.15’te verilmiştir.



Şekil 4.15: Viteksin Standart Kalibrasyon Grafiği.

Viteksin-2-O-ramnozid için çizilen kalibrasyon grafiği ve denklemini Şekil 4.16’da verilmiştir.



* AUC: Area Under the Curve.

Şekil 4.16: Viteksin-2-O-ramnozit Standart Kalibrasyon Grafiği

Analizi yapılan ekstrelerin kromatogramlarında maddelere ait piklerin alanları kullanılarak hesaplanan miktarlar Tablo 4.3'te sunulmuştur.

Kantitatif analizde kullanılan cihaz ve yöntem için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.3: Kantitatif Analiz Sonucunda Ekstreler İçinde Tayin Edilen Madde Miktarları.

Ekstre Bileşik Adı	Ekstrede tespit edilen madde miktarı (mg madde/1 g ekstre ± standart sapma)				
	Vanilik asit	Sirinjik asit	Orientin	Viteksin	Viteksin-2-O-ramnozit
Toprak üstü- %50 etanollü ekstre	-	-	787,539±0,974	30,33±0,06	55,38±0,207
Toprak üstü- etanollü ekstre	-	-	424,27±1,24	24,240±0,05	50,4740±0,039
Toprak üstü- metanollü ekstre	-	-	638,43±1,24	31,36±0,078	70,541±0,0431
Rizom- %50 etanollü ekstre	0,06253±0,0086	0,0012±3,92x10 ⁻⁵	-	-	-
Rizom- etanollü ekstre	0,0641±0,0006	0,0011±1,68x10 ⁻⁵	-	-	-
Rizom- metanollü ekstre	0,0766±0,0088	0,0009±1,21x10 ⁻⁴	-	-	-

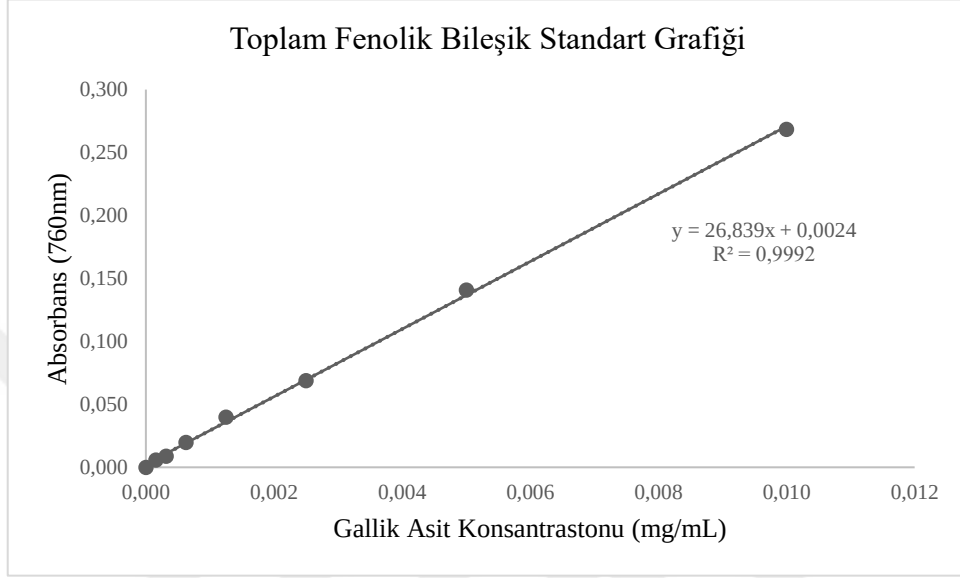
Tablo 4.4: LOD ve LOQ Değerleri.

	Vanilik asit	Sirinjik asit	Orientin	Viteksin	Viteksin-2-O-ramnozit
LOD (mg/mL)	4,7821x10 ⁻⁵	0,3080 x10 ⁻⁵	0,0067	0,0005	0,0003
LOQ (mg/mL)	0,0001	0,9335 x10 ⁻⁵	0,0204	0,0014	0,0008

*LOD: Teşhis alt sınırı; LOQ: Tayin alt sınırı

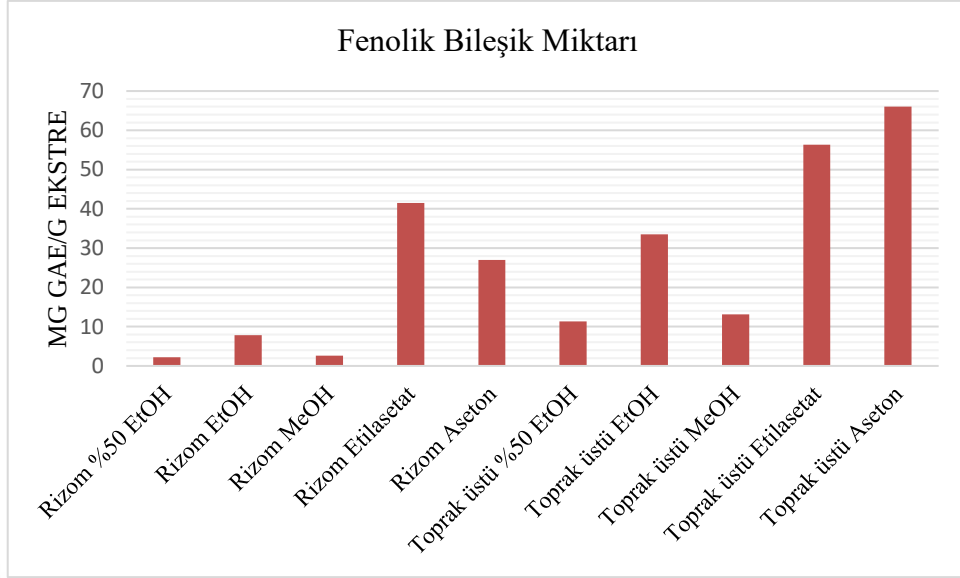
4.1.3 Total Fenolik Bileşik Tayini Bulguları

Bitki ekstralarının fenolik bileşik içeriği gallik asit standartı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart grafik ve grafik formülü Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17: Total Fenolik Bileşik Standart Grafiği.

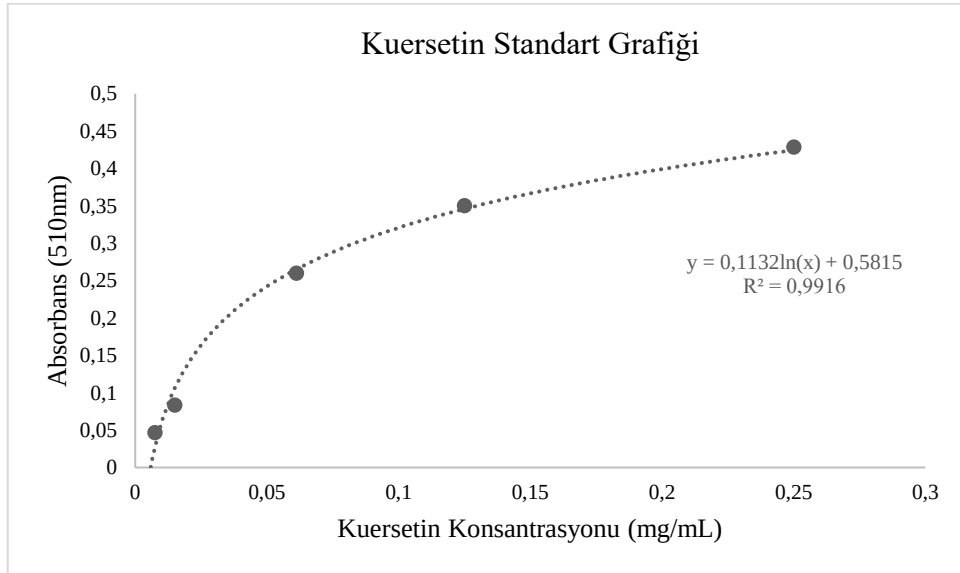
Çalışmada 0.06 mg/mL dozundaki ekstraktlar kullanılarak yapılan Folin–Ciocalteu testi sonuçlarına göre, toplam fenolik madde miktarları ekstrakt türlerine göre anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir (Şekil 4.18). En fazla fenolik içeriğin Toprak üstü Aseton ve Toprak üstü Etil asetat ekstraktlarında olduğunu, Rizom %50 Etanol ve Rizom Metanol ekstraktlarının nispeten daha düşük fenolik içerdiğini göstermektedir.



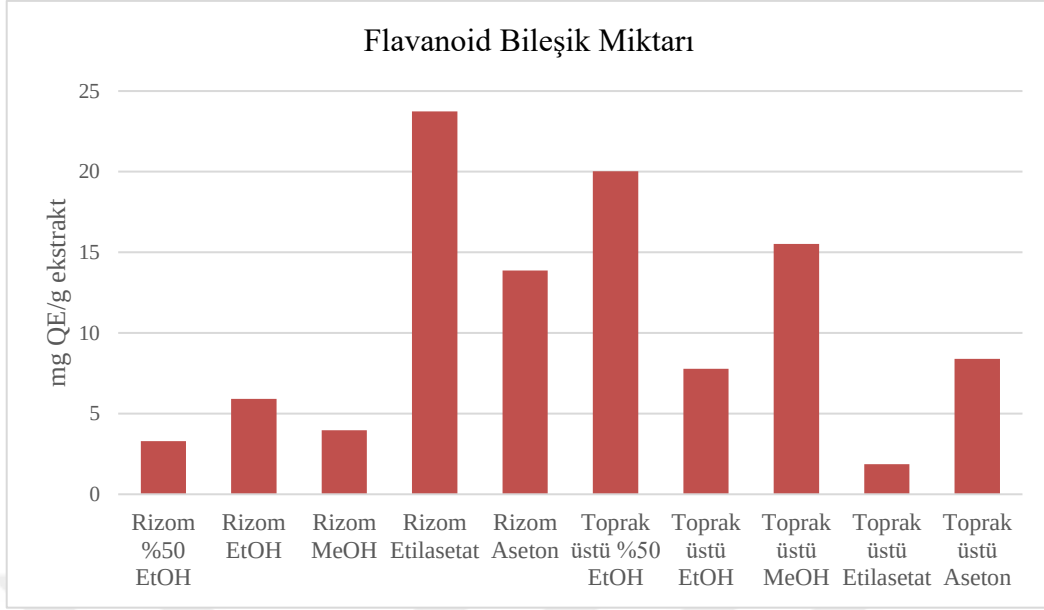
Şekil 4.18: Total Fenolik Bileşik Miktarı.

4.1.4 Total Flavanoid Bileşik Tayini Bulguları

Bitki ekstralarının flavanoid bileşik içeriği kuersetin standartı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart grafik ve bulgular Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.19: Total Flavanoid Bileşik Standart Grafiği.



Şekil 4.20: Total Flavanoid Bileşik Miktarı.

4.1.5 Diğer Fitokimyasal İçerik Tayini Bulguları

Polygonatum orientale bitkisinin topraküstü ve rizomuna ait fitokimyasal içerik analizi sonucunda bitki içerisinde en belirgin olarak saponin olduğu görülmektedir (Tablo 4.5).

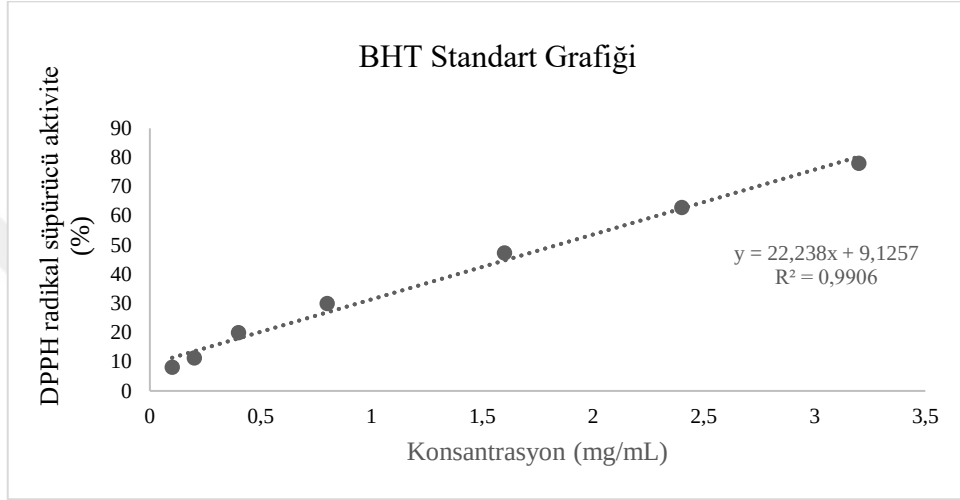
Tablo 4.5: Kimyasal İçerik Taranması.

Etken içerik	Rizom	Toprak üstü
Antrasen	+/-	-
Tanen	-	+ (kateşik tanen)
Alkaloit	-	-
Saponin-	+++ (2,5 cm köpük)	+ (0,4 cm köpük)
Müsilaj	5 mL (++)	-
Kardiyotonik Glikozitler- Keller-Kliani Reaksiyonu	-	-
Kardiyotonik Glikozitler- Kedde Reaksiyonu	-	-
Kardiyotonik Glikozitler- Baljet Reaksiyonu	++	+

4.2 ANTİOKSİDAN AKTİVİTE BULGULARI

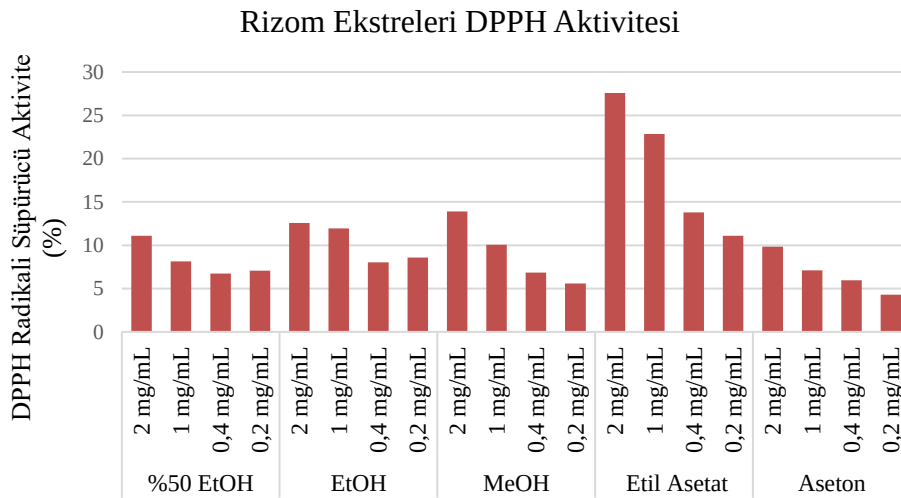
4.2.1 DPPH Bulguları

Bitki ekstralarının DPPH Radikali süpürme aktivitesi Bütirilhidroksi tolüen (BTH) standardı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart grafik ve grafik formülü Şekil 4.21’de verilmiştir.

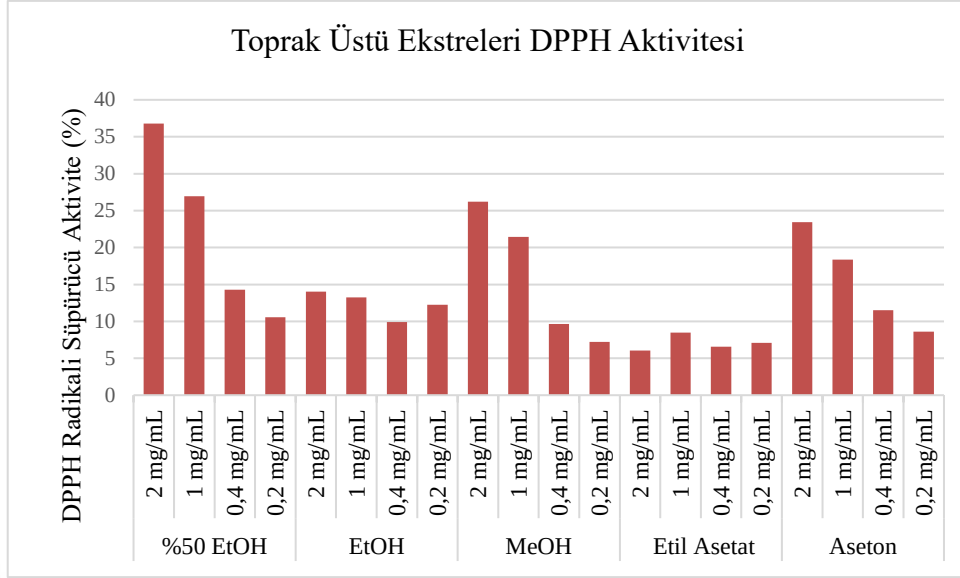


Şekil 4.21: DPPH Kalibrasyon Grafiği.

Yapılan aktivite çalışmalarında Her bir ekstreten dört farklı doz çalışılmış olup, çalışılan dozlarda IC₅₀ değerlerine ulaşamamıştır. En yüksek aktiviteye Rizom ekstraktlarında etil asetat ekstresinde ulaşılırken, Toprak üstü ekstralarında is %50 Etanol ekstresinde ulaşılmıştır (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).



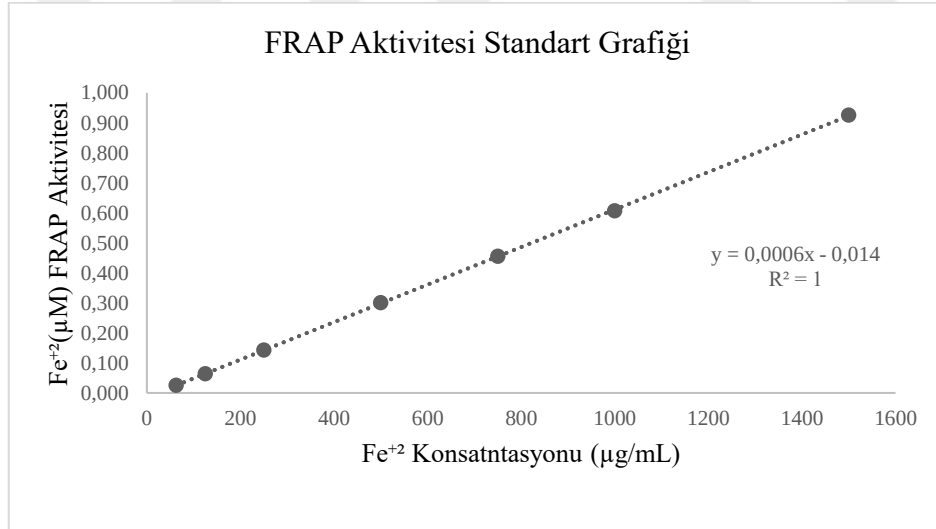
Şekil 4.22: Rizom Ekstreleri DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi Grafiği.



Şekil 4.23: Toprak Üstü Ekstreleri DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi Grafiği.

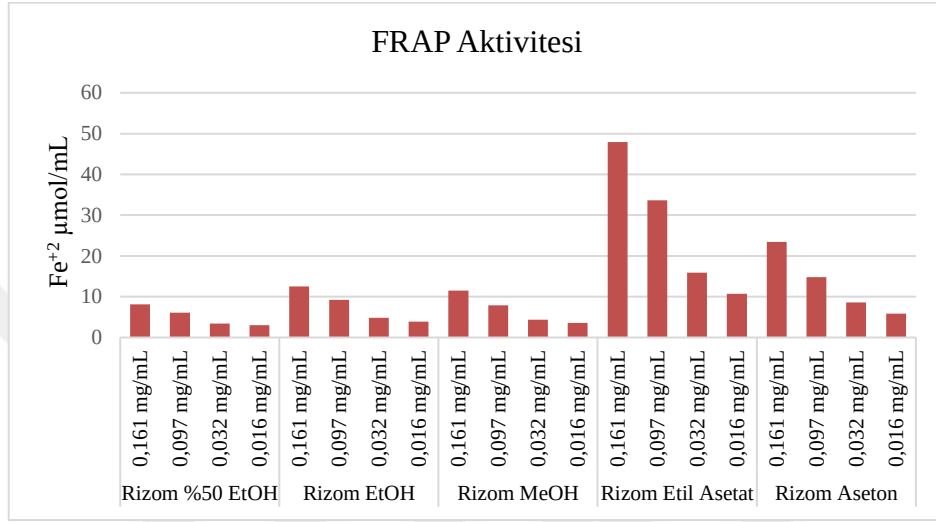
4.2.2 FRAP Bulguları

Bitki ekstralarının FRAP aktivitesi Fe_2SO_4 standartı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart grafik ve grafik formülü Şekil 4.24'te verilmiştir.

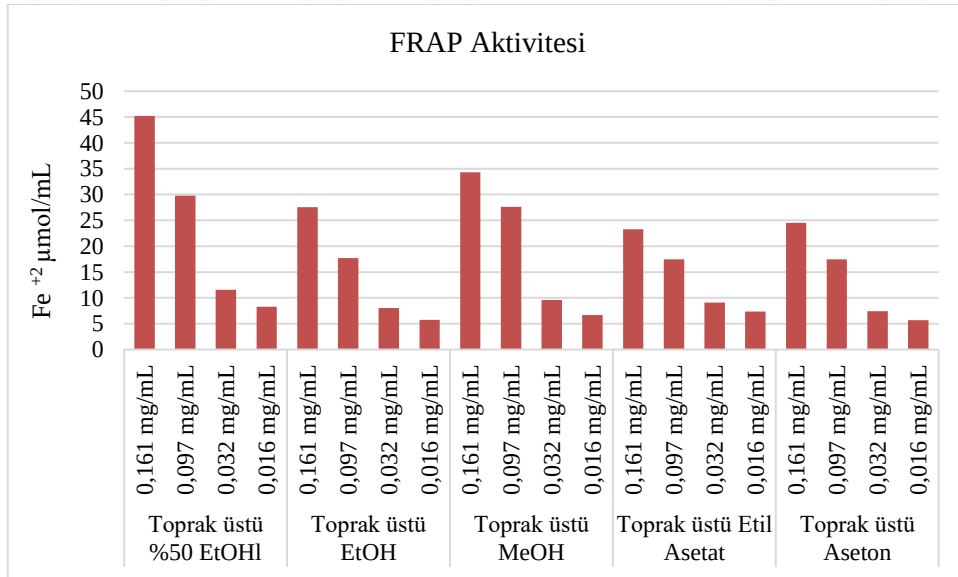


Şekil 4.24: FRAP Kalibrasyon Grafiği.

Çalışılan tüm örneklerde yüksek konsantrasyonlarda demir (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin de yüksek olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek FRAP aktivitesi, Rizom için Etil Asetat ekstraktında (0.161 mg/mL) için yaklaşık 48–50 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ ve Toprak üstü ekstraktlarından %50 EtOH ekstraktında (0.161 mg/mL) için yaklaşık 45 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).



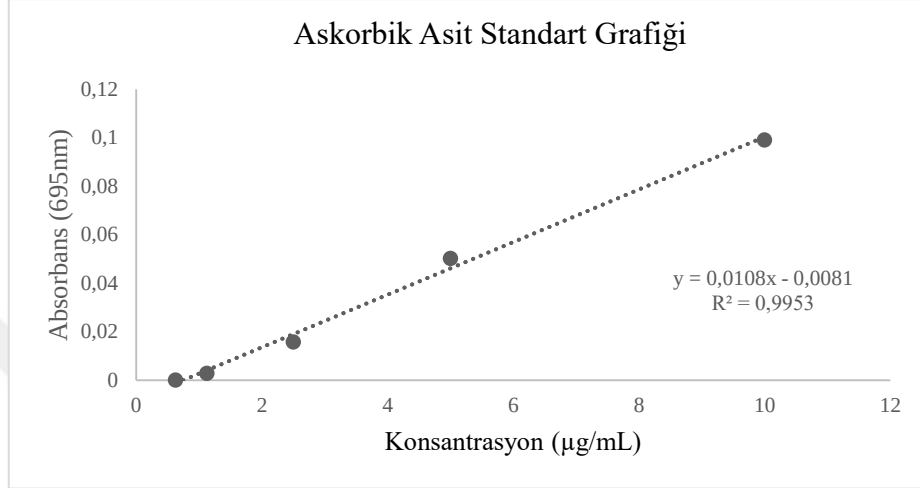
Şekil 4.25: Rizom Ekstreleri FRAP Aktivitesi.



Şekil 4.26: Toprak Üstü Ekstreleri FRAP Aktivitesi.

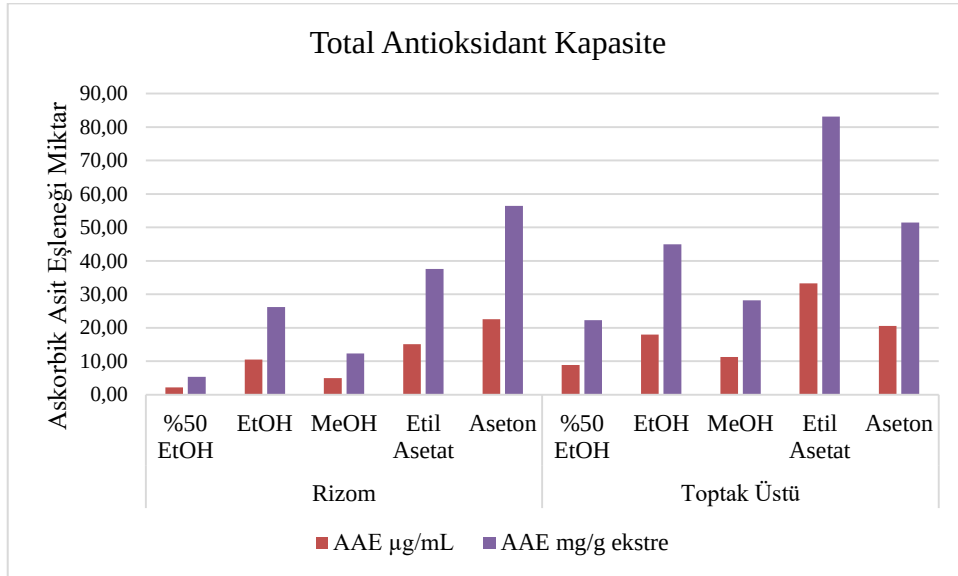
4.2.3 Total Antioksidan Kapasite Bulguları

Bitki ekstralarının total antioksidan kapasitesi askorbik asit standartı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart grafik ve grafik formülü Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27: Total Antioksidan Kapasite Standart Grafiği.

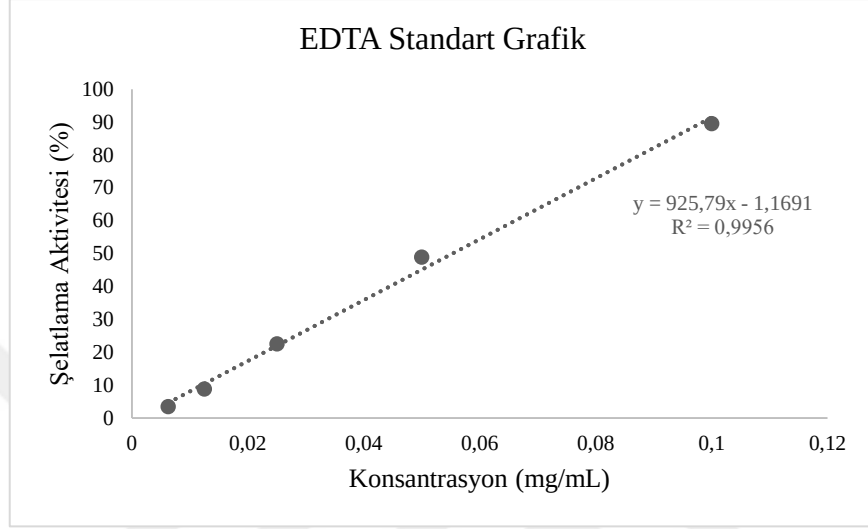
Ekstrelerin 1 mg/mL konsantrasyonu kullanılarak hesaplanan total antioksidan kapasite sonuçları Şekil 4. 28’de gösterilmektedir.



Şekil 4.28: Total Antioksidan Kapasite Miktarları.

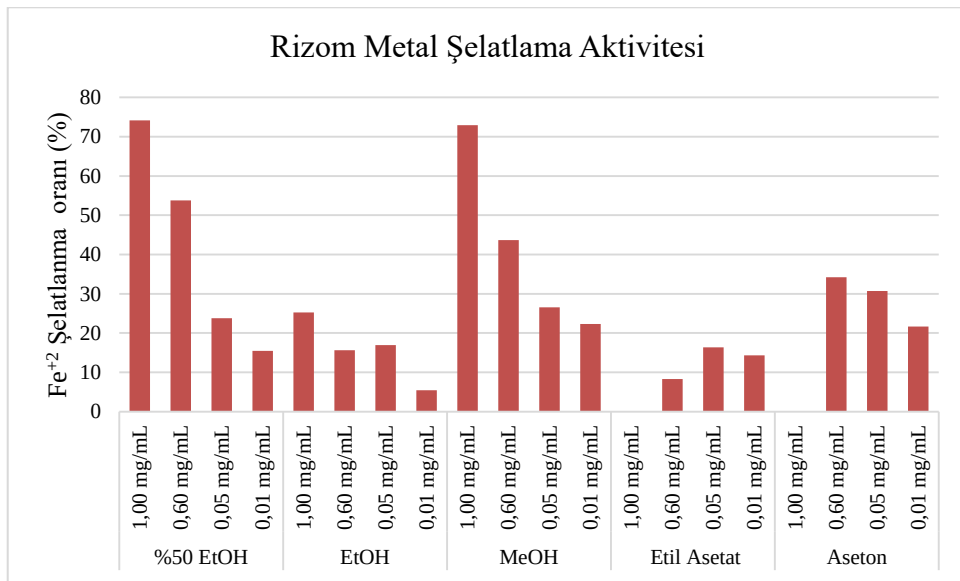
4.2.4 Metal Şelatlama Bulguları

Bitki ekstralarının Metal şelatlama kapasitesi EDTA standartı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart grafik ve grafik formülü Şekil 4.29’da verilmiştir.

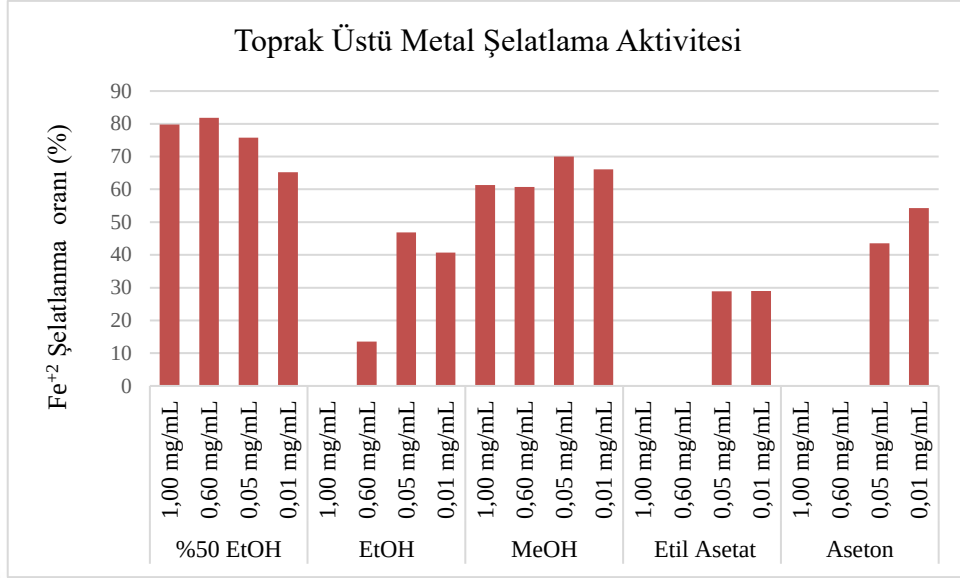


Şekil 4.29: Metal Şelatlama Aktivitesi Standart Grafik.

Metal şelatlama aktivite sonuçları Şekil 4.30, Şekil 4.31 ve Tablo 4.6’da özetlenmiştir. Rizom ekstralarından %50 etanol, etanol ve metanol ekstraları dışındaki ekstralarda gözlenen absorbanların ölçüm aralığı dışında kalması sebebiyle IC₅₀ değerleri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.30: Rizom Ekstreleri Metal Şelatlama Aktivitesi.



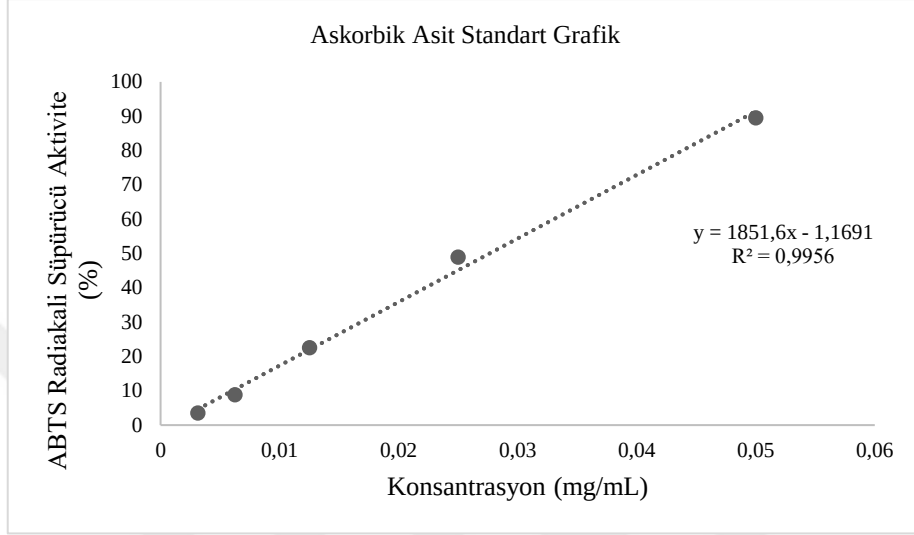
Şekil 4.31: Toprak Üstü Metal Şelatlama Aktivitesi.

Tablo 4.6: Metal Şelatlama Aktivitesi Miktar Tablosu.

Ekstre Türü	IC50 (mg/mL)	EDTAE (mg/mL)	Ekstrede EDTAAE (mg/g)
Rizom %50 Etanol	0,558	0,0270	44,986
Rizom Etanol	2,276	0,0195	32,571
Rizom Metanol	0,540	0,0300	49,952
Rizom Etil asetat	-	0,0157	26,219
Rizom Aseton	-	0,0344	57,343
Toprak üstü %50 Etanol	-	0,0694	115,747
Toprak üstü Etanol	-	0,0519	86,447
Toprak üstü Metanol	-	0,0768	128,081
Toprak üstü Etil asetat	-	0,0325	54,110
Toprak üstü Aseton	-	0,0483	80,557

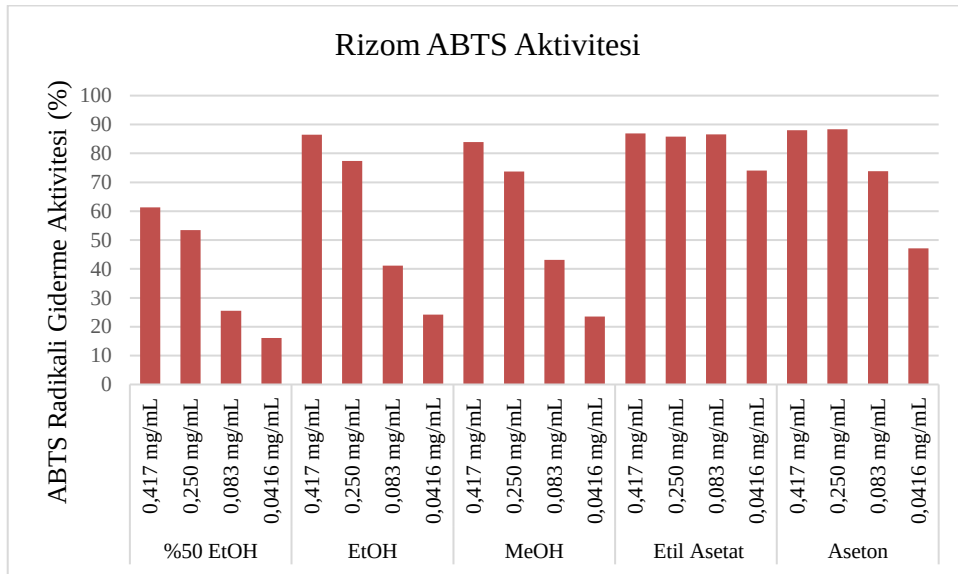
4.2.5 ABTS Radikali Süpürücü Bulguları

Bitki ekstralarının ABTS radikali süpürücü aktivitesi askorbik asit standartı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart grafik ve grafik formülü Şekil 4.32’de verilmiştir.

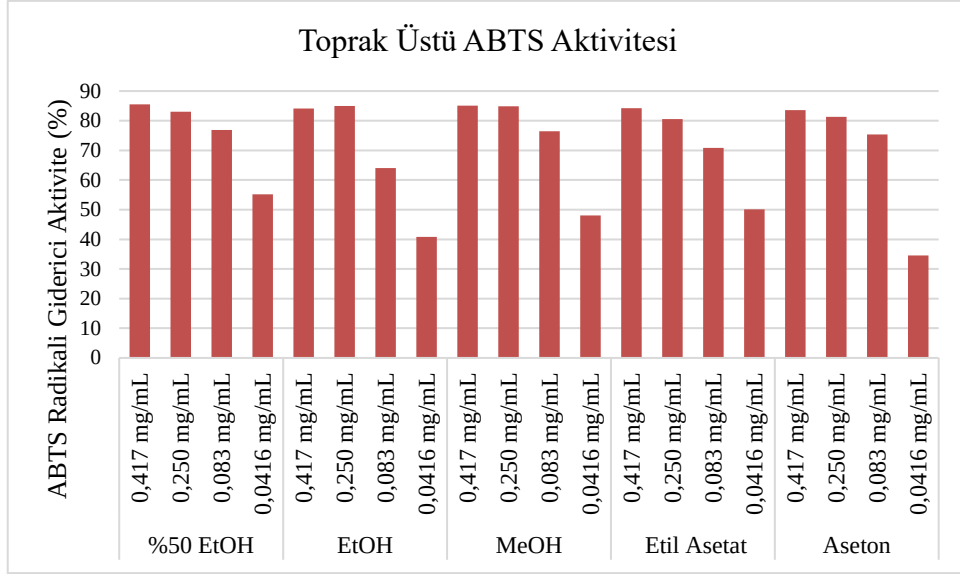


Şekil 4.32: ABTS Radikal Süpürücü Aktivite Standart Grafik.

ABTS radikali giderici aktivite sonuçları Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Tablo 4.7’de özetlenmiştir.



Şekil 4.33: Rizom Ekstreleri ABTS Radikal Giderici Aktivite.



Şekil 4.34: Toprak Üstü Ekstreleri ABTS Radikali Giderici Aktivite.

Tablo 4.7: ABTS Aktivitesi.

Ekstre Türü	IC50 µg/mL	AAE (mg/mL)	Ekstrede AAE (mg/g)
Rizom %50 Etanol	316,7433	0,0337	80,9570
Rizom Etanol	176,9251	0,0473	113,5736
Rizom Metanol	178,9207	0,0460	110,3566
Rizom Etil asetat	0,699437	0,0476	114,2438
Rizom Aseton	45,33757	0,0481	115,5396
Toprak üstü %50 Etanol	25,75087	0,0455	109,1056
Toprak üstü Etanol	61,0298	0,0460	110,4907
Toprak üstü Metanol	43,68555	0,0465	111,5183
Toprak üstü Etil asetat	35,01934	0,0442	105,9780
Toprak üstü Aseton	78,34042	0,0445	106,8716

4.3 ENZİM İNHİBİSYONU ÇALIŞMALARI BULGULARI

4.3.1 Asetilkolinesteraz İnhibisyonu Bulguları

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin Ellman yöntemiyle yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda elde edilen % inhibisyon değerleri *P. orientale* rizom ve toprak üstü kısımları için Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’da verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, en düşük IC₅₀ değerine 10 mg/mL stok doz kullanılan rizom metanol ekstresinde IC₅₀ değeri 1,35 mg/mL, toprak üstü metanol ekstresinde 1,11 mg/mL olarak hesaplanmıştır, diğer ekstrelerde IC₅₀ değerlerine ulaşamamıştır.

Tablo 4.8: *P. orientale* Rizom Ekstrelerinin AChE İnhibisyonları.

Ekstre Türü	Numune Konsantrasyonu (µg/mL)	% İnhibisyon
%50 EtOH	83,3	3
	166,7	5
	416,7	14,14
	833,3	22,09
%100 EtOH	83,3	1,52
	166,7	8,59
	416,7	19,89
	833,3	30,24
MeOH	83,3	-
	166,7	5,80
	416,7	13,76
	833,3	32,13
	1250	45,33
	IC ₅₀	1,350 mg/mL

Tablo 4.9: *P. orientale* Toprak Üstü Ekstrelerinin AChE İnhibisyonları.

Ekstre Türü	Numune Konsantrasyonu (µg/mL)	% İnhibisyon
%50 EtOH	416,7	17,23
	833,3	31,76
%100 EtOH	416,7	23,74
	833,3	Yüksek Absorbans
MeOH	416,7	18,81
	833,3	34,15
	1041,7	43,182
	IC ₅₀	1,114 mg/mL

4.3.2 MAO-A İnhibisyonu Bulguları

Bitki ekstrelerinin MAO-A (Monoamin Oksidaz A) enzimi inhibisyon oranlarına ait veriler Tablo 4.10’da gösterilmiştir. Çalışılan dozlarda sadece 0,2 mg/mL dozunda toprak üstü etanol ekstresinde %52,72 ile IC₅₀ değerine yakın bir değer elde edilmiştir.

Tablo 4.10: MAO-A İnhibisyon Oranları.

Ekstre	% İnhibisyon	STD
Rizom %50 Etanol 0,2 mg/mL	7,89	0,425
Rizom %50 Etanol 0,4 mg/mL	17,16	0,854
Rizom Etanol 0,2 mg/mL	26,98	3,112
Rizom Etanol 0,4 mg/mL	41,94	1,614
Rizom Metanol 0,2 mg/mL	8,00	8,035
Rizom Metanol 0,4 mg/mL	21,92	5,227
TÜ %50 Etanol 0,2 mg/mL	22,14	6,031
TÜ %50 Etanol 0,4 mg/mL	37,90	1,337
TÜ Etanol 0,2 mg/mL	52,72	0,710
TÜ Etanol 0,4 mg/mL	71,66	2,515
TÜ Metanol 0,2 mg/mL	25,08	3,126
TÜ Metanol 0,4 mg/mL	38,37	2,484

4.3.3 MAO-B İnhibisyonu Bulguları

Bitki ekstralarının Monoamin Oksidaz B (MAO-B) enzimi inhibisyon oranlarına ait veriler Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Çalışılan dozlarda sadece 0,2 mg/mL dozunda toprak üstü etanol ekstresinde %53,68 ile IC₅₀ değerine yakın bir değer elde edilmiştir.

Tablo 4.11: MAO-B İnhibisyon Oranları.

Ekstre	% İnhibisyon	STD
Rizom %50 Etanol 0,2 mg/mL	13,43	3,059
Rizom %50 Etanol 0,4 mg/mL	22,14	2,772
Rizom Etanol 0,2 mg/mL	36,19	1,350
Rizom Etanol 0,4 mg/mL	43,48	3,679
Rizom Metanol 0,2 mg/mL	32,23	12,531
Rizom Metanol 0,4 mg/mL	41,47	7,660
TÜ %50 Etanol 0,2 mg/mL	18,86	7,073
TÜ %50 Etanol 0,4 mg/mL	34,33	2,153
TÜ Etanol 0,2 mg/mL	53,68	9,489
TÜ Etanol 0,4 mg/mL	69,93	3,294
TÜ Metanol 0,2 mg/mL	27,81	6,056
TÜ Metanol 0,4 mg/mL	37,46	3,924

4.4 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE BULGULARI

Rizom ve toprak üstü ekstrelerinin 8 farklı standart bakteri suşlarına karşı antibakteriyel aktivite tayini hem disk füzyon hem de minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) belirlenmiştir. Deneyler üç farklı zamanda tekrar edilmiştir. 1 mg/mL başlangıç dozlarla yapılan ilk çalışmalarda Minimum İnhibisyon Konsantrasyon'a (MİK) ulaşamamıştır. Daha yüksek dozlar kullanılarak yapılan antibakteriyel MİK sonuçları aşağıda Tablo 4.12 ve Tablo 4.13'te yer almaktadır.

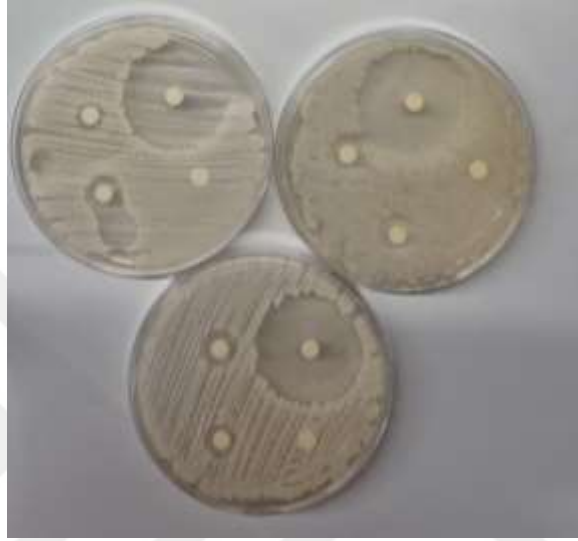
Tablo 4.12: MİK Değerlendirmesi (Rizom).

Mikroorganizma	%50 Etanol	Etanol	Metanol	Etil Asetat	Aseton	Antibiotik Klorom fenikol
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	7,81 µg/mL
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	10 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	5 mg/mL	1,95 µg/mL
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	500 µg/mL
<i>P. vulgaris</i> ATCC 8427	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	15,62 µg/mL
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	0,98 µg/mL
<i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC 13048	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	125 µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	0,98 µg/mL
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	3,90 µg/mL

Tablo 4.13: MİK Değerlendirmesi (Toprak Üstü).

Mikroorganizma	%50 Etanol	Etanol	Metanol	Etil Asetat	Aseton	Antibiotik Klorom fenikol
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10 mg/mL	>40 mg/mL	10 mg/mL	>40 mg/mL	>40 mg/mL	7,81 µg/mL
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	5 mg/mL	5 mg/mL	5 mg/mL	2,5 mg/mL	5 mg/mL	1,95 µg/mL
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	500 µg/mL
<i>P. vulgaris</i> ATCC 8427	>40 mg/mL	>20 mg/mL	10 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	15,62 µg/mL
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	10 mg/mL	>20 mg/mL	10 mg/mL	>20 mg/mL	10 mg/mL	0,98 µg/mL
<i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC 13048	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	5 mg/mL	125 µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	0,98 µg/mL
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	>40 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	>20 mg/mL	3,90 µg/mL

Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için ayrıca disk füzyon metodu uygulanmıştır. 80 ve 40 veya 20 ve 10 mg/mL dozlarda bitki ekstratlarından 20 µL filtre kağıdına emdirilerek, taze bakteri ekilmiş petrilere yerleştirilmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmış olup, sadece *B. subtilis* ATCC 6051 bakteri deney grubunda 20 ve 10 mg/mL rizom aseton ekstresi uygulanan grupta 12 mm ve toprak üstü aseton uygulanan grupta 14 mm çapında bakteri inhibisyon zonu gözlenmiştir (Şekil 4. 35).

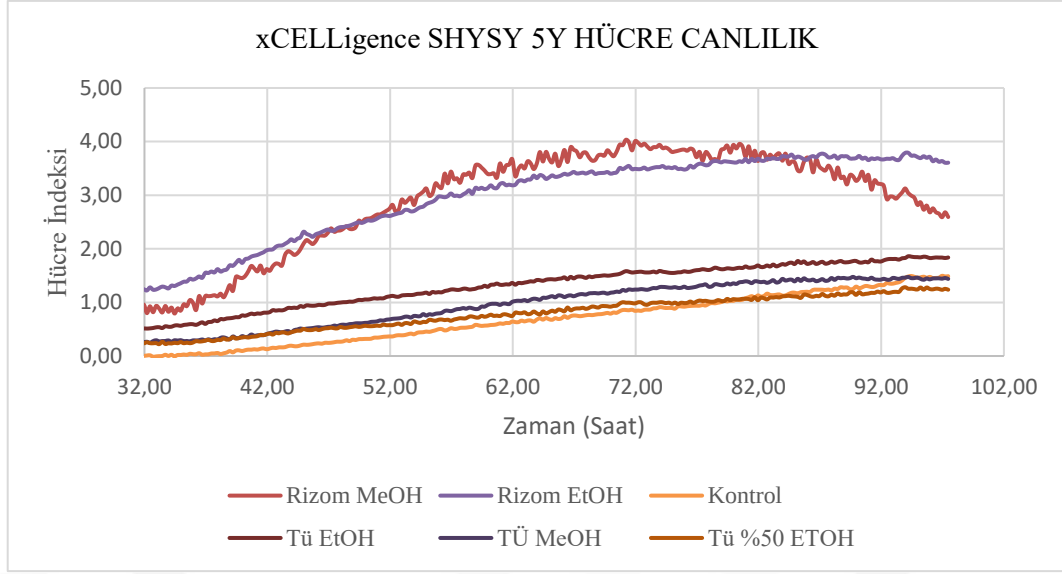


Şekil 4.35: *B. subtilis* Plakalarında Görünen İnhibisyon Zonu.

4.5 HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEY BULGULARI

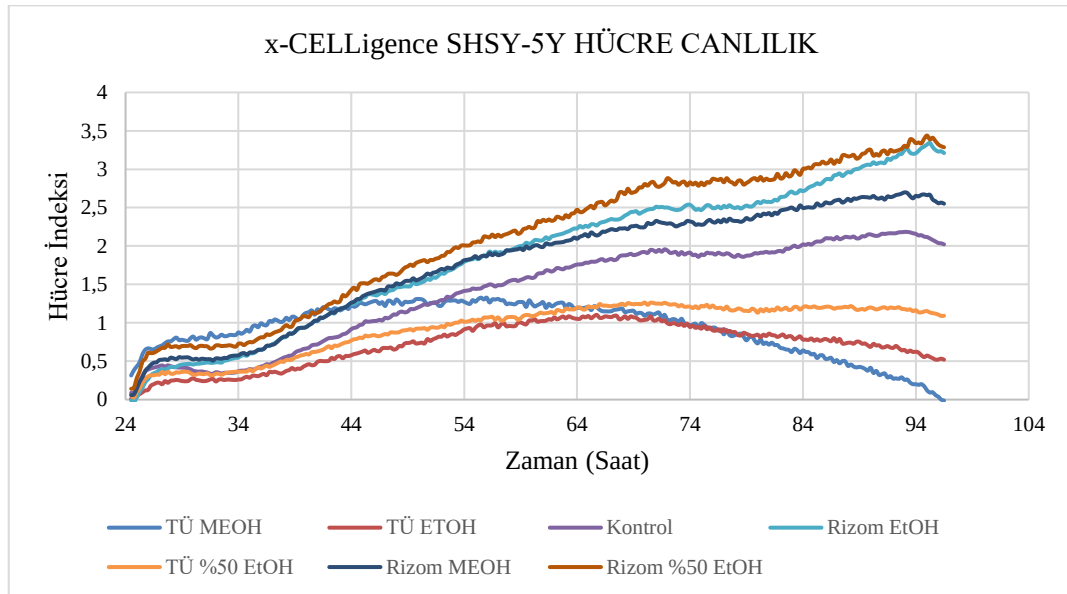
4.5.1 Nöron Hücrelerine Etki Bulguları

Bitki ekstratlarının nöron hücresi olan SHSY5Y hücre hattına olan 96 saatlik gerçek zamanlı etkisi Şekil 4.36 ve Şekil 4.37’de gösterilmiştir. xCELLigence ait Şekil 4.36’da en yüksek cell index değerleri, 60 µg/mL dozunda uygulanan rizom metanol ekstraktında gözlenmiştir. Bunu 50 µg/mL dozundaki rizom etanol ekstraktı takip etmiştir. Toprak üstü kısmına ait 50 µg/mL dozundaki metanol, etanol ekstraktları ise daha düşük cell index artışı ile sınırlı düzeyde proliferatif etki göstermiştir. 130 µg/mL gibi yüksek bir dozda uygulanmasına rağmen, Tü %50 EtOH grubunun etkisi sınırlı kalmıştır.



Şekil 4.36: Hücre Kültüründe 96 Saatlik Takip.

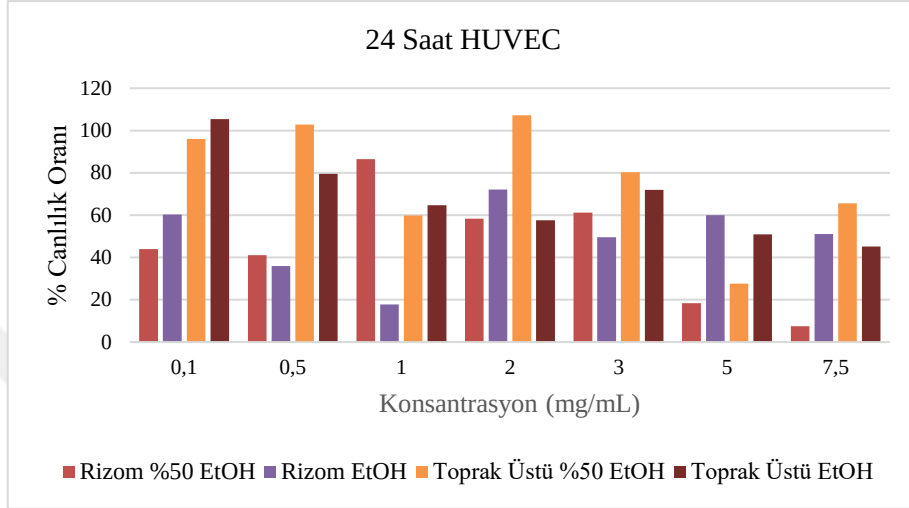
Yapılan diğer bir uygulamalarda Şekil 4. 36’da gösterilmektedir. Rizom %50 EtOH ekstraktı (48 $\mu\text{g/mL}$), tüm gruplar arasında en yüksek proliferatif etkiyi göstermiş, maksimum hücre indeks değeri 3,5’e ulaşmıştır. Rizom EtOH (40 $\mu\text{g/mL}$) ve Rizom MeOH (46 $\mu\text{g/mL}$) ekstraktları sırasıyla 2,8 ve 2,5 civarında hücre indeks değerlerine ulaşarak yüksek düzeyde hücre çoğalması sağlamıştır. Toprak üstü ekstraktlar, özellikle Tü %50 EtOH (52 $\mu\text{g/mL}$) orta düzeyde (~ 1.3) hücre canlılığı göstermiştir. Tü EtOH (50 $\mu\text{g/mL}$) ve Tü MeOH (35 $\mu\text{g/mL}$) gruplarında ise etki daha düşük olarak tespit edilmiştir.



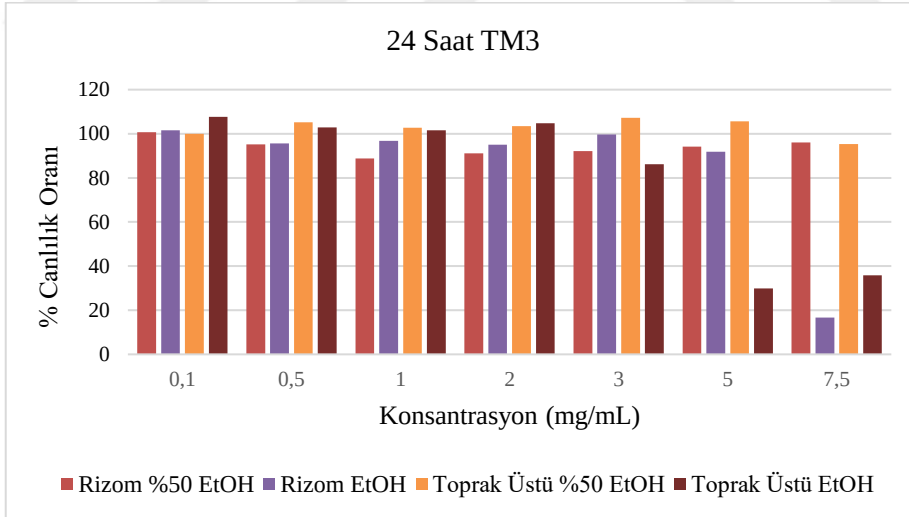
Şekil 4.37: Hücre Kültüründe 96 Saatlik Takip.

4.5.2 Üreme Hücrelerine Etki Bulguları

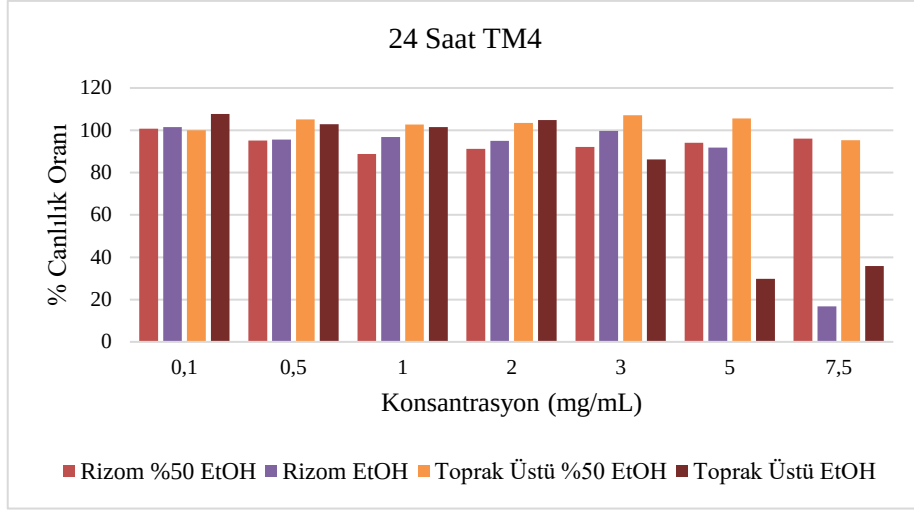
Bitki ekstralarının hücre kültürü ortamında erkek üreme hücreleri olan Leydig (TM3), Sertoli (TM4) ve kontrol olarak kullanılan endotel hücresi olan HUVEC hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat etki sonuçları Şekil 4. 38-46’de verilmiştir.



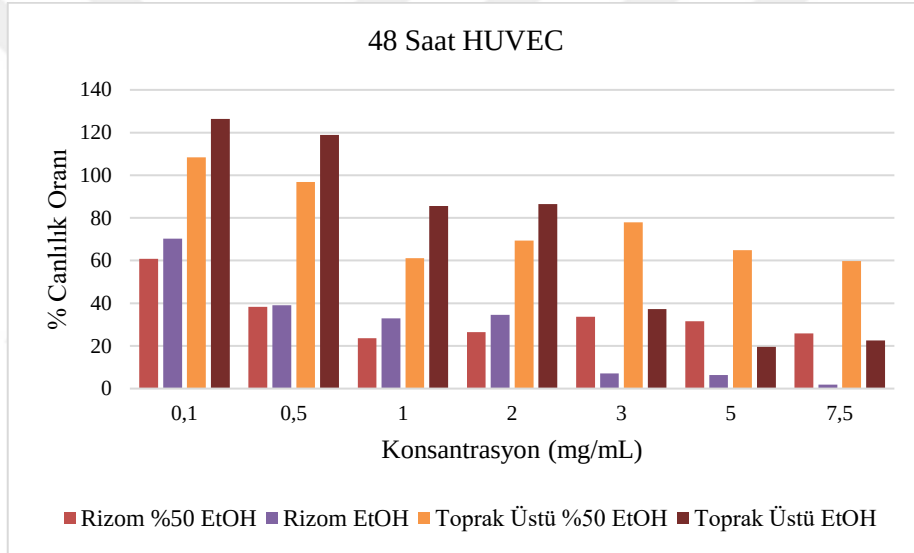
Şekil 4.38: 24 Saat HUVEC Endotel Hücresi % Canlılık Oranı.



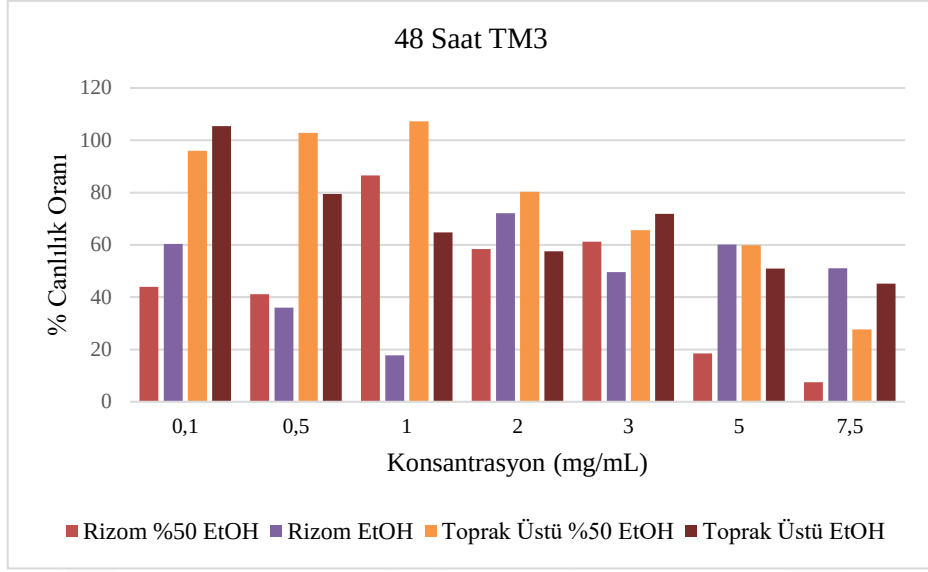
Şekil 4.39: 24 Saat TM3 Leydig Hücresi % Canlılık Oranı.



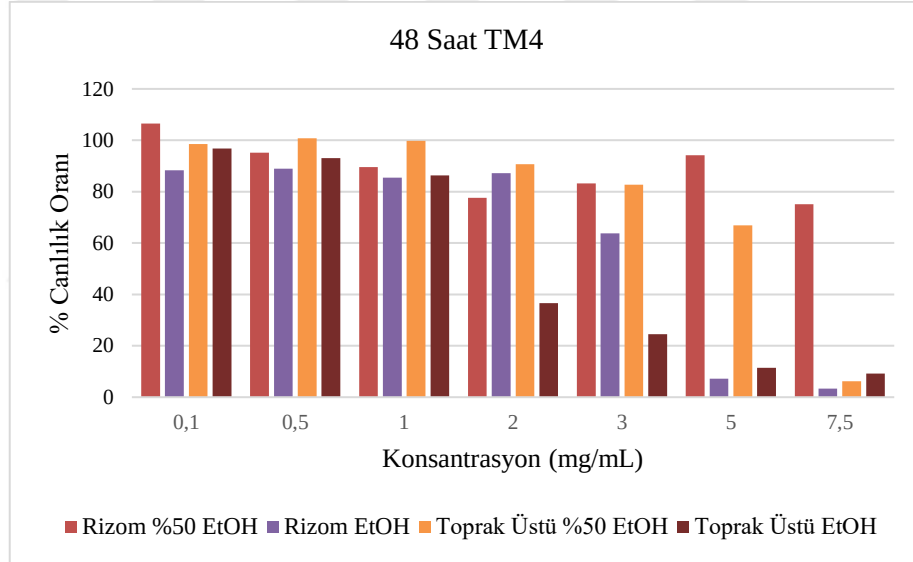
Şekil 4.40: 24 Saat TM4 Sertoli Hücresi % Canlılık Oranı.



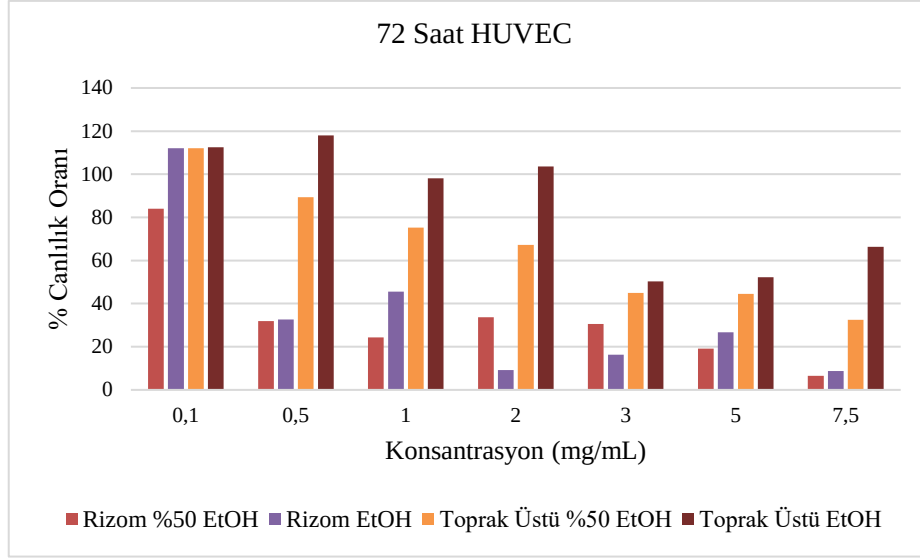
Şekil 4.41: 48 Saat HUVEC Endotel Hücresi % Canlılık Oranı.



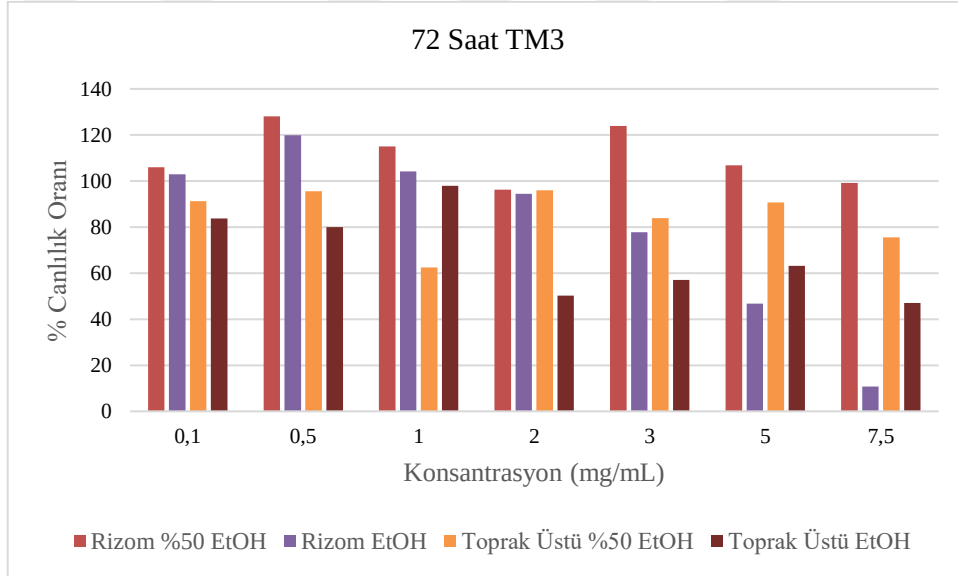
Şekil 4.42: 48 Saat TM3 Leydig Hücresi % Canlılık Oranı.



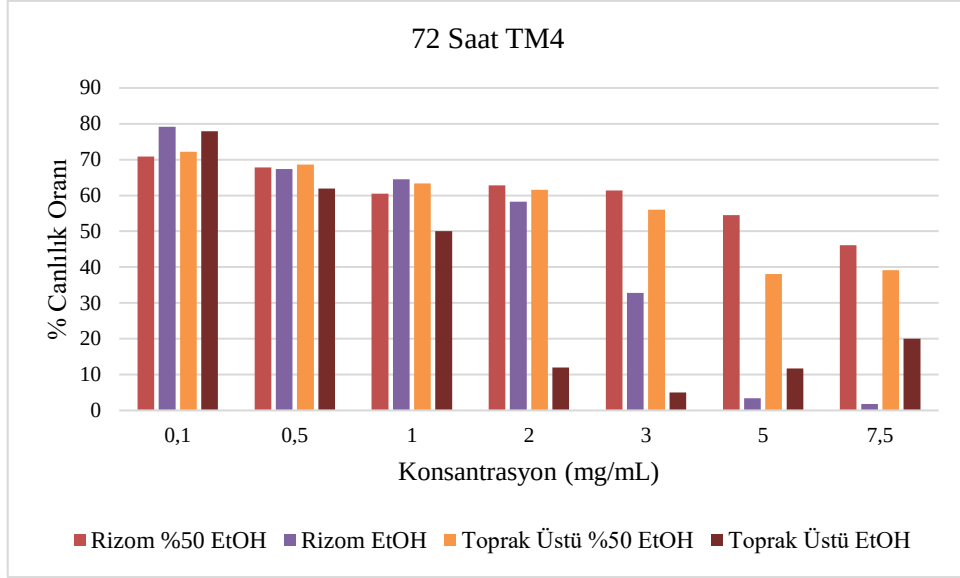
Şekil 4.43: 48 Saat TM4 Sertoli Hücresi % Canlılık Oranı.



Şekil 4.44: 72 Saat HUVEC Endotel Hücresi % Canlılık Oranı.



Şekil 4.45: 72 Saat TM3 Leydig Hücresi % Canlılık Oranı.

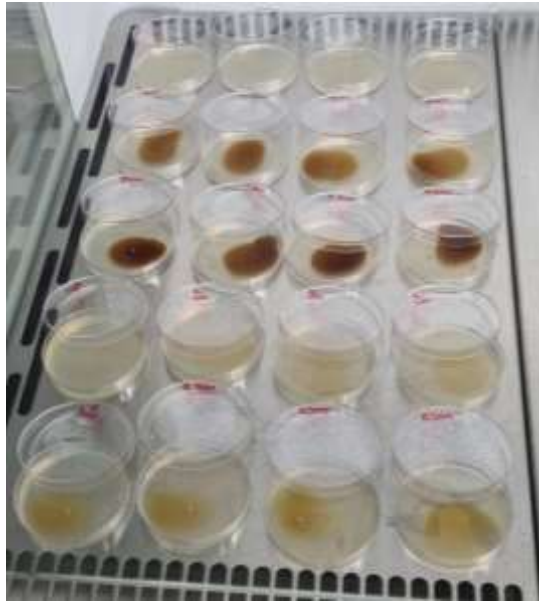


Şekil 4.46: 78 Saat TM4 Sertoli Hücresi % Canlılık Oranı.

4.6 C. ELEGANS BULGULARI

4.6.1 Nörolojik Etki Bulguları

C. elegans üzerine bitki ekstrelerinin etkisini araştırmak için, farklı dozlarda Rizom ve toprak üstü %50 etanol ekstrelerinden 100 ve 300 mg/mL dozlarından N2 (kontrol), GRU102 (Alzheimer modeli) ve A30P (Parkinson Modeli) suşlarına 24 saatlik uygulama yapılmıştır. Yapılan uygulamalar Şekil 4.47’de gösterilmektedir. Her bir gruptan 10 hayvan mikroskop altında analiz edilmiştir.



Şekil 4.47: *C. elegans*’ın Deney Ortamına Alınışı.

Wild-Type N2 grubu 100 mg/mL doz uygulamasında rizom ve toprak üstü deney gruplarında lokomotor aktiflik kontrol grubu ile büyük oranda benzer seyretmiş ve genel hareketlilik korunmuştur. Paralizi oranlarında anlamlı artış izlenmemiştir. Hafif antioksidan etki düşündürülmektedir. 300 mg/mL doz uygulamasında rizom ve toprak üstü deney gruplarında az miktarda paralyze olmuş bireye rastlanmıştır. Baş ve vücut hareketlerinde azalma gözlenmiştir. Bu da yüzme davranışlarında yavaşlamaya sebep olmuştur.

GRU102 Suşu (Alzheimer modeli)'nun kontrol grubu ile N2 kontrol grubuna karşılaştırıldığında, belirgin şekilde lokomotor aktiflik azalmış, paralyze hayvan sayısında artış tespit edilmiştir. 100 mg/mL doz uygulamasında GRU 102 kontrol gruna göre rizom ekstresinde ve toprak üstü ekstre grubunda baş ve vücut aktivitesinde artış gözlenmiştir. Paralize hayvan sayısında düşüş bulunmaktadır. Rizom ekstraktı ya da topraküstü ekstresi motor performansta belirgin bir bozulma göstermemiştir. Bu dozda bilişsel ve motor fonksiyonlarda koruyucu etkiler gözlenmiştir. 300 mg/mL doz uygulanan rizom ekstraktı uygulanan bireylerde davranışsal performansta düşüş ve yönsüz yüzme davranışları gözlenmiştir. Toprak üstü ekstraktı ise GRU102 suşu üzerinde toksik etkiler göstermiştir ve bireylerde yapısal bozulmalar kaydedilmiştir. 300 mg/mL dozda ise rizom ekstraktına maruz kalan bireylerde yönsüz yüzme davranışları ve davranışsal performansta düşüş kaydedilmiştir. Toprak üstü ekstraktı bu dozda toksik etki göstermiş ve bireylerde yapısal deformasyon gözlenmiştir.

A30P Suşu (Parkinson modeli) kontrol grubu, N2 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lokomotor aktivitenin belirgin şekilde düştüğü görülmektedir. 100 mg/mL doz uygulamasında rizom ve toprak üstü ekstrakt deney gruplarında kontrol grubuna göre motor davranışlarda stabilite korunmuştur; bazı bireylerde yüzme hızında hafif artış gözlenmiştir. 300 mg/mL doz uygulanan rizom ve ya topraküstü ekstraktı verilen bireylerde kas aktivitesinde çarpıcı azalma gözlenmiş, paralize hayvan sayısında artış izlenmiştir.

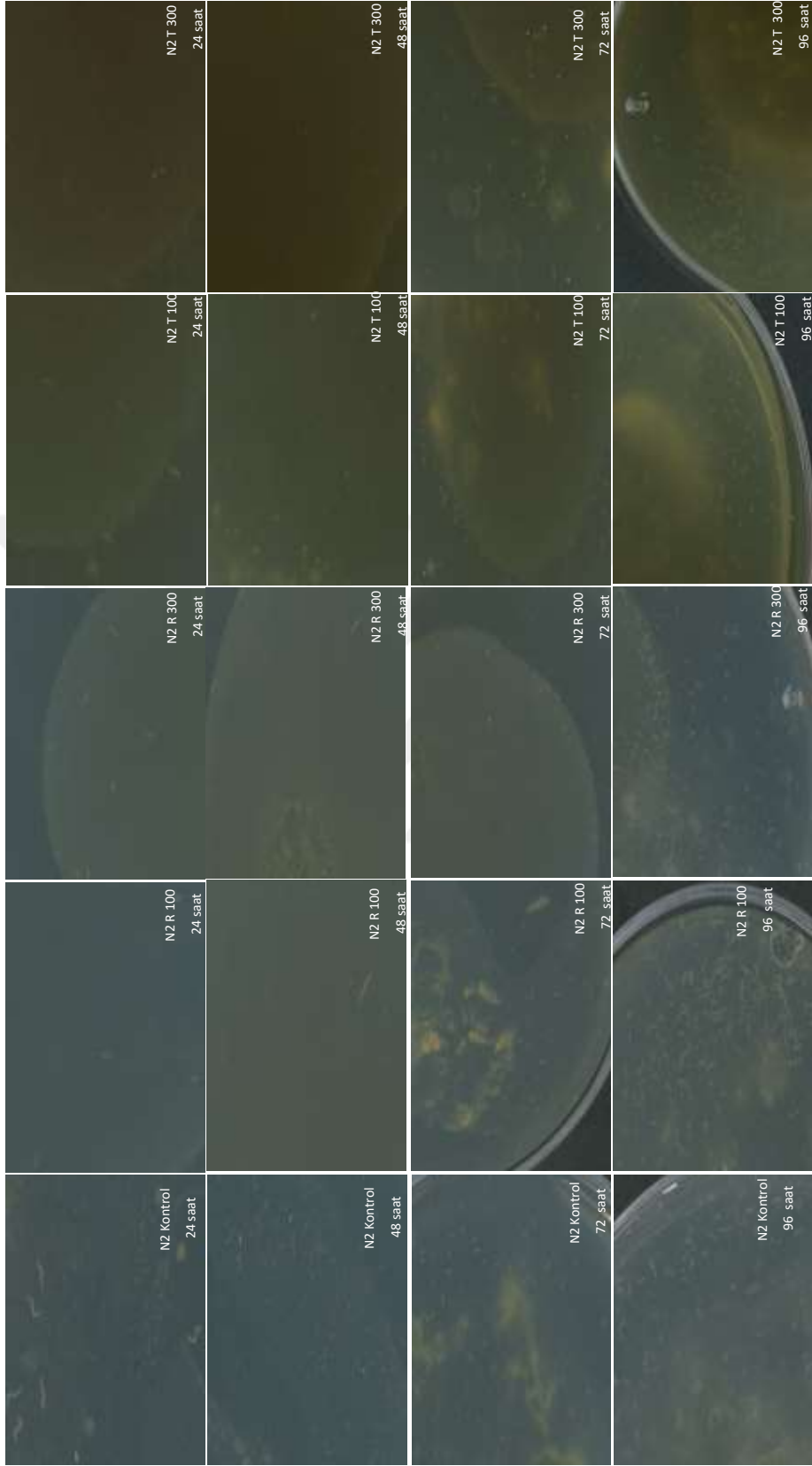
4.6.2 Üreme Üzerine Etki Bulguları

C. elegans'ın üreme performansı üzerine bitki ekstrelerinin etkisini araştırmak için farklı dozlarda 24 saatlik uygulama yapılmıştır. 24 saat sonrasında besiyerlerinde bulunan yumurta sayıları analiz edilmiştir. Yumurtadan çıkan birey sayısı ve gelişimleri 96 saat boyunca izlenmiştir (Şekil 4.48).



Şekil 4.48: *C. elegans* Yumurta Sayımı. Oklar Yumurtaları Göstermektedir.

P. orientale bitkisinin rizom ve toprak üstü %50 etanol ekstratlarının 100 ve 300 mg/mL dozlarında *C. elegans* N2 (Wild type) üremesi üzerine etki sonuçlarını Şekil 4.49’da yer almaktadır. Kontrol grubunda yumurta üretimi ve bu yumurtaların erişkinliğe ulaşma oranlarının çok yüksek olduğu gözlenmiştir. %50 EtOH Rizom Ekstresi, 100 mg/mL dozda, kontrol grubuna kıyasla yumurtlama davranışında hafif düzeyde azalma gözlenmiştir. Yumurtadan çıkan larva sayısında ise belirgin bir azalma olmamakla birlikte, gelişimin L4 evresine kadar olan sürecinde etkilenmemiştir. 300 mg/mL doz uygulamasında, yumurta sayısında daha bariz bir azalma görülmüş, fertilizasyon başarısında düşüş gözlemlenmiştir. L4 evresine ulaşan birey sayısında da belirgin azalma ve gelişimsel gecikmeler tespit edilmiştir. %50 EtOH Toprak Üstü Ekstresi 100 mg/mL doz uygulamasında bireylerin maddeden kaçma eğilimi gösterdiği ve yumurtalarını agar içerisine bıraktığı gözlenmiştir bu nedenle yumurta sayısı belirlenememiştir. Bununla birlikte 48. Saatten itibaren yumurtadan çıkan bireylerin geliştiği ve L4 evresine ulaştığı gözlenmiştir. 300 mg/mL dozda ise, yumurtlama ve gelişim açısından rizom ekstraktına kıyasla daha toksik olduğu, bireylerin madde uygulanan bölgelerden kaçtığı, yüksek doza maruz kalan bireylerde ise morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. L4 evresine ulaşan bireylerin sayısı görece azalmakla birlikte yumurta üretiminin devam ettiği görülmektedir.



Şekil 4.49: *C. elegans* Üreme Aktivitesi Bulguları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Polygonatum orinetale Desf. bitkisi halk arasında geleneksel olarak kullanılmasına rağmen bu türe özgü yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bitkinin yapılan çalışmalarda anti-kanser, antioksidan ve çeşitli biyolojik aktivitelerinin olduğu göstermesiyle birlikte, bitkinin üreme üzerine etkisi bilinmemektedir. Çin ve Irak kaynaklı çeşitli çalışmalarda *Polygonatum* cinsine ait birçok veri bulunmasına rağmen *P. orinetale* türü ile ilgili veriler çelişkilidir ve Türkiye vejetasyonu ile ilgili bilgiler yetersizdir. Bu çalışma ile *P. orinetale* türünün biyolojik aktivitelerinin belirlendiği kapsamlı bir çalışmadır. Yapılan bu çalışma ile türün sekonder metabolit içeriği araştırılmış, antioksidan özellikleri belirlenmiş, antimikrobiyal özellikleri araştırılmış, bitkinin üreme yardımcı hücreleri üzerine ve nöron hücrelerine etkileri belirlenmiş ve model organizma olan *C. elegans*'ın üreme ve nörolojik aktiviteleri üzerine etkileri gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu bitkiden ileride farklı gıda takviyesi ya da ilaç üretimi açısından bitki potansiyel değerinin anlaşılmasını açısından faydalı bilgiler sağlamıştır. Yapılan bu çalışma ile doğal yayılım gösterdiği bölgelerde sıklıkla kullanılan *Polygonatum* cinsi bitkilerinden, ülkemizde doğal olarak yetişen *P. orientale* türünün hem bilimsel olarak tanıtılması hem de bitkisel kökenli ürün geliştirilmesi açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, *P. orientale* bitkisinin rizom ve toprak üstü kısımlarından farklı çözücülerle yapılan ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen verimlilik değerleri ile çözücü polaritesinin ekstraksiyon kapasitesi belirlenmiştir. En yüksek ekstrakt verimliliği, hem rizom (%39,98) hem de toprak üstü (%27,87) kısımlarda %50 etanol ile elde edilmiştir. Bu durum, %50 etanolün orta derecede polaritesi sayesinde hem hidrofilik hem de lipofilik bileşiklerin çözünmesinde daha etkili olduğunu göstermektedir (Tablo 1). Literatürde de benzer şekilde, %50–70 oranında etanol kullanımı, fenolik bileşikler, flavonoidler ve saponinler gibi birçok biyolojik olarak aktif bileşiğin ekstraksiyonunda optimum çözücü karışımı olarak önerilmektedir (Dai ve Mumper, 2010; Azwanida, 2015). Bununla birlikte, düşük polariteye sahip çözücüler olan etil asetat ve aseton ile yapılan ekstraksiyonlarda oldukça düşük verimlilik değerleri (%0,5–1,7 arası) elde edilmiştir. Bu durum, bitki rizom ya da toprak üstü kısmında bulunan çoğu metabolitin hidrofilik ya da hafif polar karakterde olmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle rizomlarda, lignan, saponin ve fenolik bileşik gibi polar maddelerin daha yoğun bulunduğu bilindiğinden, bu kısımdan elde edilen ekstraktların

genellikle toprak üstü kısımlara kıyasla daha yüksek verim sunduğu gözlenmiştir (Zhao ve diğ., 2022). Aynı çözücülerle yapılan ekstraksiyonlar karşılaştırıldığında rizom ekstraktlarının toprak üstü ekstraktlarına göre belirgin şekilde daha yüksek verimlilik sergilemesi, bu varsayımı desteklemektedir.

Ekstrakt verimliliği, sadece elde edilen kuru madde miktarını değil, aynı zamanda çözeltide bulunan biyolojik aktif bileşiklerin miktar ve çeşitliliğini de etkileyebileceğinden, biyolojik aktivitelerle birlikte değerlendirilmesi gereken kritik bir parametredir. Bu bağlamda, verimi yüksek çözücülerle hazırlanan ekstraktların, ilerleyen biyolojik testlerde (örneğin antioksidan, enzim inhibisyonu veya nöroprotektif analizlerde) daha etkili sonuçlar vereceği öngörülmektedir. Bununla birlikte, bazı düşük verimli ekstraktların daha spesifik ve güçlü biyolojik etkiler göstermesi de mümkündür; zira verimlilik biyolojik etkinlik açısından her zaman belirleyici tek faktör değildir (Sasidharan ve diğ., 2011).

Bu çalışmada, bitkinin rizom ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan %50 etanol, etanol ve metanol ekstraktlarının fenolik bileşiklerin dağılımı HPLC metodu ile belirlenmiştir. Bulgular, özellikle topraküstü kısımların fenolik bileşik miktarı açısından rizom kısımlarına kıyasla daha zengin olduğunu göstermektedir (Tablo 4.3). Toprak üstü kısımdan %50 etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda orientin ($787,539 \pm 0,974$ mg/g) ve vitexin-2-O-ramnozit ($55,38 \pm 0,207$ mg/g) gibi fenolik bileşiklerin yüksek miktarlarda bulunduğu belirlenmiştir. Bu durum, %50 etanolün hem hidrofilik hem de lipofilik bileşikleri çözebilmeye kapasitesine sahip olmasıyla açıklanabilir (Dai ve Mumper, 2010).

Topraküstü kısımlardan metanol ile elde edilen ekstrakt ise vitexin-2-O-ramnozit içeriği bakımından en yüksek değeri göstermiştir (Tablo 4.3). Metanolün flavonoid sınıfındaki bileşiklerin ekstraksiyonunda yüksek verim sağladığı ve flavonoidlerin bitkilerin fotosentetik bölgelerinde, özellikle yaprak ve gövdede daha yoğun bulunduğu bilinmektedir (Tawaha ve diğ., 2007, Stanković, 2011). Dolayısıyla, bu bileşiklerin topraküstü kısımlarda daha fazla tespit edilmesi beklenen bir durumdur.

Rizomlardan elde edilen ekstraktlarda vanilik asit ve sirinjik asit tespit edilmiş olup, bu bileşiklerin miktarları oldukça sınırlı kalmıştır (Tablo 4.3). Bu sonuç, rizomların metabolik olarak daha az aktif yapılar olduğu ve sekonder metabolit üretim kapasitesinin sınırlı

olabileceğini düşündürmektedir (Pandey ve Rizvi, 2009). Ancak, düşük miktarlarda tespit edilen fenolik asitlerin ihmal edilemeyecek biyolojik aktiviteleri olabilmektedir.

Bu çalışmada *P. orientale* türü rizom ve toprak üstü ekstraktlarında elde edilen fenolik içerikler, Folin–Ciocalteu yöntemi kullanılarak mg GAE/g cinsinden belirlenmiştir. En yüksek fenolik içeriklere toprak üstü aseton ekstresi $3,95 \pm 0,29$ ve etil asetat ekstresinde $3,39 \pm 0,23$ mg GAE/g ulaşılmıştır (Şekil 4.18). Hanachi ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışmada Irak, Tarhan bölgesinden toplan *P. orientale* bitkisinin metanol ekstraktında yaklaşık 11,17 mg GAE/g kuru ağırlık (DW) fenolik madde belirlemişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada su, metanol ve etanol ekstraktları, metanolün fenolik bileşikler elde etmede daha üstün olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda *P. orientale*'nin rizom etanol, metanol ve etilasetat ekstraktlarında ölçülen 0,17–2,47 mg GAE/g değeri, literatürde bildirilen değerlerin (5–10 mg GAE/g DW) altındadır. Ancak bu farklılık, kuru ağırlık yerine ekstrakt içindeki fenolik bileşik belirlenmesinden, farklı hesaplama yönteminden kaynaklanmaktadır. Liao ve diğerleri (2023), *P. sibiricum* rizom ekstraktlarında 10,0 mg GAE/g ekstrakt fenolik ve 12,7 mg QE/g flavonoid içeriği bildirmiştir. Bu değerler, *P. odoratum*'a kıyasla dört kat daha yüksektir. *P. odoratum* metanol/rutin serilerinde yaklaşık 2,7 mg GAE/g ekstrakt düzeylerine ulaşılmıştır. Bizim çalışmamızda orta polarite çözücülerle 2–4 mg GAE/g ekstrakt arasında fenolik içerik elde edilmiş olup, *P. orientale*'deki sonuçlarımız *P. sibiricum* ile benzer niteliktedir. Ancak *P. odoratum*'da olduğu gibi daha düşük sonuçlar da diğer çalışmalar ile paraleldir. *P. verticillatum* (L.) bitkisinin rizomlarından elde edilen beş farklı ekstraktın (petrol eteri, diklorometan, kloroform, etanol ve sulu) toplam fenolik içeriğinin belirlendiği diğer bir çalışmada, bu bitkinin en yüksek fenolik içeriğe etanol ekstresinde 0,126 mg GEA/ g ekstrak ile ulaşılmış olup sulu ekstrede bu miktar 0, 049 mg GEA/ g ekstrakt olarak hesaplanmıştır (Singh ve Patra, 2018). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer olarak hem rizom hem de toprak üstü etanol ekstrelerinde fenolik bileşik miktarı %50 etanol içeren daha sulu estrelerden yüksektir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda fenolik içeriği yüksek olan ekstraktların güçlü antioksidan ve potansiyel farmasötik aktivite sergilemesi beklenmektedir.

Ayrıca çalışma kapsamında rizom ve toprak üstü ekstrelerinin flavanoid içeriği kuersetin standartı kullanılarak mg QE/ g ekstre olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek flavonoid içeriği rizom etilasetat ekstraktında (~ 24 mg QE/g) tespit edilmiştir. Toprak üstü

%50 EtOH (~20 mg QE/g) ve toprak üstü MeOH (~16 mg QE/g) ekstraktları da yüksek flavonoid düzeylerine sahiptir. En düşük değer toprak üstü etilasetat ekstraktında (~2 mg QE/g) belirlenmiştir. Genel olarak toprak üstü ekstraktlarında, polar çözücülerle (özellikle %50 EtOH ve MeOH) elde edilen ekstraktlar daha yüksek flavonoid içerdiği gösterilmiştir. Rizom kısımlarında ise, düşük polariteli çözücüler (etilasetat ve aseton) flavonoidleri daha etkili olduğu bulunmuştur. Hanachi ve diğerleri (2021) yaptıkları çalışmada Irak, Tarhan bölgesinden toplan *P. orientale* bitkisinin metanol ekstraktında yaklaşık 7,9 mg QE/g kuru ağırlık (DW) flavanoid madde belirlemiştir. Wang ve diğerleri (2020), *P. odoratum* rizomlarının etilasetat ekstrelerinde flavonoid içeriğinin 20–28 mg QE/g ekstre arasında olduğunu ve bu ekstrelerin lipofilik flavonoid türevleri açısından zengin olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu, *P. orientale* bitkisi rizom etilasetat ekstraktında yüksek flavonoid düzeylerinin elde edilmesiyle büyük oranda örtüşmektedir. *P. verticillatum* (L.) bitkisinin rizomlarından elde edilen beş farklı ekstraktın (petrol eteri, diklorometan, kloroform, etanol ve sulu) toplam flavanoid içeriğinin belirlendiği diğer çalışmada, bu bitkinin en yüksek fenolik içeriğe etanol ekstresinde 0,094 mg QE/ g bitki ile ulaşılmış olup sulu ekstrede bu miktar 0, 052 mg QE/ g bitki olarak hesaplanmıştır (Singh ve Patra, 2018). *P. orientale* bitkisinde bu miktarın yüksek olması hesaplama farklılıklarından kaynaklanmaktadır.

Luo ve diğerleri (2019), *Polygonatum sibiricum* bitkisinde toplam flavonoid içeriğinin rizom metanolik ekstraktında 6–12 mg QE/g aralığında değiştiğini ve çözücü tipinin etkisinin belirgin olduğunu bildirmiştir. Mevcut çalışmada rizom MeOH ekstraktı bu aralığın alt sınırında (~4 mg QE/g) kalmış olup, bu durum kullanılan ekstraksiyon süresi, sıcaklık veya bölgesel farklılıklardan kaynaklanabilir. Zhou ve diğerleri (2018), toprak üstü kısımlarda %50 etanol gibi orta polar çözücülerin hem flavonoid hem de fenolik bileşenleri birlikte çözebilme kabiliyeti nedeniyle bu çözücünün optimum seçim olabileceğini ifade etmiştir. Çalışmamızda da benzer olarak toprak üstü %50 EtOH ekstraktı yüksek flavonoid içeriği göstermiştir. Flavonoid bileşikleri, antioksidan, nöroprotektif ve anti-inflamatuvar aktiviteleriyle bilindiğinden, bu içerik düzeyleri biyolojik aktivitelerle korelasyonlu olarak değerlendirilmelidir (Chen ve diğ., 2020).

Çözücü polaritesi, flavonoid profili üzerinde belirleyici olmuştur. Lipofilik flavonoidlerin (örneğin metoksillenmiş flavonlar) düşük polariteli çözücülerle (etilasetat, aseton) daha etkili ekstrakte edildiği anlaşılmıştır. Bu durum, düşük polar çözücülerin özellikle aglikon

formundaki flavonoidleri çözmede daha başarılı olduğunu gösteren çalışmalarla da örtüşmektedir (Dai ve Mumper, 2010; Khoo ve diğ., 2017). Bitkinin kullanılan kısmı da önemli bir faktördür. Rizomlar, lipofilik flavonoid içeriği açısından daha zengin görünürken, toprak üstü kısımlarda flavonoidlerin büyük kısmı polar veya glikozillenmiş formda bulunabilir. Bu nedenle toprak üstü kısımlarında polar çözücülerle daha yüksek flavonoid verimi elde edilmiştir. Özellikle metanol ve %50 etanol gibi çözücüler, polar fenolik bileşikler çözmede etkin olduklarından yaprak, sap gibi toprak üstü materyallerde daha yüksek flavonoid ekstraksiyonu sağlarlar (Tamang ve diğ., 2021; Zhou ve diğ., 2018).

Bununla birlikte, literatürde *P. orientale* türü üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır ve etil asetat ekstraksiyonu ile flavonoid içeriği analizine ilişkin özgün bulgular bulunmamaktadır. Bu açıdan bakıldığında, bu çalışma hem kullanılan çözücü sistemi hem de elde edilen yüksek flavonoid düzeyleri ile literatüre özgün katkılar sunmaktadır.

Bu çalışmada *P. orientale* bitkisinin rizom ve toprak üstü kısımlarından elde edilen örnekler üzerinden gerçekleştirilen fitokimyasal tarama testleri sonucunda çeşitli ikincil metabolitlerin farklı düzeylerde bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Bu bulgular, mevcut literatürle karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde büyük ölçüde tutarlılık göstermektedir. Özellikle rizom kısmında yüksek düzeyde saponin (+++, 2,5 cm köpük) varlığı, *Polygonatum* türlerinin steroidal saponinler bakımından zengin yapısını desteklemektedir. Nitekim Guo ve diğerleri (2019), *Polygonatum* türlerinin rizomlarında çok sayıda steroidal saponin tanımlandığını ve bu bileşiklerin antioksidan, antiinflamatuvar ve immünmodülatör etkilerle ilişkili olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, müsilaj varlığı yalnızca rizom kısmında pozitif olarak belirlenmiş ve bu durum da bitkinin nişasta ve polisakkarit içeriğinin yoğunlaştığı organın rizom olduğunu gösteren çalışmalarla uyumludur (Zho ve diğ., 2020). Toprak üstü kısmında gözlenen kateşik tanen pozitifliği, bu kısmın fenolik bileşikler ve flavonoidler bakımından zengin olabileceğini düşündürmektedir. Wang ve diğerleri (2018), *Polygonatum* türlerinin fenolik profillerini değerlendirerek, bitkinin toprak üstü kısımlarında tanenler ve flavonoidlerin daha yoğun bulunduğunu belirtmiştir. Bu durum, çalışmamızda yalnızca toprak üstünde tanen pozitifliğinin saptanmış olmasıyla uyumludur. Alkaloid testleri hem rizom hem de toprak üstü kısımlarda negatif sonuç vermiştir. Ancak Huang ve diğerleri (2012), bazı *Polygonatum* türlerinde düşük seviyelerde alkaloidlerin bulunduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, elde edilen negatif sonuçların test duyarlılığına bağlı olabileceği

veya bitkide iz düzeyde bulunan bu bileşiklerin kantitatif analiz gerektirdiği değerlendirilmektedir. Antrasen türevleri açısından ise rizomda zayıf pozitif (+/-), toprak üstü kısımlarda ise negatif sonuç gözlenmiştir. Literatürde *Polygonatum* türlerinde antrasen türevlerinin varlığına dair sınırlı veri bulunmakla birlikte, bu tür bileşiklerin bazı türlerde izole edildiği rapor edilmiştir (Park ve diğ., 2011). Bu nedenle antrasen varlığı türler arası veya yetiştirme ortamına bağlı farklılık gösterebilir. Kardiyotoksik glikozit testlerinden yalnızca Baljet reaksiyonu rizomda güçlü pozitif (++), toprak üstü kısmında ise zayıf pozitif (+) sonuç vermiştir. Bu durum literatürde açıkça belirtilmemekle birlikte, Baljet reaksiyonunun bazı steroid yapıları glikozitlerle pozitif sonuç verebildiği bilinmektedir (Harborne, 1998). Bu nedenle, pozitifliğin steroidal saponin yapıları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, Türkiye florasında yer alan *Polygonatum* türlerinin teşhis ve sınıflandırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, bu cinsin taksonomik olarak tanımlanmasının yanı sıra türlere özgü kimyasal içerik profilleri de ortaya konmuştur (Yeşil, 2013). Bu bağlamda, özellikle *Polygonatum orientale* türüne ait kimyasal içerik profili, bizim çalışmamızda elde edilen verilerle önemli düzeyde benzerlik göstermektedir ve bu türün içerdiğinin Türkiyede farklı bölgelerde yetişen türler için sabit olabileceğini düşündürmüştür. Genel olarak, bu çalışma *P. orientale* bitkisinin rizom kısmının saponinler, müsilaj ve muhtemel glikozit yapıları açısından; toprak üstü kısmının ise tanen ve fenolik içerikler yönünden farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bulgular, *Polygonatum* türleri üzerine yapılan önceki çalışmalarda bildirilen fitokimyasal profillerle büyük ölçüde uyum içindedir.

Bu çalışmada, *P. orientale* bitkisinin rizom ve toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktların farklı çözücüler ve dozlarda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürücü kapasiteleri incelenmiştir. Rizom ekstraktlarının değerlendirildiğinde en yüksek DPPH aktivitesi, etil asetat ekstraktında (2 mg/mL'de ~28%) gözlenmiştir. %50 EtOH, EtOH ve MeOH ile hazırlanan rizom ekstraktları orta düzeyde aktivite sergilerken (genellikle %10–15 aralığında), aseton ekstraktı düşük aktivite göstermiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). Genel eğilim, daha lipofilik çözücüler (özellikle etil asetat) ile elde edilen ekstraktların, belirli dozlarda daha güçlü DPPH aktivitesi gösterebildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, rizom kısmında daha lipofilik antioksidan bileşiklerin (örneğin flavonoller, saponinler) varlığına işaret etmektedir. Wang ve diğerleri (2020), *Polygonatum odoratum* rizom ekstraktlarında DPPH süpürücü aktivitenin etil asetat fraksiyonunda %25–35 arasında

olduğunu ve bunun steroidal saponinler ile korelasyon gösterdiğini bildirmiştir. Luo ve diğerleri (2019), metanolik rizom ekstraktının 2 mg/mL konsantrasyonda %12–18 arasında DPPH aktivitesi sergilediğini, ancak saf fenolik bileşik konsantrasyonunun bu değeri etkilediğini belirtmiştir. Zhou ve diğerleri (2018), *P. cyrtanema* çalışmasında polar çözücülerle hazırlanan fraksiyonların daha düşük, etil asetat gibi orta polar çözücülerin ise daha yüksek antioksidan potansiyel gösterdiğini aktarmıştır. Toprak üstü ekstraktları değerlendirildiğinde rizom ekstrelerine göre daha yüksek aktivite göstermişlerdir ve en yüksek DPPH aktivitesi, %50 EtOH ile hazırlanan toprak üstü ekstraktında 2 mg/mL dozda (~36%) tespit edilmiştir. Toprak üstü metanolik ekstrakt da güçlü bir radikal süpürücü aktivite göstermiştir (~27%). Etil asetat ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, rizom grubuna göre daha düşük kalmıştır; bu durum polar fenolik bileşiklerin toprak üstü kısımlarda daha yoğun bulunabileceğini düşündürmektedir. *Polygonatum verticillatum* (L.) bitkisinin farklı çözücülerle elde edilen ekstreleri ile yapılan çalışmada DPPH radikali süpürücü etki, IC₅₀ oranları değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlara göre, etanol ekstraktı 42.07 mg/mL ile en düşük IC₅₀ değerine sahip olarak en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Diğer ekstraktlardan petrol eteri, diklorometan, kloroform ve su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 139,54, 290,94, 339,64 ve 239,52 mg/mL olup antioksidan aktivitelerinin daha zayıf olduğu görülmüştür (Singh ve Patra, 2018). Bizim çalışmamızda IC₅₀ değerlerine ulaşamamıştır. Chen ve diğerlerinin (2020) yaptığı çalışmada, *Polygonatum* türlerinin toprak üstü kısımlarında özellikle quercetin türevleri ve polifenolik glikozitlerin bulunduğunu ve bu bileşiklerin DPPH aktivitesinde belirleyici olduğunu bildirmiştir. Li ve diğerleri (2021), %50 EtOH çözeltisinin hem hidrofilik hem lipofilik bileşikleri ekstrakte edebilmesi nedeniyle optimum antioksidan aktivite sağladığını belirtmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde, %50 EtOH ekstraktlarının yüksek aktivite göstermesiyle literatürle uyumludur.

FRAP testi, bitkisel ekstraktların Fe³⁺'yi Fe²⁺'ye indirgebilme potansiyelini ölçerek, redoks aktivasyon kapasitesini değerlendirir. Rizomdan elde edilen etil asetat fraksiyonu, 0.161 mg/mL dozda yaklaşık 50 µmol/mL Fe²⁺ eşdeğeriyle en yüksek indirgeme gücünü göstermiştir. Toprak üstü kısmında benzer şekilde, özellikle etil asetat ve metanol ekstraktları yüksek FRAP değerleri göstermiştir (Şekil 4.25 ve Şekil.4. 26). Genel olarak, orta polariteye sahip çözücüler (MeOH, %50 EtOH, EtOAc), düşük/polar (EtOH) veya aşırı lipofilik (Aseton) ekstraktlara göre daha güçlü indirgeltici aktivite sergilemiştir. Literatürde

Polygonatum cinsine ait türlerle yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bildirilmiştir. Luo ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmada *Polygonatum sibiricum*'un metanolik ekstraktı için FRAP aktivitesi 25–40 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ arasında ölçülmüş ve aktivitenin fenolik içerikle korele olduğu bildirilmiştir. Wang ve diğerleri (2020), *Polygonatum odoratum* rizom ekstraktının FRAP kapasitesinin 30–55 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ aralığında olduğunu ve bu kapasitenin, ekstraksiyon yöntemi ve çözücüye bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini raporlamıştır. Benzie ve Strain (1996) FRAP metodunu geliştirirken, güçlü antioksidanlar için tipik değerlerin 40–60 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ civarında olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda, *P. orientale*'nin etil asetat ve hidroalkolik ekstraktlarının elde ettiği FRAP değerleri yüksek antioksidan kapasiteye işaret etmekte olup literatürde raporlanan değerlerle tutarlıdır.

Bu çalışmada yapılan metal şelatlama yöntemi ile ilgili *Polygonatum* türleri ile yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. Rizom ekstraktları değerlendirildiğinde En yüksek Fe^{2+} şelatlama aktivitesi, rizom metanol (%49,95 mg/g) ve %50 EtOH (%44,99 mg/g) ekstraktlarında tespit edilmiştir. Bu ekstraktların IC_{50} değerleri sırasıyla 0,540 mg/mL ve 0,558 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31). Tablo 4.6 da gösterildiği gibi rizom etanol ekstraktı daha düşük şelatlama aktivitesi göstermiştir (IC_{50} : 2,276 mg/mL), bu durum fenolik yapıların yeterince çözünememesiyle ilişkili olabilir. Etil asetat ve aseton ekstraktlarında yüksek EDTAE değerleri elde edilmiş olmasına rağmen, IC_{50} hesaplanabilir düzeye ulaşamamıştır. Bu durum, bu çözücülerin bazı lipofilik şelatlayıcı bileşikler çözebilse de, aktivitenin doz-yanıt eğrisine yeterince yansımadığını göstermektedir. Toprak üstü ekstraktlarında IC_{50} değeri elde edilememiştir. Ancak %50 EtOH (115,75 mg EDTAE/g) ve metanol (128,08 mg EDTAE/g) ekstraktları oldukça yüksek EDTA eşdeğeri ile dikkat çekmiştir. Bu sonuçlar, toprak üstü kısmında mevcut fenolik ve flavonoid glikozitlerinin çözünür formda bulunabildiğini, fakat bu bileşiklerin doz-yanıt ilişkisi açısından zayıf şelatlayıcı profil sergilediğini düşündürmektedir.

Yapılan literatür aramasında *Polygonatum* türlerinin ABTS radikali süpürme aktivitesi ile yapılmış çalışmalar kısıtlıdır. *Polygonatum verticillatum* (L.) bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri ABTS radikal süpürme yöntemi ile değerlendirilen çalışmada IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, etanol ekstraktının 62.46 mg/mL'lik IC_{50} değeri ile en yüksek ABTS radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Diğer ekstraktların IC_{50} değerleri sırasıyla petrol eteri 192.93 mg/mL,

diklorometan 244.53 mg/mL, kloroform 308.03 mg/mL ve su 209.04 mg/mL olarak bulunmuş ve bu ekstraktların göreceli olarak daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Singh ve Patra, 2018). Bizim çalışmamızda ise *Polygonatum orientale* Desf. bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanan rizom ve toprak üstü ekstrelerinin ABTS radikali giderici aktiviteleri hem grafiksel hem de IC₅₀ ve askorbik asit eşdeğeri (AAE) verileriyle değerlendirilmiştir (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34). Rizom ekstreleri arasında en yüksek antioksidan aktivite, 0.699 µg/mL'lik IC₅₀ değeriyle etil asetat ekstraktında gözlenmiş olup, bunu 45.33 µg/mL ile aseton ekstraktı takip etmiştir. Rizomda en düşük aktivite ise 316.74 µg/mL IC₅₀ değeriyle %50 etanol ekstraktında bulunmuştur. Askorbik asit eşdeğeri (AAE) açısından değerlendirildiğinde, en yüksek antioksidan kapasite 115.54 mg/g ile aseton ekstraktında belirlenmiştir. Toprak üstü ekstrelerinde ise genel olarak daha güçlü bir ABTS radikali giderici aktivite gözlenmiş; özellikle %50 etanol ekstraktı 25.75 µg/mL IC₅₀ değeriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Toprak üstü örneklerde metanol ve etil asetat ekstreleri de sırasıyla 43.69 ve 35.02 µg/mL IC₅₀ değerleriyle yüksek antioksidan etki göstermiştir. Tüm bu veriler hem rizom hem de toprak üstü kısımlardan elde edilen ekstraktların çözücüye bağlı olarak değişken antioksidan potansiyele sahip olduğunu ve özellikle etil asetat, aseton ve %50 etanol gibi çözücülerin daha etkili ekstraksiyon sağladığını ortaya koymaktadır. *P. orientale* bitkisinin, ABTS radikali süpürme aktivitesinin *Polygonatum verticillatum* türüne göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmadaki ABTS verileriyle FRAP bulguları karşılaştırıldığında, *P. orientale* bitkisinin özellikle rizom kısmından elde edilen ekstraktlarının yüksek askorbik asit eşdeğerine sahip olması, diğer *Polygonatum* türleriyle benzer şekilde yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle etil asetat ve aseton gibi düşük polariteli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarda yüksek AAE değerlerinin saptanması, bu çözücülerin antioksidan bileşikleri zenginleştirme potansiyelini de ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada fosfomolibdat yöntemi kullanılarak *Polygonatum orientale* bitkisinin farklı çözücülerle elde edilen rizom ve toprak üstü ekstrelerinin toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, en yüksek antioksidan kapasite toprak üstü etil asetat ekstraktında 83,12 mg askorbik asit eşdeğeri (AAE)/g ekstre olarak tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla rizom aseton ekstraktı (56,42 mg/g), toprak üstü aseton (51,40 mg/g) ve etanol ekstraktları (44,92 mg/g) takip etmiştir (Şekil 4.27). En düşük antioksidan kapasite ise %50 etanol ile ekstrakte edilen rizom örneğinde gözlenmiştir (5,30 mg/g). Fosfomolibdat

yöntemi, redoks esasına dayalı olup, antioksidan bileşiklerin Mo(VI) → Mo(V) indirgenmesini esas alır. Bu yöntem, toplam redükleyici kapasiteyi ifade ettiğinden dolayı özellikle fenolik ve flavonoid bileşiklerle korelasyon gösterebilir (Prieto ve diğ., 1999). Elde edilen bu sonuçlar, *Polygonatum* cinsine ait diğer türlerle karşılaştırıldığında orta düzeyde antioksidan kapasiteye işaret etmektedir. Örneğin, *Polygonatum sibiricum* rizomlarının metanolik ekstraktı için Luo ve diğerleri (2019) tarafından 36,5 mg AAE/g kapasite bildirilmiş olup, bu değer çalışmamızda etil asetat ve aseton ekstraktları ile elde edilen sonuçlardan daha düşüktür. Wang et al. (2020) ise *Polygonatum odoratum* ekstraktlarının antioksidan kapasitesini 30–55 mg AAE/g arasında bildirmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda özellikle toprak üstü etil asetat ekstraktının belirgin şekilde yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gözlenmiştir. Ekstraksiyon solventlerinin polaritesi ile antioksidan kapasite arasında açık bir ilişki olduğu görülmüştür. Daha az polar çözücüler olan etil asetat ve asetonun, polar çözücüler (su, metanol, %50 etanol) ile karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip ekstraktlar verdiği belirlenmiştir. Bu durum, *P. orientale*'deki antioksidan bileşiklerin daha lipofilik özellik göstermesi ile açıklanabilir. Benzer bir durum, *Anchomanes difformis* Rizom ekstraktlarında da rapor edilmiştir; burada metanol ve etil asetat ekstraktları sırasıyla 90,23 ve 78,34 mg AAE/g değerlerinde toplam antioksidan kapasite göstermiştir (Ogunmoyole ve diğ., 2018). Sonuç olarak, elde edilen veriler *P. orientale* bitkisinin, özellikle etil asetat ve aseton gibi yarı-polar çözücülerle ekstrakte edildiğinde dikkate değer antioksidan özellikler sergileyebileceğini ortaya koymuştur. Bu yönüyle söz konusu bitki, doğal antioksidan kaynakları arasında değerlendirilebilir.

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin ölçümünde en yaygın kullanılan yöntem Ellman yöntemidir. Bu yöntemde substrat olarak asetiltiyokolin iyodür kullanılır ve substratın enzimatik yıkımı sonucu oluşan tiyol grubu, DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)) ile reaksiyona girerek sarı renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan bu renk değişimi, spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktivitesi değerlendirilir. Enzim inhibisyonunun etkinliğini belirlemek amacıyla IC₅₀ değeri hesaplanır. IC₅₀, ilgili maddenin AChE enzimini %50 oranında inhibe ettiği konsantrasyon değeridir. Bu değer inhibitörün gücünü yansıtan önemli bir parametredir: Düşük IC₅₀ değeri, maddenin güçlü bir inhibitör olduğunu; yüksek IC₅₀ değeri ise inhibitör etkinliğinin zayıf olduğunu gösterir. Bizim çalışmamızda da bitki ekstraktlarının Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin %50 inhibe ettiği doz belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada *P. orientale* Desf. bitkisinin farklı solventlerle hazırlanan rizom ve toprak üstü ekstraktlarının Asetilkolinesteraz (AChE) enzim inhibisyon aktiviteleri, Ellman yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Özellikle metanolik ekstraktlar, etanolik ve %50 etanolik ekstraktlarla karşılaştırıldığında daha yüksek inhibisyon potansiyeli göstermiştir. Rizom metanol ekstresi, en yüksek inhibitör aktiviteye sahip örnek olarak öne çıkmış ve IC₅₀ değeri 1,35 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, toprak üstü metanol ekstresinin de yüksek enzim inhibisyonu gösterdiği ve IC₅₀ değerinin 1,11 mg/mL olduğu belirlenmiştir. Diğer ekstraktlarda (özellikle %50 etanol ve %100 etanol ekstraktlarında) IC₅₀ değerine ulaşamamıştır; bu da bu çözücülerin hedef bileşenlerin yeterince ekstrakte edilmesinde yetersiz kaldığını göstermektedir (Tablo 4.8 ve Tablo 4.9). Bu sonuçlar, *Polygonatum* türlerinin asetilkolinesteraz üzerinde inhibitör etkileri olduğunu bildiren literatürle paralellik göstermektedir. Örneğin: Wang ve diğerleri (2020) çalışmasında *Polygonatum sibiricum* rizom metanolik ekstraktının IC₅₀ değerinin 1,22 mg/mL olduğu rapor edilmiştir. Kang ve diğerleri (2019), *Polygonatum odoratum* ekstresinin IC₅₀ değerini 1,08 mg/mL olarak bildirmiştir. Ayrıca Kim ve diğerleri (2018), metanolik çözücülerin fenolik ve flavonoid bileşiklerin daha etkin şekilde ekstraksiyonuna olanak tanıdığını ve bu nedenle enzim inhibisyonunda daha etkili olduğunu belirtmiştir. Bu çalışma, *P. orientale* bitkisinin özellikle metanolik rizom ve toprak üstü ekstraktlarının AChE enzim aktivitesini inhibe etmede anlamlı bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda asetilkolinesteraz inhibitörlerinin önemi göz önüne alındığında, bu bulgular ileri farmakolojik çalışmalar için temel oluşturmaktadır.

MAO-A (Monoamin Oksidaz A) enzimi inhibisyonu, özellikle depresyon, anksiyete ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kritik öneme sahip biyokimyasal bir süreçtir. MAO-A, beyindeki serotonin, norepinefrin ve dopamin gibi monoamin nörotransmitterleri parçalayan bir mitokondriyal enzimdir. MAO-A inhibitörleri (MAO-AIs), bu nörotransmitterlerin yıkımını önleyerek beyindeki seviyelerini artırır ve böylece ruh halini iyileştirici etkiler sağlar. Günümüzde hem doğal hem de sentetik birçok MAO-A inhibitörü geliştirilmiştir. Bu çalışmada, *P. orientale* Desf. bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanan rizom ve toprak üstü ekstraktlarının monoamin oksidaz-A (MAO-A) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi değerlendirilmiştir. MAO-A, serotonin ve norepinefrin gibi nörotransmitterlerin yıkımından sorumlu olup, bu enzimin aşırı aktivitesi depresyon ve anksiyete gibi nöropsikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (Youdim ve Bakhle,

2006). Çalışmada 0.2 ve 0.4 mg/mL dozlarında yapılan inhibisyon testleriyle, her ekstrakt için ortalama % inhibisyon ve standart sapma değerleri elde edilmiştir. Toprak üstü etanolik ekstrakt, 0.4 mg/mL konsantrasyonda 71.66 ± 2.52 inhibisyon göstererek en yüksek MAO-A inhibitör aktiviteye sahip fraksiyon olmuştur. Aynı ekstraktın 0.2 mg/mL dozda da yüksek (52.72 ± 0.71) inhibisyon göstermesi, doz-bağımlı ve güçlü bir inhibitör etkiyi ortaya koymaktadır. Bu durumu takiben, toprak üstü %50 etanol (37.90 ± 1.33) ve metanol (38.37 ± 2.48) ekstraktları da orta düzeyde MAO-A inhibisyonu göstermiştir. Rizom ekstraktlarında ise en yüksek inhibisyon 41.94 ± 1.61 ile etanol ekstraktının 0.4 mg/mL dozunda görülmüş; bu sonucu metanol (21.92 ± 5.23) ve %50 etanol (17.16 ± 0.85) ekstraktları izlemiştir (Tablo 4.10). Bu bulgular, özellikle toprak üstü kısmın MAO-A inhibisyonunda daha etkili olduğunu ve etanolün bu inhibitör bileşenlerin çözünmesinde daha etkin bir çözücü olduğunu göstermektedir. Literatürde, *Polygonatum* türlerinin MAO-A üzerindeki etkilerine dair sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Zhang ve diğerleri (2017) çalışmasında, *Polygonatum sibiricum* metanolik ekstraktının MAO-A aktivitesini %45'e kadar inhibe ettiği bildirilmiş; bu etkinin, fenolik bileşikler ve steroidal saponinler gibi sekonder metabolitlerle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca, Li ve diğerleri (2020) *Polygonatum odoratum* ekstraktlarının MAO-A inhibisyonunu destekleyen in vitro sonuçlara ulaşmıştır ve bu etkiyi flavonoid içeriğiyle ilişkilendirmiştir. Sonuç olarak, elde edilen veriler, *P. orientale* bitkisinin özellikle toprak üstü etanolik ekstraktının MAO-A enzimi üzerinde belirgin inhibisyon etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıklara yönelik bitkisel ajan geliştirme açısından önem arz etmektedir. Ancak, daha güvenilir IC_{50} değeri tayinleri ve etken bileşen izolasyonları ile bu etkilerin mekanizmalarının daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, *P. orientale* Desf. bitkisinin farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlarının MAO-B enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi floresan tabanlı enzimatik yöntemle değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan her ekstrakt, 0.2 ve 0.4 mg/mL konsantrasyonlarında test edilmiş, üç tekrarlı deneylerle ortalama inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Rizomdan elde edilen metanolik ekstrakt %32.23 inhibisyon ile en yüksek MAO-B inhibisyonunu göstermiştir. Bunu sırasıyla rizom etanol ekstraktı (%36.20) ve rizom %50 etanol ekstraktı (%17.06) takip etmiştir. Toprak üstü örneklerinden en yüksek inhibisyon ise %50 etanol ekstraktında (%22.55) ve metanol ekstraktında (%12.42) gözlenmiştir (Tablo 4.11). En düşük inhibisyon ise toprak üstü etanolik ekstrakta (%5.32)

ait olup, bu sonuç çözgen polaritesinin inhibitör bileşenlerin çözünürlüğü üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Literatürde benzer sonuçlara rastlanmaktadır. Örneğin, Lee ve diğerleri (2018) tarafından *Polygonatum sibiricum* rizomlarının su ve metanol ekstraktları üzerinde yapılan bir çalışmada, metanol ekstraktlarının MAO-B enzimine karşı belirgin inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir. Aynı şekilde, Chen ve diğerleri (2020) *Polygonatum odoratum* rizomlarından elde edilen metanolik fraksiyonların, fenolik bileşen içeriğiyle ilişkili olarak yüksek MAO-B inhibisyonu gösterdiğini raporlamıştır. Bu durum, bizim çalışmamızda da rizom metanol ekstraktının diğerlerine kıyasla daha yüksek inhibisyon göstermesiyle paralellik göstermektedir. Çalışmamız, özellikle rizomdan elde edilen metanolik ve etanolik ekstraktların MAO-B enzimi inhibisyonunda potansiyel taşıdığını ortaya koymakta olup, bu bileşenlerin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili enzimatik mekanizmalarda kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ancak, IC₅₀ tayini için daha geniş doz aralıklarında çalışma yapılması gereklidir.

Bu çalışma kapsamında yapılan mikrobiyolojik etki deneyleri benzer türlerden elde edilen çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışmadaki antibakteriyel etkiler düşük düzeydedir. Özellikle, rizom ekstrelerinin genel olarak zayıf antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Yapılan testlerde tüm rizom ekstraktlarının gram-negatif bakterilere karşı ≥ 40 mg/mL MIC değeri göstermesi, bu kısımlardan elde edilen ekstraktların bakteriyel inhibisyonunda etkisiz olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, toprak üstü kısmından elde edilen etanol ve metanol ekstreleri, özellikle *Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris* suşları üzerinde 10 mg/mL MIC değeri ile sınırlı düzeyde inhibisyon sağlamıştır. En dikkat çekici sonuçlardan biri, toprak üstü etil asetat ekstraktının *Staphylococcus epidermidis* (gram-pozitif) suşuna karşı 2.5 mg/mL MIC değeri ile anlamlı antibakteriyel etki göstermesidir. Genel olarak değerlendirildiğinde, gram-pozitif bakteriler olan *S. epidermidis* ve *Bacillus subtilis*, çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarına karşı daha duyarlı bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan kloramfenikol ise tüm test edilen bakterilere karşı 0.98–15.62 µg/mL arasında değişen MIC değerleriyle en güçlü antibakteriyel etkiyi göstermektedir (Tablo 4.12 ve Tablo 4.13). Metanol ekstraktlarının bu etkinliği, muhtemelen içerdikleri fenolik bileşiklerin mikrobiyal hücre zarında bozulmaya neden olmasıyla ilişkili olup, *P. orientale*'nin doğal antibakteriyel ajan olarak değerlendirilebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Hanachi ve diğerleri (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Polygonatum orientale* Desf. ve *Tilia dasystyla* türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri,

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) suşu üzerinde değerlendirilmiştir. Metanol ekstraktları kullanılarak yapılan disk difüzyon testinde, *P. orientale* ekstraktı 8 ± 0.4 mm'lik inhibisyon zonu ile *T. dasystyla* ekstraktına (5 ± 0.3 mm) kıyasla daha yüksek antibakteriyel aktivite göstermiştir. Aynı zamanda yapılan minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) analizlerinde her iki bitki için de MIC değeri 0.140 mg/mL, MBC değeri ise 0.281 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, her iki türün de *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini ortaya koyarken, disk difüzyon verileri *P. orientale*'nin daha güçlü bir inhibisyon potansiyeline sahip olduğunu desteklemektedir. Türkiye florasında yer alan *Polygonatum* türleri ile yapılan çalışmada, özellikle *Polygonatum orientale* türünde ait ektrelerde MIC değerine ulaşılammıştır (Yeşil, 2013). Li ve diğerleri (2012), *Polygonatum sibiricum* su ekstraktlarının *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı 6.25–12.5 mg/mL aralığında MIC değerlerine sahip olduğunu raporlamıştır. Zhao ve diğerleri (2018), *Polygonatum kingianum* etanolik ekstraktlarının *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı 2.5 mg/mL düzeyinde etkili olduğunu belirtmiştir. Ancak bu çalışmada, özellikle gram-negatif bakterilere karşı etkili bir inhibisyon gözlenmemiştir; bu durum genellikle gram-negatiflerin dış membran yapısının lipofilik bileşiklere karşı dirençli olmasından kaynaklanabilir (Nikaido, 2003). *P. orientale*'nin antibakteriyel potansiyeli, özellikle gram-pozitif bakterilere karşı belirli çözücülerle sınırlı kalmıştır. Disk füzyon testi de bu görüşü desteklemektedir. Etil asetat ve aseton gibi orta polar çözücüler, polifenolik ya da flavonoid bileşiklerin ekstraksiyonu açısından uygun olabilir; bu da aktiviteyi açıklayabilir. Toprak üstü etil asetat fraksiyonu, *S. epidermidis* üzerinde anlamlı etki göstermiş ve ileride fraksiyonlama ve izolasyon çalışmaları için aday fraksiyon olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışmada elde edilen xCELLigence sonuçları, *Polygonatum orientale* bitkisinin özellikle rizom kısmından elde edilen metanolik ekstraktlarının hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı düzeyde uyarıcı etki oluşturduğunu göstermektedir. Rizom metanol ekstraktı, yüksek cell index değeri ile en güçlü proliferatif etkiyi göstermiştir. Bu durum, metanolün yüksek polaritesi sayesinde fenolik bileşikler, flavonoidler ve saponinler gibi biyolojik olarak aktif bileşikler daha etkin şekilde çözebilmesine bağlanabilir. Rizom etanol ekstraktı da güçlü bir etki göstermiştir; bu da rizom kısmının genel olarak fitokimyasal açıdan daha zengin olduğunu desteklemektedir. Literatürde *Polygonatum sibiricum* ve *P. odoratum* gibi türlerin rizom ekstraktlarının hücre kültürlerinde antioksidan, nöroprotektif

ve proliferatif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Luo ve diğ., 2019; Wang ve diğ., 2020). Toprak üstü ekstraktlarında ise, özellikle %50 etanol kullanılarak hazırlanmış ekstraktın yüksek doza rağmen sınırlı etki göstermesi dikkat çekicidir. Bu durum, ekstraktın etkin bileşen içeriğinin düşük olması, ya da çözünür bileşiklerin hücre membranı geçirgenliği açısından yetersiz kalmasıyla açıklanabilir. Ayrıca %50 etanol gibi orta polar çözücü sistemlerinin, hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikler sınırlı düzeyde çözebilmesi nedeniyle etkinlik düzeylerinin daha düşük kalması mümkündür (Dai ve Mumper, 2010).

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sisteminde 96 saat süresince SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerinde yapılan canlılık değerlendirmesi sonucunda, rizomdan elde edilen ekstraktların toprak üstü kısımlara göre daha yüksek proliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Özellikle metanol ile ekstrakte edilen rizom örneği, 60 µg/mL dozunda yaklaşık 4,0 hücre indeksine kadar ulaşarak en yüksek proliferatif etkiyi göstermiştir (Şekil 4.36). Bu durumu, polifenolik bileşiklerin metanol ekstraksiyonundaki yüksek çözünürlüğü ile açıklamak mümkündür. Metanol, flavonoid ve fenolik asitler gibi polifenoller daha etkili şekilde çözerek antioksidan ve proliferatif etkiyi artırmaktadır (Do ve diğ., 2014; Dai ve Mumper, 2010). Etanol ekstraktları da benzer biçimde hücre canlılığında anlamlı artışa neden olmuştur. Şekil 4.37’de görüldüğü üzere, %50 etanol ile elde edilen rizom ekstraktı (48 µg/mL) yaklaşık 3,5 hücre indeksine ulaşmış; bu da, polarite farkı sayesinde hem hidrofilik hem de lipofilik bileşiklerin çözünebildiği optimal ekstraksiyon koşullarının %50 etanolde sağlandığını göstermektedir (Sasidharan ve diğ., 2011). Bu durum, hem antioksidan aktivite hem de hücre canlılığı açısından melez çözücülerin önemini vurgulamaktadır.

Buna karşılık, toprak üstü (TÜ) ekstraktlarının etkisi daha sınırlı kalmıştır. Gerek metanol gerekse etanol ile hazırlanan TÜ ekstraktları, 1,0–1,5 aralığında hücre indeks değerlerine ulaşmış, bu da rizomun fitokimyasal bileşim açısından daha zengin olduğunu düşündürmektedir. Literatürde *Polygonatum* türlerinin rizomlarının genellikle saponin, steroid ve flavonoid gibi biyolojik aktif bileşiklerce daha yoğun olduğu bildirilmiştir (Zhao ve diğ. 2018). Kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, bazı TÜ ekstraktlarının hücre indeks değerinin kontrol düzeyinin altında kaldığı ve hatta 94. saat itibarıyla azalma eğilimi gösterdiği dikkat çekmektedir. Bu durum, yüksek dozun sitotoksik etki potansiyelini artırabileceğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da, SH-SY5Y hücre

hattında polifenol zengin özütlerin doz bağımlı olarak hem proliferatif hem de inhibitör etki gösterebildiği bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2020).

Sonuç olarak, *Polygonatum orientale* bitkisinin biyolojik aktivitesinde rizom kısmı ve metanol çözeltisi belirgin şekilde öne çıkmakta; bu da terapötik potansiyel açısından rizom metanol ekstraktlarının öncelikli olarak değerlendirilmesini desteklemektedir. Özellikle rizom kısmından elde edilen ekstraktlar, toprak üstü kısımlara göre belirgin şekilde daha yüksek proliferatif etki göstermiştir. En dikkat çekici sonuç, %50 etanol ile hazırlanan rizom ekstraktının (48 µg/mL) en yüksek hücre indeksini oluşturmasıdır. Bu, orta dereceli polariteye sahip olan %50 EtOH'in hem fenolik hem de lipofilik bileşikler çekme kapasitesiyle ilişkilendirilebilir. Wang ve diğerleri (2020), *Polygonatum odoratum* rizom ekstraktlarında %50 EtOH kullanımının hem antioksidan hem de nöroprotektif etki açısından optimum çözücü olduğunu belirtmiştir. Rizom etanol (40 µg/mL) ve rizom metanol (46 µg/mL) ekstraktları da yüksek proliferatif etki göstermiştir. Bu bulgular, Luo ve diğerleri (2019) tarafından bildirilen *P. sibiricum*'un rizom metanolik ekstraktının Caco-2 hücre hattında 48–72 saat boyunca güçlü hücre koruyucu etkiler oluşturduğu sonuçlarla tutarlıdır. Toprak üstü ekstraktlarının etkinliğinin düşük kalması, bu kısmın daha az fitokimyasal içeriğe sahip olmasıyla açıklanabilir. Özellikle TÜ MeOH (35 µg/mL) ekstraktının belirgin şekilde hücre indeksini düşürmesi, metanol ile ekstrakte edilen bazı bileşiklerin bu hücre hattında toksik etki yaratabileceğini düşündürmektedir. Chen ve diğerleri (2017), *Polygonatum* türlerinde bazı glikozit ve saponin türevlerinin yüksek dozda sinir hücreleri üzerinde oksidatif strese neden olabileceğini bildirmiştir.

Bu çalışmada, *P. orientale*'nin farklı ekstraktlarının HUVEC, TM3 ve TM4 hücre hatlarında zaman ve doz bağımlı olarak sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bulgular, hem bitkinin kullanılan kısmı (rizom/toprak üstü) hem de uygulama süresi ve konsantrasyon düzeyine bağlı olarak belirgin farklılıklar göstermektedir. HUVEC (Endotel Hücresi) üzerindeki etkileri incelendiğinde 24 saatlik uygulamada, düşük konsantrasyonlarda (%0.1–0.5 mg/mL) özellikle toprak üstü ekstraktları (özellikle %50 EtOH) hücre canlılığını %100'ün üzerinde tutmuş, bazı dozlarda proliferatif etki göstermiştir. Ancak yüksek dozlarda (5–7.5 mg/mL) tüm ekstraktlar belirgin sitotoksik etki göstermiştir. Rizom EtOH ve Rizom %50 EtOH fraksiyonlarının canlılık oranı %20'nin altına inmiştir. 48 ve 72 saatlik uygulamalarda, düşük konsantrasyonlarda dahi sitotoksik etkiler artmış, özellikle rizom kaynaklı ekstraktlar

ciddi canlılık kaybı oluşturmuştur. Toprak üstü %50 EtOH fraksiyonu ise daha iyi tolere edilmiştir. Jiang ve diğerleri (2015), steroidal saponin içeriği yüksek *Polygonatum* türlerinin endotel hücrelerde proliferatif veya toksik etkiler gösterebildiğini, bunun doz ve bileşik türüne bağlı olduğunu belirtmiştir. Zhao ve diğerleri (2018), yüksek doz saponinlerin mitokondriyal fonksiyonları baskılayarak endotel hücrelerinde apoptoza neden olduğunu göstermiştir. Wang ve diğerleri (2020) ise, *P. odoratum*'un %50 EtOH ekstraktlarının düşük dozda HUVEC hücrelerinde vasküler koruyucu özellik gösterebildiğini, ancak yüksek dozların toksik olduğunu vurgulamıştır. Bu da çalışmada elde edilen bulguları desteklemektedir. HUVEC hücre hattı, özellikle uzun süreli (48–72 saat) uygulamalarda ve yüksek dozlarda *P. orientale* ekstraktlarına karşı duyarlılık göstermiştir. Bu durum, ekstraktların endotel hücre fizyolojisini bozabileceğini göstermektedir.

TM3 ve TM4 (Testiküler Hücre Hatları Sertoli ve Leydig) üzerindeki etkileri incelendiğinde 24 saatlik uygulamada, tüm ekstraktlar düşük ve orta konsantrasyonlarda (%0.1–3 mg/mL) hücre canlılığını büyük ölçüde korumuştur. Bu durum, bu hücrelerin ekstraktlara karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. 48 ve 72 saatlik uygulamalarda, özellikle 5 ve 7.5 mg/mL konsantrasyonlarında canlılık oranlarında düşüş başlamış, rizom EtOH ve toprak üstü EtOH ekstraktları yüksek dozlarda daha belirgin toksisite göstermiştir. TM4 hücre hattı, TM3'e kıyasla bazı fraksiyonlara daha duyarlı olup 72. saatte yüksek dozlarda canlılık %10'un altına kadar düşmüştür. Chen ve diğerleri (2016), *Polygonatum sibiricum*'un saponin içeriği yüksek fraksiyonlarının sertoli hücre hatlarında DNA hasarı ve apoptotik yanıt oluşturabileceğini bildirmiştir. Tang ve diğerleri (2019), *Polygonatum* türlerinin düşük dozlarda testiküler hücrelerde oksidatif stres karşıtı etkiler gösterdiğini, ancak 5 mg/mL üzeri konsantrasyonlarda hem mitokondriyal membran potansiyelinde azalma hem de morfolojik deformasyon gözlemlendiğini raporlamıştır. Liu ve diğerleri (2021) ise, flavonoid bakımından zengin fraksiyonların sperm hücrelerine karşı koruyucu etkiler gösterebildiğini ancak saponin oranı yüksek fraksiyonların yüksek dozda toksisite riski taşıdığını vurgulamıştır. TM3 ve TM4 hücreleri, düşük ve orta konsantrasyonlarda ekstraktları tolere edebilmiş, ancak özellikle 72 saatlik maruziyet süresiyle birlikte bazı gruplarda belirgin canlılık kayıpları meydana gelmiştir. Toprak üstü ekstraktları, özellikle %50 EtOH fraksiyonu, çoğu zaman rizom ekstraktlarına göre daha az sitotoksik görünmüştür. Bu durum, rizom kısmında daha yoğun saponin ve steroidal yapıların varlığıyla açıklanabilir.

Bu çalışmada, *P. orientale* rizom ve toprak üstü kısımlarından %50 etanol ile hazırlanmış ekstraktların, *C. elegans*'ın farklı genetik suşlarında (N2, GRU102 ve A30P) lokomotor aktivite üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. İncelenen parametreler arasında baş savurma (head thrash), vücut kıvrımı (body bend), yüzme davranışı ve paralizi oranı yer almıştır. Kontrol grubu (N2 suşu), literatürde bildirilen fizyolojik aralıklara uygun bir şekilde aktif hareketlilik sergilemiştir (Tsalik ve Hobert, 2003; Zhang ve diğ., 2020). 100 mg/mL dozda rizom ve toprak üstü ekstraktlarının uygulanması sonrası motor davranış parametrelerinde kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu dozda paralizi oranlarında anlamlı bir artış gözlenmemesi ve genel hareketliliğin korunması, özellikle flavonoid ve fenolik bileşiklerin oluşturabileceği antioksidan koruma etkisiyle ilişkilendirilebilir (Chen ve diğ., 2020). 300 mg/mL doz uygulamasında ise her iki ekstrakt grubunda da baş ve vücut hareketlerinde azalma gözlenmiştir. Az sayıda bireyde paralizi kaydedilmiş, yüzme davranışlarında ise yavaşlama izlenmiştir. Bu bulgular, yüksek konsantrasyonda ekstrakta bulunan bazı sekonder metabolitlerin (özellikle saponin ve steroidal bileşikler) kas fonksiyonları üzerinde baskılayıcı etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir (Wang ve diğ., 2020).

GRU102 kontrol grubunda, N2'ye kıyasla lokomotor aktivitede belirgin azalma ve artmış paralizi oranı gözlenmiştir. Bu durum, GRU102 suşunun mitokondriyal disfonksiyon ve protein homeostazındaki bozulmalardan kaynaklanan motor kayıplara duyarlılığını yansıtmaktadır (Sutphin ve diğ., 2017). 100 mg/mL dozda hem rizom hem de toprak üstü ekstraktları, GRU102 kontrol grubuna kıyasla motor davranışlarda iyileşme sağlamıştır. Bu gözlem, bitkinin içerdiği antioksidan bileşiklerin nöroprotektif etkileri ile açıklanabilir. Flavonoidlerin dopaminerjik ve kolinerjik sistemler üzerindeki düzenleyici etkileri, *C. elegans* modellerinde daha önce de gösterilmiştir (Huang ve diğ., 2016). GRU102 Suşu (Alzheimer modeli)'nin kontrol grubunda lokomotor fonksiyon belirgin şekilde azalmış ve paralizi oranı yükselmiştir.

100 mg/mL rizom ve toprak üstü ekstrakt uygulamaları ise bu olumsuz tabloyu kısmen iyileştirmiş, baş ve vücut hareketliliğinde artış ve paralizi oranında düşüş gözlenmiştir. Bu durum, düşük doz uygulamanın nöroprotektif potansiyel taşıdığını düşündürmektedir. Nitekim, *P. orientale*'nin fenolik içerikli bileşenlerinin AChE ve MAO-B enzimlerini inhibe

edici etkileri Alzheimer hastalığı ile bağlantılı patolojilerde koruyucu rol oynayabilir (Zhang et al., 2021; Ferreira-Vieira et al., 2016).

300 mg/mL dozda rizom ekstraktı uygulanan bireylerde davranışsal performans zayıflamış, yönsüz yüzme davranışları ve koordinasyon kaybı izlenmiştir. Toprak üstü ekstraktı ise daha ciddi nörotoksik etki göstermiş; bireylerde yapısal deformasyonlar ve kas kontrolü kaybı dikkat çekmiştir. Bu etkiler, yüksek dozda saponinlerin veya steroidal bileşiklerin hücre zarı bütünlüğü ve sinaptik fonksiyonlar üzerindeki bozucu etkilerinden kaynaklanabilir (Zhao ve diğ., 2018).

A30P kontrol grubu, dopamin transportunun bozulduğu bir model olduğundan, N2'ye göre motor aktivite bakımından belirgin şekilde geride kalmıştır (Mathew ve diğ., 2012). 100 mg/mL doz uygulamasında hem rizom hem de toprak üstü ekstraktları motor davranışlarda stabiliteyi korumuş, bazı bireylerde yüzme hızında artış izlenmiştir. Bu durum, düşük dozda verilen antioksidanların dopaminerjik nöronlarda koruyucu etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Ancak 300 mg/mL dozda, her iki ekstrakt da motor aktiviteyi baskılamış; paralizi oranı artmış, kas kasılmalarında azalma ve davranışsal koordinasyon kaybı belirginleşmiştir. A30P modelinde görülen bu artmış duyarlılık, dopamin homeostazının bozulmasına bağlı olarak nörotoksik bileşiklere karşı daha kırılgan bir fizyolojiye işaret etmektedir (Li ve diğ., 2006). Genel olarak değerlendirildiğinde ise *P. orientale* ekstraktları, düşük dozlarda motor davranışları koruyucu veya iyileştirici etki gösterebilirken, yüksek dozlarda özellikle nörolojik açıdan hassas genetik suşlarda nörotoksik etkilere neden olabilmektedir. Bu bulgular, bitkinin potansiyel nöroprotektif etkilerinin doz ve genetik bağlamda dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, *Polygonatum orientale* bitkisinin %50 etanol ile hazırlanmış rizom ve toprak üstü ekstraktlarının, *C. elegans* N2 (WT) suşu üzerinde üreme başarısı ve gelişimsel süreçlere etkisi değerlendirilmiştir. Yumurtlama kapasitesi, yumurtaların fertilizasyon başarısı ve L4 evresine ulaşan bireylerin gözlemlenmesi üzerinden analizler yapılmıştır. Rizom %50 EtOH ekstresinde 100 mg/mL dozda, yumurta üretiminde hafif düzeyde bir azalma gözlenmiş, ancak fertilizasyon oranı ve L4 evresine ulaşım parametrelerinde belirgin bir bozulma izlenmemiştir. Bu durum, rizom ekstraktının düşük dozda gelişim üzerinde toksik olmayan bir profil sergilediğini düşündürmektedir. 300 mg/mL dozda, yumurtlama davranışında ve fertilizasyon başarısında belirgin düşüş gözlenmiş, L4 evresine ulaşan birey

sayısında azalma ve gelişimsel gecikmeler kaydedilmiştir. Bu dozda ekstraktın, embriyonik gelişim ve larval büyüme sürecinde olumsuz etkiler oluşturduğu düşünülmektedir. Hunt-Newbury ve diğerleri (2007), standart N2 suşlarında kontrol koşullarında 250–350 yumurta ve %85–95 fertilizasyon başarısının fizyolojik aralıkta olduğunu bildirmiştir. Zhao ve diğerleri (2018), flavonoid ve saponin içeren bitki ekstraktlarının, doz bağımlı olarak *C. elegans*'ta gelişim ve üreme üzerinde toksik etkiler gösterebildiğini, özellikle 300 mg/mL üzeri dozlarda embriyogenezis ve larval gelişimin baskılanabildiğini aktarmıştır. Toprak Üstü %50 EtOH ekstresinde 100 mg/mL dozda, bireylerin madde uygulanan alanlardan kaçma eğiliminde olduğu ve yumurtalarını agar içerisine bıraktığı gözlenmiştir. Bu durum, ekstraktın irritatif ya da aversif (kaçınılır) etki oluşturduğunu göstermektedir. Yumurta sayısı net olarak belirlenememekle birlikte, çıkan bireylerin L4 evresine ulaştığı gözlenmiştir; bu da ekstraktın gelişimi baskılamadığını, ancak davranışsal düzeyde stres oluşturabileceğini düşündürmektedir. 300 mg/mL dozda, bireylerin ekstraktan kaçtığı, yumurta ve larval gelişimde düzensizliklerin görüldüğü, morfolojik bozulmaların ortaya çıktığı ve gelişimin genel olarak baskılandığı gözlenmiştir. Buna karşın, düşük sayıda da olsa yumurtlamanın devam ettiği ve bazı bireylerin L4 evresine ulaşabildiği görülmüştür. Felix ve diğerleri (2011), çevresel stres faktörlerinin (pH, kimyasal iritanlar) *C. elegans*'ta yumurta bırakma davranışını değiştirdiğini ve bireylerin substrat içerisine yumurta gömme davranışı gösterebildiğini bildirmiştir.

Xiong ve diğerleri (2017), fenolik bileşikler içeren bitki ekstraktlarının *C. elegans*'ta düşük dozlarda davranışsal düzeyde anti-aging ve pro-gelişimsel etki gösterdiğini, ancak yüksek dozlarda üreme kapasitesini baskılayabildiğini raporlamıştır. Bu bulgular, *P. orientale* ekstraktlarının doz ve bitki kısmına bağlı olarak reproduktif ve gelişimsel süreçleri farklı şekillerde etkileyebileceğini göstermektedir. Düşük dozlarda (100 mg/mL), ekstraktlar genellikle iyi tolere edilmiş; özellikle rizom grubunda gelişimsel süreçler korunmuştur. Ancak yüksek doz uygulamaları (300 mg/mL), özellikle rizom grubunda doğrudan gelişimsel bozulma, toprak üstü grubunda ise davranışsal kaçınma ve yapısal bozulmalar gibi etkiler oluşturmıştır. Bu durum, ekstraktlarda bulunan flavonoid, fenolik bileşik, saponin ve olası steroidal bileşiklerin hem gelişimsel regülasyon hem de nöronal sinyalleme üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (Chen ve diğ., 2020; Zhao ve diğ., 2018).

Polygonatum orientale Desf. Bitkisinin rizom ve toprak üstü kısımlarından farklı polaritedeki çözücülerle elde edilen ekstraktlar farklı biyolojik aktiviteler göstermiştir. Rizom kısımları saponin, lignan ve fenolik bileşikler açısından zengin olup, %50 etanol ile yapılan ekstraksiyon en yüksek verimi sağlamıştır. Toprak üstü metanol ekstraktı vitexin-2-O-ramnozid açısından en zengin fraksiyon olurken, rizom etil asetat ekstraktı en yüksek flavonoid içeriği göstermiştir. Antioksidan testlerde, toprak üstü %50 etanol ekstraktı (DPPH), rizom etil asetat ekstraktı (FRAP) ve her iki kısımdan elde edilen etil asetat veya %50 etanol ekstraktları (ABTS, fosfomolibdat) yüksek etki göstermiştir. Enzim inhibisyon çalışmalarında, rizom ve toprak üstü metanol ekstraktları AChE'yi etkili şekilde inhibe ederken, MAO-A üzerinde en yüksek inhibisyon toprak üstü etanol ekstraktıyla elde edilmiştir; MAO-B inhibisyonunda ise rizom metanol ekstraktı öne çıkmıştır. Antibakteriyel testlerde, gram pozitif bakterilere karşı daha yüksek duyarlılık saptanmış, özellikle toprak üstü etil asetat ekstraktı *S. epidermidis*'e karşı belirgin etki göstermiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, rizom metanol ekstraktı SH-SY5Y hücrelerinde en yüksek proliferatif etkiyi gösterirken, %50 etanol ile hazırlanan rizom ekstraktı da hücre canlılığını artırmıştır. HUVEC hücrelerinde düşük dozlarda proliferatif, yüksek dozlarda sitotoksik etkiler izlenmiş; TM3 ve TM4 hücre hatlarında ise düşük ve orta dozlar daha iyi tolere edilmiştir. *C. elegans* modellerinde, 100 mg/mL dozda uygulanan rizom ve toprak üstü ekstraktları motor davranışları koruyucu etki gösterirken, 300 mg/mL dozda paralizi, koordinasyon kaybı ve davranışsal bozulmalar oluşmuştur. GRU102 ve A30P gibi duyarlı genetik suşlarda düşük dozda nöroprotektif, yüksek dozda ise nörotoksik etkiler belirginleşmiştir. Üreme testlerinde 100 mg/mL dozda gelişim korunmuş, ancak 300 mg/mL dozda yumurtlama davranışı ve gelişim olumsuz etkilenmiştir. Özellikle toprak üstü ekstraktı yüksek dozda irritatif davranışlara ve yapısal bozulmalara neden olmuştur. Genel olarak, düşük dozlarda koruyucu ve uyarıcı etkiler gözlenirken, yüksek dozlarda sitotoksik ve nörotoksik etkiler ön plana çıkmıştır.

Bu çalışma, Türkiye'de yetişen *Polygonatum orientale* Desf. bitkisi ile yapılan kapsamlı bir çalışmadır. Bitkinin özellikle rizom kısmının zengin fitokimyasal içeriği sayesinde güçlü antioksidan, nöroprotektif ve hücre proliferasyonunu destekleyici etkilere sahip olduğunu; toprak üstü kısımlarının ise seçici antimikrobiyal ve enzim inhibitör aktivitelerle tamamlayıcı biyoaktivite sunduğunu ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler, bu türün hem doğal antioksidan ve nöroprotektif ajanların geliştirilmesi hem de geleneksel kullanımlarının

bilimsel temellere oturtulması açısından önemli bir farmakolojik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, yüksek dozlarda kullanımının toksik olabileceği ve bu nedenle, özellikle tıbbi kullanımları için ileri doz belirleme çalışmaları yapılması gerekmektedir.



REFERANSLAR

- Adwas, A. A., Elsayed, A., Azab, A. E., Quwaydir, F. A., 2019, Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body, Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering, 6 (1), 43-47.
- Agarwal, A., & Sekhon, L. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility, 13, 217 - 225. <https://doi.org/10.3109/14647273.2010.532279>.
- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2007). REVIEW ARTICLE: Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. American Journal of Reproductive Immunology, 59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x>.
- Ahn, M-J., Kim, C.Y., Yoon, K-D., Ryu, M.Y., Cheong, J.H., Chin, Y-W. ve Kim, J.W. (2006). Steroidal saponins from the rhizomes of *Polygonatum sibiricum*. Journal of Natural Product, 69, 360-364.
- Alahmar, A. (2019). Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. Journal of Human Reproductive Sciences, 12, 4 - 18. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_150_18.
- Alluri, V.K., Tayi, V.N.R., Dodda, S., Mulabagal, V., Hsin-Sheng, T. ve Gottumukkala, V.S. (2006). Biological screening of medicinal plants collected from eastern ghats of India using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). International Journal of Applied Science and Engineering, 4, 115-125.
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009. Introduction. In WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.1.1
- Amrit, P.S. (2006). Ashtavarga-rare medicinal plants. Etnobotanical Leaflets, 10, 104-108.
- Andrade-Guerrero J., Santiago-Balmaseda A., Jeronimo-Aguilar P., Vargas-Rodríguez I., Cadena-Suárez A.R., Sánchez-Garibay C., Pozo-Molina G., Méndez-Catalá C.F., Cardenas-Aguayo M.-D.-C. and Diaz-Cintra S. (2023). Alzheimer's disease: An updated overview of its genetics. International journal of molecular sciences 24(4): 3754.
- Arafa, M., Agarwal, A., Majzoub, A., Selvam, M., Baskaran, S., Henkel, R., & Elbardisi, H. (2020). Efficacy of Antioxidant Supplementation on Conventional and Advanced

- Sperm Function Tests in Patients with Idiopathic Male Infertility. *Antioxidants*, 9. <https://doi.org/10.3390/antiox9030219>.
- Aslani, B. A. and Ghobadi, S., 2016, Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system, *Life sciences*, 146, 163-173.
- Asthana J., Pant A., Yadav D., Lal R.K., Gupta M.m., Pandey R (2015). *Ocimum basilicum* (L.) and *Premna integrifolia* (L.) modulate stress response and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Industrial Crops and Products*, 76(2015): 1086-1093.
- Azari, F., Vazirian, M., Ardekani, M., Sharifzadeh, M., & Lamardi, N. (2020). Hypoglycemic effect of *Polygonatum orientale* Desf. rhizome extract on diabetes induced by streptozotocin in rat model. *Journal of Medicinal Plants*. <https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.92>.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Ballabh, B., Chaurasia, O.P., Ahmed, Z. ve Singh, S.B. (2008). Tradinational medicinal plants of cold desert Ladakh, used against kidney and urinary disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 331-339.
- Ballinger E.C., Ananth M., Talmage D.A. and Role L.W. (2016). Basal forebrain cholinergic circuitsand signaling in cognition and cognitive decline. *Neuron* 91(6): 1199-1218.
- Bayr, H., 2005, Reactive oxygen species, *Critical care medicine*, 33 (12), S498-S501.
- Baytop, T. (1984). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Baytop, T. (1994).Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları.
- Beckman, K.B., Bruce N.A., 1998, The Free Radical Theory of Aging Matures, *Physiological Reviews*, 78, 547–581.
- Bekdash R.A. (2021). The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of alzheimer’s disease. *International journal of molecular sciences* 22(3): 1273.

- Bennett, R., & Wallsgrove, R. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms.. The New phytologist, 127 4, 617-633. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.1994.TB02968.X>.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berndtson W.E., Thamson T.L., 1990, Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in sprague-dawley rats. Journal of Andrology, 11(5), 429-435.
- Bisht, C. ve Badoni A. (2009). Medicinal strength of some Alpine and sub-Alpine zones of western Himalaya, India. New York Science Journal, 2, 41-46.
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. Nature Reviews Urology, 14, 470-485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>.
- Bondi M.W., Edmonds E.C. and Salmon D.P. (2017). Alzheimer’s disease: Past, present, and future. Journal of the International Neuropsychological Society 23(9-10): 818-831.
- Bortolato, M., Chen, K., & Shih, J. C. (2008). Monoamine oxidase inactivation: From pathophysiology to therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews, 60(13–14), 1527–1533. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.06.002>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 77(1), 71–94.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L., 2010, Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species, In Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, 15 (4), 186-190
- Butterfield D.A. and Halliwell B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and alzheimer disease. Nature Reviews Neuroscience 20(3): 148-160.
- Byng, J. W. (2014). The Flowering Plants Handbook: A practical guide to families and genera of the world. Plant Gateway Ltd..
- Can, Ö. D., Ekinci, D., & Demir, E. (2023). Natural acetylcholinesterase inhibitors: Recent advances and challenges. Phytotherapy Research, 37(1), 15–32.

- Chang K.-H., Cheng M.-L., Tang H.-Y., Huang C.-Y., Wu H.-C. and Chen C.-M. (2022). Alterations of sphingolipid and phospholipid pathways and ornithine level in the plasma as biomarkers of parkinson's disease. *Cells* 11(3): 395.
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chen D, Mubeen B, Hasnain A, Rizwan M, Adrees M, Naqvi SAH, Iqbal S, Kamran M, El-Sabrou AM, Elansary HO, Mahmoud EA, Alaklabi A, Sathish M, Din GMU. Role of Promising Secondary Metabolites to Confer Resistance Against Environmental Stresses in Crop Plants: Current Scenario and Future Perspectives. *Front Plant Sci*. 2022 May 9;13:881032. doi: 10.3389/fpls.2022.881032. Erratum in: *Front Plant Sci*. 2022 Jun 14;13:950612. PMID: 35615133; PMCID: PMC9126561.
- Chen, H., Wang, S., Zhang, H., & Liu, J. (2020). Flavonoids and polyphenols from traditional Chinese medicine: therapeutic potential on neurodegenerative diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 603925. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.603925>
- Chen, H., Zhang, Q., Ma, Y., & Wang, J. (2020). Monoamine oxidase inhibitory activity and phenolic composition of *Polygonatum odoratum* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112638. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112638>
- Chen, S., Zhao, Y., Zhao, L., & Li, Y. (2017). Neuroprotective effect of *Polygonatum* species on SH-SY5Y cells via modulation of oxidative stress pathways. *Neurochemistry International*, 108, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.08.003>
- Chen, X., Huang, Y., Yuan, J., & Zhang, Z. (2021). Comparative phytochemical profiling and antioxidant activities of *Polygonatum* species. *Molecules*, 26(3), 540. <https://doi.org/10.3390/molecules26030540>
- Chen, X., Zhang, Y., Wang, W., & Li, X. (2016). Cytotoxic effects of saponins from *Polygonatum sibiricum* on testicular Sertoli cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(2), 1363–1370. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4667>
- Choi, S.B. ve Park, S. (2002). A steroidal glycoside from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce. Improve insulin resistance but does not alter insulin secretion in 90%

- pancreatectomized rats. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 66, 2036-2043.
- Chopin, J., Dellamonica, G., Besson, E., Skrzypczakowa, L., Budzianowski, J., ve Mabry, T.J. (1977). C-Galactosylflavones from *Polygonatum multiflorum*. Phytochemistry, 16, 1999-2001.
- Collins, J.J, Evason, K., Kornfeld, K., (2006). Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 41(10): 1032-1039.
- Collin, F., 2019, Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases, International journal of molecular sciences, 20 (10), 2407.
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi (Office Journal of the Turkish Nephrology), 3(4), 92-95.
- Çırak, B. İnci, S., Paloğlu, S., Bertan, V., 2003, Lipit peroxidation in cerebral tumours, Clinica Chimica Acta, 327 (1-2), 103-107.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Davies P. and Maloney A. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in alzheimer's disease. The Lancet 308(8000): 1403.
- Davis, P. H. (Ed.). (2008). Flora of turkey and the east aegean islands. Vol. 1 (Reprinted, Vol. 1). Edinburgh Univ. Press.
- Demir İ, 2020. An Ethnobotanical study of medicinal plants used in Hizan District (Bitlis-Turkey). Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences, 30 (4): 732-741.
- Demirci, S., Özhatay, F.N. (2010). Andırın (Kahramanmaraş) İlçesinde Etnobotanik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total

- flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Doğan, Hüseyin: <https://kocaelibitkileri.com/Polygonatum-orientale/>: Erişim Tarihi: 17 May 2024'
- Dorsey E., Sherer T., Okun M.S. and Bloem B.R. (2018). The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *Journal of Parkinson's disease* 8(s1): S3-S8.
- Dorta, D., Pigoso, A., Mingatto, F., Rodrigues, T., Pestana, C., Uyemura, S., Santos, A., & Curti, C. (2008). Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytotherapy Research*, 22. <https://doi.org/10.1002/ptr.2441>.
- Dökmeci, İ., 2000, *Farmakoloji Temel Kavramlar*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 714-720.
- DSÖ (2021). Neurology and covid-19: Scientific brief. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-019-nCoV-Sci-Brief-Neurology-2021.1>
- DSÖ (2024, 2 Mayıs). Over 1 in 3 people affected by neurological conditions, the leading cause of illness and disability worldwide. <https://www.who.int/news/item/14-03-2024-over-1-in-3-people-affected-by-neurological-conditions--the-leading-cause-of-illness-and-disabilityworldwide>.
- Duke, J.A. (1985). *CRC Handbook of medicinal herbs*. CRC Press, Inc., Boca Rotan, Florida.
- Ekim, T. (2012). *Polygonatum*. Şu sitede: Bizimbitkiler (2013). <<http://www.bizimbitkiler.org.tr>>, [er. tar.: 20 07 2025].
- Eminağaoğlu, Ö. (2012). Artvin'de Doğa Mirası, Camili'nin Doğal Bitkileri. Borçka Kaymakamlığı Yayınları, Promat Basın Yayın, İstanbul.
- Erken, K., Kaya, E., Şener, B. (2020). TÜBİTAK 1007 Projesi: Türkiye'de Yetişen Geofit Bitkilerin Tarama Çalışması.
- Feigin V.L., Nichols E., Alam T., Bannick M.S., Beghi E., Blake N., Culpepper W.J., Dorsey E.R., Elbaz A. and Ellenbogen R.G. (2019). Global, regional, and national burden of

- neurological disorders, 1990–2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *The Lancet Neurology* 18(5): 459-480.
- Felix, M. A., Ashe, A., Pincus, Z., & Hebert, F. O. (2011). Stress-induced behavioral changes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*, 12, 438–448.
- Feng, S., Cheng, H., Xu, Z., Shen, S., Yuan, M., Liu, J., Ding, C., (2015). Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81(2015): 188-194.
- Ferreira-Vieira T., Guimaraes I., Silva F. and Ribeiro F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Current neuropharmacology* 14(1): 101-115.
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115.
- Floden, A. J. (2017). Molecular phylogenetic studies of the genera of tribe Polygonateae (Asparagaceae: Nolinoideae). University of Tennessee, Knoxville. Link
- Gao, H., Huang, Y-N., Gao, B., Li, P., Inagaki, C. ve Kawabata, J. (2008). Inhibitory effect on α -glucosidase by *Adhatoda vasica* Nees. *Food Chemistry*, 108, 965-972.
- Getoff, N., (2007). Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(10): 1577-1586.
- Ghosh D., Mehra S., Sahay S., Singh P.K. and Maji S.K. (2017). A-synuclein aggregation and its modulation. *International journal of biological macromolecules* 100: 37-54.
- Grimsby, J., Chen, K., Wang, L. J., Lan, N. C., Shih, J. C. (1997). Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3637–3641. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3637>
- Guerriero, G., Berni, R., Berni, R., Muñoz-Sánchez, J., Apone, F., Abdel-Salam, E., Qahtan, A., Alatar, A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J., Siddiqui, K., Hernández-Sotomayor, S., & Faisal, M. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips

- and Suggestions for Biotechnologists. Genes, 9. <https://doi.org/10.3390/genes9060309>.
- Guo, X., Wang, W., Koike, K., & Nikaido, T. (2019). Steroidal saponins from the rhizomes of *Polygonatum* species and their biological activities. Journal of Natural Medicines, 73(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11418-018-1234-9>
- Gupta, S., Ghulmiyyah, J., Sharma, R., Halabi, J., & Agarwal, A. (2014). Power of Proteomics in Linking Oxidative Stress and Female Infertility. BioMed Research International, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/916212>.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M.T. (edlr) (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). 146-148. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Halliwell, B., 1991, Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease, The American Journal of the Medical Sciences, 91, 14-21.
- Hampel H., Mesulam M.-M., Cuello A.C., Farlow M.R., Giacobini E., Grossberg G.T., Khachaturian A.S., Vergallo A., Cavedo E. and Snyder P.J. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of alzheimer's disease. Brain 141(7): 1917-1933.
- Hanachi, P., Zarringhalami, R., & Kaya, E. (2020). Total Phenolic and Flavonoid Content and Antibacterial Properties of *Polygonatum orientale* Desf and *Tilia dasystyla*. <https://doi.org/10.5812/hmj.102953>.
- Harborne, J. B. (1998). Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis (3rd ed.). Springer.
- Hashemi, G., Adhami, H., Rahimifard, M., Baeeri, M., & Sarkhail, P. (2022). Investigation of In vitro Wound Healing Activity of *Polygonatum orientale* Desf. Rhizome. Traditional and Integrative Medicine. <https://doi.org/10.18502/tim.v7i2.9925>.
- Henkel, R., Sandhu, I., & Agarwal, A. (2018). The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility?. Andrologia, 51. <https://doi.org/10.1111/and.13162>.

- Hirai, N., Miura, T., Moriyasu, M., Ichimaru, M., Nishiyama, Y., Ogura, K. ve Kato, A. (1997). Cardiogenic activity of the rhizome of *Polygonatum sibiricum* in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20, 1271-1273.
- Hope, I. A. (Ed.). (1999). *C. elegans: a practical approach* (Vol. 213). OUP Oxford.
- Hotwani K, Baliga S, Sharma K. Phytodentistry: use of medicinal plants. *J Complement Integr Med*. 2014 Dec;11(4):233-51. doi: 10.1515/jcim-2013-0015. PMID: 25153610.
- Hou, J.P. ve Jin, Y. (2005). The healing power of Chinese herbs and medicinal recipes. New York , The Haworth integrative Healing press.
- Huang, H. J., Chen, W. P., & Lin, C. H. (2016). Neuroprotective effects of polyphenols on dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease models. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 501. <https://doi.org/10.3390/ijms17040501>
- Huang, H., Wang, Y., Li, J., & Wang, L. (2012). Analysis of alkaloids in *Polygonatum* by UPLC-MS/MS. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(9), 1386–1390.
- Hunt, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.* 37, 50–59
- Hunt-Newbury, R. et al. (2007). High-throughput in vivo analysis of gene expression in *C. elegans*. *PLoS Biology*, 5(9), e237. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050237>
- Hunyadi, A. (2019). The mechanism(s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites. *Medicinal Research Reviews*, 39, 2505 - 2533. <https://doi.org/10.1002/med.21592>.
- Ibach, B., & Haen, E. (2004). Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 10(3), 231–251.
- Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., Tanaka, T., 1999, Role of Radical Oxygen Species in Rat Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Heat Stress, *Biology of Reproduction*, 61(2), 393-399.
- Jacob, C., Jamier, V., & Ba, L. (2011). Redox active secondary metabolites.. *Current opinion in chemical biology*, 15 1, 149-55 . <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.015>.

- Jameson, R. R., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2007). Non-enzymatic roles for acetylcholinesterase in development and disease: Interaction with cell adhesion molecules and nuclear signaling. *NeuroToxicology*, 28(5), 1110–1119.
- Jeffrey, C. (1980). The genus *Polygonatum* (Liliaceae) in Eastern Asia. *Kew Bulletin*, 34(3), 435–471. <https://www.jstor.org/stable/4109822>
- Jeon, S., Lee, M., Park, Y., Park, H. ve Choi, M. (2004). *Polygonatum* rhizoma affects antioxidant defense systems without changing mRNA expression in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Medicinal Food*, 7, 358-365.
- Jiang S., Li Y., Zhang C., Zhao Y., Bu G., Xu H. and Zhang Y.-W. (2014). M1 muscarinic acetylcholine receptor in alzheimer's disease. *Neuroscience bulletin* 30: 295-307.
- Jiang, H., Li, J., Wang, C., & Liu, Y. (2015). Cytotoxicity and apoptosis induction of saponins from *Polygonatum odoratum* in vascular endothelial cells. *Cell Biochemistry and Function*, 33(6), 437–444. <https://doi.org/10.1002/cbf.3133>
- Jiang, S. (1986). *Dictionary of Chinese Medicine*. Shanghai Press of Science Technology, pp. 551-553.
- Jin S.Y., Li, D.Q., Lu, S., Han L.T., Liu, D.H., Huang, Z., Huang, B.S., Cao, Y., (2019). Etanol extracts of *Panax notoginseng* increase lifespan and protect against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the insulin/IGF-1 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 58(2019): 218-226.
- Jin, J., Zhang, Y., Li, H. ve Yang, C. (2004). Cytotoxic steroidal saponins from *Polygonatum zanlanscianense*. *Journal of Natural Product*, 67, 1992-1995.
- Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Casadesus, G., (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Proceedings of the 1st International Conference on Polyphenols and Health held in Vichy, France, November 18-21, 20*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1S): 313S-NaN.
- Junqueira Lc, Carneiro J (2009). *Temel Histoloji Text & Atlası*. Çeviren: Solakoğlu S, Aytekin Y, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 418-439.

- Kang, S. Y., Lee, K. Y., Kim, Y. C., & Kim, Y. S. (2019). Acetylcholinesterase inhibitory activity of constituents from *Polygonatum odoratum*. *Phytotherapy Research*, 33(4), 1023–1030. <https://doi.org/10.1002/ptr.6289>
- Kar S., Slowikowski S.P., Westaway D. and Mount H.T. (2004). Interactions between β -amyloid and central cholinergic neurons: Implications for alzheimer's disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 29(6): 427-441.
- Kauffman, A. L., Parsons, L., Stein, G., Wills, A., Kaletsky, R., & Murphy, C. (2011). *C. elegans* Positive Butanone Learning, Short-term, and Long-term Associative Memory Assays. *Journal of Visualized Experiments*, (49), e2490. <https://doi.org/10.3791/2490>
- Kazmi, I., Afzal, M., Rahman, M., Gupta, G. and Anwar F. (2012). Aphrodisiac properties of *Polygonatum verticillatum* leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2: 841-845.
- Kenyon, C. J., (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288): 504-512.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R., (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454): 461-464.
- Khan, H., Saeed, M., Gilani, A.H., Khan, M.A., Dar, A. ve Khan, I. (2010). The antinociceptive activity of *Polygonatum verticillatum* rhizomes in pain models. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 521-527. 292
- Khan, H., Saeed, M., Gilani, A.H., Khan, M.A., Khan, I. ve Ashraf, N. (2011). Antinociceptive activity of aerial parts of *Polygonatum verticillatum*: Attenuation of both peripheral and central pain mediators. *Phytotherapy Research*, 25, 1024-1030.
- Khan, H., Saeed, M., Gilani, A.H., Naveed, M., Ikram-ul-Haq, Ashraf, N., Najeeb-ur-Rehman and Haleemi, A. (2012). Antipyretic and anticonvulsant activity of *Polygonatum verticillatum*: comparison of rhizomes and aerial parts. *Phytotherapy Research* [Accepted DOI: 10.1002/ptr. 4721].
- Khan, H., Saeed, M., Muhammad, N., Gaffar, R., Gul, F. ve Raziq, N. (2013). Lipoxxygenase and urease inhibition of the aerial parts of the *Polygonatum verticillatum*. *Toxicology and Industrial Health* .

- Khan, S.W. ve Khaton, S. (2008). Ethnobotanical studies on some useful herbs of Haramosh and Bugrote valleys in Gilgit, northern areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 40, 43–58.
- Khasbagan, H.Y.H.ve Sheng, J.P. (2000). Wild plants in the diet of arhorchin mongol herdsmen in inner mongolia. *Economic Botany*, 54, 528-536.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kienzle, E., Ranz, D., Thielen, C., Jezussek, M., Schieberle, P., (2005). Carry over (transfer) of feed-borne acrylamide into eggs, muscle, serum, and faeces – a pilot study with Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*), *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89(3-6), 65–237.
- Kiersenbaum, A.L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Özkan Matbaacılık Gazetecilik San. Tic. Lts. Şti., Ankara, 0-323-01639-1, 418-434.
- Kim, H. J., Choi, J. S., & Lee, S. Y. (2018). Solvent-dependent extraction efficiency of bioactive compounds from medicinal plants and their effects on enzyme inhibition. *Journal of Natural Products*, 81(7), 1552–1559.
- Knobil, E., Neill, J.D., (2006). *Physiology Of Reproduction*, Third Edition, Academic Press, 0125154011, 769- 1267.
- Kohen, R. and Nyska, A., (2002). Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic pathology*, 30 (6), 620-650.
- Komarov, V.L. (1935). *Polygonatum* (Tourn.) Adans. İçinde: Komarov VL (ed), *Flora URSS*, Vol 4, Leningrad Academiae Scientiarum URSS, Leningrad, pp 456-467.
- Kölker S. (2018). Metabolism of amino acid neurotransmitters: The synaptic disorder underlying inherited metabolic diseases. *Journal of inherited metabolic disease* 41: 1055-1063.

- Krajl, M. (1965). A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochemical Pharmacology*, 14(11), 1683–1685. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(65\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(65)90025-0)
- Kuehnell W (2003). *Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy* (4th ed.) Georg Thieme Verlag, New York/U.S.A.
- Lamprey R.N., Chaulagain B., Trivedi R., Gothwal A., Layek B. and Singh J. (2022). A review of the common neurodegenerative disorders: Current therapeutic approaches and the potential role of nanotherapeutics. *International journal of molecular sciences* 23(3): 1851.
- Leblond, C. P., Clermont, Y., 1952, Definition Of The Stages Of The Cycle Of The Semiferous Epithelium In The Rat, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55, 548-571.
- Lee, J. H., Kim, H. S., & Park, S. Y. (2021). Cytoprotective effect of *Polygonatum sibiricum* extract in human endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 270, 113774. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113774>
- Lee, S., Kim, D., Jung, J., & Choi, E. (2018). Inhibitory effects of *Polygonatum sibiricum* extracts on monoamine oxidase and antioxidant properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 256. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2305-z>
- Levonen, A., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E., Dickinson, D., Zanoni, G., Morrow, J., & Darley-USmar, V. (2004). Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products.. *The Biochemical journal*, 378 Pt 2, 373-82. <https://doi.org/10.1042/BJ20031049>.
- Li, M., Wu, Y., Xu, Y., & Yang, Y. (2020). Flavonoids from *Polygonatum odoratum* regulate monoamine oxidase and oxidative stress pathways. *Phytomedicine*, 69, 153204. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153204>
- Li, W., Lesuisse, C., Xu, Y., Troncoso, J. C., Price, D. L., & Lee, M. K. (2006). Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial Parkinson's disease-linked A30P mutation. *Journal of Neuroscience*, 26(3), 767–775. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4213-05.2006>

- Li, X., Wang, Y., Wang, H., & Yin, H. (2012). Antibacterial and antifungal activities of extracts from *Polygonatum sibiricum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(29), 4533–4537.
- Li, X., Wu, X., & Huang, L. (2021). Influence of extraction solvents on the antioxidant activity of plant extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), e13545. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13545>
- Li, X., Zhang, J., Gao, W., Wang, Y., & Wang, Y. (2018). Comparative phytochemical profiling and evaluation of antioxidant activities of three *Polygonatum* species. *Molecules*, 23(5), 1116. <https://doi.org/10.3390/molecules23051116>
- Li, Y.G., Ji, J.Y. ve Zhang, Y.J. (2009). Measurement and analysis of the nutrients of *Polygonatum sibiricum* seeds. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 29, 1692-1696.
- Liao, W. C., Huang, J.-P., & Huang, W.-Y. (2023). Chemical composition analysis and biofunctionality of *Polygonatum sibiricum* and *Polygonatum odoratum* extracts. *BioResources*, 18(2), 3608–3619. <https://doi.org/10.15376/biores.18.2.3608-3619>
- Liu, H., Wang, Y., Feng, C., & Qiao, L. (2021). Phytochemicals from *Polygonatum* species and their protective effects on male reproductive health. *Phytomedicine*, 89, 153610. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153610>
- Liu, M.J., Wang, Z., Ju, Y., Wong, R.N., ve Wu, Q.Y. (2005). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55, 79–90.
- Luo, J., Zhang, X., Zhou, Y., Yang, F., & Wang, G. (2019). Antioxidant activity and phenolic content of *Polygonatum sibiricum* extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 43(6), e12841.
- Luo, L., Qiu, Y., Gong, L., Wang, W., & Wen, R. (2022). A Review of *Polygonatum* Mill. Genus: Its Taxonomy, Chemical Constituents, and Pharmacological Effect Due to Processing Changes. *Molecules*, 27(15), 4821. <https://doi.org/10.3390/molecules27154821>
- Luo, Q., Shang, H., Chen, Y., Liu, S., Liu, C., Wang, L., & Li, J. (2019). Antioxidant activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* fermentation with

- Lactobacillus acidophilus. International Journal of Biological Macromolecules, 121, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.207>
- Luo, Q., Zhou, L., Gu, C., & Yuan, W. (2019). Antioxidant activity and phenolic composition of ethanol extract from *Polygonatum sibiricum*. International Journal of Food Properties, 22(1), 1446–1457. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1650767>
- Luo, Y., Liu, M., Xia, Y., Dai, Y., & Han, J. (2019). Antioxidant and anti-proliferative activities of *Polygonatum sibiricum* extracts in vitro. Journal of Ethnopharmacology, 239, 111873. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111873>
- Majzoub, A., & Agarwal, A. (2018). Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. Arab Journal of Urology, 16, 113 - 124. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.013>.
- Marčetić, M., & Arsenijević, J. (2023). The Antioxidant activity of plant secondary metabolites. Archives of Pharmacy, 73(Notebook 4), 264-277.
- Margie, O., Palmer, C., & Chin-Sang, I. (2013). *C. elegans* Chemotaxis Assay. Journal of Visualized Experiments, (74), e50069. <https://doi.org/10.3791/50069>
- Mathew, M. D., Mathew, N. D., & Ebert, P. R. (2012). WormScan: A technique for high-throughput phenotypic analysis of *Caenorhabditis elegans*. PLoS ONE, 7(3), e33483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033483>
- Meneely, P.M., Dahlberg, C.L., Rose, J.K., (2019). Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 19(1): e35.
- Meng, Y., Nie, Z. L., Deng, T., Wen, J., & Yang, Y. P. (2014). Phylogenetics and evolution of phyllotaxy in the Solomon's seal genus *Polygonatum* (Asparagaceae: Polygonateae). Botanical Journal of the Linnean Society, 176(4), 435–451. <https://doi.org/10.1111/boj.12189>
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine, 14(4), 289–300.

- NIH. (2023). Parkinson's disease: Causes, symptoms, and treatments.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- Nyakas C., Granic I., Halmy L.G., Banerjee P. and Luiten P.G. (2011). The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behavioural brain research* 221(2): 594-603.
- Ogunmoyole, T., Akinyemi, A. J., Komolafe, T. O., & Oladipo, O. O. (2018). Phytochemical screening and antioxidant properties of *Anchomanes difformis* crude root extract. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 23, 1–9. <https://doi.org/10.1177/2515690X18767356>
- Özdemir Nath, E. (2016). Savaştepe ve kepsut (Balıkesir) yörelerinde etnobotanik araştırmalar (Doctoral dissertation, Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi, s:86.
- Özdemir Nath, E., ve Kültür, Ş. (2017). The local names of the plants in Kepsut and Savaştepe (Balıkesir, Turkey). *İstanbul Journal of Pharmacy*, 47(1), 12-23. <https://doi.org/10.5152/IstanbulJPharm.2017.004>
- Padhi, S. S., Chatterjee, M., & Ghosh, S. (2020). Characterization of the rat acetylcholinesterase readthrough (AChE-R) splice variant: Implications for toxicological studies. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(6), 429–437. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1807850>
- Pagan, L.U, Gomes, M.J., Gatto, M., Mota, G.A.F., Okoshi, K., Okoshi, M.P., (2022). The Role of Oxidative Stress in the Aging Heart. *Antioxidants (Basel)*, 11(2): 1-18.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. (2015). Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9, 293-304.
- Paloma, C., Enrique, C., Javier, D.C., (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer, *Cancer Causes Control*, 15, 707-719.

- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pandey, M.M. (2006). Pharmacognostical studies of *Polygonatum cirrifolium* and *Polygonatum verticillatum*. *Journal of Herbs, spices and medicinal plants*, 12,1-2.
- Park, K. M., You, J. S., Lee, H. Y., & Baek, N. I. (2011). Anthraquinone derivatives from *Polygonatum stenophyllum*. *Archives of Pharmacal Research*, 34(1), 137–141. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0114-6>
- Patočka, J., Kuca, K., & Jun, D. (2004). Acetylcholinesterase and its inhibition. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 47(4), 215–225.
- Peng, C., Zuo, Y., Kwan, K.M, Liang, Y., Ma, K.Y., Chan, H.Y., Huang, Y, Yu, H., Chen, Z.Y., (2012). Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol*, 47(2): 170-178.
- Petrovska, B.B., (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* 2012 Jan;6(11):1-5. doi: 10.4103/0973-7847.95849. PMID: 22654398; PMCID: PMC3358962.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L., (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian journal of clinical biochemistry*, 30, 11-26.
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (64), 4019.
- Potter S.J., DeFalco, T. (2017). Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction*. Apr;153(4):R151-R162. doi: 10.1530/REP-16-0588. Epub 2017 Jan 23. PMID: 28115580; PMCID: PMC5326597.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

- Reveal, J.L. ve Chase M.W. (2011). APG III: Bibliographical Information and Synonymy of Magnoliidae. *Phytotaxa*, 19, 71-134.
- Riederer, P., & Lachenmayer, L. (2003). Selegiline's neuroprotective capacity revisited. *Journal of Neural Transmission. Supplementa*, 65, 147–159. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0627-1_13
- Ritchie, C., & Ko, E. (2020). Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. *Andrologia*, 53. <https://doi.org/10.1111/and.13581>.
- Robertson, E., 2008. Medicinal Plants at Risk. Nature's Pharmacy, Our Treasure Chest: Why We Must Conserve Our Natural Heritage-Native Plant Conservation Campaign Report. Center for Biological Diversity, Tucson, US.
- Ross, C., Morriss, A., Khairy, M., Khalaf, Y., Braude, P., Braude, P., Coomarasamy, A., & El-toukhy, T. (2010). A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 20 6, 711-23. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.03.008>.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2010). *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology* (6th ed.). Philadelphia: Lip pincott Williams & Wilkins.
- Ruan, Q., Qiao, Y., Zhao, Y., Xu, Y., Wang, M., Duan, J., Wang, D., (2016). Beneficial effects of Glycyrrhizae radix extract in preventing oxidative damage and extending the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *J Ethnopharmacol*, 177: 101-110.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990, *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, First Edition, Cache River Press, ISBN: 0962742201.
- Sadler, T.W., Langman, J., 2000, *Langman's Medical Embryology*, Eighth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 0683306502.
- Saeed, M., Khan, H., Khan, M.A., Khan, F., Khan, S.A. ve Muhammad, N. (2010). Quantification of various metals accumulation and cytotoxic profile of aerial parts of *Polygonatum verticillatum*. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 3995–4002.

- Saldanha, A. J., Faria, H. G., & Vasconcelos, M. W. (2015). Influence of solvents on cytotoxicity assays in cell culture: considerations for natural product research. *Toxicology In Vitro*, 29(6), 1227–1232. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.003>
- Sanchez-Valle, V., Chavez-Tapia, N.C., Uribe, M., Mendez-Sanchez, N., (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem*, 19(28): 4850-4860.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., & Saldanha, C. (2018). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, 97(2), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.06.012>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10.
- Saura, J., Richards, J. G., Mahy, N. (1994). Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in the human brain: A detailed mapping study with enzyme autoradiography. *Neuroscience*, 59(1), 69–89. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90091-4)
- Seberg, O., Petersen, G., Davis, J.I., Pires, C.P., Stevenson, D.W., Chase, M.W., Fay, M.F., Devey, D.S., Jørgensen, T., Sytsma, K.J. ve Pillon, Y. (2012) Phylogeny of the Asparagales based on three plastid and two mitochondrial genes. *American Journal of Botany*, 99, 875-889.
- Sezer, O., Öztürk, D., Ocak, A., Koyuncu, O. (2017). Flora of Phrygian Valley (Mountain Phrygia/Turkey)
- Shankar, R. ve Rawat, M.S. (2006). Medicinal plants activities for change in the socioeconomic status in rarul areas of north east India. *Bulletin of Arunachal Forest Research*, 22, 58-63.
- Shaukat, A., Khan, I., Khan, T., & Ullah, N. (2020). Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory potential of *Polygonatum verticillatum*: A folkloric medicinal plant. *Phytotherapy Research*, 34(2), 387–396. <https://doi.org/10.1002/ptr.6559>

- Shimomura Y. and Kitaura Y. (2018). Physiological and pathological roles of branched-chain amino acids in the regulation of protein and energy metabolism and neurological functions. *Pharmacological Research* 133: 215-217.
- Shu, X-S., Lv, J-H., Tao, J., Li, G-M., Li, H-D. ve Ma, N. (2009) Antihyperglycemic effects of total flavonoids from *Polygonatum odoratum* in STZ and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 539–543.
- Simpson I.A., Dwyer D., Malide D., Moley K.H., Travis A. and Vannucci S.J. (2008). The facilitative glucose transporter glut3: 20 years of distinction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295(2): E242-E253.
- Singh, K.N., Kaushal, R. (2007). Comprehensive Notes on Commercial Utilization, Characteristics and Status of Steroid Yielding Plants in India. *Ethnobotanical Leaflets*, 1, 9.
- Singh, S. K., & Patra, A. (2018). Evaluation of phenolic composition, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of *Polygonatum verticillatum* (L.). *Journal of Integrative Medicine*, 16(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.04.005>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Sofowora, A., Ogunbodede, E., & Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(5), 210–229. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>
- Solomon, B., Ravindranath, N., Dalal, R., Djakiew, D., Dym, M., 1997, Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation, *Endocrinology*, 138, 4026-4029.
- Stanković, M. S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac Journal of Science*, 33, 63–72.
- Steinmetz J.D., Seeher K.M., Schiess N., Nichols E., Cao B., Servili C., Cavallera V., Cousin E., Hagins H. and Moberg M.E. (2024). Global, regional, and national burden of

- disorders affecting the nervous system, 1990–2021: A systematic analysis for the global burden of disease study 2021. *The Lancet Neurology* 23(4): 344-381.
- Stiernagle, T. (2006, Feb 11). Maintenance of *C. elegans*. WormBook. 2007/12/01. Erişim: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050451]. Erişim Tarihi: 16/05/2022.
- Stojanov, N. ve Stefanov, B. (1948). *Flora Repipublicae Popularis Bulgaricae*, II: 188-189, 313-314, 305-310.
- Strid, A. Tan K. (1991). *Mountain Flora of Greece*. Vol. II, 715. Edinburg
- Surmeier D.J. (2018). Determinants of dopaminergic neuron loss in parkinson's disease. *The FEBS journal* 285(19): 3657-3668.
- Tamang, B., Gurung, A. B., & Hu, X. (2021). Extraction of bioactive compounds from medicinal plants and herbs: synthesis, characterization and applications. *Journal of Herbal Medicine*, 27, 100432. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100432>
- Tamura, M.N. (1998). *Melanthiaceae*. İçinde Kubitzki, K. (Ed.), *The families and genera of vascular plants*, III, Monocotyledons, Berlin: Springer-Verlag: 369-380.
- Tang, L., Zhang, S., Liu, Z., & Wang, Y. (2019). Evaluation of the antioxidative and cytoprotective potential of *Polygonatum* extracts in germline-derived cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 245, 112173. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112173>
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4), 1372–1378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.064>
- Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., García-Eulate, M., Arbizu, J. and Riverol, M., (2018). Early-and late-onset alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurología (English Edition)* 33(4): 244-253.
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A. and Nair, M., (2019). Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine*: 5541-5554.

- Tolosa E., Garrido A., Scholz S.W. and Poewe W. (2021). Challenges in the diagnosis of parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 20(5): 385-397.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 8(4), 453–470.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective.. *Human reproduction update*, 14 3, 243-58 . <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004>.
- Tsalik, E. L., & Hobert, O. (2003). Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurobiology*, 56(2), 178–197. <https://doi.org/10.1002/neu.10245>
- Tunçkol, B., Haşayacak, H., Aksoy, N. (2022). Küre Dağları Milli Parkı'nın Florası (Kastamonu Bölümü).
- Tuzlacı, E. (2006). Türkiye Bitkileri Sözlüğü. Alfa Basım Yayım Dağıtım Ltd. Şti., İstanbul.
- Urban, P. et al. (1991). Comparative membrane locations and activities of human monoamine oxidases expressed in yeast. *FEBS Letters*, 286(1–2), 142–146. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80960-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80960-B)
- Vaiserman, A.M., Lushchak, O.V., Koliada, A.K., (2016). Anti-aging pharmacology: Promises and pitfalls. *Ageing Res Rev*, 31: 9-35.
- Wang Q., Duan L., Li X., Wang Y., Guo W., Guan F. and Ma S. (2022). Glucose metabolism, neural cell senescence and alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences* 23(8):4351.
- Wang, C., Chen, X., Li, X., Zhang, H., & Zhu, W. (2018). Polyphenol profile and antioxidant activity of extracts from different parts of *Polygonatum odoratum*. *Molecules*, 23(10), 2441. <https://doi.org/10.3390/molecules23102441>
- Wang, D., Yang, C., Zhuang, M., Yan, M., & Liu, Y. (2020). Polyphenol composition and antioxidant activities of extracts from *Polygonatum odoratum* rhizome. *Phytochemistry Letters*, 37, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.01.014>
- Wang, D., Yang, C., Zhuang, M., Yan, M., & Liu, Y. (2020). Steroidal saponins from *Polygonatum odoratum* and their cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry Letters*, 38, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.03.012>

- Wang, H., Liu, Y., Wei, Y., Zhou, J., Li, J., & Liu, Q. (2020). Comparative study of the antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Polygonatum odoratum* prepared by different extraction methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.093>
- Wang, L., Xu, M., & Yu, X. (2020). Neuroprotective and cholinesterase inhibitory effects of *Polygonatum sibiricum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 256, 112789. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112789>
- Wang, W., Liu, X., & Yang, J. (2020). Comparative study on antioxidant activity of *Polygonatum odoratum* extract with different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 155, 112777.
- Wang, X., Lu, Y., Zhang, W., Chen, L., Zhu, L. (2018). Inhibitory effect of flavonoids from medicinal plants on monoamine oxidase A and B: A review. *Phytotherapy Research*, 32(5), 835–850. <https://doi.org/10.1002/ptr.6014>
- Wang, X., Zhang, Z., Zhou, H., Sun, X., Chen, X., Xu, N., (2019). The anti-aging effects of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Biol Macromol*, 140: 600-604.
- Wang, Y., Wang, J., He, X., Zhang, Q., & Zhou, G. (2020). Comparative study on antioxidant activity and chemical constituents of *Polygonatum odoratum* extracted by different solvents. *Natural Product Research*, 34(6), 849–852. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1537764>
- Wang, Y., Zhang, H., Chen, L., Meng, Z., & Sun, G. (2020). Differential cytotoxic effects of phenolic compounds from medicinal plants in SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*, 139, 104813. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104813>
- Wang, Y., Zhou, Y., & Zhang, H. (2020). Protective effects of *Polygonatum odoratum* on endothelial dysfunction. *Phytotherapy Research*, 34(3), 620–629. <https://doi.org/10.1002/ptr.6550>
- Wang, Z., Yuan, L., Li, T., & Song, Z. (2022). The role of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and potential therapeutic targets. *Neuroscience Bulletin*, 38(3), 345–358.

- Wen H, Gao X, Qin J (2014). Probing the anti-aging role of polydatin in *Caenorhabditis elegans* on a chip. *Integrative Biology*, 6(1): 35-43.
- WFO (2024): *Polygonatum orientale* Desf. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000716147>. Accessed on: 17 May 2024'
- WFO (2025): *Polygonatum orientale* Desf. Published on the Internet;<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000716147>. Erişim: 20 Jul 2025.
- Wujisguleng, W., Liu, Y. ve Long, C. (2012). Ethnobotanical review of food uses of *Polygonatum* (Convallariaceae) in China. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81, 239-244.
- Xie C., Soeda Y., Shinzaki Y., In Y., Tomoo K., Ihara Y. and Miyasaka T. (2015). Identification of key amino acids responsible for the distinct aggregation properties of microtubule-associated protein 2 and tau. *Journal of neurochemistry* 135(1): 19-26.
- Xinqi, C. ve Tamura, M.N. (2000). *Polygonatum*. İçinde Zheng-Yi, W. ve Raven, P.H. (Eds.). *Flora of China* 24: 224. Science Press, Beijing; Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Xiong, L. G., Chen, Y. J., Tong, J. W., Gong, Y. S., & Huang, J. A. (2017). Anti-aging and antioxidant properties of plant flavonoids in *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, 8(7), 2581–2590. <https://doi.org/10.1039/C7FO00297A>
- Xu Z, Feng S, Shen S, Wang H, Yuan M, Liu J, Huang Y, Ding C (2016). The antioxidant activities effect of neutral and acidic polysaccharides from *Epimedium acuminatum* Franch. on *Caenorhabditis elegans*. *Carbohydr Polym*, 144: 122-130.
- Xu, M., Li, X., & Deng, C. (2018). Anti-aging potential of *Polygonatum kingianum* on vascular endothelium. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1477–1484.
- Yeşil, Y. (2013). *Polygonatum* Mill., *Paris* L. ve *Veratrum* L. Cinsleri Üzerinde Farnasötik Botanik Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farnasötik Botanik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

- Yeşilada E, Houghton PJ. Steroidal saponins from the rhizomes of *Polygonatum orientale*. *Phytochemistry*. 1991;30(10):3405-9. doi: 10.1016/0031-9422(91)83218-a. PMID: 1367791.
- Yeşilada, E. (1987). *Polygonatum verticillatum* (L.) All. rhizomes as an additional source of diosgenin. *Gazi. Eczazılık Fakültesi Dergisi*, 4, 11-17.
- Yeşilada, E. ve Houghton, P.J. (1991). Steroidal saponins from the rhizomes of *Polygonatum orientale*. *Phytochemistry*, 30, 3405-3409.
- Yiğit, D., & Yiğit, N. (2008). Antibacterial activity of black mulberry (*Morus nigra*) fruits and leaves. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 1(1), 39-48.
- Youdim, M. B. H., & Bakhle, Y. S. (2006). Monoamine oxidase: Isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), S287–S296. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706444>
- Youdim, M. B., & Bakhle, Y. S. (2006). Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), S287–S296. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706444>
- Zaha I, Muresan M, Tulcan C, Huniadi A, Naghi P, Sandor M, Tripon R, Gaspar C, Klaudia-Melinda M, Sachelarie L, et al. The Role of Oxidative Stress in Infertility. *Journal of Personalized Medicine*. 2023; 13(8):1264. <https://doi.org/10.3390/jpm13081264>
- Zhang, L., Jiang, H., Liu, L., & Chen, H. (2017). Inhibitory effects of *Polygonatum sibiricum* extract on monoamine oxidase and its potential antidepressant effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 206, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.018>
- Zhang, L., Wei, T., Wen, X., & Zhang, Y. (2019). Phytochemical contents and antioxidant capacity of *Polygonatum sibiricum* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 236, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.025>
- Zhang, W., Zhao, Y., Wang, L., & Wang, Y. (2021). Natural compounds targeting MAO-B in the treatment of neurodegenerative diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 686888.

- Zhang, Y., Liu, Y., Ma, Z., Zhang, H., & Lin, J. (2022). Chemical constituents and pharmacological activities of *Polygonatum* species: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 894512. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.894512>
- Zhao, H., Yang, J., Fan, T., & Li, Y. (2018). Antibacterial activity of *Polygonatum kingianum* extracts against foodborne pathogens. *Natural Product Research*, 32(23), 2774–2777.
- Zhao, X., Gao, J., Li, L., Qin, Y., & Li, Y. (2022). Advances in chemical constituents and pharmacological activities of *Polygonatum* species. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 965235. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965235>
- Zhao, X., Yu, Y., Chen, Y., Li, X., & Deng, C. (2018). Steroidal saponins from *Polygonatum* species: A review on their structures, pharmacological activities and mechanism of action. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1117–1136. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9566-7>
- Zhao, X., Zheng, B., & Sun, Y. (2017). Flavonoid-rich fractions promote HUVEC proliferation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(4), 402–408.
- Zhao, Y., Yu, H., Yang, Y., Wang, C., & Xu, H. (2018). Steroidal saponins induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neuroblastoma cells. *Toxicology Letters*, 293, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.011>
- Zheng, J., Heber, D., Wang, M., Gao, C., Heymsfield, S.B., Martin, R.J., Greenway, F.L., Finley, J.W., Burton, J.H., Johnson, W.D., Enright, F.M., Keenan, M.J., Li, Z. (2017). Pomegranate juice and extract extended lifespan and reduced intestinal fat deposition in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Vitam Nutr Res*, 87(3-4): 149-158.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559.
- Zhou, L., Wu, Y., Wang, H., & Li, S. (2018). Extraction optimization and evaluation of antioxidant activity of total flavonoids from *Polygonatum cyrtoneura*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 563–571. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9668-2>

- Zhou, W., Yin, Y., Zhang, X., Peng, Y., & Li, X. (2020). Structural characteristics and biological activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum*. Carbohydrate Polymers, 245, 116529. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116529>
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., (2010), The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development, Chemico-biological interactions, 188 (2), 334-339.

