



**TARHUN (*Artemisia dracunculus* L.)
BİTKİSİNDEN BİYOLOJİK AKTİVİTE
GÖSTEREBİLECEK SEKONDER
METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE
KİMYASAL YAPILARININ BELİRLENMESİ**

Bayram YURTVERMEZ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Bilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Tuba AYDIN
2016
Her hakkı saklıdır**

**AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TARHUN (*Artemisia dracunculus* L.) BİTKİSİNDEN BİYOLOJİK
AKTİVİTE GÖSTEREBİLECEK SEKONDER METABOLİTLERİN
İZOLASYONU VE KİMYASAL YAPILARININ BELİRLENMESİ**

Bayram YURTVERMEZ

ORGANİK KİMYA ANABİLİM DALI

**AĞRI
2016**

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAY FORMU

TARHUN (*Artemisia dracunculus* L.) BİTKİSİNDEN BİYOLOJİK AKTİVİTE
GÖSTEREBİLECEK SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE KİMYASAL
YAPILARININ BELİRLENMESİ

Yrd.Doç.Dr. Tuba AYDIN danışmanlığında, Bayram YURTVERMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından KİMYA Anabilim Dalı ORGANİK KİMYA Bilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak oybirliği / oy çokluğu (A/...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Ahmet ÇAKIR

Üye : Doç.Dr. Murat ŞENTÜRK

Üye : Yrd.Doç.Dr. Tuba AYDIN

İmza : 

İmza : 

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ocak AKDEMİR
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TARHUN (*Artemisia dracunculus* L.) BİTKİSİNDEN BİYOLOJİK AKTİVİTE GÖSTEREBİLECEK SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE KİMYASAL YAPILARININ BELİRLENMESİ

Bayram YURTVERMEZ

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tuba AYDIN

Bu tezde, *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarının ekstre ve saf metabolitlerinin insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerine karşı inhibe edici etkileri araştırıldı. Bitkinin diklormetan ekstrelerinden AD-1, AD-2, AD-3 ve AD-4 kodlu dört madde izole edildi ve AD-1 bileşiğinin kimyasal yapısı IR, 1D ve 2D NMR yöntemleriyle **herniarin** olarak karakterize edildi. *A. dracunculus* L. bitkisinin etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstraktları ile herniarinin insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerine karşı enzim aktivasyonları incelendi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu çalışmada *Artemisia dracunculus* L.'un ekstraktları ve major maddesi herniarinin ilk defa çok güçlü insan karbonik anhidraz I ve II izoenzim inhibitörü oldukları belirlendi.

Bu tezde ilk defa *A. dracunculus* L. bitkisi ekstrelerini ve herniarinin, epilepsi ve glokom hastalığı ile doğrudan ilişkili karbonik anhidraz enzim inhibitörleri olduğu ortaya kondu.

2016, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Artemisia dracunculus* L., tarhun, izolasyon, kumarinler, karbonik anhidraz, enzim inhibitörü

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION OF BIOACTIVE SECONDARY METABOLITES FROM TARRAGON (*Artemisia dracunculus* L.) AND IDENTIFICATION OF THEIR CHEMICAL STRUCTURES

Bayram YURTVERMEZ

Ağrı İbrahim Çeçen University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Organic Chemistry Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Tuba AYDIN

In this thesis, inhibition activities of extracts and pure metabolites of the aerial parts of *Artemisia dracunculus* L. were investigated against human carbonic anhydrase I and II isoenzymes. Four metabolites coded as AD-1, AD-2, AD-3 and AD-4 were isolated from dichloromethane extract and the chemical structure of AD-1 was characterised with IR, 1D and 2D NMR methods as **herniarin**. Enzyme inhibition activities of ethanol, dichloromethane, *n*-hexane and methanol extracts of *A. dracunculus* L. and herniarin were investigated against human carbonic anhydrase I and II isoenzymes and their IC₅₀ values were calculated. In this study, first time it was determined that extracts and major component, herniarin of *A. dracunculus* L were found to be strongly inhibitor againts the human carbonic anhydrase I and II isoenzyme.

For the first time in this thesis, it was also revealed that *A. dracunculus* L. extracts and herniarin were carbonic anhydrase enzyme inhibitors directly associated with epilepsy and glaucoma.

2016, 83 pages

Keywords: *Artemisia dracunculus* L., tarragon, isolation, coumarins, carbonic anhydrase, enzyme inhibitor

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, akademik çalışma, azim ve kararlılığı veren, geniş hoşgörü ve yardımlarıyla iyi bir çalışma ortamı sağlayan, tezimin gerek bilimsel gerekse biçimsel açıdan düzenlenmesinde katkıda bulunan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuba AYDIN'a teşekkür ederim.

Tez savunması için Kilis 7 Aralık Üniversitesi'nden gelerek bizi onurlandıran, desteğini ve yardımlarını bizden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Tez jürimde bulunan ve enzim aktivitesi çalışmalarında desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde her konuda gerekli kolaylığı sağlayan, personeli olduğum Patnos İlçe Emniyet Müdürlüğü'ne ve KOM Büro Amirliğindeki mesai arkadaşlarıma; ismini sayamadığım tüm yakınlarıma ve ayrıca her zaman ve her konuda tükenmeyen desteklerini gösteren başta eşim Öznur YURTVERMEZ'e ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bayram YURTVERMEZ

Temmuz, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. <i>Artemisia</i> Türleri.....	3
2.2. <i>Artemisia dracunculus</i> L.	3
2.3. <i>Artemisia dracunculus</i> L. Bitkisinden İzole Edilen Saf Metabolitler ve Bu Metabolitlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	6
2.4. Kumarinler.....	9
2.5. Kumarinlerin Türevleri.....	11
2.5.1. Benzen halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler.....	11
2.5.2. Piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler.....	12
2.5.3. Hem benzen hem de piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler ...	12
2.5.4. Benzen halkasına halkalı yapıların kondense olması ile meydana gelen kumarinler.....	12
2.5.5. Piron halkasına halkalı yapıların kondense olması ile meydana gelen kumarinler.....	13
2.6. Karbonik anhidraz.....	14
2.7. Karbonik anhidraz izoenzimleri.....	16
2.8. Karbonik anhidrazın önemli inhibitörleri.....	17
2.9. Çalışmanın Amacı.....	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Bitki materyali.....	19
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	19

3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar	19
3.1.4. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	20
3.1.5. Kullanılan revelatörler	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. İzolasyon için ekstrenin hazırlanması	21
3.2.2. Diğer ekstrelerin hazırlanması	22
3.2.3. Kromatografik yöntemlerle çalışmalar	22
3.2.4. Ekstreler ve AD-1 üzerinde karbonik anhidraz izoenzimleri aktivite çalışmaları	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Deneysel Bulgular	31
4.1.1 İnce tabaka kromatografisi sonuçları	31
4.2. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Spektral Bulgular	31
4.3. Ekstreler ve Major Saf Madde AD-1'in hCA I ve hCA II izoenzimleri Üzerine Aktivasyonunu Gösteren Bulgular	68
4.3.1. Etanol ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği	68
4.3.2. Diklormetan ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği ..	69
4.3.3. <i>n</i> -Hekzan ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği	70
4.3.4. Metanol ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği	71
4.3.5. Herniarinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	74
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

^{13}C -NMR	Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans
^1H -NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
1-D	1 boyutlu
2-D	2 boyutlu
COSY	Two Dimensional ^1H -Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Dublet
<i>dd</i>	Dubletin dubleti
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMSO- d_6	Dötero dimetilsülfoksit
EN	Erime noktası
g	Gram
H	Hidrojen
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multi Bond Coherence
Hz	Hertz
IR	Infrared
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	jiromanyetik sabiti
KK	Kolon Kromatografisi
<i>m</i>	Multiplet
<i>m/z</i>	Kütle/İyon
MA	Molekül Kütlesi
mg	Miligram
MHz	Mega Hertz
ml	Mililitre
MS	Kütle Spektrometresi
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans

<i>o-</i>	Orto
<i>p-</i>	Para
ppm	Milyonda bir (NMR spektrumlarında ölçü) ve konstrasyon birimi
<i>s</i>	Singlet
<i>s.</i>	Sayfa
<i>sec-</i>	Sekonder
SKK	Silika jel Kolon Kromatografisi
subsp.	Alt tür
<i>t</i>	Triplet
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>A. dracunculus</i> L. bitkisi.....	4
Şekil 3.1. Ekstraksiyon işlemi.....	21
Şekil 3.2. İzolasyon işlemi.....	23
Şekil 4.1. AD-1 bileşiğinin IR Spektrumu.....	34
Şekil 4.2. AD-1'in 2 veya 3 bağ üzerinden heteronükleer (H→C) bağ korelasyonları..	35
Şekil 4.3. AD-1 maddesinin (herniarin) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu...	36
Şekil 4.4. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	37
Şekil 4.5. AD-1 maddesinin (herniarin) DEPT 90-135 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu....	38
Şekil 4.6. AD-1 maddesinin (herniarin) ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	39
Şekil 4.7. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu ..	40
Şekil 4.8. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu ..	41
Şekil 4.9. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu ..	42
Şekil 4.10. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	43
Şekil 4.11. AD-2 maddesinin ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	46
Şekil 4.12. AD-2 maddesinin ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	47
Şekil 4.13. AD-2 maddesinin DEPT 90 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	48
Şekil 4.14. AD-2 maddesinin DEPT 135 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	49
Şekil 4.15. AD-2 maddesinin ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	50
Şekil 4.16. AD-2 maddesinin ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	51
Şekil 4.17. AD-2 maddesinin ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	52
Şekil 4.18. AD-3 maddesinin ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	54
Şekil 4.19. AD-3 maddesinin ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	55
Şekil 4.20. AD-3 maddesinin DEPT (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	56
Şekil 4.21. AD-3 maddesinin ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	57
Şekil 4.22. AD-3 maddesinin ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	58
Şekil 4.23. AD-3 maddesinin ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu	59
Şekil 4.24. AD-4 maddesinin ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	61
Şekil 4.25. AD-4 maddesinin ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.....	62
Şekil 4.26. AD-4 maddesinin DEPT 90 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrum	63

Şekil 4.27. AD-4 maddesinin DEPT 135 (CDCl ₃ , 400 Mz) spektrumu	64
Şekil 4.28. AD-4 maddesinin ¹ H- ¹ H COSY (CDCl ₃ , 400 Mz) spektrumu.....	65
Şekil 4.29. AD-4 maddesinin ¹³ C- ¹ H HMQC (CDCl ₃ , 400 Mz) spektrumu	66
Şekil 4.30. AD-4 maddesinin ¹³ C- ¹ H HMBC (CDCl ₃ , 400 Mz) spektrumu	67
Şekil 4.31. Etanol ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği.....	68
Şekil 4.32. Etanol ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği	69
Şekil 4.33. Diklorometan ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği.	69
Şekil 4.34. Diklorometan ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği.....	70
Şekil 4.35. <i>n</i> -Hekzan ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği.....	70
Şekil 4.36. <i>n</i> -Hekzan ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği	71
Şekil 4.37. Metanol ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği.....	71
Şekil 4.38. Metanol ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği.....	72
Şekil 4.39. Herniarin insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği	72
Şekil 4.40. Herniarin insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>A. dracunculus</i> L.'tan izole edilen bileşikler ve sınıflandırılması.....	8
Çizelge 3.1. Ölçülen aktivite tayini işlemleri için kullanılan maddeler, kontrol tüpü ve numune tüpleri	28
Çizelge 4.1. Saf maddelerin farklı çözücü sistemlerindeki R_f değerleri.....	31
Çizelge 4.2. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri	68



1. GİRİŞ

Doğadaki dengenin temel unsurlarından biri olan bitkiler, geçmişten bu yana insanlar için çok önemli görevlere sahip olmuştur. Bitkiler insanlar için hep ihtiyaç maddesi olmuştur (Gezgin *et al.* 2006; Faydaoğlu *et al.* 2011). İnsanlar bitkileri özellikle beslenmek, ısınmak ve hastalıkları iyileştirmek gibi temel ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla kullanmıştır (Balkaya *et al.* 2001). Arkeolojik kazılarda elde edilen bulgular da insanların bitkilerden faydalandığını ispat etmektedir. İnsanların çeşitli ihtiyaçlarını karşılamak için bitkileri kullandığına dair ilk bulgular Kuzey Irak'ta Şanidar Mağarası'nda yapılan arkeolojik kazılarda ortaya çıkmıştır. Bu kazılarda günümüzden yaklaşık iki yüz bin ile yirmi sekiz bin yıl önce yaşamış insan mezarlarındaki kalıntılardan insanların bitkileri kullandığı tespit edilmiştir (Lewin R. *et al.* 2000; Heinrich *et al.* 2004). Geçmişten günümüze kadar insanların bitkilere olan ilgisi, bitkileri araştırma ihtiyacını ortaya çıkarmıştır ve bunun sonucunda da etnobotanik bilim dalı doğmuştur (Koçyiğit *et al.* 2005).

İnsanlığın var olmasından bu yana insanlar çeşitli hastalıklarla mücadele etmek zorunda kalmıştır. Modern tıbbın gelişmediği dönemlerde hastalıkların tedavisinde bitkiler şifa kaynağı olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) hastalıkların tedavi edilmesi için ilk olarak bitkisel kaynaklardan faydalanılması gerektiğini bildirmiştir (Farnsworth *et al.* 1985; Faydaoğlu *et al.* 2011). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yürütülen araştırmalara göre insanların dörtte üçünün geleneksel tıba güvendiği ve tedavi olmak için otsu bitkiler kullandığı ortaya çıkmıştır (Azaizeh *et al.* 2010).

Yirminci yüzyılda bitkisel ilaç kaynakları, bitkilerden saflaştırıldıktan sonra saf madde olarak kullanılmaya başlanmıştır. Aynı zamanda doğal ürünlerin sentetik olarak üretimi de önem kazanmıştır. Bitkilerden saf betabolitlerin izolasyonu ve sentetik ilaç üretiminin hız kazandığı bu dönemlerde saf etken maddeler endüstriyel ilaç olarak kullanılmıştır. Milattan sonraki yıllarda tedavilerde kullanılan ilaçların %25'lik kısmını bitki kökenli ilaçlar oluşturmuştur (Principe *et al.* 1991; Koçer *et al.* 2012). Günümüzde sentetik kimyasal maddelerden kaynaklanan olumsuz sonuçlar ve bu kimyasal

maddelerin ortaya çıkardığı yeni hastalıklar bitkilerin ve bitkisel kaynaklı doğal ilaçların kullanımını ve aynı zamanda pazar payını da arttırmıştır. Örneğin dünya ekonomisinde büyük güce sahip olan Amerika’da sadece diyet tedavisinde kullanılan bitkilere yıllık 1,5 milyar dolar civarında önemli bir bütçe ayrılmaktadır (Çelik *et al.* 2007).

Türkiye’de yetiştirilen aromatik bitkiler sadece tıbbi amaçlarla değil farklı amaçlarda da kullanılmaktadır. Kurutulup baharat olarak, bitki çayı, temizlik ürünü ve kozmetik ürünü olarak da tercih edilmektedir (Özcan *et al.* 2008).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Artemisia* Türleri

Bitki kaynaklı doğal ürünler geleneksel tıpta geçmişten bu yana temel ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır. *Artemisia* (Pelinotugiller) türleri yaklaşık 23.000 tür ve 1.535 cinse sahip *Asteraceae* familyasına ait bitkilerdir. Bu türler çok farklı üreme davranışı gösterirler ve değişik uçucu yağ içeriğine sahiptirler. Bu türdeki bitkiler antifungal, insektisidal, allelopatik ve antibakteriyel gibi birçok karakteristik özelliklerinden dolayı endüstriyel olarak oldukça önemlidir (Karimi *et al.* 2015). Türkiye’de *Artemisia* cinsine ait 22 tür bulunduğu bilinmektedir (Baytop *et al.* 1984; Davis *et al.* 1982).

Artemisia türleri çok geniş alana yayılmış olup geleneksel tıpta tedavi edici özelliklere ve yüksek ekonomik değere sahip bitkilerdir (Reza *et al.* 2015). Bu cinsteki bitkilerin diyabet, gastrointestinal bozukluklar ve hipertansiyon gibi hastalıklarda geleneksel ilaç olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Aglarova *et al.* 2008)

2.2. *Artemisia dracunculus* L.

Artemisia dracunculus L. küçük çalı şeklinde ve çok yıllık bir bitki türüdür (Sayyah *et al.* 2004; Chauhan *et al.* 2010). *Artemisia* cinsine ait olan bu bitki türü yüksek fenotip ve genotip çeşitlilik gösterir. *A. dracunculus* L. bitkisi Japonya, Hindistan, İran, Avrupa, Kuzey Amerika ve Çin’de yayılış gösterir (Hooker *et al.* 1890; Karimi *et al.* 2015). Bitki tıbbi özelliklere sahip olmasının yanında yenilmekte, salata ve sirke yapımında da kullanılmaktadır (Poulev *et al.* 2004).



Şekil 2.1. *A. dracunculus* L. bitkisi

A. dracunculus L., literatürde çeşitli anlamları da kapsayan “Tarragon” genel ismiyle bilinmektedir. Tarragon adı ejderha otu, ejderha acı otu, küçük ejderha otu, tarhun, yalancı tarhun gibi farklı anlamlarda kullanılmıştır. Bitki Anadolu’da ise yaygın bir şekilde “Tarhun” ismiyle tanınmaktadır (Kordali *et al.* 2005; Aglarova *et al.* 2008). Bitkinin tarihte ilk defa Çinliler tarafından MÖ 2000’li yıllarda kullanıldığı rapor edilmiştir. Tarhun bitkisinin “Türk tarhunu”, “Fransız tarhunu” ve “Rus tarhunu” olmak üzere yaygın olan üç türü olduğu bilinmektedir. Bunlardan Türk tarhunu ile Fransız tarhununun birbirine en çok benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Türközü *et al.* 2014).

Ülkemizde özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde taze baharat olarak kullanılan tarhun, çorbalara, tavuk, balık ve deniz ürünlerine, av etlerine ilave edilip lezzet verici olarak kullanılmaktadır (Asımgil *et al.* 1997; Türközü *et al.* 2014). Tarhunun baharat olarak kullanılması dışında çeşitli içecekler, çay, sirke, hardal hazırlanmasında da kullanıldığı bilinmektedir. Tarhun ayrıca meze, salata ve et yemeklerinin yanında garnitür olarak da kullanılmaktadır (Aglarova *et al.* 2008).

Tarhunun Abu Mansur, İbn-i Sina ve Ibn Baitar tarafından ateş düşürücü etkiye sahip olduğu, üst solunum yollarını ve balgamı temizlediği, solunumu rahatlattığı, ilaç hoşnutsuzluğunu giderdiği ve iyi bir uyku etkisine sahip olduğu gibi tedavici edici

özellikleri olduğu rapor edilmiştir (Nuraliev *et al.* 1991; Kupriyanov *et al.* 1998; Aglarova *et al.* 2008). Bitkinin kurutulmuş toprak üstü kısımları İran geleneksel tıbbında epilepsi tedavisi için kullanılmıştır (Aqili Khorasani *et al.* 1992). Tarhunun orta çağda Ermenistan'da habis ülser tedavisinde ve veba salgınlarında içecek olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. Avrupa'da iştah açıcı, gaz giderici, sindirimi kolaylaştırıcı, yatıştırıcı, epilepside antikonvülsan etkili, hastalık nöbetlerinde, vitaminsizlikte kullanıldığı rapor edilmiştir (Aglarova *et al.* 2008).

Bitkinin yapraklarından elde edilen su ekstresinin fruktozlu içme suyu verilen ratlarda antinosiseptif ve antienflamatuar etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Reza *et al.* 2015). Geleneksel tıpta sindirim kanalı hastalıklarının tedavi edilmesinde *A. dracunculus* L.'un kullanılmasını destekleyen bir çalışmada ratlarda bitkinin uçucu yağlarının antidiyareik özellik gösterdiği anlaşılmıştır (Amin *et al.* 2015). Başka bir çalışmada, *A. dracunculus* L.'un yapraklarının en yüksek kumarin içeriğinin metanol ekstresi olduğu ve bu ekstrenin antikoagülant aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Duric *et al.* 2015). *A. dracunculus* L.'un uçucu yağlarının antibakteriyel ve antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre gıda sanayisinde sentetik koruyucu ve antioksidan maddelerin yerine *A. dracunculus* L.'un uçucu yağının kullanılabileceği rapor edilmiştir (Chaleshtori *et al.* 2013).

A. dracunculus L.'un antienflamatuar ve antidiyabetik aktivitelere sahip olduğu ayrıca bitkinin uykusuzluk, alerjik döküntüler ve dermatif tedavilerinde kullanıldığı bilinmektedir (Sayyah *et al.* 2004; Obolskiy *et al.* 2011). Bitkinin ekstrelerinin insan iskelet kas kültüründe enflamatuvarı azaltarak insülin hassasiyetini iyileştirdiği rapor edilmiştir (Vandanmagsar *et al.* 2014).

Başka bir çalışmada *A. dracunculus* L. etanol ekstresinin yaşlılığa bağlı kas kaybı obezitetlerinin tedavisinde güçlü iyileştirici etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Kirk-Ballard *et al.* 2014). Ayrıca bitkinin uçucu yağlarının çevresel ve merkezi antinosiseptif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Maham *et al.* 2014).

2.3. *Artemisia dracunculus* L. Bitkisinden İzole Edilen Saf Metabolitler ve Bu Metabolitlerin Biyolojik Aktiviteleri

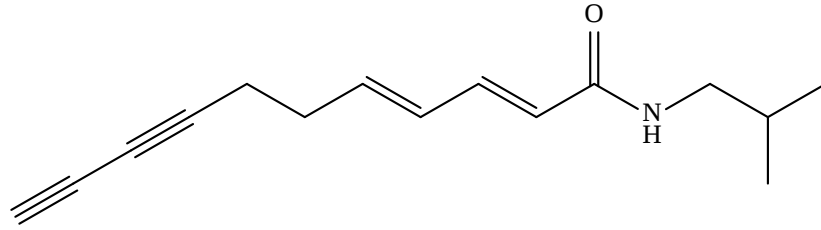
A. dracunculus L. bitkisinin içeriğinde önemli biyolojik aktivitelere sahip uçucu yağlar, flavanoitler, fenolkarbonik asitler ve kumarinler olduğu rapor edilmiştir (Deans and Svoboda 1988; Stubbendieck *et al.* 2003; Sayyah *et al.* 2004; Heidari *et al.* 2014). Bitkinin toprak üstü kısımları %0,15-3 oranında uçucu yağ içerdiği, diğer temel bileşenlerin ise izokumarin türevleri, asetilen ve aromatik bileşikler ile yağ asitleri olduğu bilinmektedir (Deans and Svoboda 1988; Meepagala *et al.* 2002; Sayyah *et al.* 2004; Kordali *et al.* 2005; Curini *et al.* 2006).

Estrajol ve metil ujenol *A. dracunculus* L. bitkisinin uçucu yağlarının temel bileşenleridir ve toksik etkiye sahiptir. Ayrıca estrajolün insanlar üzerinde faydalı fizyolojik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Aglarova *et al.* 2008; Obolskiy *et al.* 2011). Tarhun uçucu yağlarının %95.91 oranında monoterpen hidrokarbon ve %0.46 oranında seskiterpen hidrokarbonları içerdiği rapor edilen bir çalışmada tarhunun sığırtı gibi et ürünlerinde antibakteriyel ajan olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır (Chaleshtori *et al.* 2014).

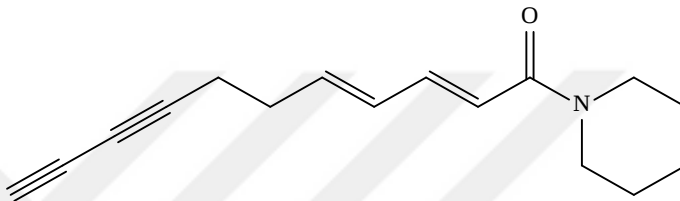
A. dracunculus L.'un toprak üstü kısımlarının petrol eteri ile ekstrakte edildiği bir çalışmada bitkiden pellitorin, neopellitorin A, neopellitorine B alkamitleri ile herniarin kumarin türü bileşiği izole edilmiştir. Aynı çalışmada bu bileşiklerin *Sitophilus oryzae* ve *Rhyzopertha dominica* böceklerine karşı insektisidal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Saadali *et al.* 2001).

A. dracunculus L.'tan izole edilen diğer bileşikler flavanoitler, fenilpropanoitler, kromonlar, kumarinler, alkamitler ve benzodiazepin türü bileşiklerdir (Obolskiy *et al.* 2011).

2012 yılında yapılan bir çalışmada ilk defa bitkiden sitokrom P450 (CYP) inhibitörü olan iki madde izole edilmiştir (Brahmi *et al.* 2012).

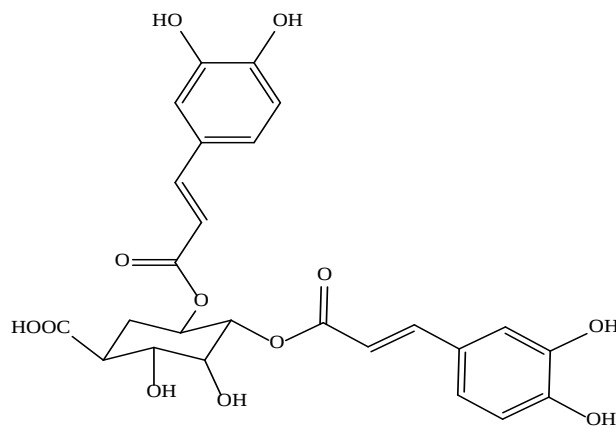


2*E*,4*E*-undeka-2,4-dien-8,10-diyonik asit izobutilamit

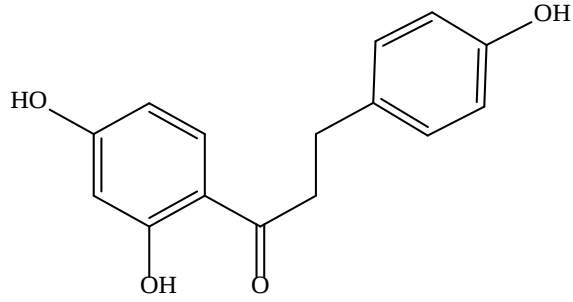


2*E*,4*E*-undeka-2,4-dien-8,10-diyonik asit piperit

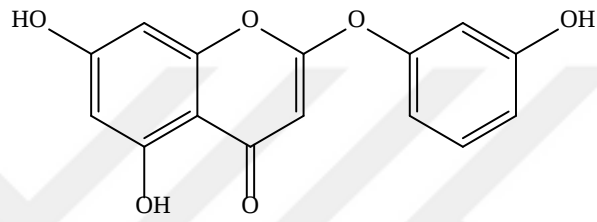
A. dracunculus L. bitkisinden izole edilen diğer bileşikler antispazmodik aktiviteye sahip davidigenin, 4,5-di-*O*-kafeoilkuinik asit, 6-dimetoksikapillarisin ve 2',4'-dihidroksi-4-metoksi dihidrokalkondur (Logendra *et al.* 2006; Desire *et al.* 2010).



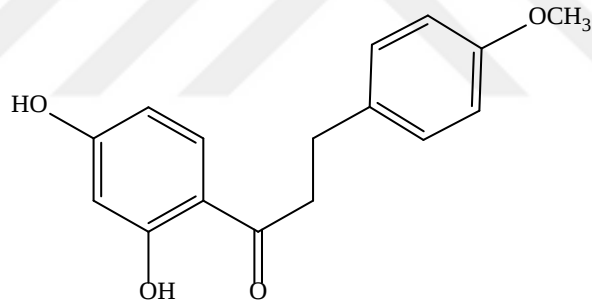
4,5-di-*O*-kafeoilkuinik asit



Davidigenin



6-Demetoksikapillarisin



2',4'-dihidroksi-4-metoksidihidrokalkon

Çizelge 2.1. *A. dracunculus* L.'tan izole edilen bileşikler ve sınıflandırılması (Obolskiy *et al.* 2011).

Flavanoitler	5,6,7,8,4'-pentahidroksimetoflavon estragonisit 7-O-β-D-glukopiranosit 5,7- dihidroksiflavavon pinosebrin 7-O-β-D-glukopiranosit luteolin kuercetin rutin kaempferol	(Aglarova <i>et al.</i> 2008) Supilnikova 2004 (Balza and Towers, 1984) (Kurkin <i>et al.</i> 1997) (Hofer <i>et al.</i> 1986) (Venskutonis <i>et al.</i> 1996)
--------------	---	--

Çizelge 2.1. (devam)

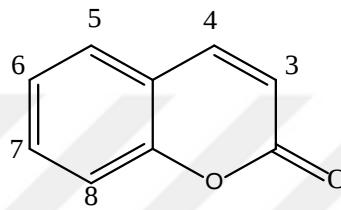
	annangenin 5,7-dihidroksiflavan naringenin 3,5,4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon 3,5,4- trihidroksi-7,3'-dimetoksiflavanon 2',4'-dihidroksi-4-metoksidihidrokalkon davidigenin sakuranetin	
Fenilpropanoitler	şikorik asit hidroksibenzoik asit (E)-2-hidroksi-4-metoksisinnamik klorojenik asit kafeik asit 5-O-caffeoylquinic acid 4,5-di-O-caffeoylquinic acid	(Supilnikova 2004) (Hofer <i>et al.</i> 1986) (Venskutonis <i>et al.</i> 1996)
Kromonlar/kumarinler	herniarin (-)-(R)-2'-metoksidihidro artemidin (+)-(S,R)-epoksiartemidin drasumerin (+)-(R)-(E)-3'-hidroksiartemidin kapillarin izovalerate 7,8-metilendioksi-6-metoksikumarin eskuletinin γ,γ -dimetilallil eteri skopoletin skoparon dafnetin metilen eter dafnetin 7-metil eterr artemidiol 4-hydroxycoumarin artemidin artemidinal artemidinol eskulin kapillarin 8-hidroksikapillarin 8-hidroksiartemidin 6-dimetoksikapillarisin	(Aglarova <i>et al.</i> 2008; Chumbalov and Mukhamed'yarova, 1970; Herz <i>et al.</i> 1970; Kordali <i>et al.</i> 2005; Mallabaev <i>et al.</i> 1971; Onuchak <i>et al.</i> 2000; Saadali <i>et al.</i> 2001; Venskutonis <i>et al.</i> 1996)
Alkamitler	pellitorin neopellitorin A neopellitorin B	(Saadali <i>et al.</i> 2001)
Benzodiazepinler	delorazepam temazepam	(Kavvadias <i>et al.</i> 2000)

2.4. Kumarinler

Doğal ürünlerden izole edilerek elde edilen kumarinler, farmakoloji bilimi için oldukça önemli biyoaktif maddelerdir (Gomez-Verjan *et al.* 2015). Kumarinler ilk defa 1820 yılında izole edilip, farmasötik endüstrisinde antikoagülan ilaç sentezinde ön madde

olarak kullanılmıştır. Kumarinler bir çeşit K vitamini antagonistidirler ve birçok ülkede warfarin, asenokumarol ve fenprokumon isimleriyle kullanılmaktadır (Matos *et al.* 2015).

Kumarinlerin temel kimyasal yapıları doğada fazla miktarda bulunan benzopiron (1,2-benzopiron ya da 2H-1-benzopiran-2-on) iskeletine sahiptir (Venugopala *et al.* 2013).



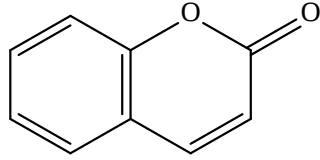
benzopiron (1,2-benzopiron ya da 2H-1-benzopiran-2-on)

Kumarinler ilk izole edildiklerinden bu yana parfüm, kozmetik, katkı maddesi endüstrisinde, alkollü içeceklerde, aroma olarak tütünlerde kullanılmıştır. Kokuları yeni biçilmiş saman kokusunu anımsatır ve bitkilerde zararlılara karşı savunma amacıyla sentezlendikleri tahmin edilmektedir (Fais *et al.* 2009).

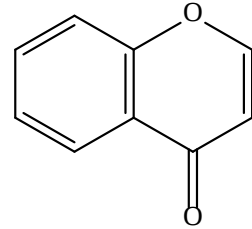
Kumarinlerin farmakolojik aktivitelerinden dolayı ilaç üretiminde kullanımları oldukça yaygındır. Özellikle bu tür maddelerin düşük toksite, yüksek ilaç direnci, geniş spektrum ve iyi tedavi etme gibi özelliklerinden dolayı ilaç olarak kullanımları fazladır (Matos *et al.* 2015). Ayrıca kumarinlerin antitümör, antihiv, kardiyoprotektif, vasodilatör ve Ca^{+2} antagonist aktivitesi gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip oldukları rapor edilmiştir (Sollai *et al.* 2008).

Benzopiranlar, piron halkasının benzen halkasıyla kondensasyonu sonucu oluşan heterosiklik bileşiklerdir. Heterosiklik halkadaki karbonil grubunun konumuna göre iki gruba ayrılırlar. Birincisi α -piron halkasının benzen halkasına kondensasyonu ile oluşur ve kumarin olarak adlandırılır. İkincisi γ -piron halkasının benzen halkasına

kondensasyonu ile oluşur ve kromon olarak adlandırılır (Sethna *et al.* 1944; Koçak *et al.* 2011).



Kumarin (benzo- α -piron)

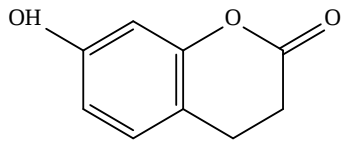


Kromon (benzo- γ -piron)

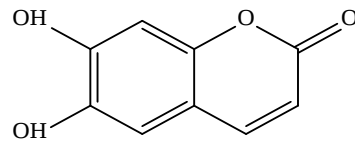
2.5. Kumarinlerin Türevleri

2.5.1. Benzen halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler

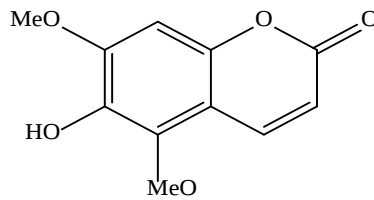
Kumarinlerin benzen halkasına farklı süstitüentlerin bağlanmasıyla mono-di-tri süstitüe kumarinler meydana gelir.



7-hidroksikumarin



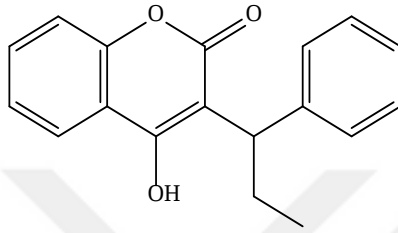
6-7 -Dihidroksikumarin



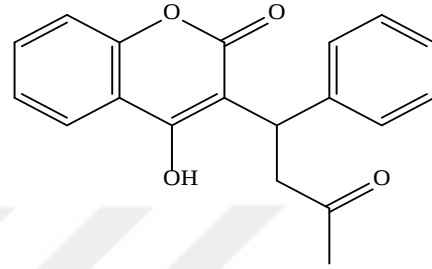
6-hidroksi-5,7 dimetoksikumarin

2.5.2. Piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler

Kumarinlerin piron halkasına değişik süstitüentlerin bağlanmasıyla mono ve di süstitüe kumarinler meydana gelir.

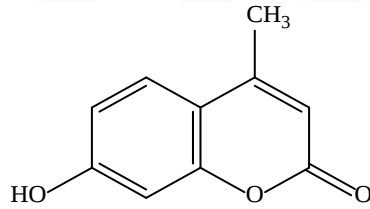


Fenprokumon

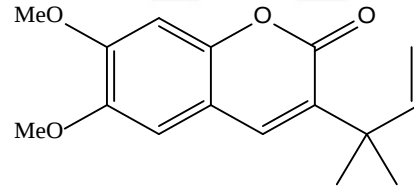


Warfarin

2.5.3. Hem benzen hem de piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler



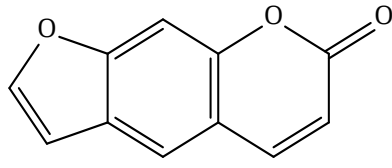
4-Metilumbelliferon



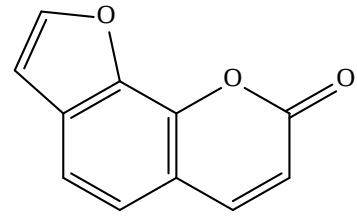
Ratakultin

2.5.4. Benzen halkasına halkalı yapıların kondense olması ile meydana gelen kumarinler

Furanokumarinler: Bu bileşikler kumarine beş üyeli furan halkasının bağlanmasıyla oluşurlar.

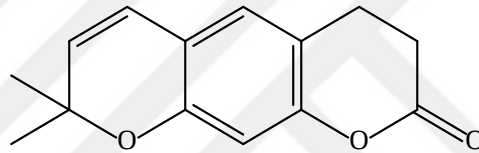


Psoralen



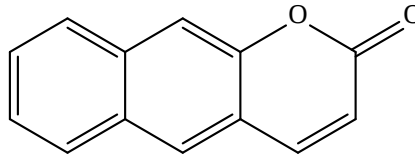
Anjesilin

Piranokumarinler: Kumarinin benzen halkasına bir piron halkasının kondense olmasıyla oluşurlar.



Xsantiletin

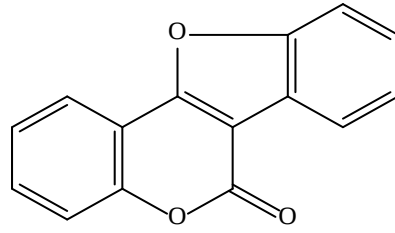
Benzokumarinler: Kumarinin benzen halkasına bir benzen halkasının kondense olmasıyla benzokumarinler meydana gelir.



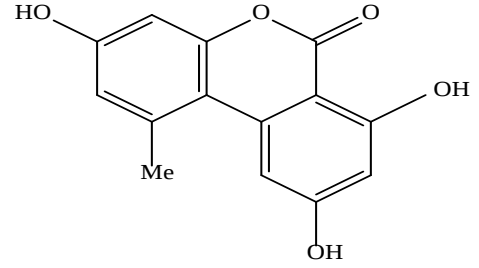
Benzokumarin

2.5.5. Piron halkasına halkalı yapıların kondense olması ile meydana gelen kumarinler

Kumarinin piron halkasının 3 ve 4 konumundaki karbon atomlarına beş veya altı üyeli halkalı yapıların kondensasyonu ile oluşan kumarin türevleridir.

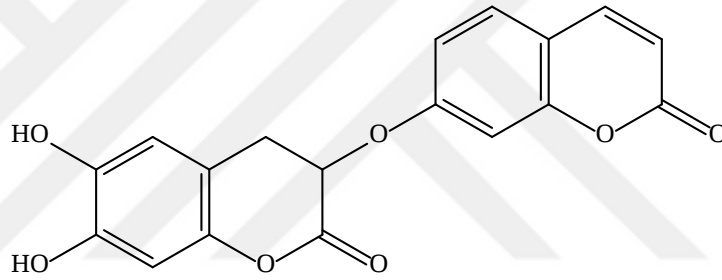


Kumestan



Aeterniyol

Dimerkumarinler: Demetildafnoretin ve dikumarol gibi biskumarinler iki kumarin biriminin birbirine bağlanmasıyla oluşur (Lacy *et al.* 2004).



Dimetildafnoretin

2.6. Karbonik anhidraz

Karbonik anhidraz (CA) enzimi, ilk defa 1933 yılında insanda keşfedilmiştir (Meldrum and Roughton 1933). Daha sonra sığırdada, suda yaşayan canlılarda, bitki, mantar, böcek ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Krungkrai *et al.* 2001; Ekinici *et al.* 2013).

Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmıştır. Bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir (Demirdag *et al.* 2013). Hall and Schraer (1983) gökkuşuğu alabalık (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden CA enzimini kloroform-etanol

ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Bio-jel iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır.

CA enzimleri, hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamit, dorzolamit ve brinzolamit gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül *et al.* 2002). Örneğin insanlarda glukom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak, ayrıca ödem ve epilepsi tedavilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte birçok kimyasal madde ve atıklar da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, kemikli balıklardan olan yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun *in vitro* şartlarda, hem solungaç hem de barsak CA izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisini araştırmış, solungaç ve barsak homojenatlarında CA aktivitelerinin önemli oranda inhibe olduğunu belirlemişlerdir (Krungkrai vd 2001).

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir (Arslan 1994).

CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO₂/bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO₂ homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al.* 2000).

2.7. Karbonik anhidraz izoenzimleri

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik pH değerinin farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

Hayvanlar aleminde CA'nın 16 izoenzimi vardır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA-I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.* 2004; Supuran 2008). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori 2004; Hilvo *et al.* 2005).

İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükrük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett-Emmett 2000; Sugrue 2000).

CA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde CA-I izoenzimi yanında CA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO_2 'i, HCO_3^- 'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO_3^- 'ın CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. CA-I izoenziminin turnover sayısı $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu CA-II kadar açık değildir. CA-I eksikliği sendromu

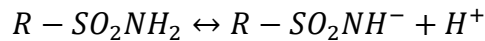
belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001).

CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 C’de 106 s^{-1} olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan CA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer CA-I’e kıyasla daha azdır.

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan CA-II izoenziminin önemi, glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (Renzi *et al.* 2000). Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan CA-II izoenzimi ile Na^+ ve H_2O ’nun geri emilimi sağlanmaktadır. CA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da; kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da CA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren *et al.* 1997).

2.8. Karbonik anhidrazın önemli inhibitörleri

Yapılan çalışmalarda CA enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



Sülfonamidlerin bu özelliği CA enziminin üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarak da kullanılmaktadır (Roughton and Booth 1946; Tozlu 1997).

Glokom hastalığı tedavisinde CA enziminin güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid ilacı kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan CA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Bülbül *et al.* 2002; Supuran 2008; Isık *et al.* 2015).

2.9. Çalışmanın Amacı

Artemisia dracunculus L. bitkisi ülkemizde özellikle Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde taze baharat olarak tüketilmekte ve tarhun yaygın adıyla tanınmaktadır. Bitki özellikle epilepsi hastalığına karşı tedavi edici etkiye sahip olmasının yanında birçok farmakolojik aktiviteye de sahiptir. Tarhunun epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılması ve de CA enzimlerinin epilepsi ve glokom hastalıkları ile ilişkisi nedeniyle, bu çalışmada *A. dracunculus*'un CA-I ve II izoenzimlerine karşı etkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramasında *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin ekstre ve saf metabolitlerinin insan CA-I ve II izoenzimlerine karşı inhibe edici etkileri ile ilgili bir çalışmanın mevcut olmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin ekstre ve saf metabolitlerinin insan CA-I ve II izoenzimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Bu çalışmada bitki materyali olarak Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) bitkisinin toprak üstü kısımları kullanıldı. Bitkinin kurutulmuş haldeki toprak üstü kısımları 2015 yılı Mayıs ayı içerisinde Erzurum ilinde aktardan ticari olarak satın alındı ve Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda muhafaza edildi.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Bu çalışmanın ekstraksiyon, izolasyon ve yapı karakterizasyonu aşamalarında kimyasal madde olarak vanilin, metanol, etanol, aseton, kloroform, etilasetat, dietileter, aseton, diklormetan, *n*-hekzan, heptan, sülfürik asit (%98), piridin (Sigma-Aldrich, Merck) ve dötere kloroform (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

Enzim aktivasyonu belirleme çalışmalarında kullanılmak üzere ise selüloz, *p*-nitrofenil asetat, standart serum albumin ve bezoilklorür Sigma Chemical Company'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, G-250, coomassie brilliant blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar

NMR Spektrometre	: Bruker 400 MHz
IR Spektrometre	: Thermo Scientific

Erime Noktası Tayin Cihazı	: Stuart SMP30
Spektrofotometre	: Perkin-Elmer
Rotary Evaporatör	: Heidolph 94200
UV Lambası	: Camag UV Bethrachter
UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	: Sanyo, Japan
pH metre	: Hanna Instrument
Hassas terazi	: Scaltec SBA 41
İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	: Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	: Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.1.4. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Kolon Kromatografisi: Silika jel (Kiesel gel 60, 70-230 mesh, Merck; Kiesel gel 60, 230-400 mesh, Merck)

İnce Tabaka Kromatografisi: Silika jel (Hazır plak, Kiesel gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm, Merck, 5554)

Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi: Silika jel (Hazır plak, Kiesel gel 60 F₂₅₄, 0,5 mm, Merck 5557)

3.1.5. Kullanılan revelatörler

Vanilin/Sülfürik asit: Vanilinin %1'lik derişik H₂SO₄ (%98) içindeki çözeltisi (püskürtmeden sonra kromatogram 105°C'de birkaç dakika ısıtılır).

UV Lambası: UV₂₅₄ nm ve UV₃₆₆ nm

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolasyon için ekstrenin hazırlanması

Tarhun bitkisinin ekstreleri üzerinde yapılan CA-I ve II izoenzimlerine karşı enzim inhibisyonu aktivitesinin belirlendiği ön çalışmalarda en etkili ekstrenin CH₂Cl₂ ekstresi olması nedeniyle, izolasyon için bitkinin CH₂Cl₂ ekstresi hazırlandı. Bu amaçla kurutulmuş halde satın alınan 1900 gram tarhun bitkisi blendırda öğütüldü ve 6 L CH₂Cl₂ ile oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek ekstrakte edildi. Aynı işlem 5 defa tekrarlandıktan sonra elde edilen ekstreler adi süzgeç kağıdı ile süzüldü ve süzüntüler birleştirildi. Süzüntüdeki CH₂Cl₂ bir Rotary evaporatör ile düşük sıcaklık ve basınçta ile uzaklaştırıldı ve 104 g ekstre elde edildi. Verim %5,47 olarak belirlendi. İzolasyon işlemleri dışında biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere CH₂Cl₂ ekstresinin 6 g ekstre ayrı olarak muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Ekstraksiyon işlemi

3.2.2. Diğer ekstrelerin hazırlanması

Biyolojik aktivite çalışmalarında doğrudan kullanılmak üzere *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin metanol, etanol ve n-hekzan organik çözücüleri ile ayrı ayrı ekstreleri hazırlandı. Bu ekstreler hazırlanırken 50 g bitki ve 500 ml çözücü kullanıldı. Ekstraksiyon oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek yapıldıktan sonra ekstre süzüldü ve aynı işlem 5 defa tekrarlandı. Süzüntüler birleştirildikten sonra çözücü bir Rotary evaporatör ile uzaklaştırıldı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda 5 g metanol ekstresi, 4,8 g etanol ekstresi ve 2 g n-hekzan ekstresi elde edildi.

3.2.3. Kromatografik yöntemlerle çalışmalar

Tarhunun CH₂Cl₂ ekstresi uygun bir organik çözücünde çözüldü ve farklı çözücü sistemlerinde İTK ile yürütüldü. İTK ile yapılan kontroller sonucunda CH₂Cl₂ ekstresinin saf metabolitlerini izole etmek üzere uygun hareketli faz sistemi CH₂Cl₂:etil asetat (50:50) olarak belirlendi. Tarhun bitkisinin CH₂Cl₂ ekstresini fraksiyonlarına ayırmak üzere SKK yapıldı. Bu amaçla ekstre (98 g) öncelikle iki eşit kısma ayrıldı ve bu iki kısım için iki ayrı kolon kuruldu. Ekstrenin birinci kısmını fraksiyonlamak için 300 g silika jel (Kiesel gel 60, 70-230 mesh, Merck) CH₂Cl₂:etil asetat (50:50) sisteminde süspansiyon haline getirildikten sonra 4x65 cm ebatlarındaki kolona tatbik edildi. Ekstre aynı çözücü sistemi ile çözüldükten sonra pasteur pipeti yardımıyla kolona yüklendi ve kolon CH₂Cl₂:etil asetat (50:50) çözücü sistemi ile elüe edildi. Fraksiyonlar 50 ml hacimler halinde toplandı ve İTK ile aynı çözücü sisteminde kontrol edildi. Aynı lekeleri içeren fraksiyonlar birleştirildi ve kolon bu şekilde sonlandırıldı. Fraksiyonlama işlemlerinin sonucunda ana ekstre toplam 7 alt fraksiyona ayrıldı. Alt fraksiyonlar ADA (1-6. Fr.), ADB (7-10. Fr.), ADC (11-17. Fr.), ADD (18-21. Fr.), ADE (22-56. Fr.), ADF (57-79. Fr.) ve ADG (80-82. Fr.) olarak kodlandı.

CH₂Cl₂ ekstresinin ikinci kısmı için de aynı fraksiyonlama işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 400 g silika jel (Kiesel gel 60, 70-230 mesh, Merck) CH₂Cl₂:etil asetat (50:50) sisteminde süspansiyon haline getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Ekstre aynı

ADA Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

ADA fraksiyonu düşük polaritede ve lipofilik türevi maddeler içerdiği düşünülerek bu fraksiyon üzerine her hangi bir kromatografi çalışması yapılmamıştır.

ADB Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

ADB fraksiyonu için uygun kolon sistemi İTK ile Et₂O:heptan (80:20) olarak belirlendi. Fraksiyon üzerine Et₂O:heptan (80:20) çözücü sistemi eklendiğinde fraksiyonda kendiliğinden kristallenme meydana geldi. Kristaller adi süzgeç kağıdı ile ayrılıp metanol ile iyice temizlendikten sonra İTK'da kontrol edildiğinde kristallerin temiz olduğu anlaşıldı. Saf kristaller **AD-1** (2,10 g) olarak kodlandıktan sonra ADB fraksiyonunun kalan kısmı SKK ile elüe edildi. Bu amaçla kalan ADB (7,55 g) fraksiyonu 300 g silika jel (Kieselgel 60,70-230 mesh, Merck) Et₂O:heptan (80:20) çözücü sisteminde süspansiyon haline getirildikten sonra kolona (4x22 cm) yüklendi. ADB (9,55 g) fraksiyonu aynı çözücü sisteminde çözüldükten sonra kolona tatbik edildi. Fraksiyonlar 25 ml hacimler halinde toplandı ve İTK ile kontrol edildi. Kontroller sonucunda 15-18. fraksiyonlarda (1 g) temiz bir maddenin olduğu ancak bazı safsızlıklar içerdiği anlaşıldı. 15-18. fraksiyonlardaki major maddeyi saflaştırmak için yeni bir kolon yapıldı. Bu amaçla 3x27 cm ebatlarındaki kolona tatbik edilmek üzere 100 gr silika jel (Kieselgel 230-400 mesh, Merck) etil asetat:*n*-hekzan (50:50) çözücü sisteminde süspanse edildi. Karışım aynı çözücü sisteminde çözüldükten sonra kolona damlalıklarla tatbik edildi. İTK ile yapılan kontrollerde 11-21. fraksiyonlarda madde temiz olarak elde edildi ve **AD-2** (50 mg) olarak kodlandı.

ADC Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

ADC fraksiyonu elüe etmek amacıyla uygun sistem etil asetat:*n*-hekzan (50:50) olarak belirlendi. Bu amaçla 100 gr silika jel (230-400 mesh) etil asetat:*n*-hekzan (50:50) sisteminde solüsyon haline getirilerek 3x30 cm ebatındaki kolona dolduruldu. 9,55 gr ekstre aynı çözücü sistemde çözülerek kolona tatbik edildi. Kolon 20 ml hacimlerde

fraksiyonlara ayrılırken 34-54. fraksiyonlarda majör bir madde tespit edildi. Bu maddeyi saf olarak elde etmek için yeni bir kolon yapıldı. Miktarı 800 mg olan 34-54. fraksiyonlar için etil asetat:*n*-hekzan (50:50) çözücü sisteminde 100 gr silika jel (230-400 mesh) süspansiyon haline getirildikten sonra 3x23 cm ebatındaki kolona dolduruldu. Ekstre (800 mg) aynı çözücü sistemde çözülerek kolona tatbik edildi. Elüentler 20 ml hacimlerle toplandı ve 13-15. fraksiyonlarında saf madde alındı. Madde **AD-3** (40 mg) olarak kodlandı.

ADD Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

ADD fraksiyonunu elüe etmek amacıyla hareketli faz sistemi CH₂Cl₂:etil asetat (90:10) olarak belirlendi. 200 gr silika jel (200-400 mesh) CH₂Cl₂:etil asetat (90:10) sisteminde süspanse edildikten sonra 3x83 cm ebatlarındaki kolona dolduruldu. Ekstre (30,2 g) aynı çözücü sisteminde çözülerek kolona tatbik edildi. Elüentler 30 ml hacimlerle alındı ve 53-73. fraksiyonlarda majör bir madde tespit edildi. Bu maddeyi saflaştırmak amacıyla yeni bir kolon kuruldu. Bu amaçla CH₂Cl₂:aseton (95:5) çözücü sisteminde 100 gr silika jel süspansiyon haline getirilerek 3x30 cm ebatlarındaki kolona dolduruldu. Ekstre aynı çözücü sisteminde çözülerek kolona tatbik edildi. Elüentler 15 ml hacimlerle alındı. ITK ile yapılan kontrollerde 42-47. fraksiyonlarda saf bir madde olduğu tespit edildi ve **AD-4** (30 mg) olarak kodlandı.

ADE Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

ADE fraksiyonu üzerinde yapılan kromatografik çalışmalarda saf madde alınamadı.

ADF Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

ADF fraksiyonu üzerinde yapılan kromatografik çalışmalarda saf madde alınamadı.

ADG Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

ADG fraksiyonu üzerinde yapılan kromatografik çalışmalarda saf madde alınamadı.

3.2.4. Ekstreler ve AD-1 üzerinde karbonik anhidraz izoenzimleri aktivite çalışmaları

CA-I ve II izoenzimleri üzerindeki aktivasyon belirleme çalışmaları Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK tarafından gerçekleştirilmiştir.

Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Dengeleme tamponu içerisine alınmış jel, 1x10 cm'lik filtreli cam kolona paketlenmiştir. Jel tamamen pakettendikten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı.

Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan sığır karaciğer hemojenatı kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ (pH: 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece CA enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip bCA II (sığır CA II) enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı.

CA Enzim aktivitesi tayini (Hidrataz aktivitesi)

Öncelikle hidrataz aktivitesi kullanıldı (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntem CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1ml 0.025 M veronal tamponu (pH:8,2), 0,1 ml % 0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve 2,5 ml CO₂ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t₀). Numune tüpüne ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c).

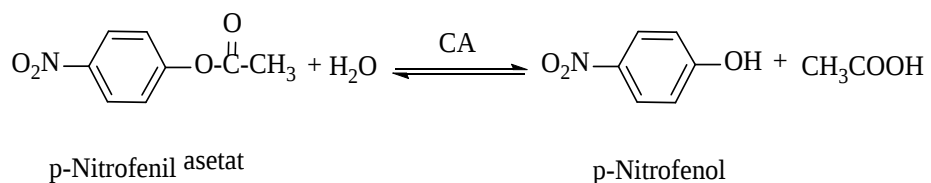
Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzim ünitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Maren 1960).

$$EU = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

Hemolizat, saf enzim çözeltisi ve inhibisyon çalışmalarında aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı. Kinetik ve inhibisyon çalışmaları için esteraz aktivite yöntemi uygulandı.

CA Enzim aktivitesi tayini (Esteraz aktivitesi)

Bu yöntem, CA'nın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; CA enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

1 ml’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı:

Çizelge 3.1. Ölçülen aktivite tayini işlemleri için kullanılan maddeler, kontrol tüpü ve numune tüpleri

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü
0,05 M Tris-SO ₄ , pH: 7,5	425	425
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	375	375
Saf su	200	190
Enzim çözeltisi	-	10
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 30 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C’de 348 nm’de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı.

Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1ml aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM’lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi. Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

Kalitatif protein tayini

Proteinlerin yapısında bulunan tirozinin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm’de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün elüatlarda kalitatif protein tayini yapıldı.

Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem, proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 ile kompleks oluşturması ve oluşturduğu yapının 595 nm’de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bradford yönteminin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

İnsan kanından saflaştırılan CA enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Örnekler jele yüklenmeden önce %1 SDS ve %10’luk 2-merkaptetanol

ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numunenin %20 ayırma jelinde elektroforezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi.

Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzim Aktiviteleri Üzerine Ekstrelerin Etkilerinin Belirlenmesi

A. dracunculus L. bitkisinden elde edilen etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstreleri ile saf AD-1 maddesinin insan CA-I ve II izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite yöntemleriyle yapıldı. Daha sonra IC₅₀ değerleri belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Deneysel Bulgular

4.1.1 İnce tabaka kromatografisi sonuçları

A. dracunculus L. bitkisinin diklormetan ekstresinden izole edilen 4 bileşiğin ince tabaka kromatografisi ile değişik çözücü sistemlerinde belirlenen R_f değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Saf maddelerin farklı çözücü sistemlerindeki R_f değerleri

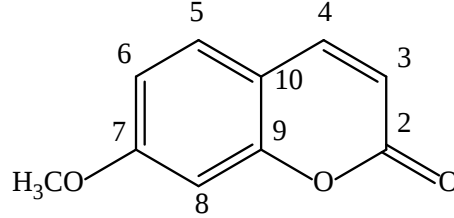
Madde	Çözücü sistemi	R_f değeri	Adsorban
AD-1	dietileter: <i>n</i> -hekzan (90:10)	0,86	Silika jel
	kloroform:metanol (90:10)	0,88	
AD-2	dietileter: <i>n</i> -hekzan (90:10)	0,65	Silika jel
	etil asetat: <i>n</i> -hekzan (50:50)	0,70	
AD-3	dietileter: <i>n</i> -hekzan (90:10)	0,53	Silika jel
	kloroform:etil asetat (90:10)	0,73	
AD-4	dietileter: <i>n</i> -hekzan (90:10)	0,64	Silika jel
	etil asetat: <i>n</i> -hekzan (50:50)	0,84	

4.2. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Spektral Bulgular

Bu bölümde *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin CH_2Cl_2 ekstresinden izole edilen AD-1, AD-2, AD-3 ve AD-4 saf maddelerinin molekül yapılarını tayin etmek üzere IR, UV, 1D ve 2D NMR yöntemleriyle elde edilen spektral bulgular değerlendirilmiştir. Yapı karakterizasyonu çalışmaları neticesinde **AD-1** bileşiğinin yapısı **herniarin** olarak belirlendi. **AD-2** bileşiğinin yapısı uzun zincirli asit olarak tahmin edildi ancak tam yapı

analiz edilemedi. **AD-3** ve **AD-4** bileşiklerinin yapısı ise NMR verilerinde görülen bazı safsızlıklardan dolayı tam olarak aydınlatılamadı.



AD-1 Kodlu Bileşik**Herniarin**

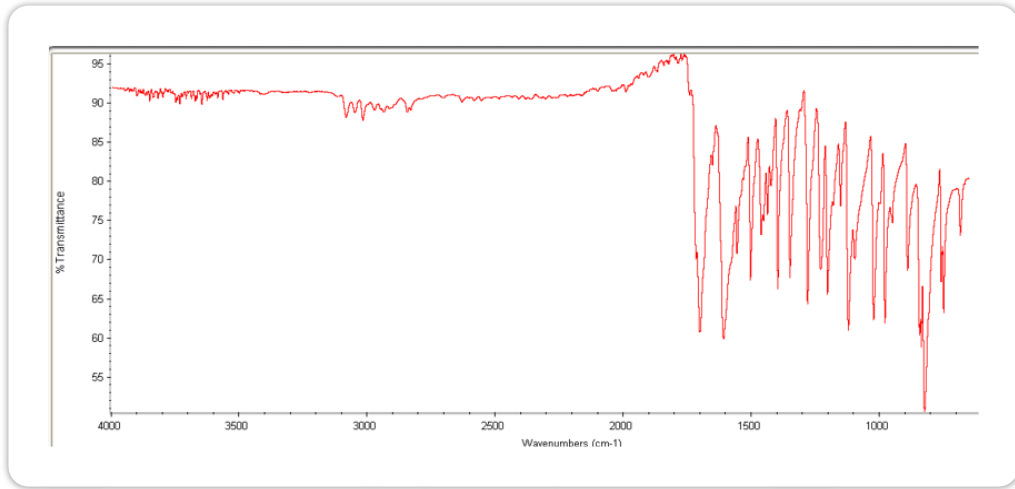
(7-Metoksikromen-2-on; 7-Metoksikumarin; 7-O-Metilumbelliferon; Metil umbelliferil eter; Ayapanin)



MA: 176 g/mol; EN: 116-117°C

Gün ışığında beyaz renkli ve kristal yapıda bir madde olarak izole edilen AD-1 bileşiği, UV₂₅₄ nm’de mor renk verirken UV₃₆₆ nm’de renksizdir. Bileşiğe vanilin/H₂SO₄ (105°C) reaktifi püskürtüldüğünde hafif pembemsi bir renk vermektedir.

Bileşiğe ait IR, 1D ve 2D NMR spektral verileri incelendiğinde bileşiğin kimyasal yapısı **herniarin** olarak karakterize edilmiştir. Bileşiğin IR spektrumu (Şekil 4.1.) incelendiğinde 3100 cm⁻¹’de C-H bağ titreşimi, 1700 cm⁻¹’de O=CH-O- titreşim bandı, 1250 cm⁻¹ ve 1600 cm⁻¹ arasında aromatik ve alifatik C=C bağ titreşim bantları, 1100 – 1200 cm⁻¹ de ise C-O bağ titreşimi olduğu görülmüştür.



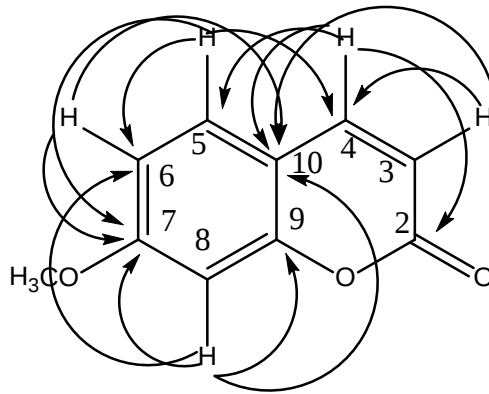
Şekil 4.1. AD-1 bileşiğinin IR Spektrumu

AD-1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu incelendiği zaman 6 farklı sinyal grubunun olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Bu sinyallerden $\delta=3,85$ ppm'de rezonans olan singlet, yapıdaki 7 numaralı karbona bağlı metoksi grubuna aittir. Diğer sinyallerin tamamı olefinik ve aromatik bölgede rezonans olmuştur. H-3 protonu H-4 protonu ile etkileşmesi sonucunda $\delta=6,22$ ppm'de d ($J=9,48$ Hz) sinyal vererek rezonans olurken, H-4 protonu da $\delta=7,63$ ppm'de d ($J=9,48$ Hz) sinyal vererek rezonans olmuştur. COSY spektrumunda (Şekil 4.6) H-3 ve H-4 olefinik protonları arasında korelasyon olduğu görülmektedir. Yine COSY spektrumunda (Şekil 4.6) birbirleriyle korele oldukları görülen H-5 ve H-6 protonlarına ait sinyaller sırasıyla $\delta=7,36$ ppm'de d ($J=8,60$ Hz) ve $\delta=6,83$ ppm'de dd ($J_1=11,04$ Hz, $J_2=6,12$ Hz) sinyal vererek rezonans olmuşlardır. H-6 protonuna ait sinyal önce H-5 ile sonra da kendisiyle etkileşerek dd sinyali vermiştir. COSY spektrumunda (Şekil 4.6) diğer protonlarla korelasyon sağlamadığı görülen ve ^1H -NMR spektrumunda $\delta=6,78$ ppm'de d ($J=2,36$ Hz) vererek rezonans olan sinyal ise H-8 protonuna aittir.

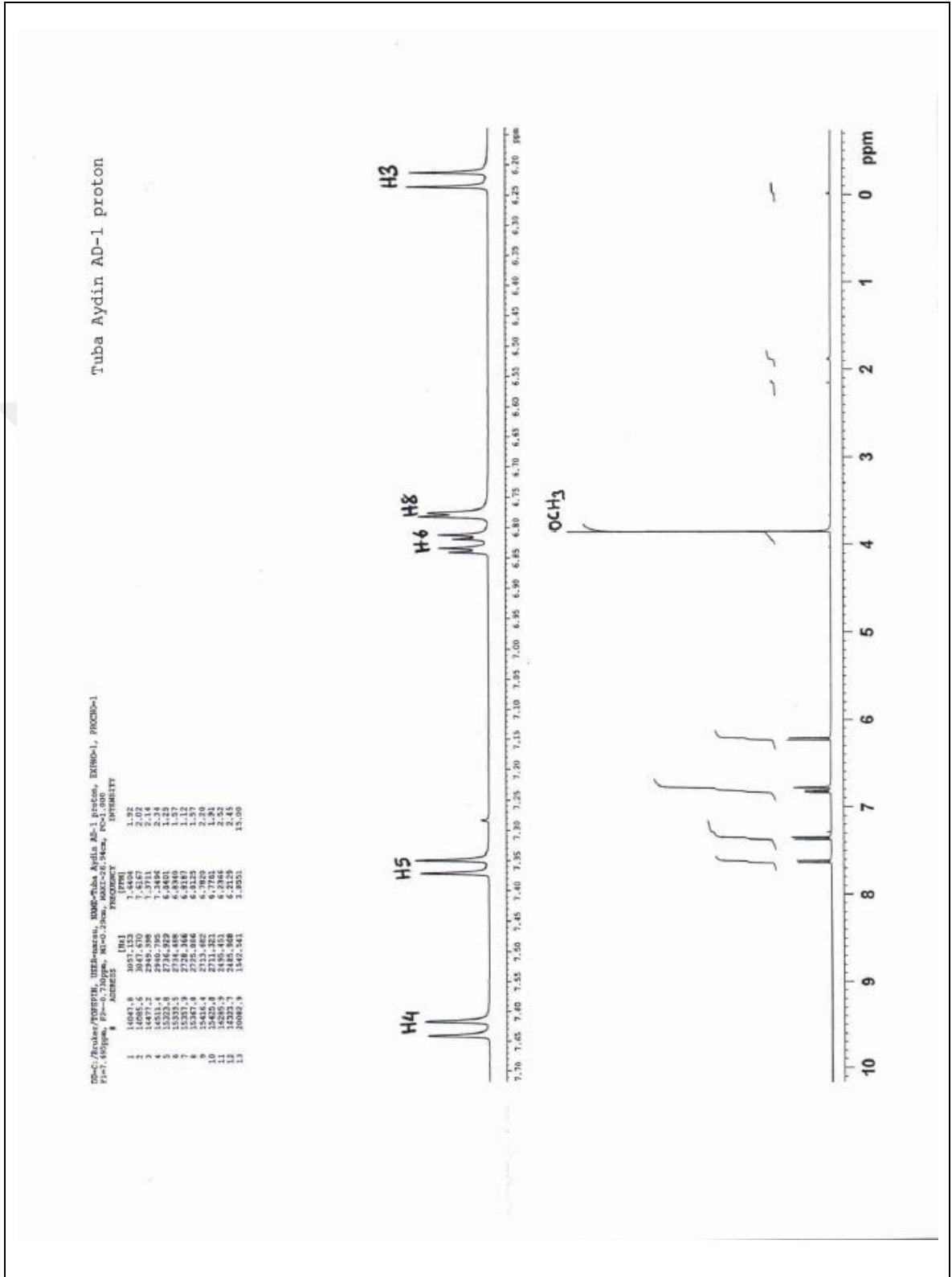
Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (Şekil 4.4) incelendiğinde toplam 9 sinyal bulunmaktadır. Bu sinyallerden $\delta=100,8$ ppm'de gözlenen pik, bileşiğin HMBC (Şekil 4.9) spektrumundan da anlaşıldığı gibi C-8 ve C-10 karbonlarına aittir. Dolayısıyla bileşiğin yapısında toplam 10 adet karbon atomu bulunmaktadır. Bileşikteki metoksi grubunun bağlı olduğu karbona ait sinyal $\delta=55,7$ ppm'de rezonans olmuştur. DEPT-90

(Şekil 4.5) spektrumunda toplam 6 adet CH sinyali, DEPT-135 (Şekil 4.5) spektrumunda ise bunlara ilaveten bir sinyal daha görülmektedir. DEPT-135 (Şekil 4.5) spektrumu ile ^{13}C -NMR (Şekil 4.4) spektrumunu karşılaştırdığımızda 150-170 ppm arasında rezonans olan 3 pikin kuvarterner karbon atomlarına ait olduğu anlaşılmaktadır. C-7, C-2 ve C-9 kuvarterner karbonlarına ait olan bu sinyaller sırasıyla $\delta=162,8$ ppm, $\delta=161,1$ ppm ve $\delta=155,8$ ppm'de rezonans olmuştur. Bileşiğin karbon-proton korelasyonlarını gösteren HMQC (Şekil 4.7) spektrumunu incelediğimizde, birbirleriyle korele olan proton ve karbon atomlarına ait sinyallerinin önerilen yapıyı desteklediği gözlemlenmiştir.

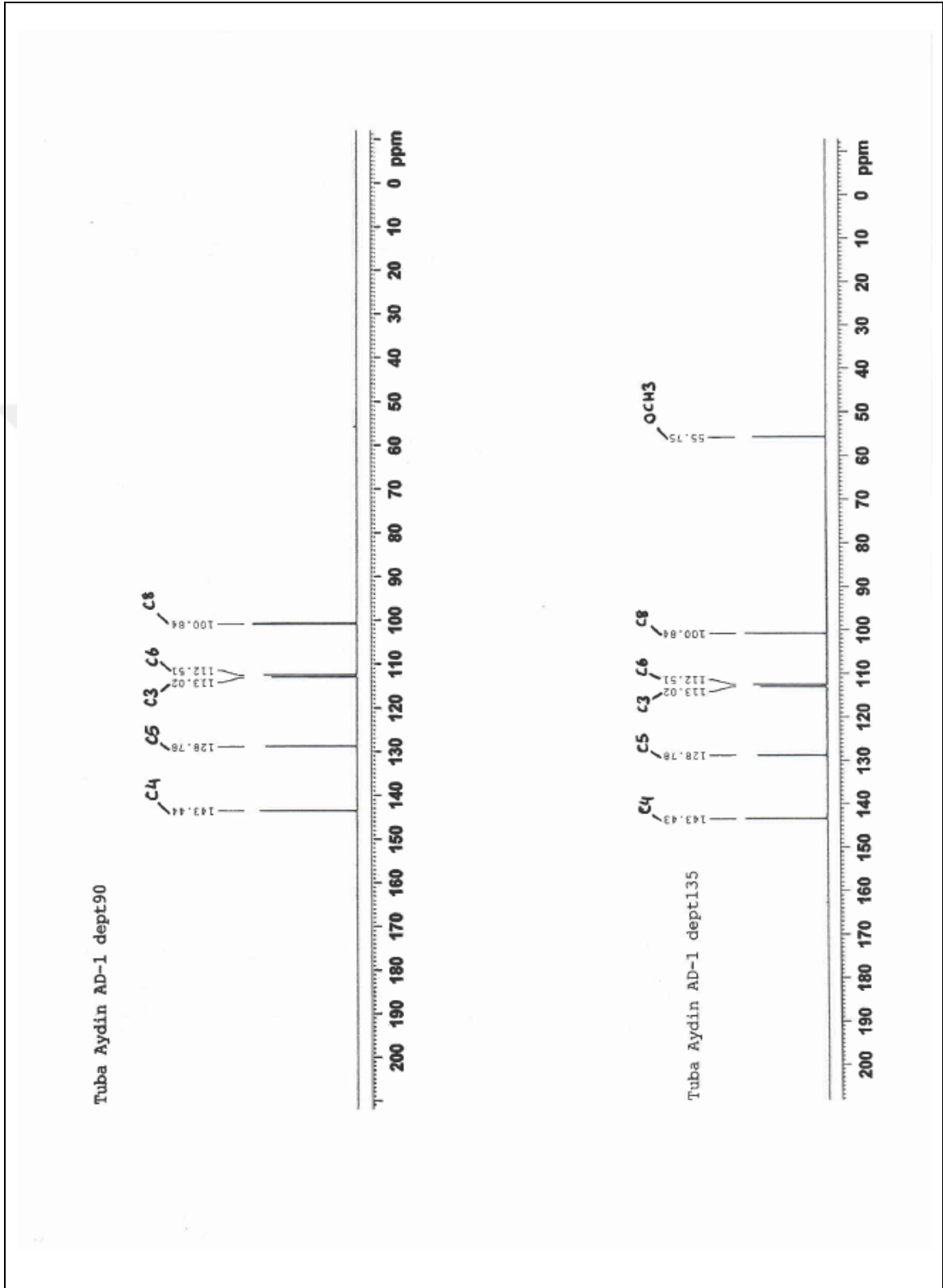
AD-1'in HMBC (Şekil 4.9) spektrumunu incelendiğimizde $\delta=100,8$ ppm'de rezonans olan C-10 karbonunun 2 bağ üzerinden H-4 ve H-5 ile, 3 bağ üzerinden H-6, H-8 ve zayıf bir etkileşim olarak H-3 ile korelasyon sağladığı görülmektedir. C-10 karbonu ile çakışan C-8 karbonu ise 3 bağ üzerinden sadece H-6 ile korelasyon sağlamıştır. Diğer korelasyonların da önerilen yapıyı tamamen doğruladığı görülmektedir. AD-1'e ait heteronükleer 2 veya 3 bağ üzerinden olan etkileşimler Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



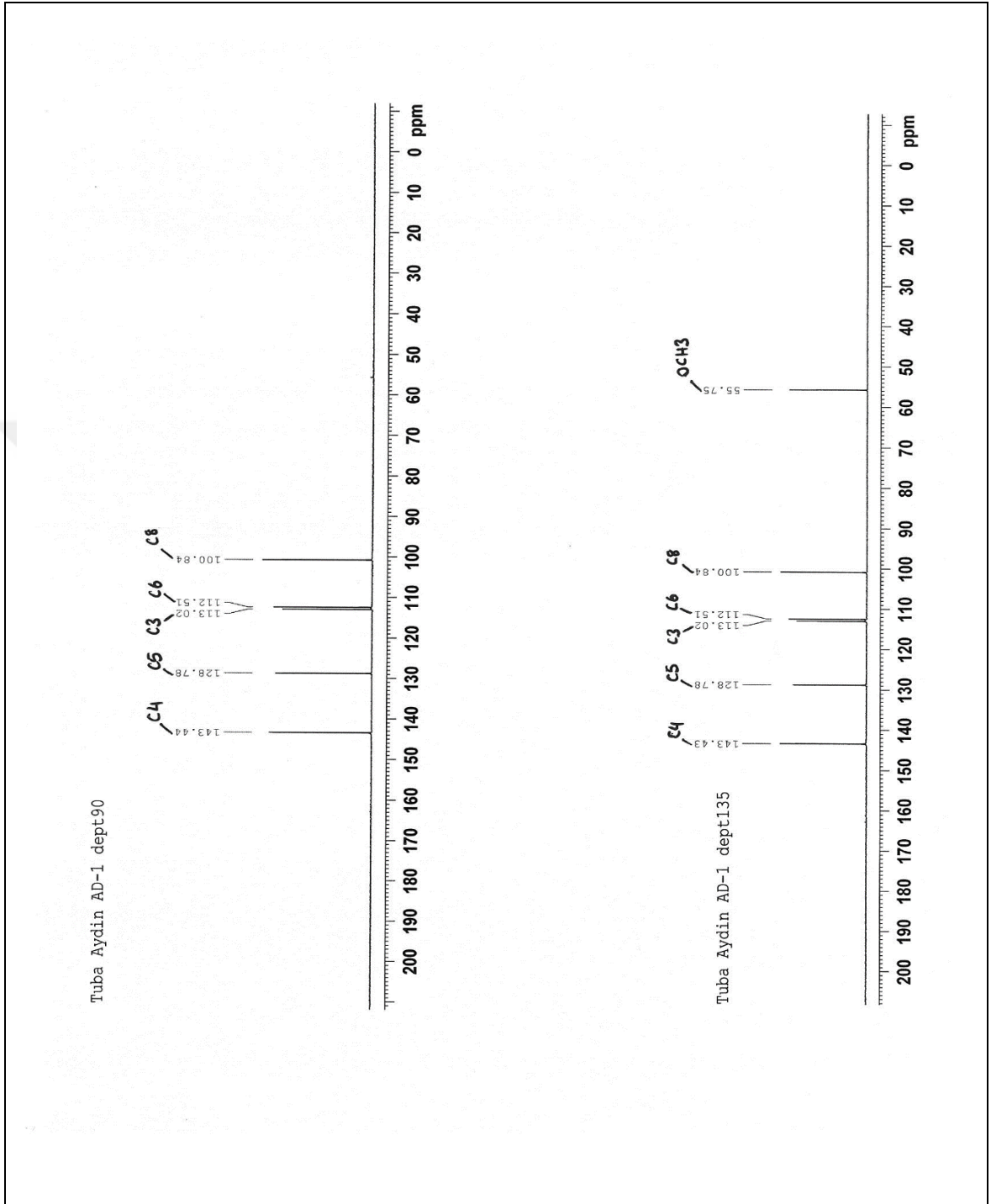
Şekil 4.2. AD-1'in 2 veya 3 bağ üzerinden heteronükleer (H→C) bağ korelasyonları



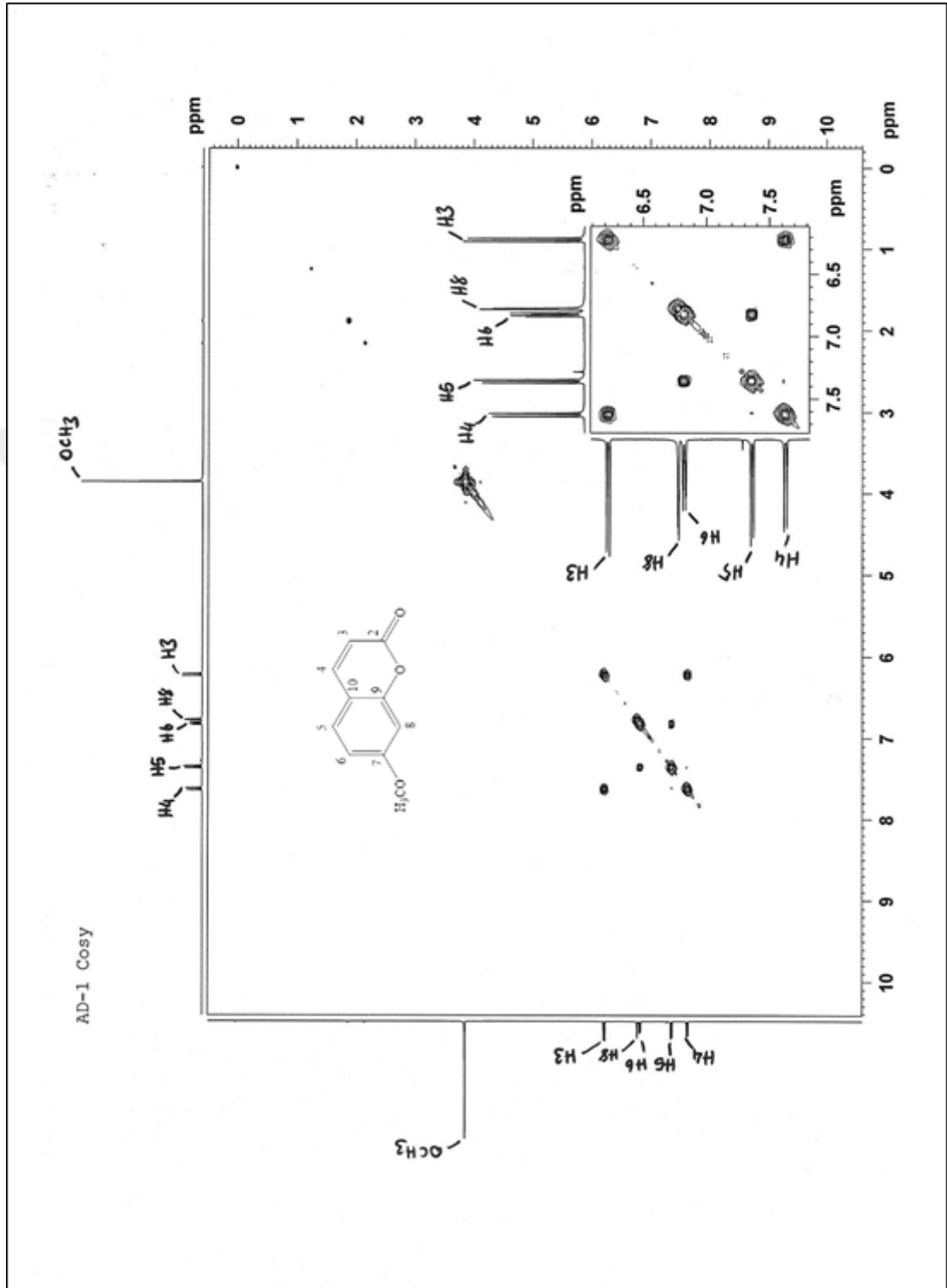
Şekil 4.3. AD-1 maddesinin (herniarin) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



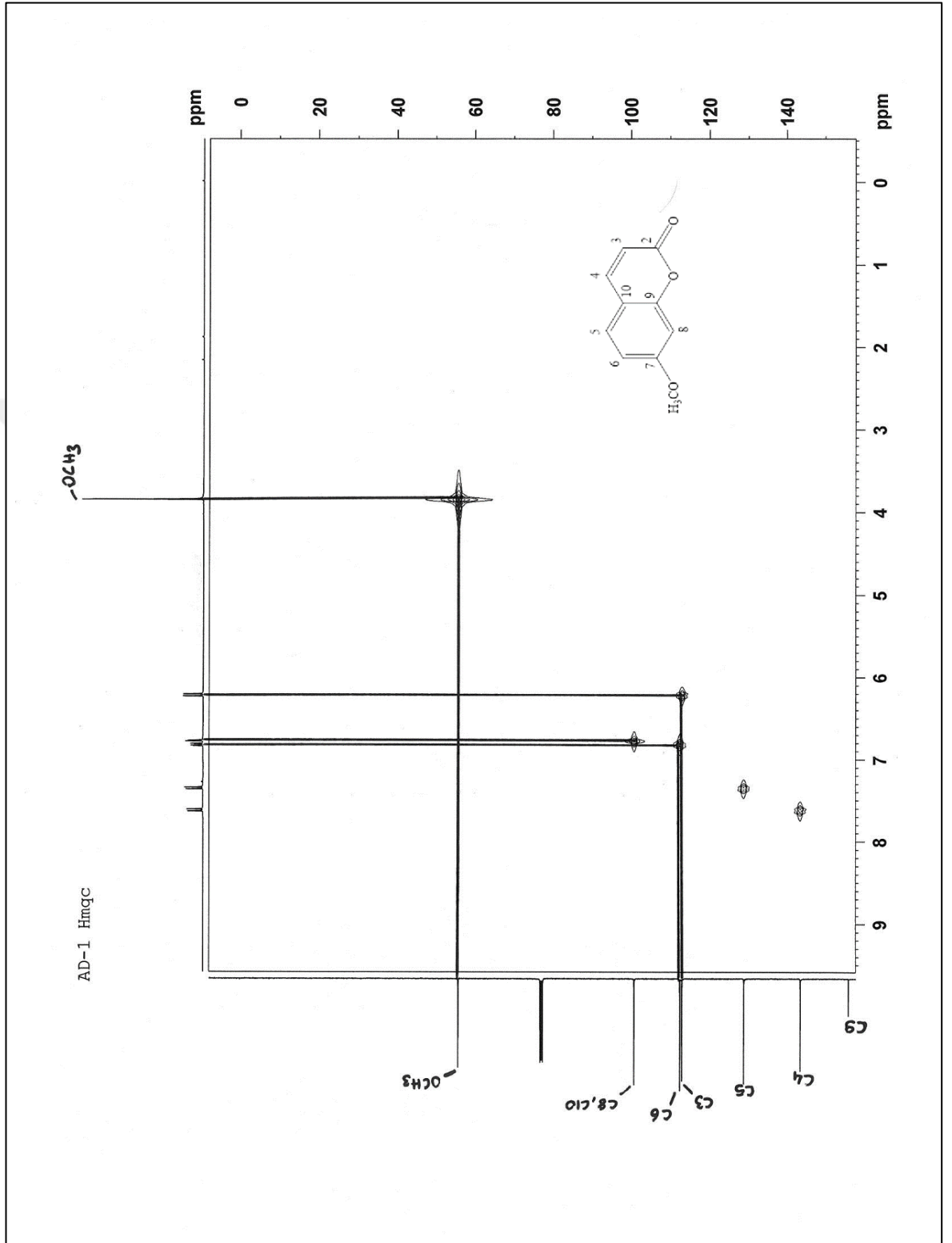
Şekil 4.4. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



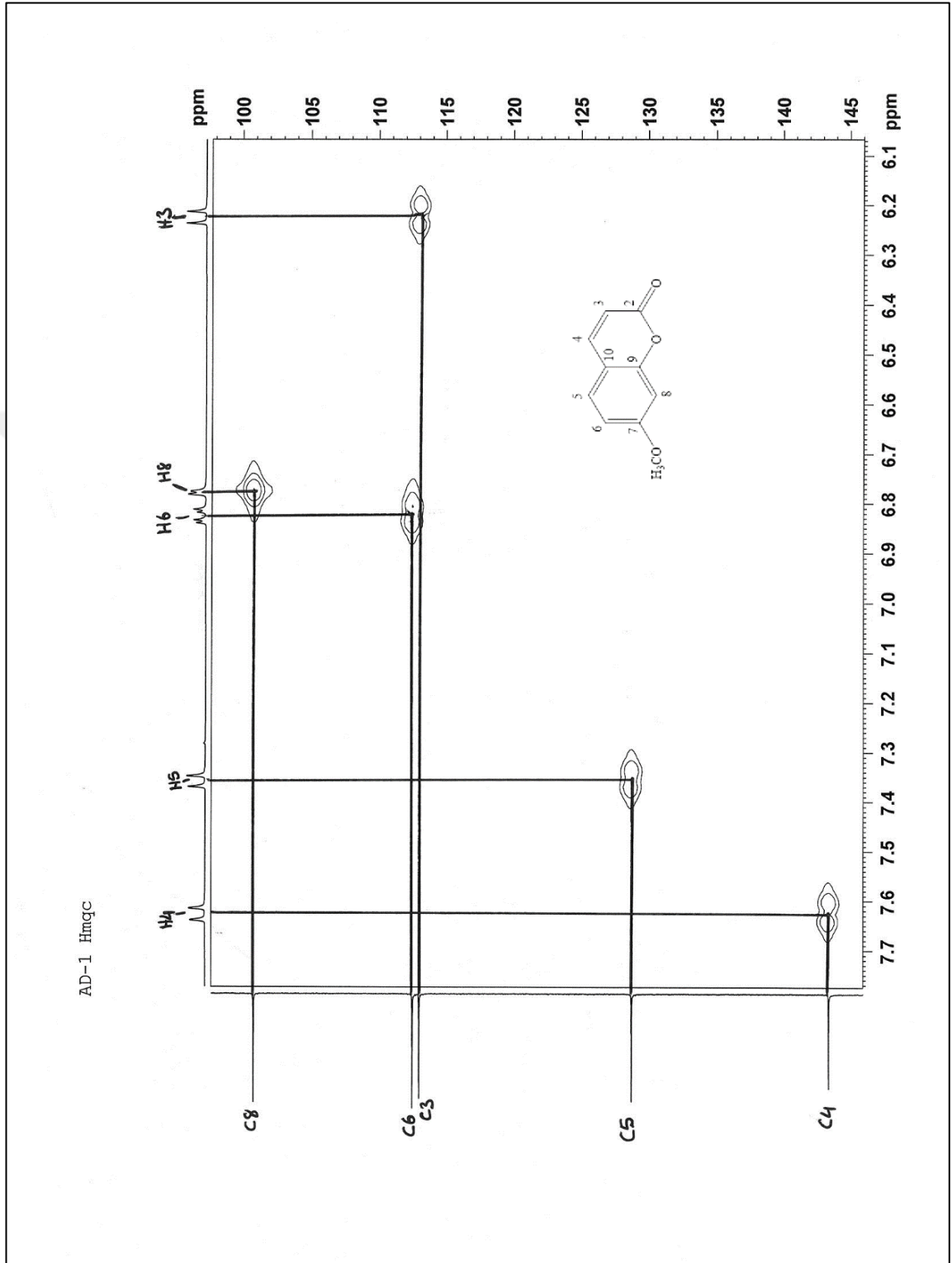
Şekil 4.5. AD-1 maddesinin (herniarin) DEPT 90-135 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



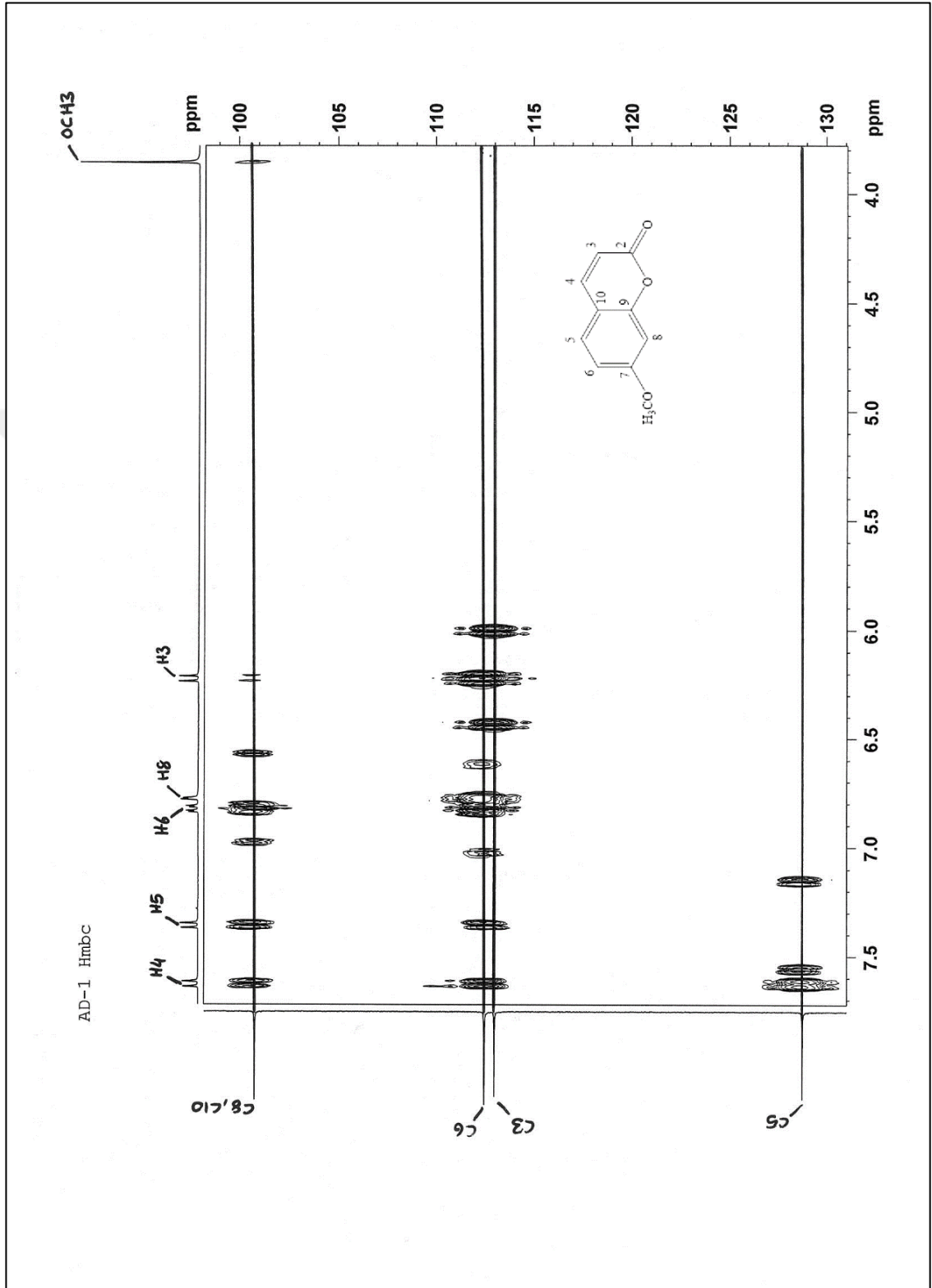
Şekil 4.6. AD-1 maddesinin (herniarin) ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



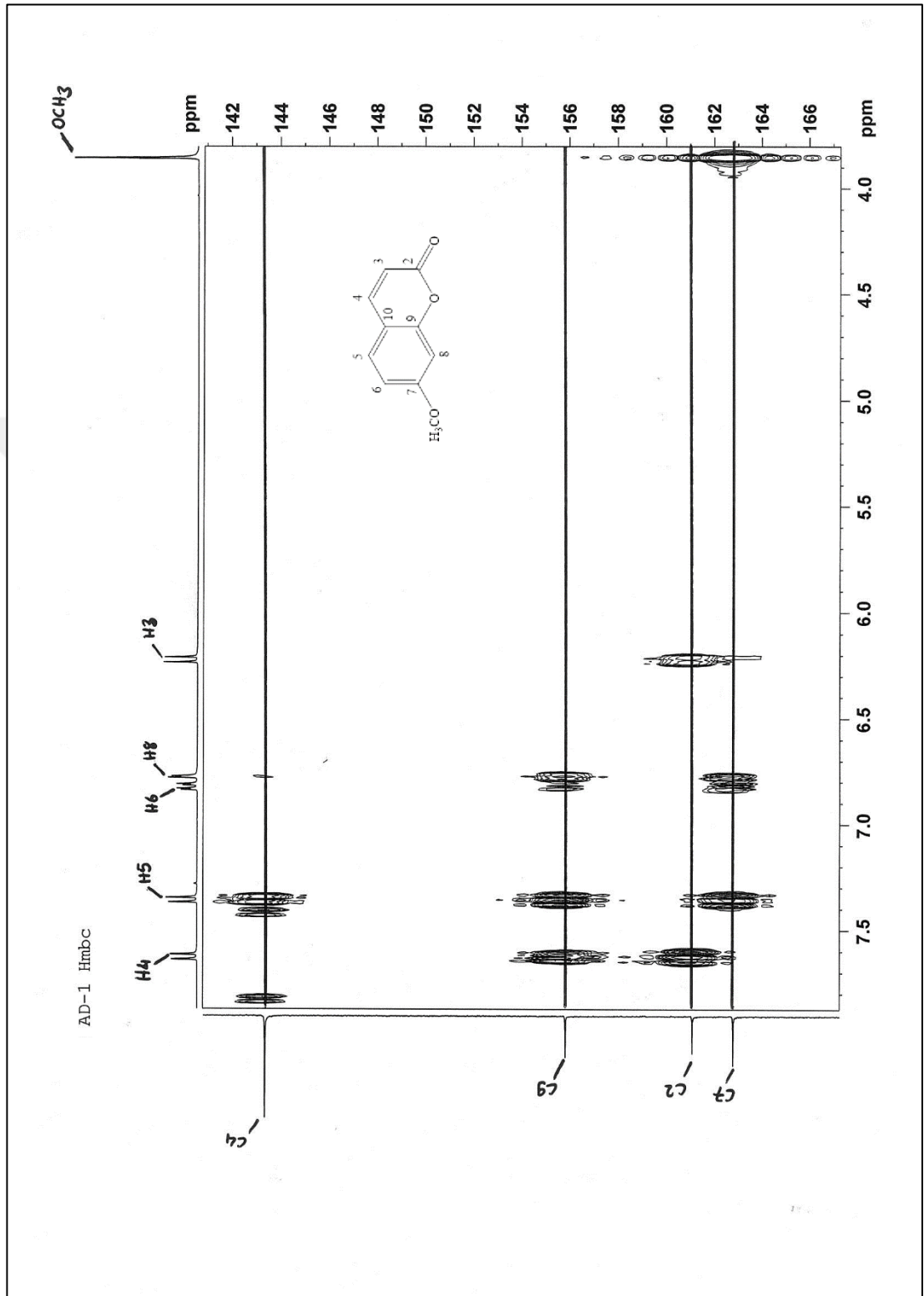
Şekil 4.7. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.8. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.9. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.10. AD-1 maddesinin (herniarin) ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu

AD-2 Kodlu Bileşik

Viskoz bir yapıda izole edilen AD-2 bileşiği kahverengimsi bir renge sahiptir. Bileşik UV_{254} ve UV_{366} nm’de renk vermeyip vanilin/ H_2SO_4 ($105^\circ C$) reaktifi püskürtüldüğünde ise pembe renge dönüşmektedir.

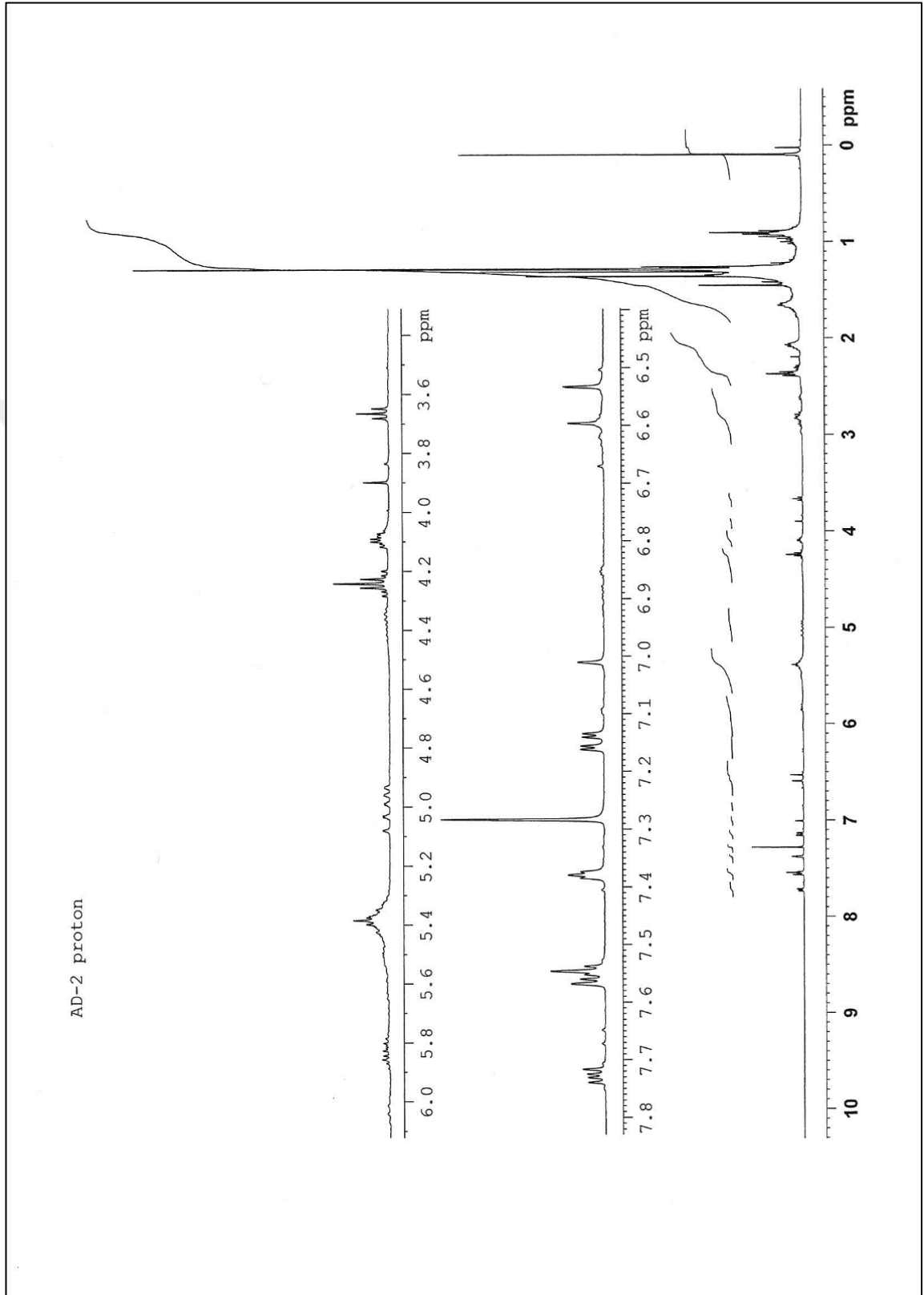
AD-2 bileşiğine ait 1D ve 2D NMR spektral verileri incelendiğinde, spektrumlarda görülen bazı safsızlıklardan dolayı bileşiğin kimyasal yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bileşiğin kimyasal yapısında uzun zincirli ve çift bağ içeren asit türevlerinde gözlemlenen bazı spesifik kimyasal yapıların bulunduğu kesinleştirilmiştir (Davis *et al.* 1982).

AD-2 bileşiğinin 1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.11) $\delta=5,39-5,40$ ppm civarlarında görülen multipler sinyalin $CH=CH$ çift bağ karbonlarına bağlı protonlara ait olduğu görülmektedir. Ancak tahmin edilen uzun zincirli yağ asidinin yapısında çift bağın hangi karbondan olduğu belirlenememektedir. $\delta=2,38$ ppm civarında görülen triplet sinyal asidik karbonunun hemen yanındaki C-2 karbonuna bağlı proton sinyaline aittir. $\delta=1,20-1,40$ ppm arasındaki şiddetli multipler sinyaller uzun zincirli yapıda fazla sayıda bulunan CH_2 protonlarına aittir. Uzun zincirli yapının son karbonu olan metil karbonlarına ait proton sinyalleri ise $\delta=0,90$ ppm civarlarında triplet olarak görülmektedir.

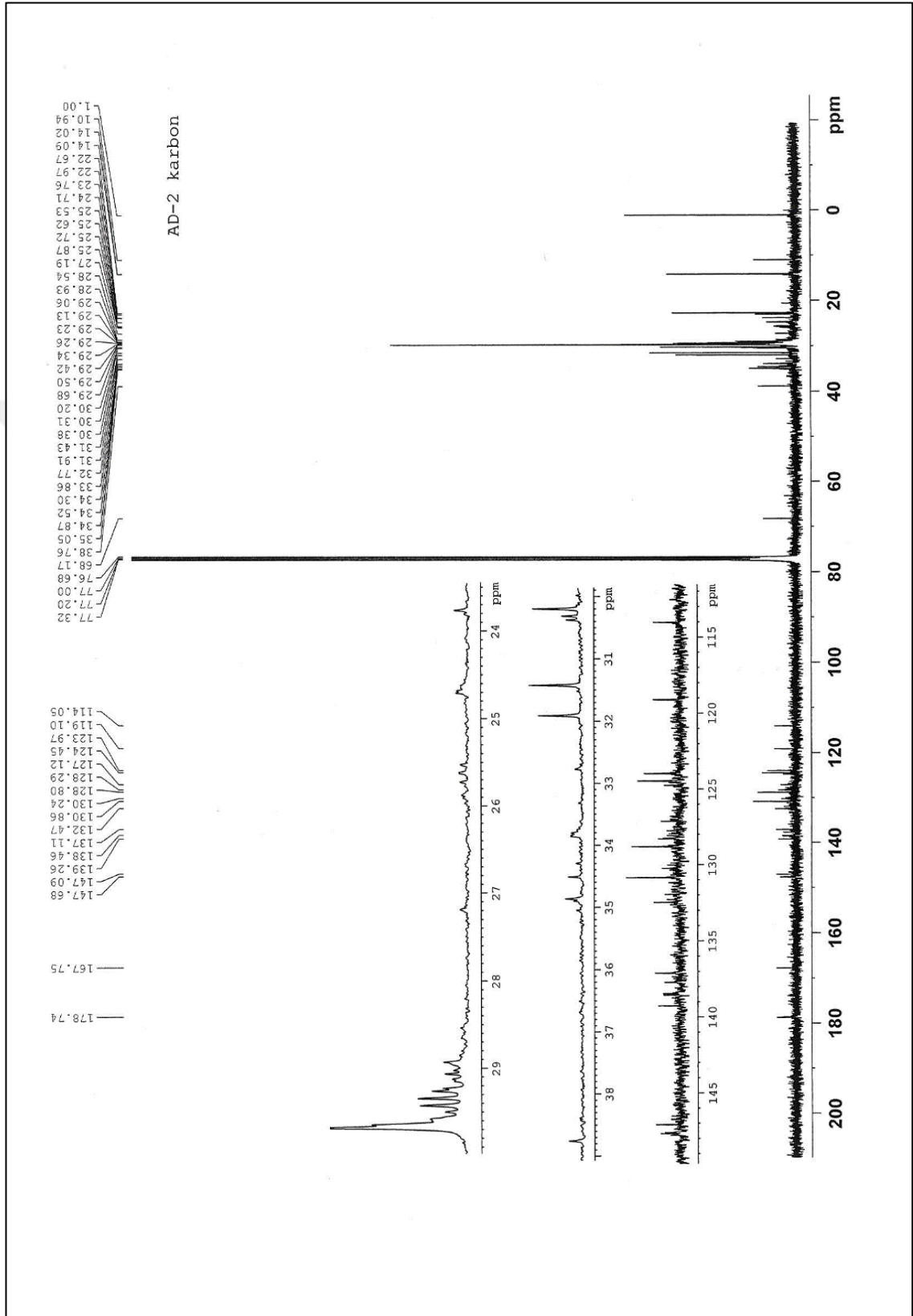
Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 4.12) $\delta=178,7$ ppm’de görülen pikin düz zincirli asitlerdeki C-1 asidik karbonuna ait olduğu görülmektedir. Aynı şekilde $\delta=14,09$ ppm’deki pikin C-18 metil karbonuna, $\delta=34,87$ ppm’deki pikin ise C-2 karbonuna ait olduğu görülmektedir. Spektrumda $\delta=29,06$ ile $29,68$ ppm civarında gelen piklerin uzun zincirli yapılarda bulunan CH_2 karbonlarına ait olduğu tahmin edilmektedir. Yine $\delta=119,11$ ve $\delta=130,86$ ppm arasındaki piklerin yapıda bulunabilecek çift bağların konumuna göre C-8 ve C-14 arasında numaralı karbonlara ait olabileceği tahmin edilmektedir.

DEPT-90 (Şekil 4.13) spektrumunda $\delta=119,11$ ve $\delta=130,86$ ppm arasındaki piklerin CH karbonlarına ait olduğu, DEPT-135 (Şekil 4.14) spektrumunda $\delta=29,06$ ile $29,68$ ppm civarındaki piklerin CH_2 protonlarına ait olduğu görülmektedir. Bileşiğe ait COSY (Şekil 4.15), HMQC (Şekil 4.16) ve HMBC (Şekil 4.17) spektrumları da bileşiğin yapısının çift bağ içeren düz zincirli yağ asidine benzer bir yapı olduğunu desteklemektedir. Genel olarak bileşiğin 1D ve 2D NMR spektrumlarında kesin tahmin edilen yapılar yanında çeşitli safsızlıklara ait piklerin de bulunması yapının tam analiz edilmesini zorlaştırmaktadır.



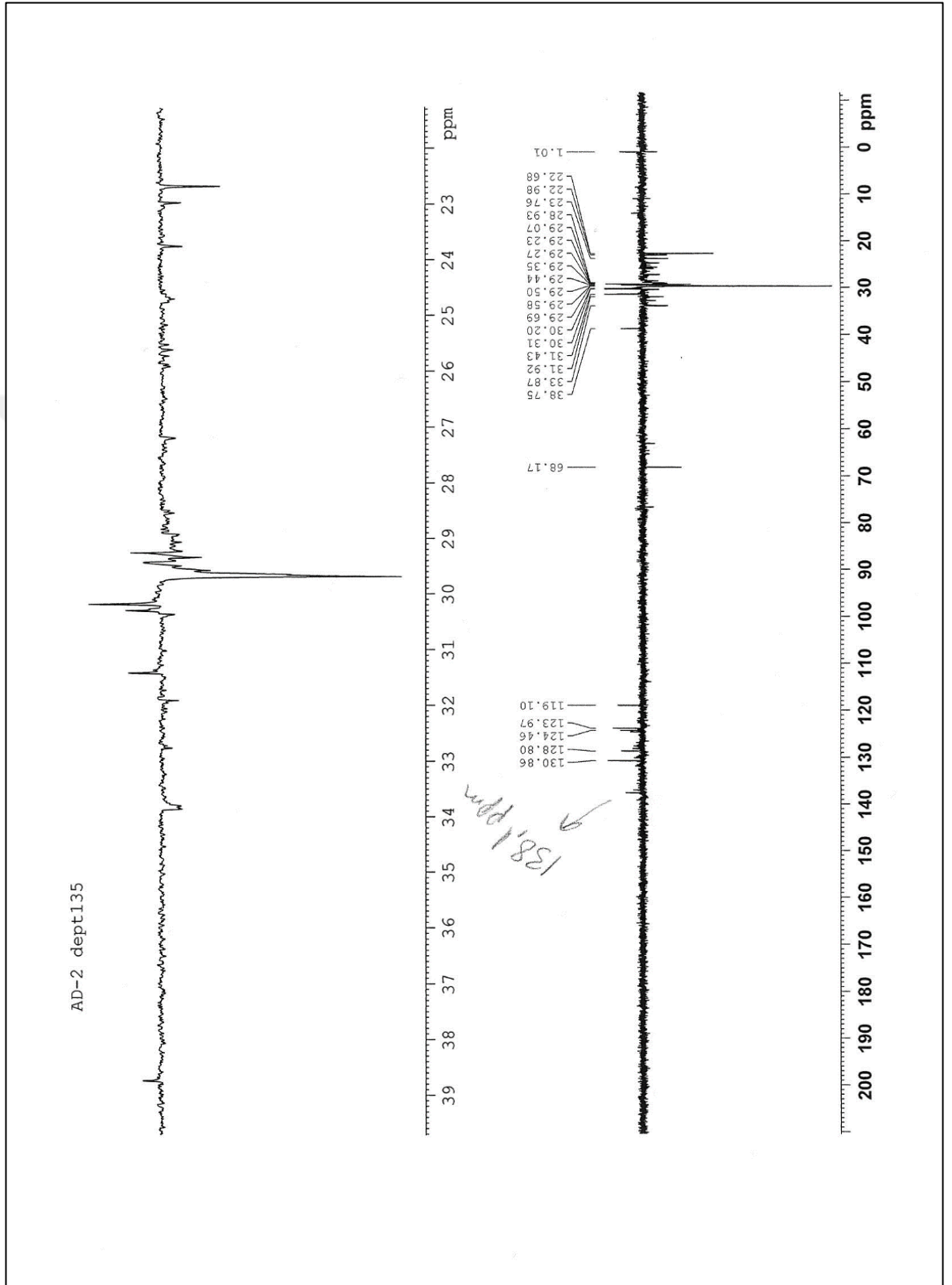


Şekil 4.11. AD-2 maddesinin ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu

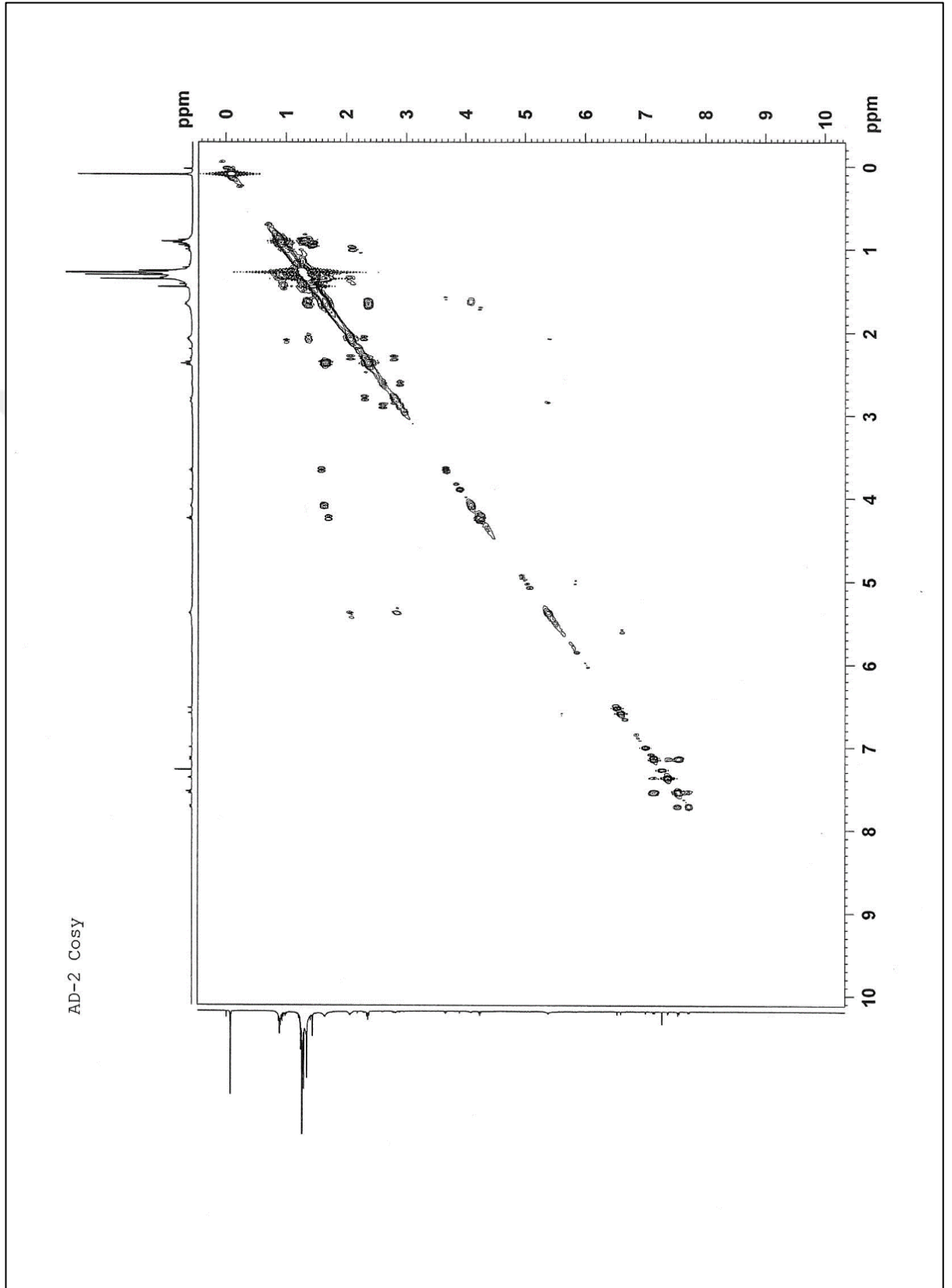


Şekil 4.12. AD-2 maddesinin ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu

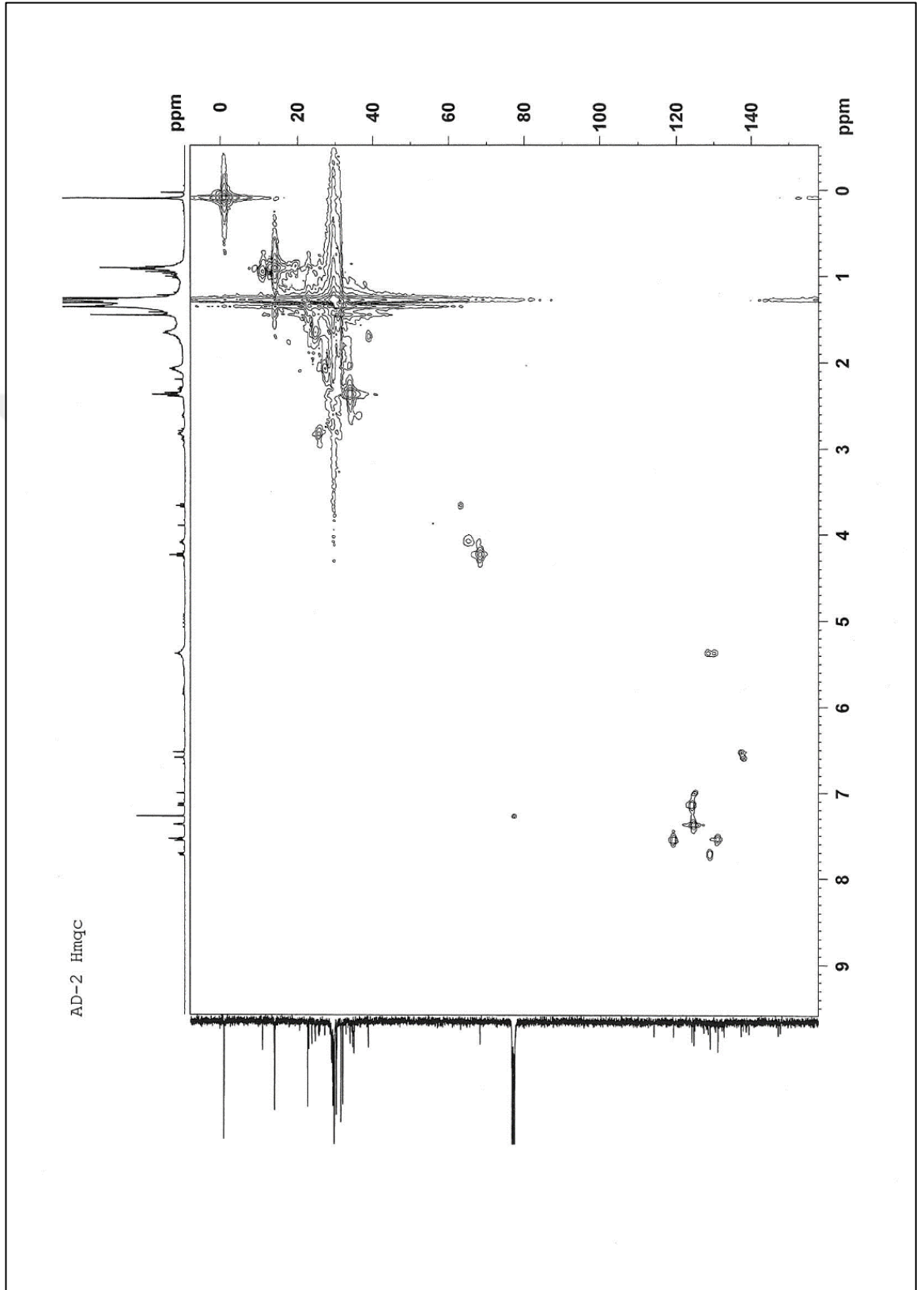
Şekil 4.13. AD-2 maddesinin DEPT 90 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



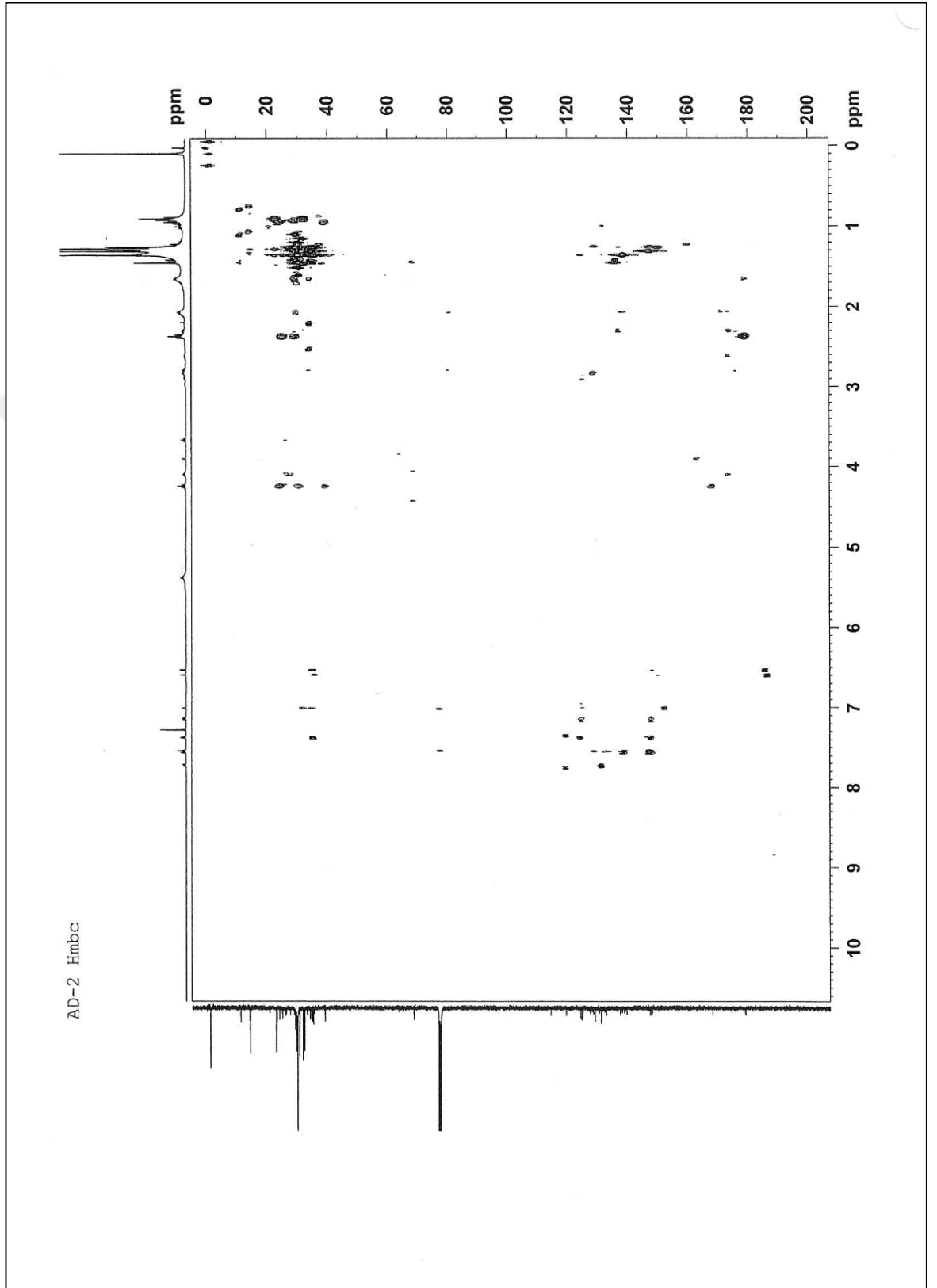
Şekil 4.14. AD-2 maddesinin DEPT 135 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.15. AD-2 maddesinin ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.16. AD-2 maddesinin ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.17. AD-2 maddesinin ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu

AD-3 Kodlu Bileşik

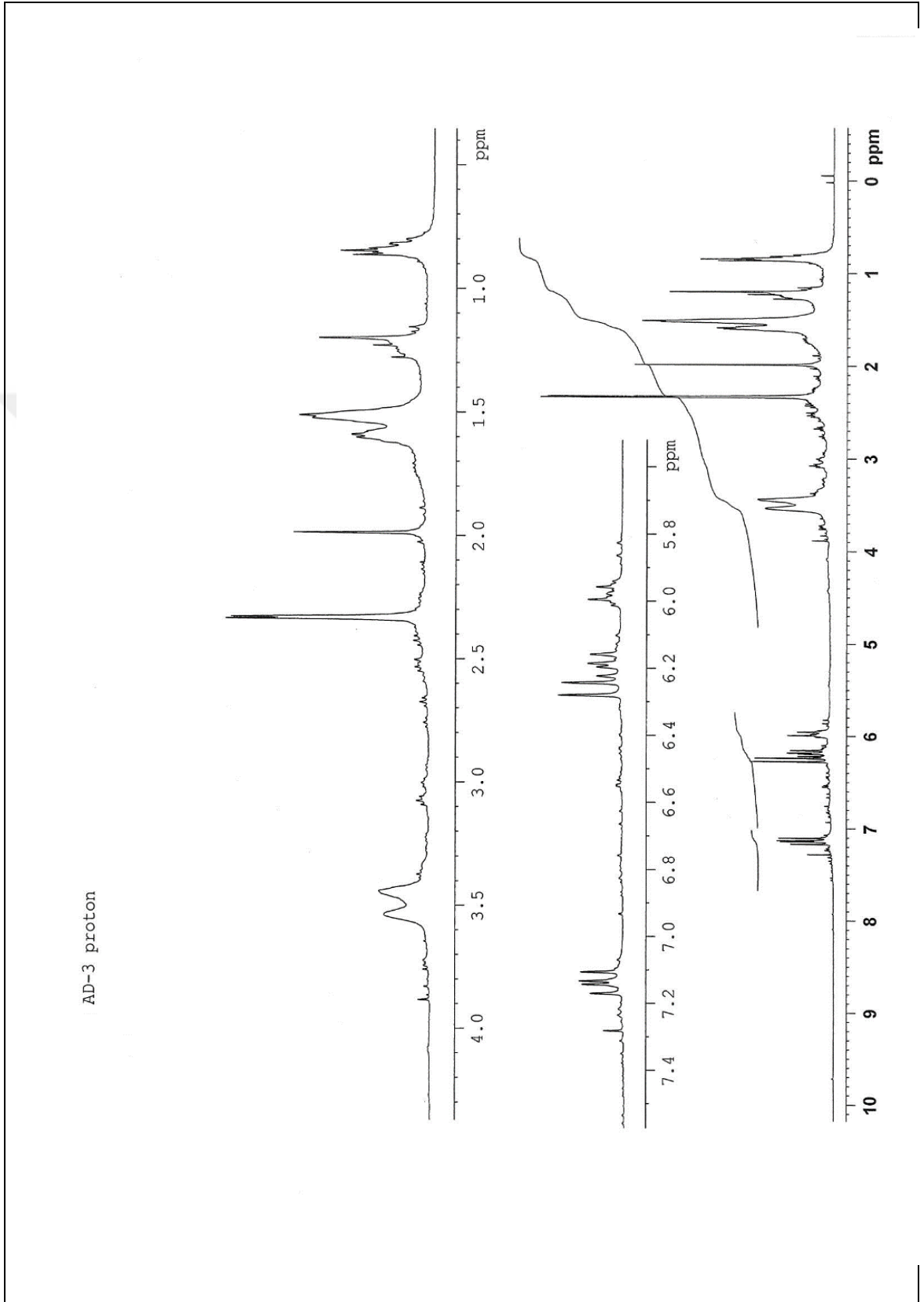
Gün ışığında viskoz ve kahverengimsi görünümüne sahip bir madde olarak saflaştırılan AD-3 bileşiği, UV₂₅₄ nm’de mor leke verirken, UV₃₆₆ nm’de renk vermemektedir. Maddeye vanilin/H₂SO₄ (105°C) reaktifi püskürtüldüğü zaman renk vermemektedir.

Bileşiğe ait 1D ve 2D NMR spektral verileri incelendiğinde spektrumlarda bulunan bazı safsızlıklar nedeniyle bileşiğin kimyasal yapısı tam olarak aydınlatılamadı.

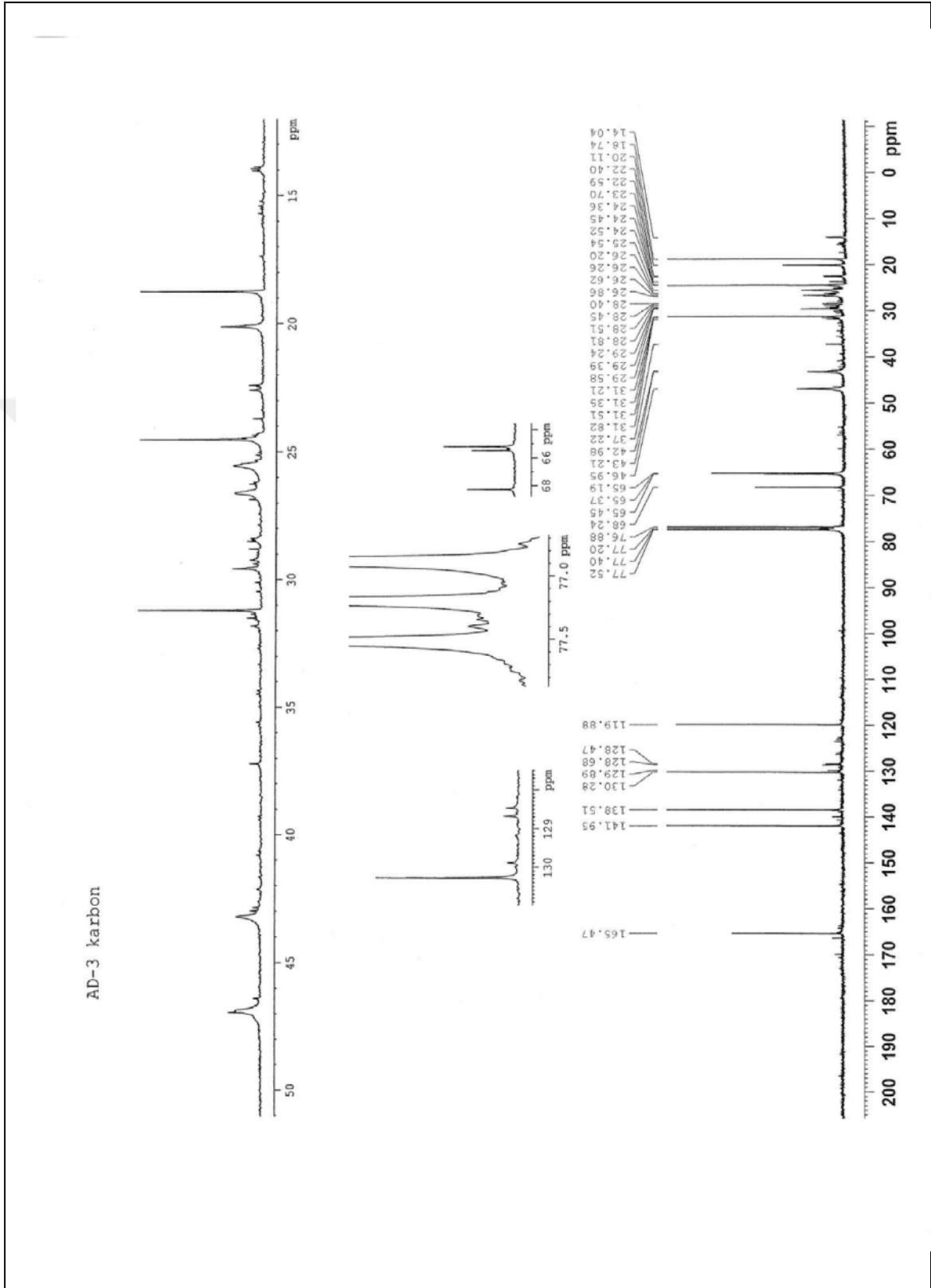
Bileşiğin ¹H-NMR (Şekil 4.18) spektrumunda aromatik bölgede 4 farklı sinyal grubu görülmektedir. Bunlardan $\delta=7,13$ ppm civarında gelen sinyal *dd*, $\delta=6,26$ ppm’de gelen sinyal *d*, $\delta=6,17$ ppm’de gelen sinyal *dd* ve $\delta=5,97$ ppm’de gelen sinyal ise *t* vererek rezonans olmuştur. Aromatik bölgedeki bu sinyal gruplarının varlığı bize yapıda aromatik bir halkanın olduğunu göstermektedir. Yine alifatik bölgedeki $\delta=3,54$ ppm’de iki adet yayvan *s* sinyal iç içe geçmiştir. Yukarı alana doğru safsızlıklara ait olduğu düşünülen düşük sinyallerden başka $\delta=2,33$ ppm’de şiddetli dubletimsi bir sinyal bulunmaktadır. Burada iki adet *s* sinyal birleşmiştir. $\delta=2,02$ ppm’de yine şiddetli bir *s* sinyal bulunmaktadır. Yukarı alandaki şiddetli sinyaller ise metil gruplarına aittir.

Bileşiğin ¹³C-NMR (Şekil 4.19) spektrumunu incelediğimizde $\delta=165,4$ ppm’deki sinyalin fonksiyonel bir grup bağlı aromatik halka karbonuna ait olduğu anlaşılmaktadır. $\delta=119,8$ ppm ve $\delta=141,9$ ppm arasında gelen 4 sinyalin aromatik karbonlara ait olduğu anlaşılmaktadır.

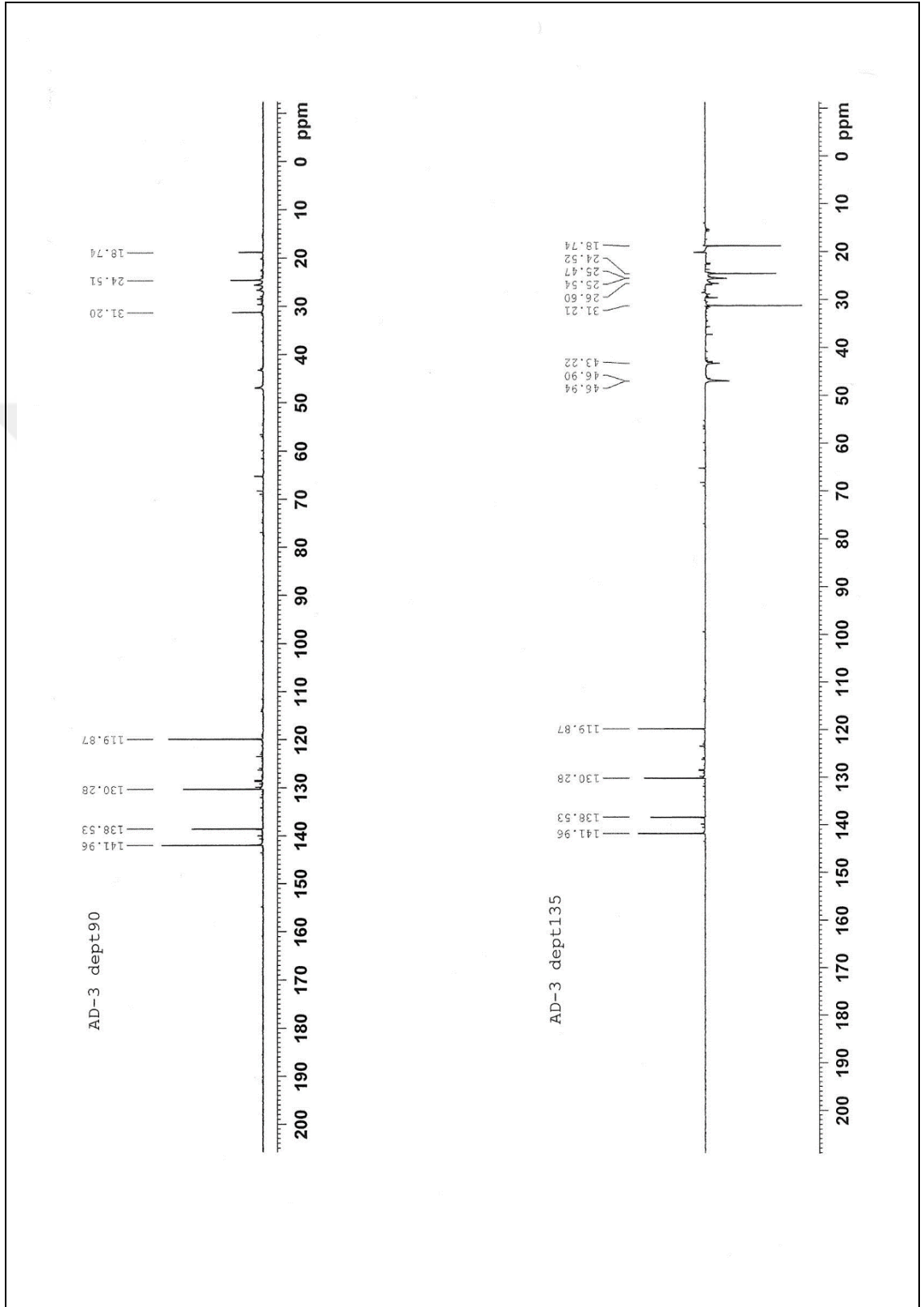
Bileşiğe ait DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC ve HMBC spektrumlarında da düşük şiddetli piklerin safsızlıklara ait olduğu görülmektedir. Eldeki spektral verilere dayanarak AD-3 bileşiğinin tam yapısı aydınlatılamamıştır.



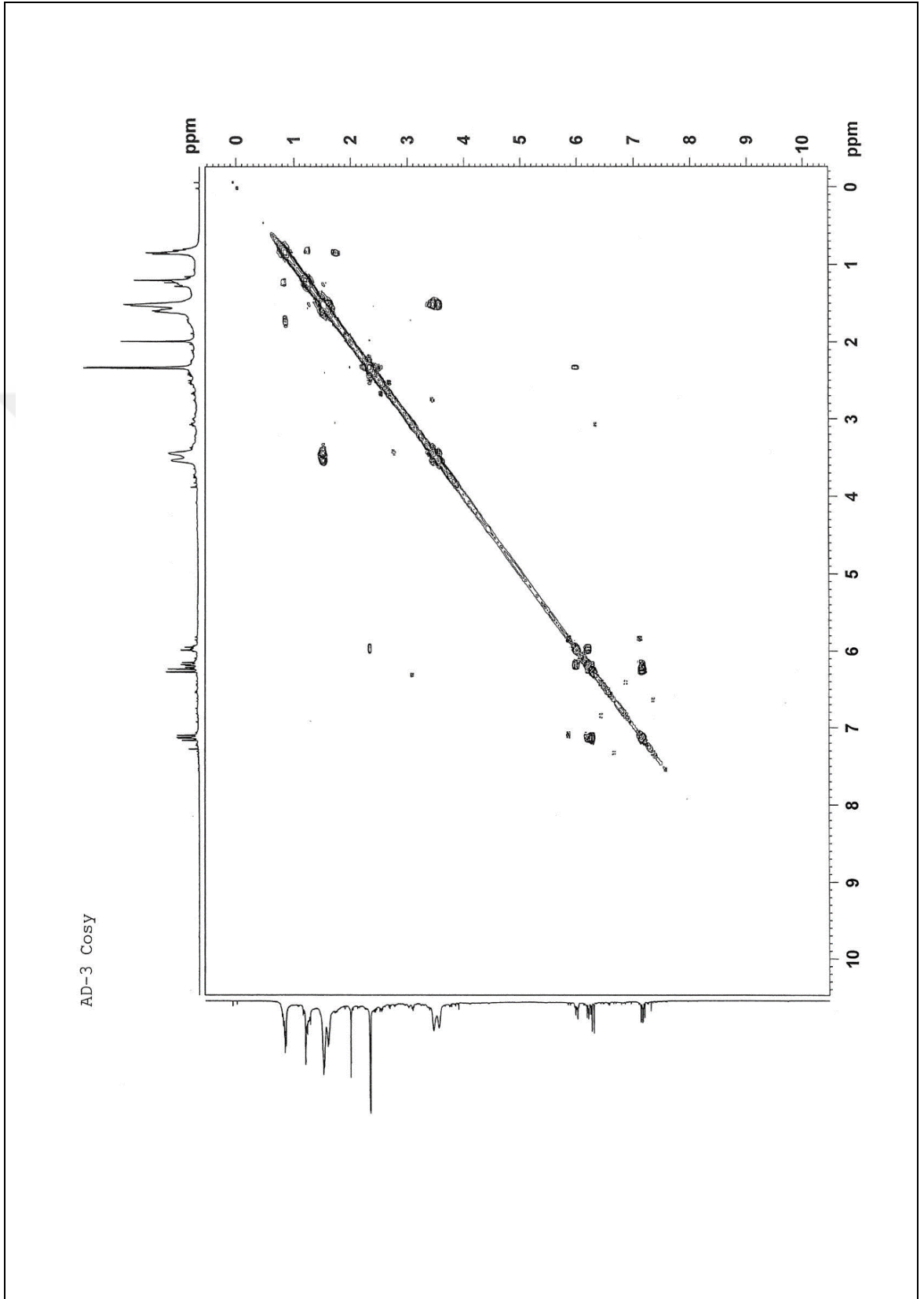
Şekil 4.18. AD-3 maddesinin ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



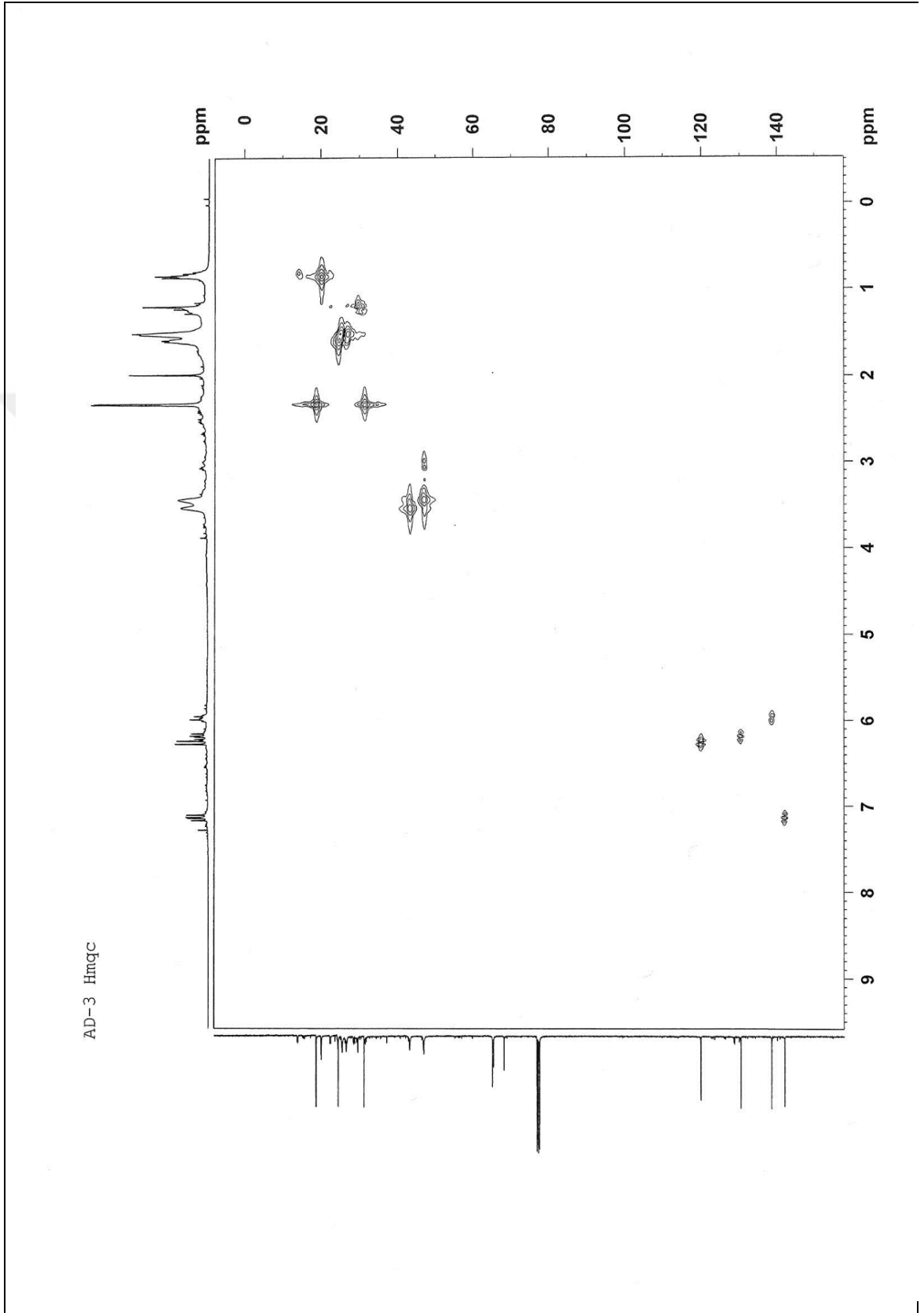
Şekil 4.19. AD-3 maddesinin ¹³C NMR (CDCl₃, 400 Mz) spektrumu.



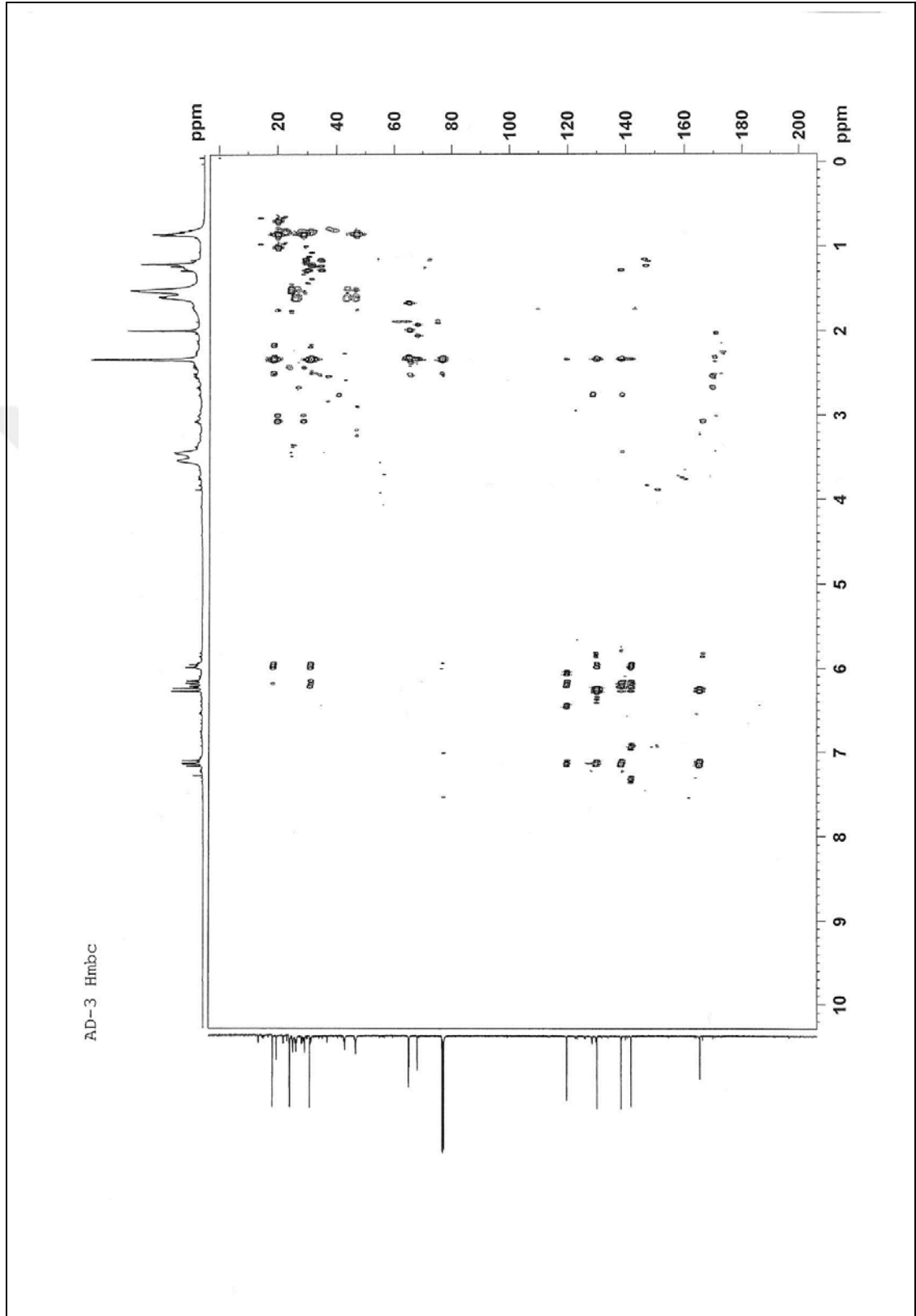
Şekil 4.20. AD-3 maddesinin DEPT (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.21. AD-3 maddesinin ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu.



Şekil 4.22. AD-3 maddesinin ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.23. AD-3 maddesinin ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu

AD-4 Kodlu Bileşik

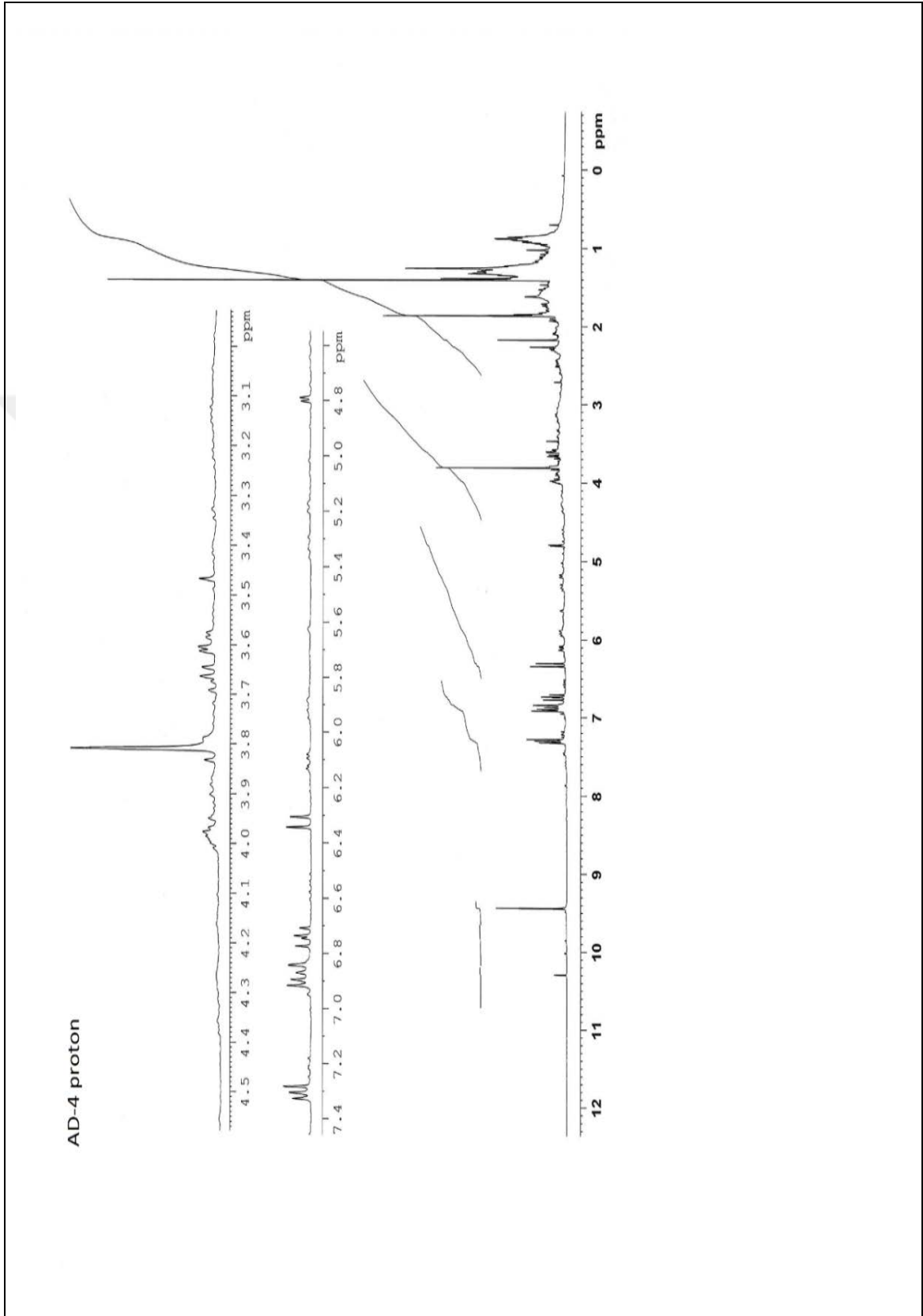
AD-4 bileşiği viskoz yapıda ve kahverengimsi bir görünüme sahip olarak saflaştırıldı. UV₂₅₄ nm’de mor renkli, UV₃₆₆ nm’de ise renk vermemektedir. Vanilin/H₂SO₄ (105°C) reaktifi püskürtülünce bileşik renk vermemektedir.

Bileşiğin 1D ve 2D NMR spektral verilerinde bazı safsızlıklara ait pikler bulunması nedeniyle bileşiğin kimyasal yapısı tam olarak aydınlatılamadı.

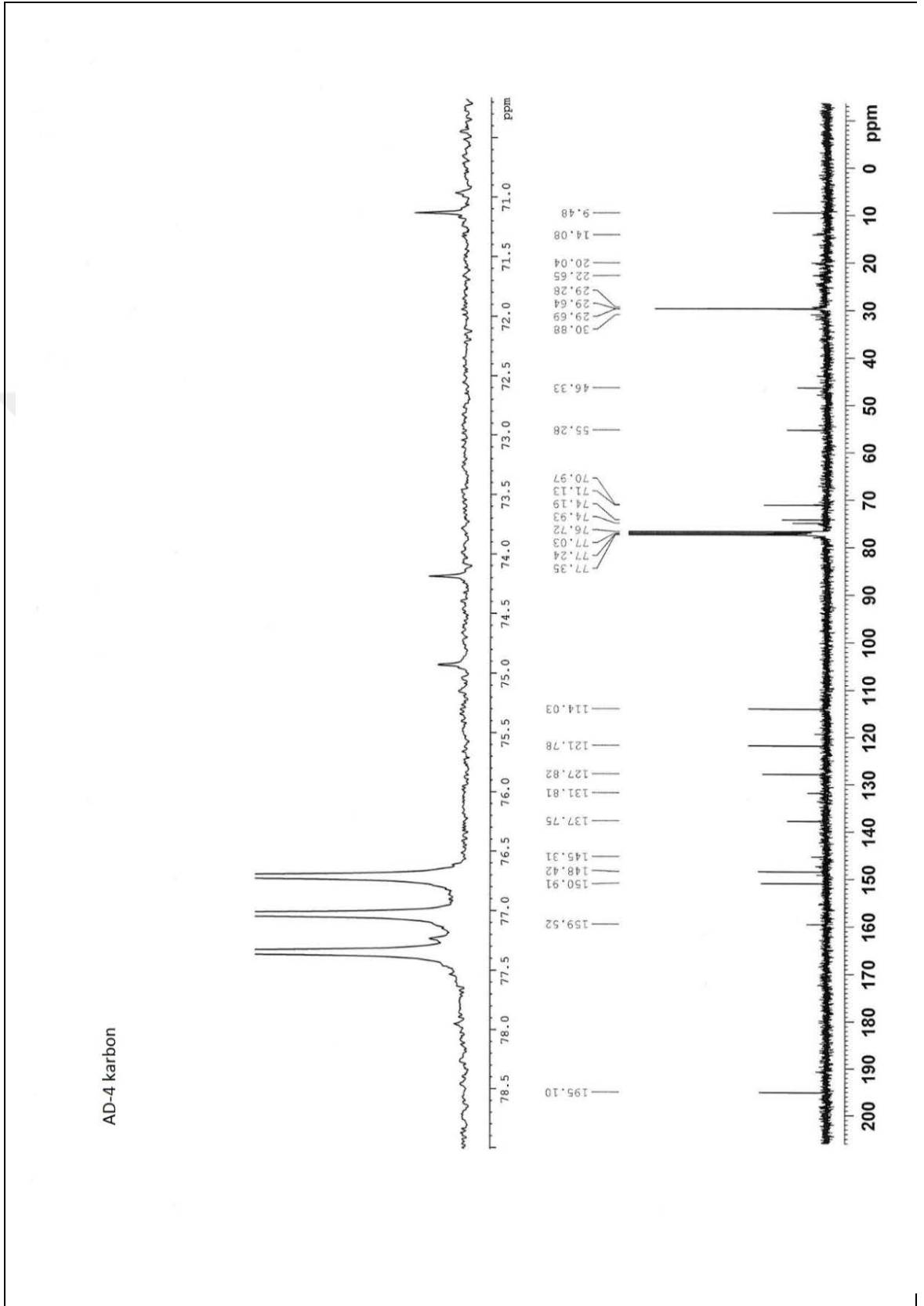
Bileşiğin ¹H-NMR (Şekil 4.24) spektrumunu incelediğimizde aşağı alanda görülen iki ayrı s pikinin yapıdaki OH protonlarına ait olduğu anlaşılmaktadır. Aromatik bölgedeki dört adet sinyal grubu yapıdaki aromatik halkadaki CH protonlarına ait olduğunu göstermektedir. $\delta=3,81$ ppm civarındaki pik yapıda bir metoksi grubunun olduğunu, yine $\delta=1,20-1,90$ ppm arasındaki s sinyallerin yapıdaki metil gruplarına ait olduğunu göstermektedir.

Bileşiğin ¹³C-NMR (Şekil 4.25) spektrumunda şiddetli piklerle birlikte safsızlıklara ait olduğu düşünülen düşük sinyalli pikler de bulunmaktadır. ¹³C-NMR spektrumunda (Şekil 4.25) yüksek olasılıkla yapıya ait olduğu düşünülen $\delta=159,5$ ppm, $\delta=137,7$ ppm ve $\delta=71,1$ ppm’de 3 adet kuarterner karbon atomu sinyali bulunmaktadır. Yine aromatik halka karbonlarına ait $\delta=150,9$ ppm, $\delta=148,4$ ppm, $\delta=127,8$ ppm, $\delta=121,7$ ppm ve $\delta=114,0$ ppm’de 5 adet CH sinyali bulunmaktadır. Metoksi karbonuna ait sinyal ise spesifik olarak $\delta=55,2$ ppm’de rezonans olmuştur. Bileşiğin yapısında metil gruplarının olduğu $\delta=31,8$ ppm ve $\delta=9,48$ ppm’deki sinyallerden anlaşılmaktadır.

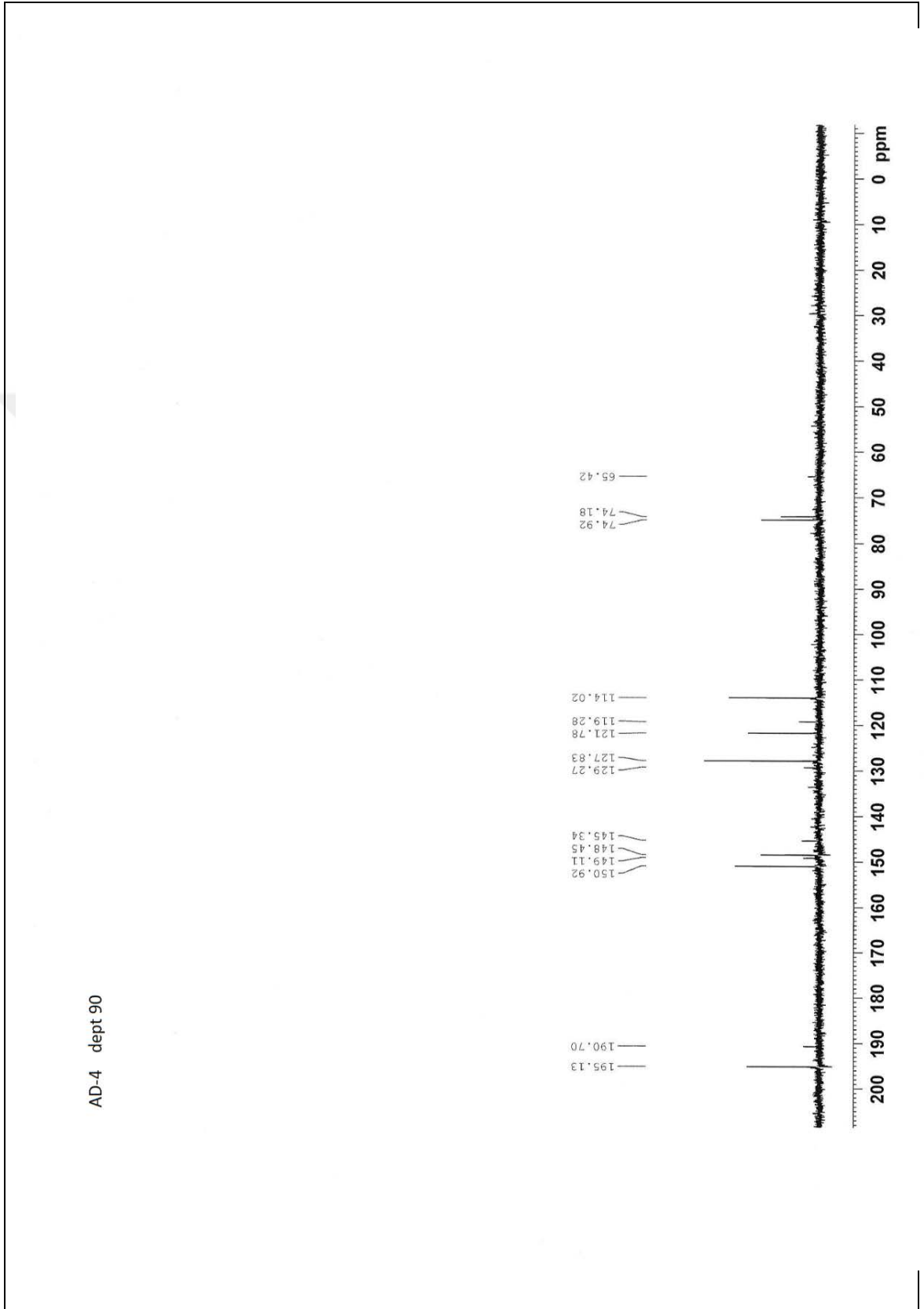
AD-4 bileşiğinin DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC ve HMBC spektrumları da proton ve karbon atomları için önerilen sinyalleri doğrulamaktadır. Ancak spektrumda çok sayıda düşük şiddetli sinyalin bulunması yapının tam karakterize edilmesini zorlaştırmaktadır. Eldeki spektral verilere dayanarak AD-4 bileşiğinin tam yapısı aydınlatılamamıştır.



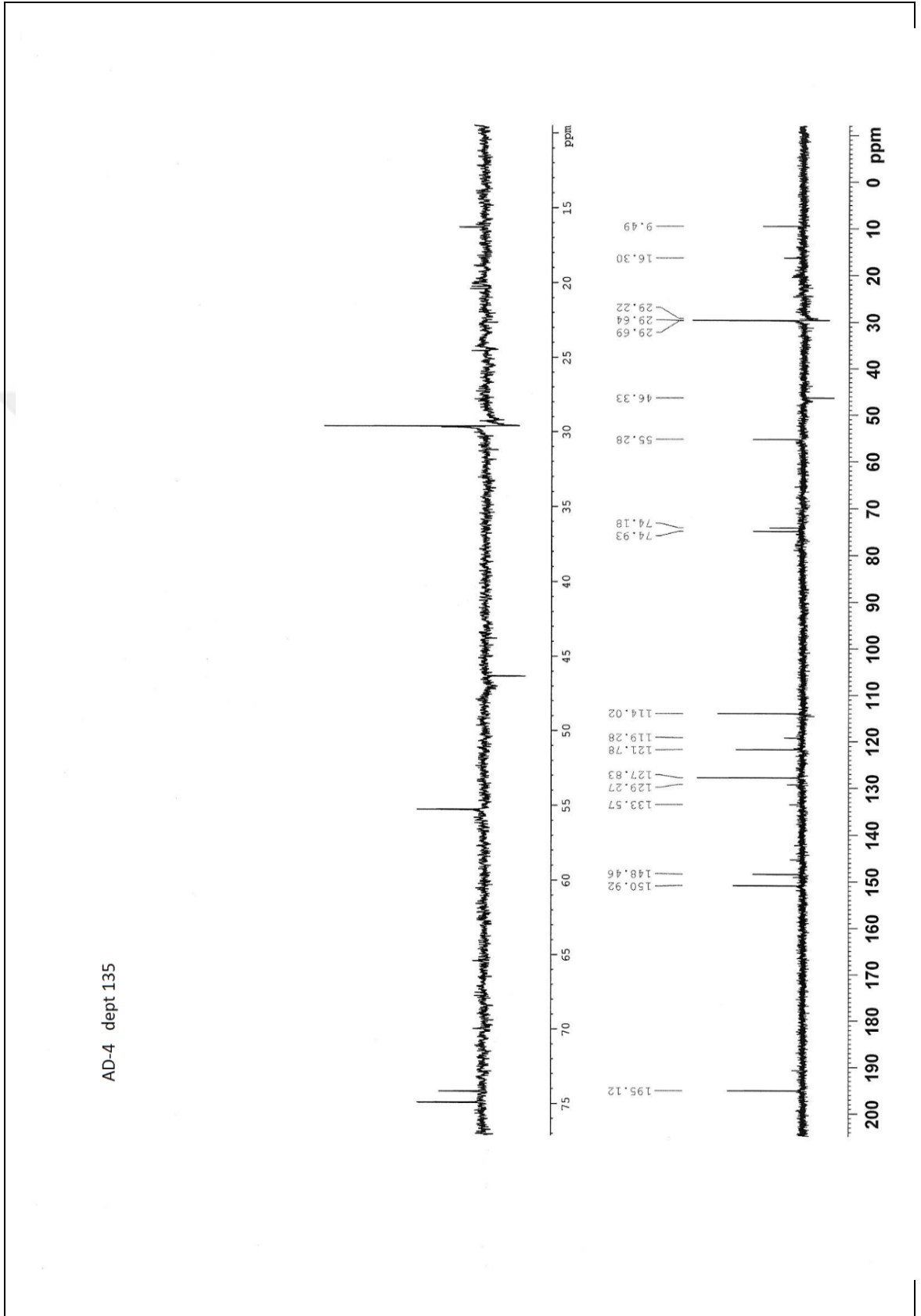
Şekil 4.24. AD-4 maddesinin ^1H NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



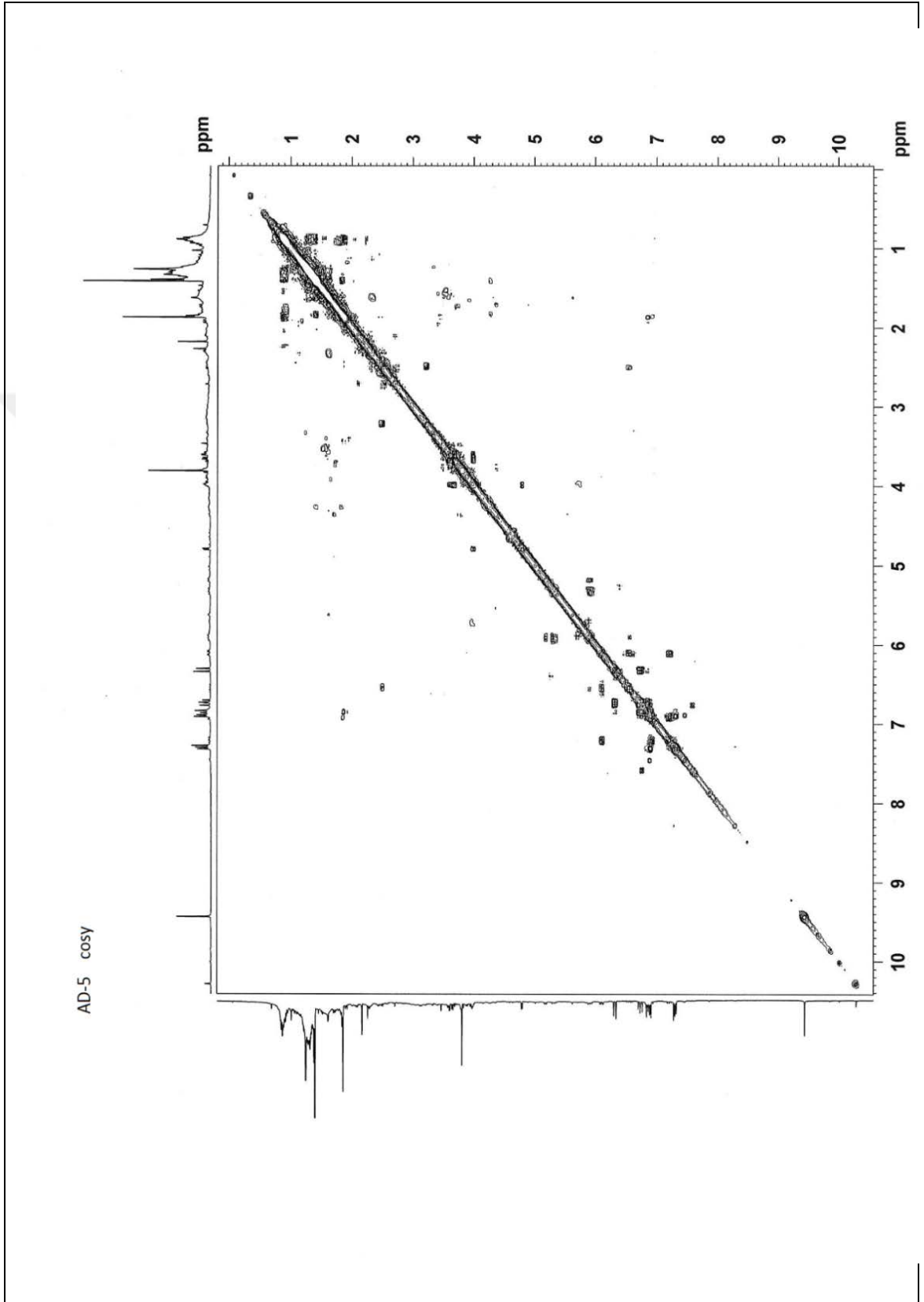
Şekil 4.25. AD-4 maddesinin ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



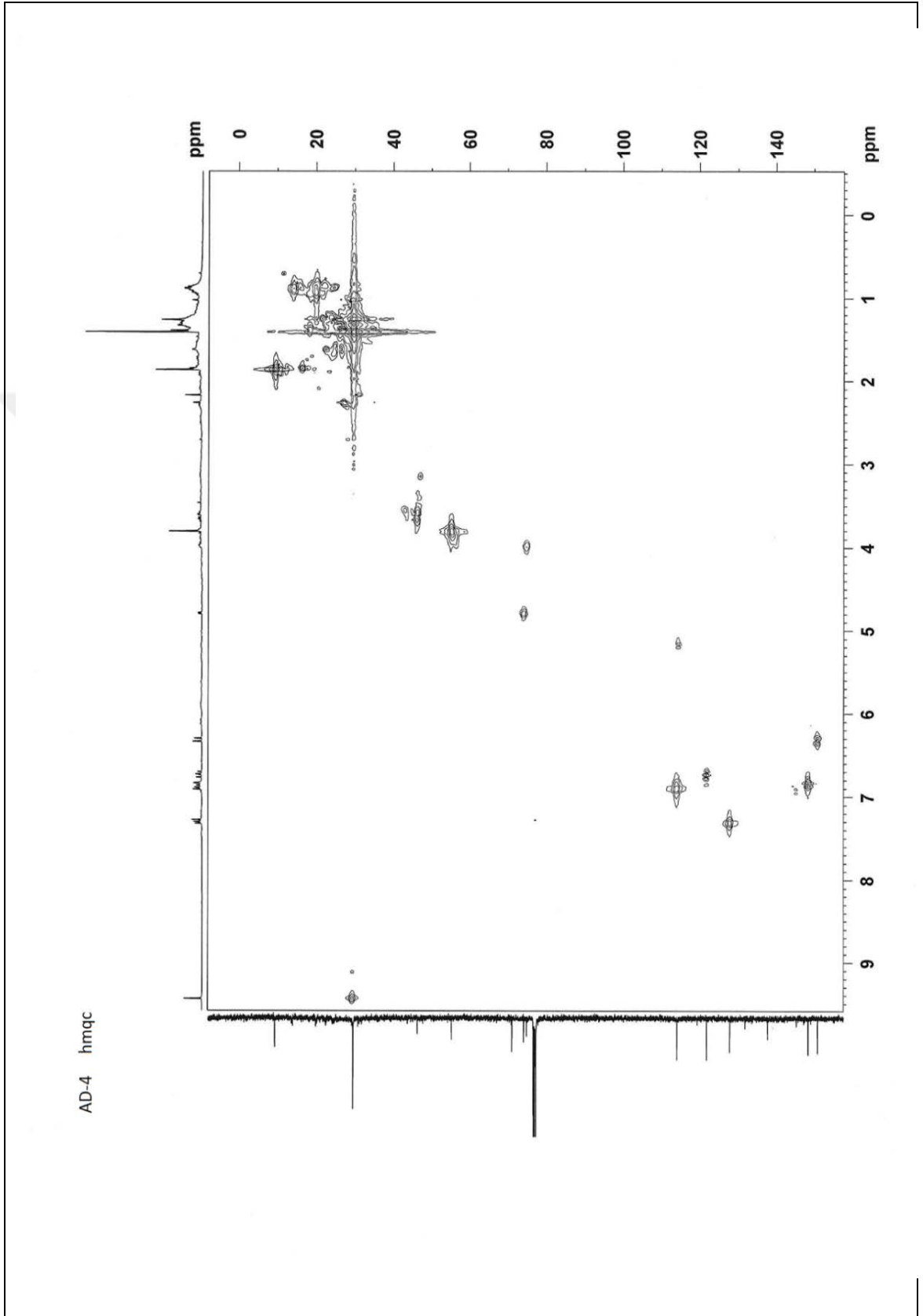
Şekil 4.26. AD-4 maddesinin DEPT 90 (CDCl_3 , 400 Mz) spektrum



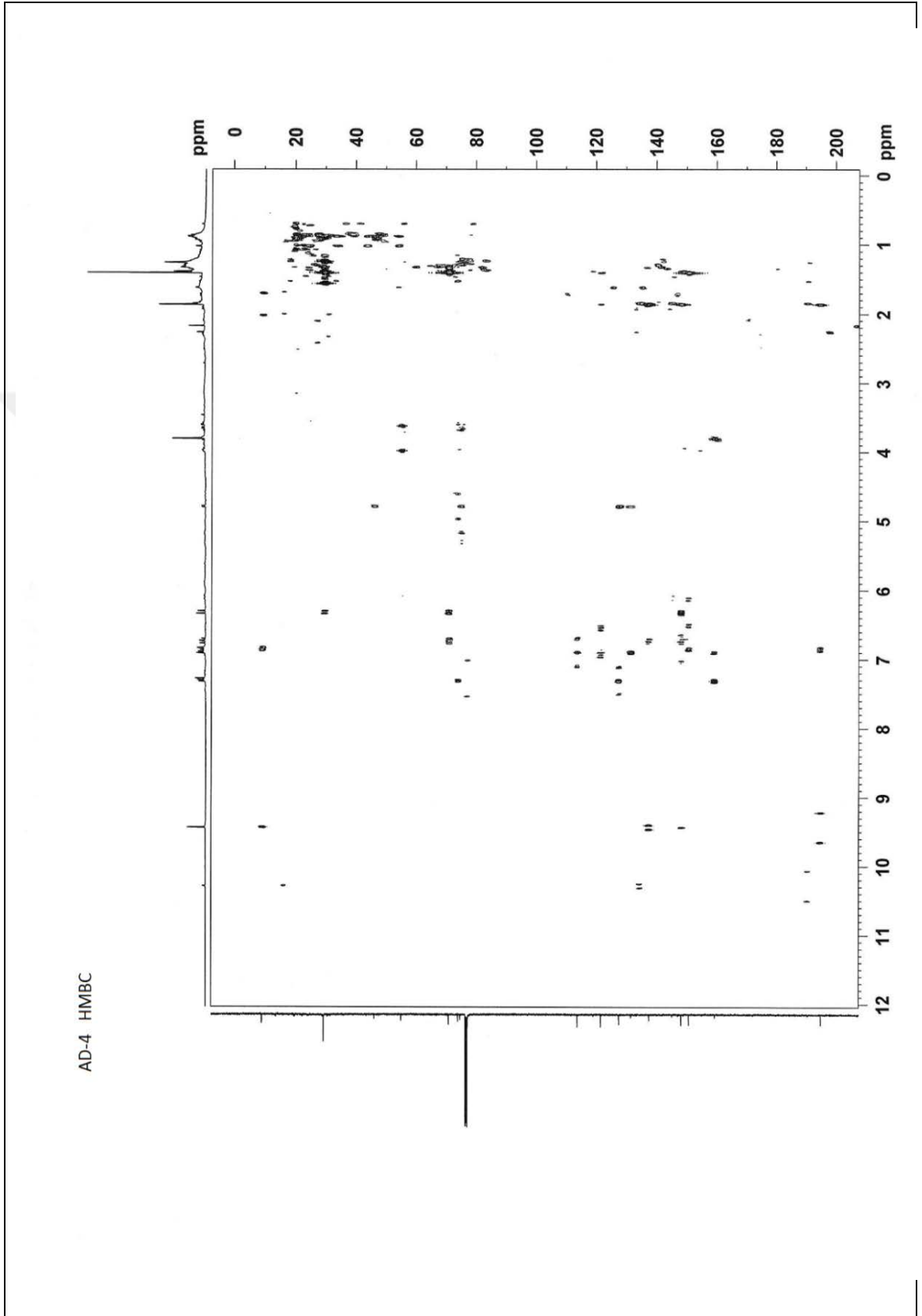
Şekil 4.27. AD-4 maddesinin DEPT 135 (CDCl₃, 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.28. AD-4 maddesinin ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.29. AD-4 maddesinin ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu



Şekil 4.30. AD-4 maddesinin ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , 400 Mz) spektrumu

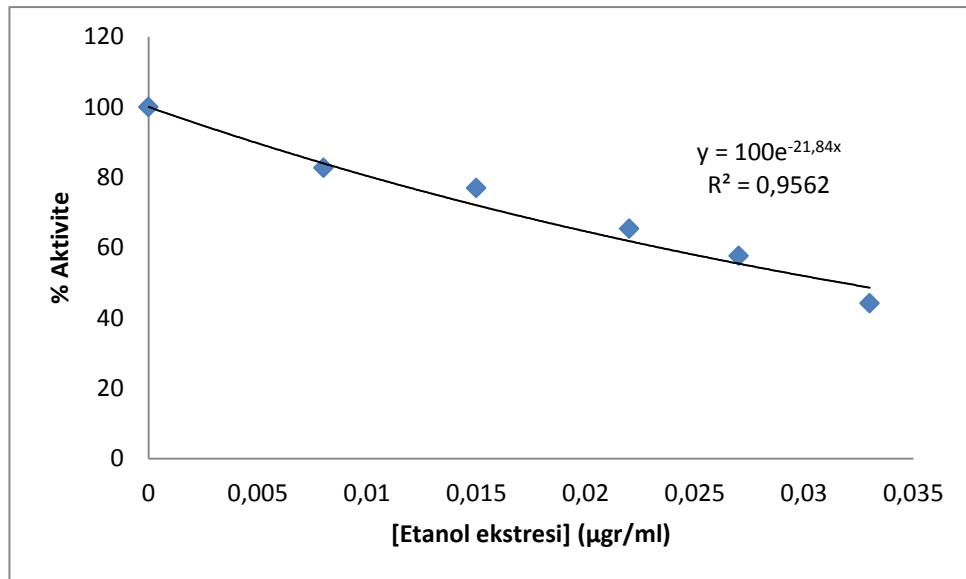
4.3. Ekstreler ve Major Saf Madde AD-1'in hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerine Aktivasyonunu Gösteren Bulgular

Bu bölümde *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstreleri ile major saf maddesi AD-1'in insan CA I ve II izoenzimleri üzerine aktivasyonunu gösteren çizelge ve grafikler verilmiştir.

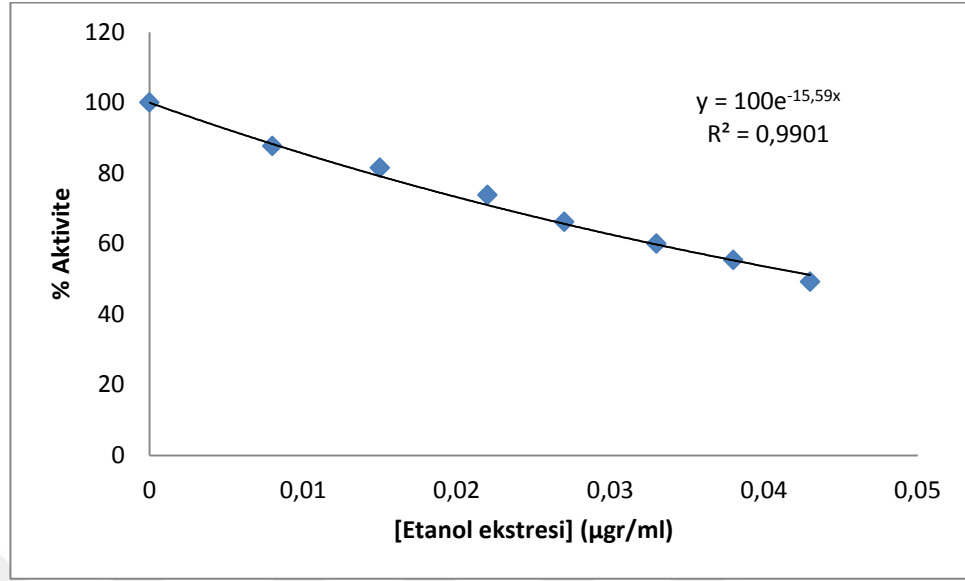
Çizelge 4.2. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC₅₀ değerleri

İnhibitör	hCA I için IC ₅₀ (µg/mL)	hCA II için IC ₅₀ (µg/mL)
Etanol ekstresi	0,031	0,045
Diklormetan ekstresi	0,020	0,031
n-Hekzan ekstresi	0,031	0,041
Methanol ekstresi	0,025	0,040
Herniarin	0,040	0,052

4.3.1. Etanol ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği

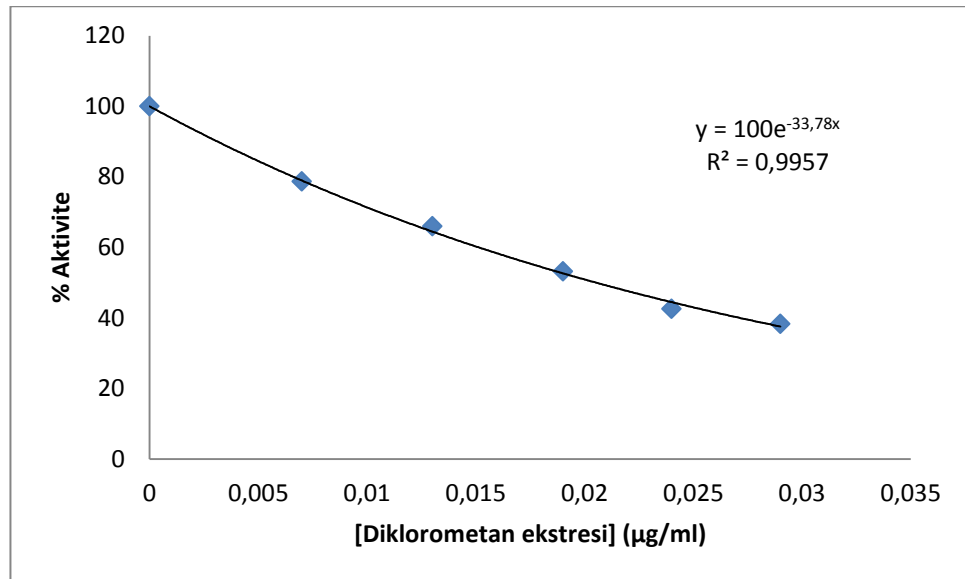


Şekil 4.31. Etanol ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği

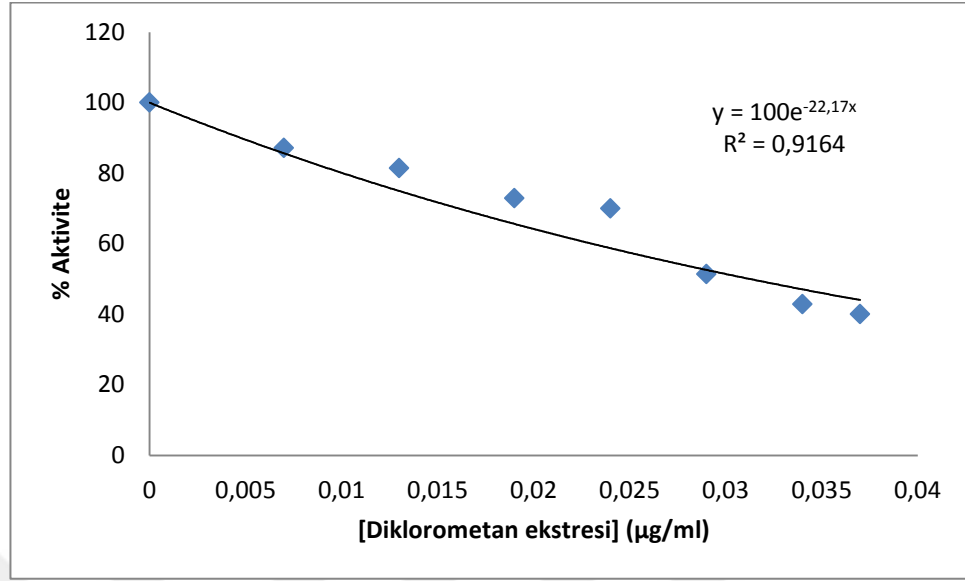


Şekil 4.32. Etanol ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği

4.3.2. Diklorometan ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği

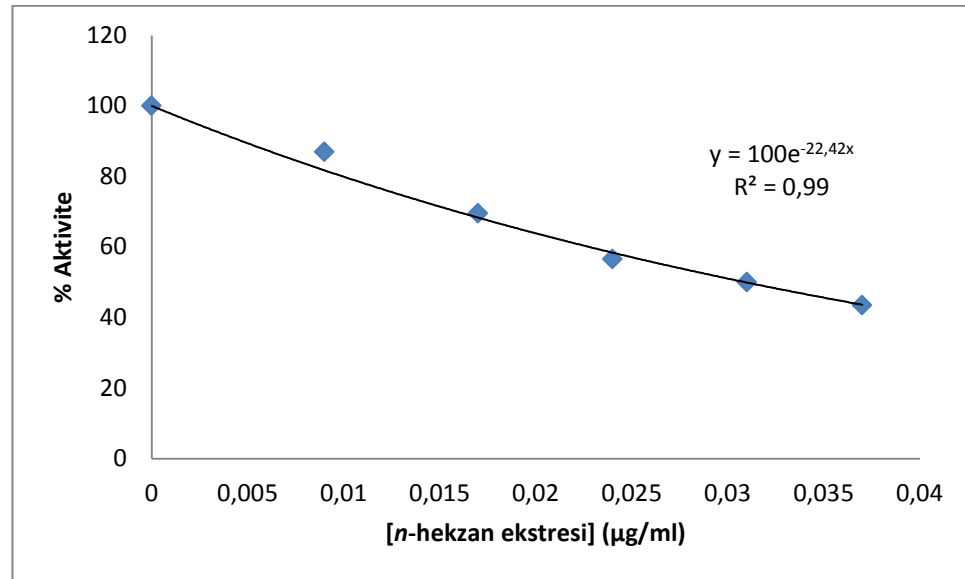


Şekil 4.33. Diklorometan ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği.

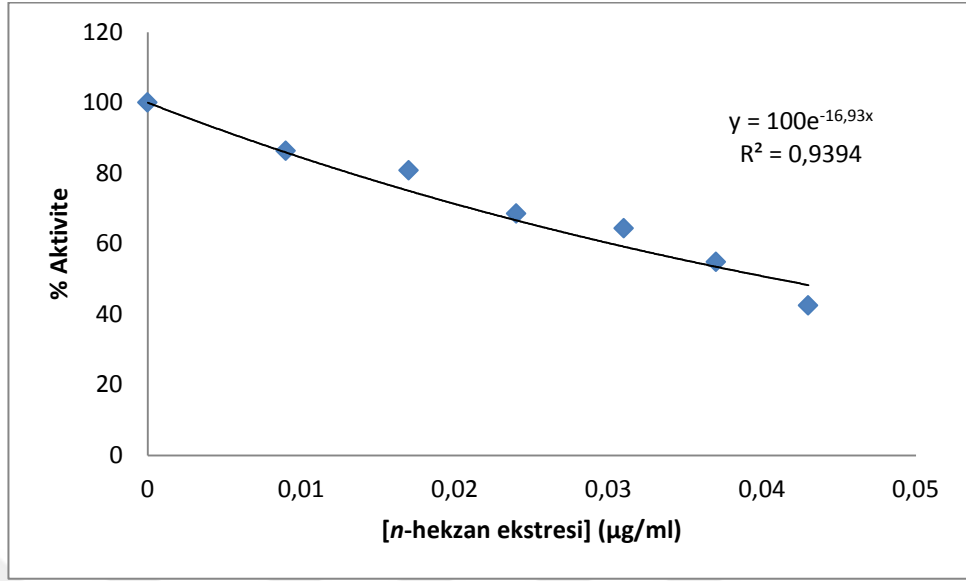


Şekil 4.34. Diklorometan ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği

4.3.3. *n*-Hekzan ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği

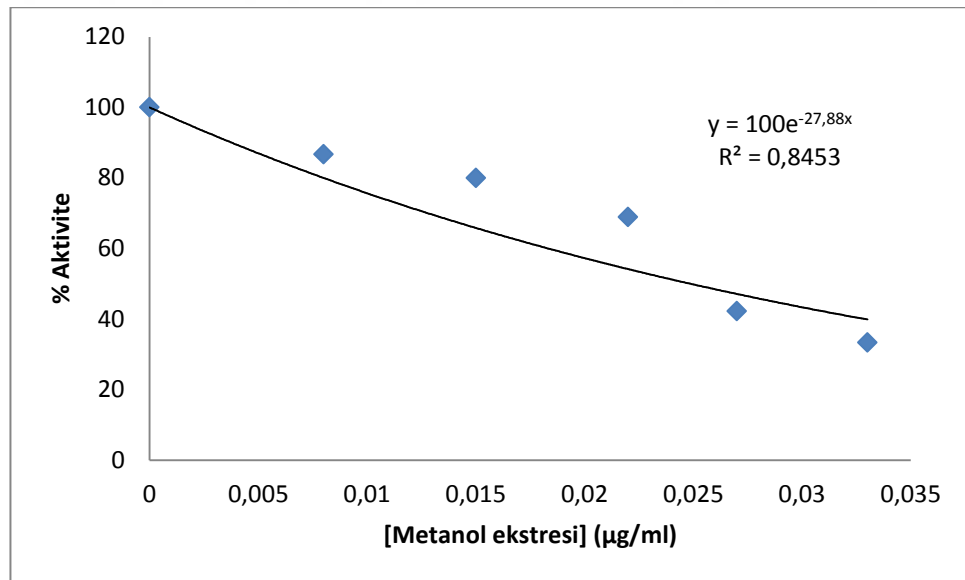


Şekil 4.35. *n*-Hekzan ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği

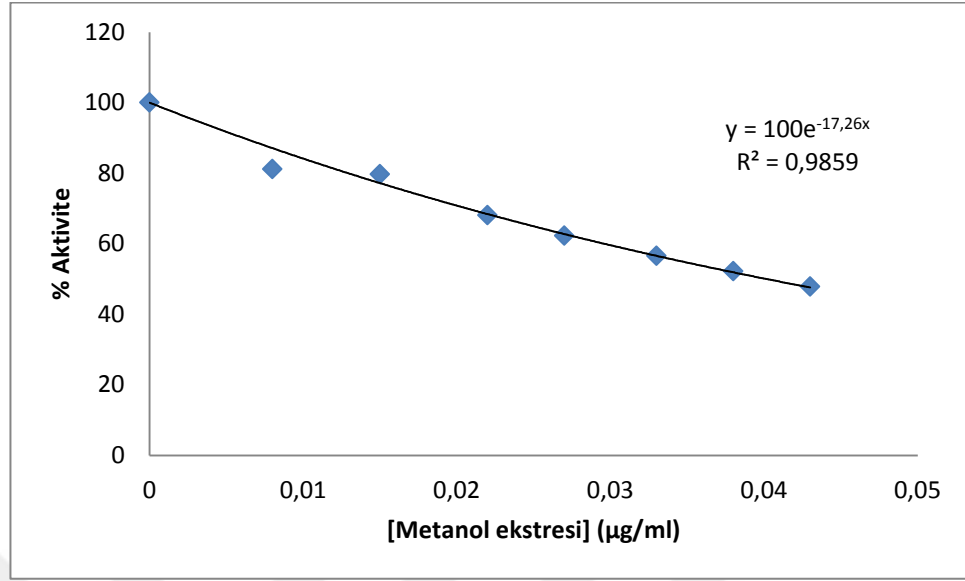


Şekil 4.36. *n*-Hekzan ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği

4.3.4. Metanol ekstresinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği

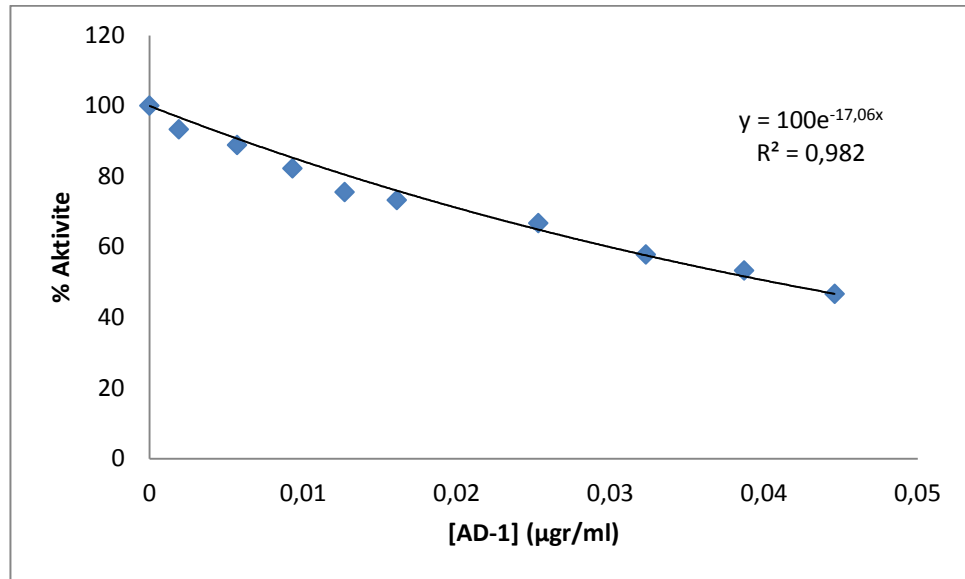


Şekil 4.37. Metanol ekstresi insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği

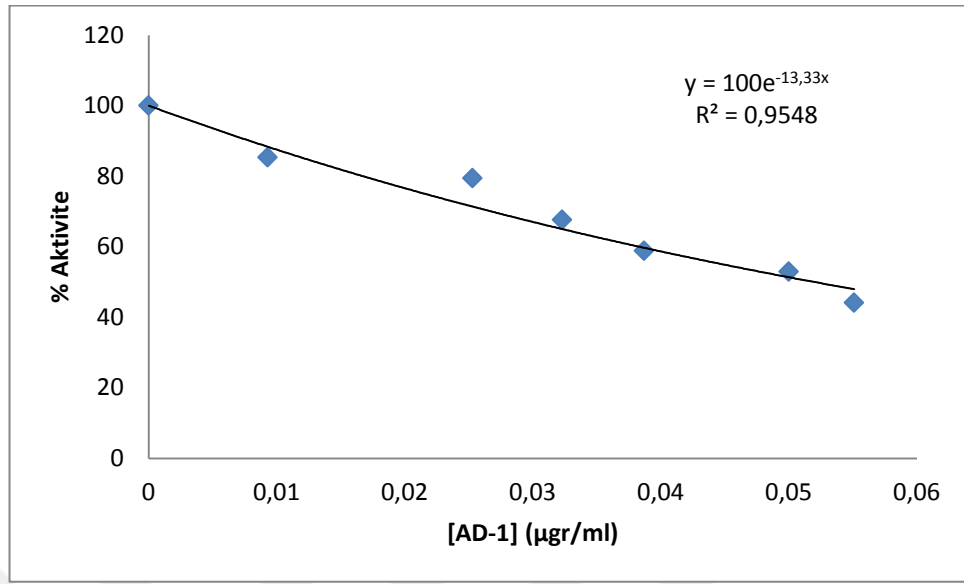


Şekil 4.38. Metanol ekstresi insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği

4.3.5. Herniarinin insan CA-I ve CA-II enzimleri için aktivite grafiği



Şekil 4.39. Herniarin insan CA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.40. Herniarin insan CA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde hammadde olarak gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde tıbbi ve aromatik bitkilerin önem kazanması ile birlikte bitkilere olan ilgi daha da artmıştır. Özellikle tıbbi ilaçlarda sentetik maddelerin oluşturduğu olumsuz sonuçlar ve yüksek maliyet doğal ürünlere olan ilgi ve ihtiyacı gün geçtikçe artırmıştır.

Yirminci yüzyıldan itibaren tedavi edici etkisi belirlenen bitkilerin sentezledikleri etken maddelerin saflaştırılması kimyasal yapılarının belirlenmesine yönelik çalışmalar başlamıştır. Bununla birlikte doğal ürün olarak saflaştırılan maddelerin sentetik üretimi de önem kazanmıştır. Bitki izolasyonu ve sentetik ilaç üretiminin hız kazandığı bu dönemlerde saf etken maddeler endüstriyel ilaç olarak kullanılmıştır (Koçer *et al.* 2012). Günümüzde kimyasal maddelerden kaynaklanan olumsuz sonuçlar ve bu kimyasal maddelerin ortaya çıkardığı yeni hastalıklar bitkilerin ve bitkisel ilaçların kullanımını ve beraberinde ekonomik değerini de artırmıştır. Büyük devletler bitkisel ilaçların kullanımını ön plana çıkarıp bitkisel kaynaklara ciddi paralar ayırmaya başlamıştır.

Oldukça zengin bir floraya sahip olan ülkemizde yetiştirilen tıbbi ve aromatik bitkilerin, bilinmeyen yeni ve ekonomik değeri yüksek farmakolojik aktivitelerinin ortaya çıkarılması için bilimsel çalışmalar yapılmakta ve gün geçtikçe bu çalışmalar daha fazla teşvik edilmektedir.

Ülkemizde halk arasında tarhun olarak bilinen *Artemisia dracunculus*. L. bitkisi yaygın bir şekilde baharat olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bitki çayı ve kozmetik sektöründe de kullanılan bitkinin geçmiş yıllarda tıbbi kullanımı da dikkat çekmiştir. Özellikle diyabet tedavisinde etkili olduğu rapor edilen tarhunun gün geçtikçe yeni bir farmakolojik aktivitesi ortaya çıkarılmaktadır (Swanston-Flatt *et al.* 1991; Aggarwal *et al.* 2015).

Tedavi edici etkileri yönünden önemli etkilere sahip olan *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin içeriğindeki özellikle kumarin türevi biyoaktif moleküller bitkinin farmakolojik aktivitesinin başlıca sebeplerindendir. Bu çalışmada *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin ekstre ve biyolojik aktivite gösterebilecek saf maddelerinin özellikle glokom hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların hedef enzimi olan CA-I ve II izoenzimlerine karşı inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmada *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin CH₂Cl₂ ekstresinden AD-1, AD-2, AD-3 ve AD-4 kodlu dört madde saflaştırılmış ve IR, 1D ve 2D NMR yöntemleriyle bu saf maddelerin kimyasal yapıları karakterize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları neticesinde AD-1 kodlu maddenin yapısı herniarin olarak belirlenmiş, AD-2 kodlu maddenin yapısının ise uzun zincirli asidik yapıda bir madde olduğu tahmin edilmiştir. AD-3 ve AD-4 kodlu maddelerin kimyasal yapılarının analiz edilebilmesi için NMR spektrumlarından yeterli saflıkta olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın bir sonraki aşamasında yapısı tam olarak belirlenemeyen AD-2, AD-3 ve AD-4 kodlu maddelerin yeniden saflaştırılması ve yapı tayinlerinin tamamlanması hedeflenmektedir.

Bu çalışmada insan eritrositlerinden CA-I ve II izoenzimleri afinite kromatografisi ile saflaştırılarak *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstraktları ile major metaboliti herniarinin bu enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir.

İnsanlar ve hayvanlarda birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar CA enzimlerini hedef alırlar. Asetazolamit, dorzolamit ve brinzolamit gibi sülfonamid türevleri ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimleri tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edilirler (Bülbül *et al.* 2002). İnsanlarda glukom hastalığının tedavisinde, ödem ve epilepsi tedavilerinde kullanılan ilaçlar CA enzimlerini inhibe ederler. CA enzimi eritrosit içeren çoğu dokuda iyi karakterize edilmiş pH düzenleyici bir enzimdir. Karbon dioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizler. Bu oldukça hızlı bir reaksiyondur. CA bu reaksiyonun hızı ileri derecede arttırarak saniyede 10⁴-10⁶ reaksiyon hızına ulaştırır (Supuran 2008).

Afinite kromatografisi ile CA enzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein muhtevaları 280 nm de absorbensları ölçülerek belirlenmiştir. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbens vermesi esasına dayanır (Segel 1968).

Kantitatif protein tayinleri Coomassie-Blue yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemin diğer protein tayinlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanabilirliği, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Enzim aktivitesi tayini için iki yöntem kullanılmıştır. Birincisi; Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen CO₂ hidrataz aktivitesidir (1960). Bu yöntemle CO₂'nin H₂O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃'ün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak ortamın pH'sını değiştirme süresinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem saflaştırma işlemlerinde elüatlardaki aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışmada kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesidir. Amstrong ve arkadaşları tarafından değiştirilen bu yöntemin esası, karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (1966).

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede IC₅₀ değerleri kullanılmaktadır. İnsan CA-I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerini belirlemek için *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstraktlarının ve major metaboliti herniarinin konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde çözeltileri hazırlanmış ve enzim üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla insan kanından saflaştırılan CA-I ve II izoenzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonlarında esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. İnhibisyon etkisi olan maddelerin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildikten sonra IC₅₀ değerleri bunlara bağlı olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstraktları ile major metaboliti herniarinin oldukça düşük IC₅₀ değerlerine

sahip olduğu, dolayısıyla bu maddelerin CA-I ve II enzim inhibisyonu aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada ilk defa *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstreleri ile major metaboliti herniarinin insan CA-I ve II izoenzimlerine karşı güçlü inhibitörler olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışmada *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin etanol, diklormetan, *n*-hekzan ve metanol ekstreleri ile CH₂Cl₂ ekstresinden saflaştırılan herniarin bileşiğinin insan CA-I ve II izoenzimlerine karşı inhibisyon aktivitesi ilk defa araştırılmıştır. Yapılan literatür taramasında *Artemisia dracunculus* L. bitki ekstrelerinin ve saf metabolitlerinin insan CA-I ve II izoenzimlerine karşı inhibisyon etkisi ile ilgili hiçbir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışma literatüre yeni bir bilgi kaynağı ve özgün bir eser olacaktır. Çalışmanın özgünlüğü yanında enzim inhibisyonu aktivitesi deneyleri sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerlerinin çok düşük çıkması ve incelenen maddelerin yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olması da çalışmanın özgünlüğüne önem ve değer katmıştır.

Literatürde önemli farmakolojik aktiviteleri rapor edilen ve günlük hayatımızda baharat olarak yaygın bir şekilde kullanılan *Artemisia dracunculus* L. bitkisine olan ilginin, bu çalışma ile daha da artacağı ümit edilmektedir. Ülkemizde tarhun yaygın adıyla bilinen *Artemisia dracunculus* L. bitkisinin tedavi edici ve faydalı yeni bir özelliğinin ortaya çıkarıldığı bu çalışmanın, bitkinin tüketimini teşvik edeceği gibi ekonomik değerini de artıracığı tahmin edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, S., Shailendra, G., M.Ribnicky, D., Burk, D., Karki, N., M.S. Wang, Q. 2015. An extract of *Artemisia dracunculus* L. stimulates insülin secretion from β cells, activates AMPK and suppresses inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 98-105.
- Aglarova, A., Zilfikarov, I., Severtseva, O. 2008. Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(2), 81-86.
- Aqili Khorasani, M.H. 1992. *Makhzan A Adviah*. Safa Publication, Tehran, pp.583–584.
- Arslan, O. 1994. Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitorlarının Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Armstrong, J., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T. 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 5137–5149.
- Asımgil, A. 1997. Şifalı Bitkiler. Timaş Yayınları-176, 276 s, İstanbul.
- Azaizeh, H., Saad, B., Cooper, E. and Siad, O. 2010. Traditional Arabic and Islamic Medicine, a Re-Emerging Health Aid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(4), 419–424.
- Amin, H., Amir S., Navid N., David C. Y. 2015. Self-tuning indirect adaptive control of noninverting buck-boost converter. *IET Power Electronics*. 8(11), 2299-2306.
- Balkaya, A. ve Yanmaz, R., 2001. Bitki Genetik Kaynaklarının Muhafaza İmkanları ve Tohum Gen Bankalarının Çalışma Sistemleri. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 10(39), 25-30.
- Balza, F. And Towers, G. 1984. Dihydroflavonols of *Artemisia dracunculus* L. *Phytochemistry*, 23, 2333-2337.
- Baytop, T. 1984. *Therapy with medicinal plants in Turkey*. Istanbul University Press, 520 s, İstanbul.
- Bottcher, K., Waheed, A. and Sly, W.S. 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: purification, characterization and comparison with mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72-248.
- Brahmi Z., Katho T., Hatsumata R., Hiroi, A., Miyakava, N., Yakaou, E., Sugaya, K., Onese, J., and Abe, N. 2012. Effective Cytochrome P450(CYP) Inhibitors Isolated from Tarragon (*Artemisia dracunculus*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(5), 1028-1031.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H.J. 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(3), 285-291.
- Bülbül, M., Saraçoğlu N., Küfrevioğlu Ö.İ., Çiftçi M. 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4- thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors:

- Syntesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10(8), 2561-2567.
- Chaleshtori, R.S., Rokni, N., Razavilar, V., Kopaei, M.R. 2013. The evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) essential oil and its chemical composition. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(9), 7877.
- Chaleshtori, R.S., Salehi, E. and Chaleshtori, A.S. 2014. Antibacterial activity of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) essential oil. *Iranian Journal of Public Health* 43(2), 148.
- Chauhan, R., Kitchlu, S., Ram, G., Kaul, M., Tava, A., 2010. Chemical composition of capillene chemotype of *Artemisia dracunculus* L. from North-West Himalaya, India. *Industrial Crops and Products*, 31, 546-549.
- Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M. 2000. The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. *The Carbonic Anhydrase New Horizons*, 90, 343-363.
- Chumbalov, T. and Yarova, M. 1970. Flavonoids of *Artemisia dracunculus* L. II. *Chemistry of Natural Compounds* 6, 645-645.
- Curini, M., Epifano, F., Genovese, S., Tammara, F., Menghini, L. 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* L. "Piemontese" from Italy. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(6), 738-739.
- Çelik, S., Konkan, R., Erkmén, H., Tabo, A. and Erkıran, M. 2007. Bitkisel İlaçlar ve Psikiyatride Kullanımı. *Düşünen Adam*, 20(4), 186-195.
- Davis, P.H. 1982. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, 311 p, Edinburgh.
- Deans, S.G. and Svoboda, K.P. 1988. Antibacterial activity of French tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) essential oil and its constituents during ontogeny. *Journal of Horticultural Science*, 63(3), 503-508.
- Demirdag, R., Comaklı V., Sentürk, M., Ekinci, D., Kufrevioğlu, O.I. and Supuran, C.T. 2013. Purification and characterization of carbonic anhydrase from sheep kidney and effects of sulfonamides on enzyme activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6), 1522-1525.
- Desire, O., Rivièrec, C., Razafindrazakab, R., Goossense, L., Moreauf, S., Guillonf, J., Ratsimamangab, S., Andriamadioa, P., Moorec, N., Randriantsoab, A. and Raharisololao, A. 2010. Antispasmodic and antioxidant activities of fractions and bioactive constituent davidigenin isolated from *Mascarenhasia arborescens* Raharisololalao. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 320-328.
- Devlin, T.M. 2002. *Biochemistry with clinical correlations*. 5th Ed., Wiley-Liss Inc., New York.
- Duric, K., Kovac-Besovic, E.E., Niksic, H., Muratovic, S. and Sofic, E. 2015. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* L. leaf extracts. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(2), 9-14.
- Ekinci, D., Karagoz, L., Ekinci, D., Sentürk, M. and Supuran, C.T. 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoid. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 28(2), 283-288.

- Fais, A., Corda, M., Era, B., Fadda, M.B, Matos, O., Quezada, E., Santana, L, Picciau, C., Podda, G. and Giovanna, D. 2009. Delogu Tyrosinase Inhibitor Activity of Coumarin-Resveratrol Hybrids. *Molecules*, 14(7), 2514-2520.
- Farnsworth, N. R., Akerev, O. and Bingel, A.S. 1985. The Bulletin of WHO. 63, 9865-9871.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1), 52-67.
- Flatt S, S. K., Flatt, P. R., Day, C. and Bailey, C. J. 1991. Traditional dietary adjuncts for the treatment of diabetes mellitus. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50(3), 641-651.
- Gezgin, D. 2006. Bitki Mitosları. Sel Yayıncılık, İstanbul.
- Gomez-Verjan, J.C., E.A. Estrella-Parra, I., Gonzalez-Sanchez, N.A., Rivero-Segura, R. Vazquez-Martinez, G., Magos-Guerrero, D. Mendoza-Villanuev, M.A. Cerbón-Cervantes, and Reyes-Chilpa, R. 2015. Toxicogenomic analysis of pharmacological active coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Genomics Data*, 6, 258-259.
- Hall, G. E. and Schraer, R. 1983. Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 75(1), 81-92.
- Heidari, S., Azizi M., Soltania F. and Hadian J. 2014. Foliar application of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and KNO_3 affects growth, essential oil content, and oil composition of French tarragon. *Industrial Crops and Products*, 62, 526–532.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. 2004. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone, 309 p, Edinburgh.
- Herz, W., Bhat, S. and Santhanam, P. 1970. Coumarins of *Artemisia dracunculoides* and 3', 6-dimethoxy-4', 5, 7-trihydroxyflavone in *A. arctica*. *Phytochemistry*, 9(4), 891-894.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the *Carbonic Anhydrase-New Horizons*. Birkhauser Verlag, New York.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hannen, M., Hamalainen, J. M., Vihinen, M., Sly, W.S. and Parkkila, S. 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase, *Biochemical Journal*, 392(1), 83-92.
- Hofer, O., Szabó, G. and Greger, H. 1986. 2-Hydroxy-4-methoxy-trans-cinnamic acid as a precursor of herniarin in *Artemisia Dracunculus* L. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 117(10), 1219-1222.
- Hooker, J.D. 1890. *The Flora of British India*. London.
- Isık, S., Vullo, D., Durdagi, S., Ekinci, D., Senturk, M., Cetin, A., Senturk, E. and Supuran, C.T. 2015. Interaction of carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with some pyridine and phenol hydrazinecarbothioamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(23), 5636-5641.
- Karimi, A., Hadian, J., Farzaneh, M. and Khadivi-Khubb, A. 2015. Phenotypic diversity and volatile composition of Iranian *Artemisia dracunculus* L. *Industrial Crops and Products*, 65, 315–323.
- Kavvadias, D., Abou-Mandour, A., Czygan, F. C., Beckmann, H., Sand, P., Riederer, P. and Schreier, P. 2000. Identification of benzodiazepines in *Artemisia*

- dracunculus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue. Biochemical and Biophysical Research Communications, 269(1), 290-295.
- Kirk-Ballard, H., Kilroy, G., Day, B.C., Wang, Z.Q., Ribnicky, D.M., Cefalu, W.T., Floyd, Z.E. 2014. An ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L. L. regulates gene expression of ubiquitin–proteasome system enzymes in skeletal muscle: Potential role in the treatment of sarcopenic obesity. Nutrition 30, S21-S25
- Koçak, G. 2011. Kumarin Halkası İçeren Metakrilat Monomerlerinin Sentezi. Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.
- Koçer, S. 2012. Liken Metaboliti Usnik Asitin Bazı Aril-Aminofenoller İle Schiff Bazları Türevleri ve Metal Komplekslerinin Sentezi, Antimutajenik Ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kilis.
- Koçyiğit, M. 2005. Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* L. and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 24, 9452–9458.
- Krungkrai, S.R., Suraveratun, N., Rochanakij, S., and Krungkrai, J. 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. International Journal of Parasitology, 31, 661-668.
- Kurkin, V. A., Zapesochaya, G. G., Avdeeva, E. V. 1997. Structure and properties of estragonoside a new flavonoid from the epigeal part of *Artemisia dracunculus*. Chemistry of Natural Compounds, 33, 61–65.
- Kupriyanov, A.N.1998. What Grows in the Garden, Barnaul.
- Lacy, A. and O’Kennedy, R. 2004. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. Current Pharmaceutical Design, 10(30), 3797-3811
- Lewin, R. 2000. Modern İnsanın Kökeni. TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, TÜBİTAK, Ankara.
- Lindskog, S. 1997. Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase, Pharmacology & Therapeutics, 74(1), 1-20.
- Logendra, S., Ribnicky, D.M., Yang, H., Poulev, A., Ma, J., Kennelly, E.J. and Raskin, I. 2006. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculus* L. Phytochemistry, 67, 1539–1546.
- Maham, M., Moslemzadeh, H. and Jalilzadeh-Amin, G. 2014. Antinociceptive effect of the essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*). Pharmaceutical Biology, 52, 208-212.
- Mallabaev, A., Saitbaeva, I. M. and Sidiyakin, G. P. 1971. The isocoumarin artemidinal from *Artemisia dracunculus*. Chemistry of Natural Compounds, 7(3), 257–259.
- Maren, T.H. 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 130(1), 26–29.
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C. and Godman, D.F. 1997. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic

- anhydrase inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 98-104.
- Matos, M., Santana, L., Riarte, E., Abreu, O., Molina, E. and Yordi, E.G. 2015. Coumarins-An Important Class of Phytochemicals Chapter. *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health, Agricultural and Biological Sciences*.
- Meepagala, K.M., Sturtz, G. And Wedge, D.A. 2002. Antifungal constituent soft essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6989–6992.
- Meldrum, N.U. and Roughton F. J. W. 1933. Carbonic anhydrase Its preparation and properties. *The Journal of Physiology*, 80(2), 113–142.
- Nishimori, I. 2004. Catalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins. in *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 24-43.
- Nuraliev, Y. 1991. Medicinal Plants [in Russian], IKPA, Nizhny Novgorod.
- Obolskiy, D., Pischel, I., Feistel, B., Glotov, N. And Heinrich, M. 2011. *Artemisia dracunculus* L. (tarragon): a critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11367-11384.
- Onuchak, L., Kurkin, V., Minakhmetov, R., A. and Kurkina, A.V. 2000. HPLC analysis of *Artemisia dracunculus* extracts in Russian. *Chemistry of Natural Compounds*, 36(2), 115–117.
- Özcan, M. and Akbulut, M. 2008. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. *Food Chemistry*, 106(2), 852–858.
- Poulev, A., Joseph, O., Gary, W., Malek, D., Jager, R. and Ilya, R. 2004. *J. Food Chemistry and Toxicology*, 42, 585–598.
- Principe, P. 1991. Monetizing the pharmacological benefits of plants, in: Cracraft, J., Grifo, T. F., (Eds.), *Medicinal Resources of the Tropical Forest*. Columbia University Press New York, pp.191-236.
- Ren, X.L. and Lindskog, S. 1992. Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120(1), 81-86.
- Renzi, M.J., Wexler, T.L. and Raper, J.A. 2000. Olfactory sensory axons expressing a dominant-negative semaphorin receptor enter the CNS early and overshoot their target. *Neuron*, 28, 437– 447.
- Reza, S.M., Hamideh, M. and Zahra, S. 2015. The Nociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Artemisia dracunculus* L. Aqueous Extract on Fructose Fed Male Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5.
- Roughton, F. J. W., and Booth, V. H. 1946. The effect of substrate concentration, PH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochemistry Journal*, 40(2), 319-330.
- Saadali, B., Boriky, D., Blaghen, M., Vanhaelen, M. and Talbi, M. 2001. Alkamides from *Artemisia Dracunculus* L. *Phytochemistry*, 58, 1083-1086.
- Sayyah, M., Nadjafnia, L. and Kamalinejad, M. 2004. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia Dracunculus* L. L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 283–287.

- Segel, N., Kay, J. M., Bayley, T. J and Paton, A. 1968. Pulmonary hypertension with hepatic cirrhosis. *British Heart Journal*, 30, 575-578.
- Senturk, M., Gulcin, I., Dastan, A., Kufrevioglu, O.I. and Supuran, C.T. 2009. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibitor of human erythrocyte I and II isoenzymes with antioxidant phenolic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3207-3211.
- Sethna, S. M. and Shah, N. M. 1944. *The Chemistry of Coumarins*, 36, 1-62.
- Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995. Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 375-401.
- Sollai, F., Zucca, P., Sanjust, E., Steri D. and Rescigno, A. 2008. Umbelliferone and Esculetin: Inhibitors or Substrates for Polyphenol Oxidases! *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(12), 2187-2193.
- Stubbendieck, J., Coffin, M.J., Landholt, L.M. 2003. Weeds of the Great Plains, 3rd ed. Nebraska Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry, in cooperation with the University of Nebraska, Lincoln, NE, pp. 605.
- Sugrue, M.F. 2000. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(1), 87-112.
- Supilnikova, A.V. 2004. Developing of Methods of Quantitative and Qualitative Analysis for Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). Ph.D. thesis, Samara.
- Supuran, C.T. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications cfor inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 168-181.
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A. 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1(1), 61-97 .
- Swanston-Flatt, S.K., Flatt, P.R., Day, C. and Bailey, C.J. 1991. Traditional dietary adjuncts for the treatment of diabetes mellitus. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50, 641-651.
- Tozlu, İ. 1997. Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Türközü, D., Yaşar F., Ellialtıoğlu Ş.Ş. and Yıldırım B. 2014. Tarhun (*Artemisia dracunculus*) Bitkisinin Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltılması Üzerinde Çalışmalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(3), 300-308.
- Vandanmagsar, B., Haynie, K., Wicks, S., Bermudez, E., Mendoza, T., Ribnicky, D., Cefalu, W. And Mynatt, R. 2014. *Artemisia dracunculus* L. L. extract ameliorates insulin sensitivity by attenuating inflammatory signalling in human skeletal muscle culture. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 16, 728-738.
- Venskutonis, R., Gramshaw, J. W., Dapkevicius, A. and Baranauskiene, M. 1996. Composition of volatile constituents in tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) at different vegetative periods. In *Flavour Science. Recent Developments*, 46-51.
- Venugopala, K.N., Rashmi ,V. and Odhav, B. 2013. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 14.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N. G. 1948. Electrometric And Colorimetric Determination Of Carbonic Anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.

ÖZGEÇMİŞ

17 Mayıs 1988 yılında Rize'nin Derepazarı ilçesinde dünyaya gelen Bayram YURTVERMEZ ilk ve orta öğrenimini Rize'nin Derepazarı ilçesinde tamamladı. 2005 yılında lisans eğitimine başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi ilköğretim Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Merzifon Polis Meslek Eğitim Merkezi'nde polislik mesleki eğitimi alarak polis memuru oldu. 2012 yılında Yüksek Lisans eğitimine başlayan araştırmacı halen Ağrı-Patnos İlçe Emniyet Müdürlüğü'nde çalışmaktadır.