



BAZI DÜZCE HALK İLAÇLARININ KİMOTRİPSİN, ÜREAZ İNHİBE EDİCİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ

CHYMOTRYPSIN, UREASE INHIBITORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SOME DÜZCE FOLK MEDICINES

Tuğba GÜNBATAN^{1*} , Ece MİSER SALİHOĞLU² , İlhan GÜRBÜZ¹ ,
Sevgi AKAYDIN² , Galip AKAYDIN³ 

¹Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyokimya Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

³Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, 06800, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Düzce'de halk ilacı olarak kullanılan yedi bitkinin [*Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin, *Mentha longifolia* (L.) L. subsp. *typhoides* (Briq.) Harley, *Origanum vulgare* L., *Rubus ulmifolius* Schott, *Salvia tomentosa* Mill., *Thymus longicaulis* C.Presl subsp. *longicaulis*, *Trachystemon orientalis* (L.) D. Don] üreaz, kimotripsin inhibe edici ve antioksidan aktivitelerinin tespiti amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla bitkilerden metanol ve su ekstraktları hazırlanmıştır. Daha sonra *in vitro* üreaz ve kimotripsin inhibitör aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca farklı yöntemlerle antioksidan aktiviteleri (ABTS, CUPRAC, DPPH), toplam fenol ve flavonoid içerikleri de tespit edilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: *D. communis*, *O. vulgare*, *S. tomentosa* ve *T. longicaulis*'in metanol ekstraktları orta düzeyde üreaz inhibitör aktivite (%34.26 ile %44.94 aralığında inhibisyon) gösterirken, diğerlerinde aktivite daha düşük bulunmuştur. En güçlü kimotripsin inhibe edici aktivite *R. ulmifolius* metanol ekstresi ve *T. orientalis* su ekstresinde gözlenmiştir (IC_{50} değerleri sırasıyla 65.32 ve 78.65 µg/ml). Genel olarak, çalışılan bitkiler yüksek fenol ve flavonoid içeriklerine uygun olarak yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Sonuç olarak *R. ulmifolius* ve *T. orientalis* kuvvetli kimotripsin inhibe edici aktiviteleri ile dikkat çekmiştir. Bu bitkilerin kimotripsin aktivitesi üzerinde daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, halk ilacı, kimotripsin, *Rubus ulmifolius*, üreaz

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Tuğba Günbatan
e-posta / e-mail: tugbagunbatan@gazi.edu.tr, Tel. / Phone: +903122023181

ABSTRACT

Objective: In this study, determining the urease, chymotrypsin inhibitory and antioxidant activities of seven plants [*Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin, *Mentha longifolia* (L.) L. subsp. *typhoides* (Briq.) Harley, *Origanum vulgare* L., *Rubus ulmifolius* Schott, *Salvia tomentosa* Mill., *Thymus longicaulis* C.Presl subsp. *longicaulis*, *Trachystemon orientalis* (L.) D. Don] used as folk medicine in Düzce was aimed.

Material and Method: For this purpose, methanol and water extracts were prepared, then in vitro urease and chymotrypsin inhibitory activities were determined. Antioxidant activities (ABTS, CUPRAC, DPPH), total phenol and flavonoid contents were also determined.

Result and Discussion: While *D. communis*, *O. vulgare*, *S. tomentosa* and *T. longicaulis* methanol extracts showed moderate urease inhibitory activity (inhibitions between 34.26% and 44.94%), the activity was lower in others. The strongest chymotrypsin inhibitory activities were observed in *R. ulmifolius* methanol extract and *T. orientalis* water extract (IC_{50} : 65.32 and 78.65 μ g/ml, respectively). In general, the studied plants showed high antioxidant activity in accordance with their high phenol and flavonoid contents. In conclusion, *R. ulmifolius* and *T. orientalis* attracted attention with strong chymotrypsin inhibitory activities. More comprehensive studies on the chymotrypsin activity of these plants are required.

Keywords: Antioxidant, chymotrypsin, folk medicine, *Rubus ulmifolius*, urease

GİRİŞ

Üreaz, bitkiler, mantarlar ve bakteriler dâhil olmak üzere çok çeşitli canlıda bulunan, amonyak ve karbondioksit oluşturmak üzere ürenin hidrolizini katalize eden nikel bağımlı bir enzimdir [1]. Birincil fizyolojik rolü, organizmanın dışarıdan aldığı veya kendisi tarafından üretilen ürenin bir azot kaynağı olarak kullanmasını sağlamaktır [2]. *Helicobacter pylori*'nin midenin düşük pH'sında yaşaması ve kolonizasyonu için üreaz enzimine gereksinim duyduğu ve böylece peptik ülser, mide kanseri gibi patolojileri indüklediği bilinmektedir. Bununla birlikte üreaz enzimi üretebilen ve insanda enfeksiyonlara neden olan farklı bakteriler de bulunmaktadır. Örneğin *Proteus mirabilis*'in ürettiği üreaz enzimi ürolitiazis ve akut piyelonefrite neden olurken, *Yersinia enterocolitica*'nın ürettiği üreaz enzimi ise reaktif artrit gelişimine katkıda bulmaktadır. Üreaz enziminin aktivitesinin kontrolü, tarım ve ekoloji açısından da oldukça önemlidir. Tarımda üre içeren gübre uygulamalarından sonra topraktaki bakterilerin ürettiği üreaz aktivitesiyle atmosfere önemli derecede amonyak salınır ki, bu da ekolojiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Diğer taraftan üreaz, ihtiyaç duydukları azottan mahrum bırakmanın yanında toprağın pH'sında artışa da neden olarak bitkiler için de zararlıdır [1]. N-(*n*-butil) tiyofosforik triamit (NBPT) gibi üreaz inhibitörleri kullanılarak bu durumun önüne geçilmeye çalışılır [3]. Fosfordiamidatlar, hidroksamik asit türevleri ve imidazol yapısındaki bazı bileşiklerin üreaz enzimini inhibe ettiği tespit edilmiş olsa da klinik kullanıma geçen sadece bir bileşik (asetohidroksamik asit) vardır. Dolayısıyla yan etkisi hiç olmayan veya kabul edilebilir düzeyde az olan yeni üreaz inhibitörlerinin keşfi oldukça önemli olup bu alanda yapılan çalışmalar son zamanlarda hız kazanmıştır [4].

Serin proteazlar, hidrolazlar grubuna ait proteazların önemli bir alt sınıfıdır. Gastrointestinal sistemde yer alan serin proteazlar insan vücudunda önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir ve protein sindiriminde de anahtar rol oynamaktadır [5]. Serin proteazların inflamasyon sırasında doku hasarına karıştığı bilinmektedir. TNF- α , IFN- γ , interlökinler, nitrik oksit ve prostaglandinler de dâhil olmak üzere proinflamatuvar mediyatörlerin üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı katılırlar. Proinflamatuvar sitokin zimojenlerinin olgunlaşmasında yer alırlar, proinflamatuvar aktivitelerini indüklerler ve monositlerden salınmalarını da etkilerler. Bu nedenle, inflamatuvar sitokinlerin üretiminde yer alan serin proteazların aktivitesinin inhibisyonu veya modülasyonu, inflamatuvar hastalıklarının tedavisinde potansiyel bir strateji olarak kabul edilmektedir [6]. Bununla birlikte, aktivitelerindeki artma veya azalma kronik obstrüktif akciğer hastalığı, pankreatit, pankreas/kolorektal kanserler, Alzheimer gibi önemli hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir [5,7]. Öte yandan, amino asitlerin fazlası yağa dönüşüp depolanan trigliseritlerin sentezinin öncüsü olan glukoz veya asetil-CoA üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla protein sindiriminde rol alan bu enzimlerin inhibisyonu, obezite tedavisinde de faydalı olabilmektedir. Ayrıca serin proteaz inhibitörlerinin bağışıklık sistemini ve kan

üretimini destekleyici etkisi de bilinmektedir [8]. AIDS tedavisinde kullanılan HIV proteaz inhibitörleri (örn: ritonavir) ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan ACE inhibitörleri gibi ilaçlar, piyasada bulunan serin proteaz inhibitörlerinin örnekleridir [7].

Önemli serin proteazlardan biri olan kimotripsin, pankreasda inaktif prekürsörü kimotripsinojen olarak üretilir. Bağırsakta tripsin ile hidroliz edilip aktif formu kimotripsine dönüşür. Aktif hale geçen kimotripsin enzimi tirozin, fenilalanin, triptofan ve lösinin C-terminal tarafındaki peptid bağlarının hidrolizini seçici olarak katalize eder. Proteinlerin, fibrin pıhtılarının sindirimi, kanser hücrelerinin etrafındaki proteinlerin uzaklaştırılmasıyla kanserden korunma gibi birçok fizyolojik olayda önemli role sahiptir [9]. Bu enzimin inhibisyonunun bakteri üremesini önlediği, kan basıncını düşürüp vazodilatasyon sağladığı, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [10]. Diğer taraftan kimotripsin inhibitörlerinin irritabl bağırsak sendromu ve ülseratif kolit semptomlarını azaltmada etkili olduğu da bildirilmiştir [11]. Günümüzde enfeksiyon hastalıkları başta olmak üzere pek çok hastalık üzerinde yapılan çalışmada, kimotripsin enziminin inhibisyonu hedef alınmakla birlikte henüz akut pankreatit, kronik pankreatit, Stevens-Johnson sendromu, yanık, septik şok ve toksik epidermal nekrolizis durumlarında klinik kullanımına onay alan bir adet kimotripsin inhibitörü bulunmaktadır. Söz konusu ürün (Ulinastatin®), yan etkileri olabilen ve intravenöz yoldan uygulanabilen bir üründür. Bu nedenle yan etkisi olmayan veya daha az olan, ucuz, oral yoldan uygulanabilecek kimotripsin inhibitörlerine ihtiyaç vardır.

Bitkiler, zengin fitokimyasal çeşitlilikleri ile yeni ilaç geliştirme çalışmalarında son derece önemli bir başlangıç noktasıdır. Tarama çalışması olarak planlanan bu projede de Düzce'de mide ağrısı, karın ağrısı, inflamasyon, iç hastalıkları, yara-yanık gibi üreaz, kimotripsin inhibe edici ve antioksidan aktivitenin etkili olabileceği durumları akla getiren hastalıklar başta olmak üzere halk ilacı olarak kullanılan [12] ve daha önce üzerinde üreaz/kimotripsin tripsin enzimini inhibe edici aktivitesi konusunda çalışma bulunmayan yedi bitkinin [*Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin, *Mentha longifolia* (L.) L. subsp. *thyphoides* (Briq.) Harley, *Origanum vulgare* L., *Rubus ulmifolius* Schott, *Salvia tomentosa* Mill., *Thymus longicaulis* C.Presl subsp. *longicaulis*, *Trachystemon orientalis* (L.) D. Don] üreaz ve kimotripsin enzimini inhibe edici aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ABTS, CUPRAC, DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivite tayinlerinin yapılması, ilaveten toplam fenol ve toplam flavonoid içeriklerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bitki Materyali

Dioscorea communis Düzce, Akçakoca, Kurukavak'dan (toplayıcı no: 09DZ066); *Mentha longifolia* subsp. *thyphoides* Düzce, Çilimli, Yukarıköy'den (toplayıcı no: 09DZ143); *Origanum vulgare* Düzce, Yığılca, Güney Köyü'nden (toplayıcı no: 09DZ155); *Rubus ulmifolius* Düzce, Merkez, Yukarıyalyalar'dan (toplayıcı no: 09DZ154); *Salvia tomentosa* Düzce, Yığılca, Mengen'den (toplayıcı no: 09DZ157); *Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis* Düzce, Gümüşova, Yeşilyayla Köyü'nden (toplayıcı no: 09DZ109); *Trachystemon orientalis* Düzce, Akçakoca, Kurukavak Köyü'nden (toplayıcı no: 09DZ068) toplanmıştır. Bitkilerin bilimsel isimlerinin tayini Prof. Dr. Galip Akaydın tarafından yapılmıştır. Herbaryum örnekleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda (GUEF) muhafaza edilmektedir.

Ekstraksiyon

D. communis'in kökleri, *Rubus ulmifolius*'un sürgünleri, *M. longifolia* subsp. *thyphoides*, *O. vulgare*, *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* ve *T. orientalis*'in toprak üstü kısımları, *Salvia tomentosa*'nın çiçek, yaprak ve toprak üstü kısımları gölgede kurutulmuş ve bitki değirmeninde kaba toz olacak şekilde öğütülmüştür. Daha sonra her bitki örneğinden 2'şer gram alınmış ve ayrı ayrı 50'şer ml metanol veya su ile ultrasonik banyoda 30 dakika çalkalanarak masere edilmiştir. Süre sonunda ekstreler süzülmuş ve maserasyon işlemi aynı şekilde ikişer kez daha tekrar edilmiştir. Her bitkiden elde edilen metanol ekstreleri kendi içinde birleştirilip alçak basınç altında 45°C'yi geçmeyen sıcaklıkta evapore edilerek kurutulmuş, sulu ekstreler ise liyofilize edilmiştir. Elde edilen tüm ekstreler kullanılıncaya kadar buzdolabında (4-6°C'de) muhafaza edilmiştir.

Üreaz İnhibe Edici Aktivite Tayini

Üreaz aktivitesi, indofenol yöntemi kullanılarak amonyak üretiminin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. İlk olarak mikroplağın kuyucuklarına 25'er µl jack bean üreaz enzim solüsyonu (10 U/ml) ve 5 µl test örneği (%80 etanol içinde) konulup 30°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 55 µl 100 mM üre içeren tampon (0.01 M K₂HPO₄, 1 mM EDTA ve 0.01M LiCl) ilave edilip tekrar 30°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 45 µl fenol reajanı (%1 a/h fenol ve %0.005 a/h sodyum nitroprusit) ve 70 µl alkali reajanı (%0.5 a/h NaOH ve %0.1 aktif klorit taşıyan NaOCl) ilave edilmiş ve 50 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 630 nm'de absorbansdaki artış ölçülmüştür. Kontrol ve referans deneylerinde test örneği yerine sırasıyla %80'lik etanol ve tiyoüre kullanılmıştır. Deneyler üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır [13]. Yüzde inhibisyon aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

A_{test}: Test örneğinin absorbansı
A_{kontrol}: Kontrolün absorbansı

Kimotripsin İnhibe Edici Aktivite Tayini

α-Kimotripsin inhibe edici aktivite Cannell ve ark. (1988) tarafından kullanılan metotta bazı değişiklikler yapılarak tespit edilmiştir. 60 µl 50 mM Tris-HCl tamponu, 10 µl test çözeltisi (etanol içinde) ve 30 µl enzim çözeltisi (36 U/ml) içeren reaksiyon karışımı 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiş ve süre sonunda 410 nm'deki absorbansları Versa Max mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür. Bu işlemin ardından reaksiyonu başlatmak için 1,3 mM 30 µl substrat (N-süksinil fenilalanin-p-nitroanilit) eklenmiştir. 60 dakika 37°C'de inkübasyondan sonra 410 nm'deki absorbanslar tekrar ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak fenilmetansülfonil florit kullanılmıştır. Tüm deney üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Yüzde inhibisyon aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır [14]:

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

A_{test}: Test örneğinin absorbansı
A_{kontrol}: Kontrolün absorbansı

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Mikroplakanın kuyucuklarına test örneklerinden (metanol veya su içinde) 150'şer µl ve 1x10⁻³ M DPPH çözeltisinden (metanol içinde) 50'şer µl konulup 30 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından absorbanslar 517 nm'de ölçülmüştür. Kontrol deneyinde test örneği yerine su veya metanol konulmuştur. Standart antioksidan ajan olarak gallik asit (metanol içinde) kullanılmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır. Yüzde inhibisyonlar aşağıdaki formülden hareketle hesaplanmıştır [15].

$$\text{Yüzde inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{test}})] / (A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

A_{kontrol}: kontrolün absorbansı
A_{test}: test örneğinin absorbansı

Bakır İndirgenme Antioksidan Kapasitenin (CUPRAC) Tayini

İlk olarak standart antioksidan bileşik olarak kullanılan gallik asitten seri dilüsyon (metanol içinde) hazırlanmıştır. Mikroplakanın kuyucuklarına 27.5 µl test örneği (metanol veya su içinde) veya farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerinden konulmuştur. Daha sonra her bir kuyucuğa sırasıyla 27.5 µl su, 50 µl 10⁻² M CuCl₂ çözeltisi, 50 µl amonyum asetat tamponu (1 M, pH 7.0), 50 µl neokuproin çözeltisi (7.5 x 10⁻³ M, %96'lık etanol içinde) konulmuş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 450 nm'deki absorbanslar köre karşı ölçülmüştür. Deney sonucunda gallik asit çözeltileri ile elde edilen absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Örneklerinin deney sonucunda verdiği absorbans ve gallik asit ile

hazırlanan kalibrasyon eğrisinin eğiminin denkleminde hareketle sonuçlar “mg gallik asit eşdeğeri (G.A.E.)/g ekstre” cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır [16].

ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] Radikal Katyonu Renk Giderici Aktivitenin Tayini

İlk olarak 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde 2 mM ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiliye 2.45 mM'lık potasyum persülfat ilave edilip manyetik karıştırıcı ile 12 saat karıştırılıp ABTS radikali üretilmiştir. Hazırlanan ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce 3:1 oranında fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Standart antioksidan olarak kullanılan gallik asitten (metanol içinde) seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Mikroplakanın kuyucuklarına 100 µl test örneği (metanol veya su içinde) veya farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltisi ve 100 µl ABTS çözeltisi konulmuştur. Kontrol olarak test örneği/gallik asit çözeltisi yerine metanol veya su kullanılmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildikten sonra absorbansları 734 nm'de okunmuş ve gallik asit çözeltileri ile elde edilen absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Örneklerin deney sonucunda verdiği absorbans ve kalibrasyon eğrisinin eğiminin denkleminde hareketle sonuçlar “mg G.A.E./g ekstre” cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır [17].

Total Flavonoit Miktar Tayini

Total flavonoit miktarının tayini "alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi" ile belirlenmiştir [18]. Bu yöntemde ilk olarak rutinden (%80 etanol içinde) bir seri dilüsyon hazırlanmıştır. Test örnekleri metanol veya suda çözülmüştür. Mikroplakanın kuyucuklarına 20 µl test örneği veya farklı konsantrasyondaki rutin çözeltilerinden konulmuştur. Üzerine 60 µl %75'lik etanol, 10 µl %10'luk alüminyum klorür, 10 µl 0.4 M sodyum asetat çözeltisi ve 100 µl distile su ilave edilip oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 415 nm'deki absorbanslar ölçülmüş ve rutin dilüsyonları ile elde edilen absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilip kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Rutin ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle örneklerin total flavonoit miktarı “mg rutin eşdeğeri (R.E.)/g ekstre” cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir.

Total Fenol Miktar Tayini

Toplam fenol miktar tayini "Folin Ciocalteu yöntemi" ile belirlenmiştir [19, 20]. Öncelikle gallik asitten seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. 100 µl test örnek çözeltisi (su içinde) 125 µl Lowry C çözeltisi* ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımına 12.5 µl Folin Ciocalteu reajanı (%96 etanol ile 1/3 oranında seyreltilerek) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyondan sonra oluşan mavi rengin absorbansı 750 nm'de Versa Max mikroplaka okuyucu ile ölçülmüştür. Gallik asit çözeltileri ile elde edilen absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilip kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Gallik asit ile elde edilen kalibrasyon eşitliğinden hareketle test örneklerinin total fenol miktarı “mg G.A.E./g ekstre” cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir. Bitkilerin metanol ekstraktlarının sudaki çözünürlüğü oldukça düşük olup ancak metanol-etanol gibi organik çözücülerde çözülebilmektedir. Organik çözücüde çözülüp bu prosedüre uygulandıklarında ise çökelek oluşması nedeniyle sonuçlar değerlendirilememiş ve sadece sulu ekstraktların fenolik içerikleri tespit edilmiştir.

* Lowry C çözeltisinin hazırlanması:

Lowry C çözeltisi = 1 ml Lowry B çözeltisi + 50 ml Lowry A çözeltisi

Lowry B solüsyonu = 25 mg CuSO₄ + 5 ml %1 NaKC₄H₄O₆ çözeltisi

Lowry A çözeltisi = 50 ml 0.1M NaOH çözeltisi + 1 g Na₂CO₃

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışılan ekstraktların üreaz ve kimotripsin inhibe edici aktiviteleri Tablo 1'de verilmiştir (sadece %40 ve üzeri inhibisyon gösteren ekstraktlar için IC₅₀ değeri hesaplanmış, daha düşük aktivite görülen durumlarda %50 ve üstü aktiviteye ulaşmak için gereken yüksek konsantrasyonlar deney prosedürü için uygun değildir). Bu tablodan anlaşılacağı üzere çalışılan bitkiler üreaz enzimi üzerinde genel olarak orta ve düşük inhibe edici aktiviteye sahip olmakla birlikte en yüksek üreaz inhibe edici aktivite D.

communis (kök) bitkisinin metanol ekstresinde görülmüştür (IC_{50} : 66.03 $\mu\text{g/ml}$). *R. ulmifolius*'un metanol ekstresi ve *T. orientalis*'in su ekstresi ise kimotripsin enzimini önemli derece inhibe etmektedir (IC_{50} değerleri 65.32 ve 78.65 $\mu\text{g/ml}$).

Tablo 1. Çalışılan bitkilerin üreaz ve kimotripsin inhibe edici aktiviteleri

| Bitkiler/referans maddeler | Ekstre | İnhibisyon (%) \pm standart hata | |
|---|---------|---|--|
| | | Üreaz ^a | Kimotripsin ^b |
| <i>D. communis</i> (kök) | Su | 38.93 \pm 2.45 | 9.36 \pm 1.21 |
| | Metanol | 44.94 \pm 0.79 (IC_{50} : 66.03 \pm 1.19 $\mu\text{g/ml}$) | 19.88 \pm 1.20 |
| <i>D. communis</i> (toprak üstü) | Su | 27.22 \pm 3.44 | - |
| | Metanol | 27.42 \pm 1.08 | 25.39 \pm 1.58 |
| <i>M. longifolia</i> subsp. <i>thyphoides</i> (toprak üstü) | Su | 24.42 \pm 1.58 | 18.25 \pm 1.37 |
| | Metanol | 20.65 \pm 1.19 | 46.21 \pm 0.90 (IC_{50} : 160.63 \pm 1.10 $\mu\text{g/ml}$) |
| <i>O. vulgare</i> (toprak üstü) | Su | 17.44 \pm 0.72 | 19.71 \pm 0.47 |
| | Metanol | 34.82 \pm 0.83 | 22.11 \pm 1.07 |
| <i>R. ulmifolius</i> (sürgün) | Su | 18.24 \pm 1.14 | 33.33 \pm 1.37 |
| | Metanol | 26.58 \pm 0.24 | 76.69 \pm 0.95 (IC_{50} : 65.32 \pm 0.43 $\mu\text{g/ml}$) |
| <i>S. tomentosa</i> (çiçek) | Su | 15.77 \pm 3.52 | 38.22 \pm 1.40 |
| | Metanol | 31.89 \pm 0.94 | 15.03 \pm 1.89 |
| <i>S. tomentosa</i> (yaprak) | Su | 16.56 \pm 1.07 | 44.33 \pm 1.13 (IC_{50} : 206.70 \pm 3.16 $\mu\text{g/ml}$) |
| | Metanol | 37.41 \pm 1.30 | 27.70 \pm 1.63 |
| <i>S. tomentosa</i> (toprak üstü) | Su | 7.55 \pm 1.01 | 47.41 \pm 1.05 (IC_{50} : 192.36 \pm 5.35 $\mu\text{g/ml}$) |
| | Metanol | 29.79 \pm 0.87 | 34.89 \pm 0.84 |
| <i>T. longicaulis</i> subsp. <i>longicaulis</i> (toprak üstü) | Su | 2.58 \pm 1.16 | 52.91 \pm 0.83 (IC_{50} : 153.96 \pm 4.57 $\mu\text{g/ml}$) |
| | Metanol | 34.26 \pm 1.16 | 39.86 \pm 0.59 |
| <i>T. orientalis</i> (toprak üstü) | Su | 15.63 \pm 1.13 | 72.27 \pm 0.80 (IC_{50} : 78.65 \pm 0.47 $\mu\text{g/ml}$) |
| | Metanol | 23.37 \pm 1.27 | 26.96 \pm 1.36 |
| Tiyoüre ^c | - | 100.0 (IC_{50} : 6.70 \pm 0.24 $\mu\text{g/ml}$) | - |
| FMSF ^d | - | - | 100.0 (IC_{50} : 0.98 \pm 0.19 $\mu\text{g/ml}$) |

^a 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki % inhibisyon

^b 153.84 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki % inhibisyon

^c Standart üreaz inhibitörü (25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda)

^d Fenilmetanesülfonil florit (standart kimotripsin inhibitörü, 4,8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda)

- İnhibitör aktivite yok

Çalışılan bitkilerin antioksidan aktivite deneylerinden elde edilen sonuçlar Tablo 2'de bir arada sunulmuştur. Tüm ekstralar genel olarak kuvvetli DPPH radikal süpürücü aktivite göstermekle birlikte en yüksek aktivite *S. tomentosa* (çiçek), *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, ve *M. longifolia* subsp. *thyphoides*'un metanol ekstralarında gözlenmiştir (sırasıyla IC_{50} değerleri; 9.11, 11.92 ve 12.70 $\mu\text{g/ml}$). ABTS testinde ise *M. longifolia* subsp. *thyphoides*, *O. vulgare* ve *S. tomentosa* (yaprak) sulu ekstraları

ön plana çıkmıştır (sırasıyla 56.47, 56.43 ve 56.35 mg G.A.E./g ekstre). *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*'in metanol, *S. tomentosa* (toprak üstü)'nin metanol ve *O. vulgare*'nin sulu ekstralarının sırasıyla 343.24, 270.77 ve 166.85 mg G.A.E./g ekstre değerleri ile en yüksek bakır indirgeyici antioksidan aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite sonuçları ile uyumlu olarak *S. tomentosa*'nın farklı kısımlarından hazırlanan ekstraların en yüksek fenolik içeriğe sahip oldukları belirlenmiştir. Benzer şekilde kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olan *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (170.04 mg R.E./g ekstre), *S. tomentosa* (145.82 mg R.E./g ekstre) ve *M. longifolia* subsp. *thyphoides*'in (145.37 mg R.E./g ekstre) yüksek flavonoit içeriğine sahip olduğu anlaşılmıştır (Tablo 3).

Tablo 2. Çalışılan bitkilerin radikal süpürücü ve bakır indirgeyici antioksidan kapasiteleri

| Bitkiler/referans maddeler | Ekstre | DPPH ^a | ABTS ^b | CUPRAC ^b |
|---|---------|-------------------|-------------------|---------------------|
| <i>D. communis</i> (kök) | Su | 42.95 ± 1.57 | 19.12 ± 0.42 | 5.89 ± 2.86 |
| | Metanol | 49.08 ± 1.00 | 26.02 ± 0.08 | 80.80 ± 0.80 |
| <i>D. communis</i> (toprak üstü) | Su | 21.39 ± 1.04 | 27.23 ± 0.08 | 26.08 ± 3.75 |
| | Metanol | 66.54 ± 1.61 | 21.12 ± 0.09 | 26.79 ± 3.90 |
| <i>M. longifolia</i> subsp. <i>thyphoides</i> (toprak üstü) | Su | 31.29 ± 0.32 | 56.47 ± 0.11 | 76.63 ± 3.33 |
| | Metanol | 12.70 ± 0.87 | 27.11 ± 0.07 | 89.56 ± 3.72 |
| <i>O. vulgare</i> (toprak üstü) | Su | 70.56 ± 1.65 | 56.43 ± 0.01 | 166.85 ± 3.94 |
| | Metanol | 29.09 ± 0.85 | 27.89 ± 0.04 | 124.84 ± 1.47 |
| <i>R. ulmifolius</i> (sürgün) | Su | 22.28 ± 0.95 | 56.25 ± 0.19 | 76.82 ± 2.38 |
| | Metanol | 19.18 ± 0.19 | 27.59 ± 0.06 | 106.26 ± 2.35 |
| <i>S. tomentosa</i> (çiçek) | Su | 29.84 ± 1.51 | 56.26 ± 0.14 | 61.51 ± 3.34 |
| | Metanol | 9.11 ± 0.34 | 27.73 ± 0.04 | 107.59 ± 3.33 |
| <i>S. tomentosa</i> (yaprak) | Su | 14.58 ± 1.58 | 56.35 ± 0.20 | 127.62 ± 4.92 |
| | Metanol | 33.32 ± 1.11 | 27.64 ± 0.032 | 104.07 ± 2.78 |
| <i>S. tomentosa</i> (toprak üstü) | Su | 31.68 ± 1.47 | 52.93 ± 0.32 | 98.30 ± 3.72 |
| | Metanol | 14.37 ± 0.32 | 27.67 ± 0.02 | 270.77 ± 2.23 |
| <i>T. longicaulis</i> subsp. <i>longicaulis</i> (toprak üstü) | Su | 18.52 ± 0.62 | 56.34 ± 0.03 | 112.83 ± 3.61 |
| | Metanol | 11.92 ± 0.39 | 28.14 ± 0.03 | 343.24 ± 3.51 |
| <i>T. orientalis</i> (toprak üstü) | Su | 42.62 ± 1.10 | 54.98 ± 0.15 | 31.45 ± 2.58 |
| | Metanol | 26.50 ± 1.53 | 28.06 ± 0.01 | 68.88 ± 3.98 |
| Gallik asit | - | 2.51 ± 0.01 | - | - |

^a IC₅₀ (µg/ml) ± standart hata

^b mg G.A.E./g ekstre ± standart hata

Yaptığımız literatür çalışmasına göre çalışılan bitkilerden *O. vulgare* dışındakilerin üreaz ve kimotripsin enzimini inhibe edici aktiviteleri daha önce araştırılmamıştır. Tablo 1'den de anlaşılacağı üzere *M. longifolia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan su ve metanol ekstraları, üreaz enzimine karşı çok yüksek inhibitör aktivite göstermemiştir (sırasıyla %24.42 ve 20.65 inhibisyon). Daha önceki bir çalışmada *M. longifolia*'nın antibakteriyel etkisi 10 ayrı klinik *H. pylori* suşu izolatu üzerinde araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda bitkinin organik ekstresinin 18-40 mm arasında değişen inhibisyon zonları ve 62.5-250 µg/ml aralığında değişen MİK değerleri ile *H. pylori*'nin üremesini engellediği ortaya çıkmıştır [21]. Fakat Bakır ve ark. (2021) daha yakın tarihteki çalışmalarında *M. longifolia*'nın %70 etanol ekstresinin *H. pylori* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını belirlemiştir [22]. Gul ve ark. (2015), bitkinin etanollü ekstresinin sıçanlarda 200 mg/kg dozda etanol ülserini %47, aspirin ülserini ise %63 oranında önlediğini tespit etmiştir [23]. Bitkinin antioksidan aktivitesinin ve total fenol-flavonoit içeriğinin incelendiği daha eski çalışmalara da rastlanmıştır. Bu çalışmalardan ilkinde üç farklı lokaliteden toplanan *M. longifolia*'nın su ve metanol ekstralarının fenol içeriklerinin 2.99 ile 28.27 mg pirokateşol/g arasında; flavonoit içeriklerinin ise 1.27-25.42 mg kersetin

eşdeğeri (K.E./g) ekstre değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. DPPH radikalini ise 100 µg/ml konsantrasyonda %38.08-95.77 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir [24]. Bir başka çalışmada ise etanol ekstresi ve infüzyonunun total fenol içeriğinin sırasıyla 67.05 ve 92.38 mg G.A.E./g ekstre; flavonoid içeriğinin ise 23.68 ile 46.18 mg R.E./g ekstre olduğu kaydedilmiştir. DPPH testinde 162.08 ve 195.96 mg troloks eşdeğeri/g ekstre; ABTS testinde 242.06 ve 269.25 mg troloks eşdeğeri/g ekstre; CUPRAC testinde ise 371.30 ve 454.99 mg troloks eşdeğeri/g ekstre antioksidan aktivite sergilemiştir [25]. Yakın tarihli bir çalışmada ise bitkinin yapraklarının metanol ekstresinin 9.1 µg/ml IC₅₀ değeriyle DPPH radikalini inhibe ettiği belirtilmiştir [26]. Üreaz enzimi üzerinde çok yüksek aktivite tespit edilmese de daha önce yapılan mikrobiyolojik ve *in vivo* deney sonuçları dikkate alındığında [21,23], biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama, yapı-aktivite gibi daha ileri çalışmaların yapılması halinde *M. longifolia*'nın *H. pylori* pozitif olan ve olmayan ülserlerin tedavisinde umut verici olabileceği ve gastroprotektif etkisine antioksidan aktivitesinin de katkı sağladığı görüşü akla gelmektedir.

Tablo 3. Çalışılan bitkilerin total fenol ve flavonoid içerikleri

| Bitkiler | Ekstre | Total fenol içeriği ^a | Total Flavonoid içeriği ^b |
|---|---------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>D. communis</i> (kök) | Su | 49.50 ± 1.73 | 4.71 ± 1.92 |
| | Metanol | - | 70.26 ± 2.90 |
| <i>D. communis</i> (toprak üstü) | Su | 40.00 ± 2.70 | 17.82 ± 1.38 |
| | Metanol | - | 97.15 ± 1.01 |
| <i>M. longifolia</i> subsp. <i>thyphoides</i> (toprak üstü) | Su | 78.87 ± 4.16 | 57.6 ± 4.80 |
| | Metanol | - | 145.37 ± 3.00 |
| <i>O. vulgare</i> (toprak üstü) | Su | 129.63 ± 9.12 | 106.04 ± 4.33 |
| | Metanol | - | 88.26 ± 2.66 |
| <i>R. ulmifolius</i> (sürgün) | Su | 170.93 ± 6.55 | 78.04 ± 4.28 |
| | Metanol | - | 99.37 ± 0.76 |
| <i>S. tomentosa</i> (çiçek) | Su | 221.50 ± 3.62 | 97.15 ± 4.07 |
| | Metanol | - | 122.48 ± 2.69 |
| <i>S. tomentosa</i> (yaprak) | Su | 313.28 ± 2.79 | 143.82 ± 4.07 |
| | Metanol | - | 145.82 ± 4.23 |
| <i>S. tomentosa</i> (toprak üstü) | Su | 387.17 ± 3.53 | 135.15 ± 3.79 |
| | Metanol | - | 126.48 ± 1.38 |
| <i>T. longicaulis</i> subsp. <i>longicaulis</i> (toprak üstü) | Su | 204.03 ± 5.23 | 135.82 ± 3.90 |
| | Metanol | - | 170.04 ± 1.01 |
| <i>T. orientalis</i> (toprak üstü) | Su | 99.73 ± 6.53 | 42.48 ± 4.01 |
| | Metanol | - | 57.37 ± 2.52 |

^amg G.A.E./g ekstre ± standart hata

^bmg R.E./g ekstre ± standart hata

- Çalışılmadı

Araştırmamızda *R. ulmifolius*'un su ve metanol ekstresinin de üreaz enzimini çok yüksek olmasa da (sırasıyla %18.24 ve 26.58 inhibisyon) inhibe ettiği görülmüştür. Daha önceki bir çalışmada yaprak ekstresinin iki *H. pylori* suşuna karşı 134 µg/ml ve 270 µg/ml minimum bakterisidal konsantrasyonu ile antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada bitkinin antioksidan kapasitesi ABTS testi ile belirlenmiş ve ABTS radikalini %55 oranında inhibe ettiği görülmüştür [27]. Bu sonuçlar bitkinin *H. pylori* üzerindeki antibakteriyel aktivitesinin kısmen üreaz enzimi inhibisyonu ile gerçekleşebileceğini, bununla birlikte farklı mekanizmaların da rol oynuyor olabileceğini düşündürmüştür. Antioksidan aktivite testi sonuçları da dikkate alındığında, bitkinin *H. pylori* pozitif olan peptik ülser hastalığı üzerindeki etkisinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmasının gerektiği düşünülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar bitkinin metanol ekstresinin kimotripsin enzimini oldukça

önemli derecede inhibe ettiğini göstermiştir (IC₅₀: 65.32 µg/ml). Bu araştırmanın bir tarama çalışması olup biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yapılmaması nedeniyle bu etkiden hangi madde/maddelerin sorumlu olduğu bilinmemektedir. Ancak bitkinin tanen ve polifenoller bakımından zengin olduğu bilinmektedir [27,28]. Kimotripsinin de arasında bulunduğu proteazların aktivitesini tanenlerin inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcut olup [29,30] *R. ulmifolius*'da gözlenen yüksek kimotripsin inhibe edici aktivitede tanenlerin etkili olabileceği düşünülmüştür.

Araştırmamızdan elde edilen sonuçlar *D. communis*'in köklerinden hazırlanan metanol ekstresinin üreaz enzimini önemli derecede inhibe ettiğini göstermiştir (IC₅₀: 66.03 µg/ml). Bu araştırmanın bir tarama çalışması olması bakımından biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yapılmamıştır ve dolayısıyla bitkideki hangi maddenin bu etkiden sorumlu olduğu bilinmemektedir. Ancak bitkinin kökleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar fenantren ve 9,10-dihydrofenantren (nudol, konfusarin, krizotoksen, herorensol, orkinol gibi) bakımından zengin olduğunu göstermiştir. Ayrıca β-sitosterol, stigmasterol ve kampesterol gibi steroller taşıdığı da bilinmektedir [31]. Bildiğimiz kadarıyla fenantrenlerin üreaz enzimi üzerindeki etkisi henüz değerlendirilmemiştir ancak daha önceki bir çalışmada sterol yapısındaki ursolik asidin üreaz enzimini %52 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir [32]. Dolayısıyla bitkinin üreaz enzimini inhibe edici aktivitesinde taşıdığı sterol yapısındaki bileşiklerin rol oynayabileceği akla gelmektedir. *D. communis*'in metanol ekstresi DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemlerinde çok yüksek olmasa da belirli bir aktiviteye sahiptir. Daha önceki bir çalışmada *D. communis*'in köklerinden hazırlanan sulu-metanol ekstresi ve ondan elde edilen kloroform, etilasetat ve kalan su fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile değerlendirilmiş, kloroform ve etilasetat fraksiyonlarının, kalan su fraksiyonundan önemli ölçüde daha yüksek radikal süpürücü aktivite gösterdiği (BHT'e yakın aktivite) anlaşılmıştır [33]. Daha yakın tarihli bir çalışmada bitkinin köklerinden hazırlanan metanol ekstresinin fenolik içeriği ve DPPH radikal süpürücü aktivitesi belirlenmiştir. Fenol içeriği bizim bulgularımızla benzer şekilde 55.2 mg G.A.E./g ekstre olarak tespit edilmiş, DPPH radikalini ise 0.128 mg/ml IC₅₀ değeri ile inhibe ettiği ifade edilmiştir [34].

Çalışmamızda *S. tomentosa*, antioksidan aktivite, toplam fenol ve toplam flavonit içeriği bakımından ön plana çıkan bitkilerden biri olmuştur. Daha önceki bir çalışmada farklı bölgelerden toplanmış yabani olarak yetişen veya kültüre alınmış *S. tomentosa* örneklerinin antioksidan aktivitesi, toplam fenol ve toplam flavonoit içeriği kıyaslanmıştır. Çalışmanın sonucunda %80 metanol ekstresinin 49.27-66.15 mg G.A.E./g ekstre aralığında değişen oranlarda fenol içeriğine ve 36.27-40.83 mg kateşin eşdeğeri/g flavonoit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir [36]. Fenol içeriğinin bizim çalışmamızdakinden farklı olmasının nedeninin, bitkinin toplandığı lokasyon, ekstraksiyon çözücüsü, ekstraksiyon yöntemi ve fenol içeriğinin tespitinde kullanılan yöntem farklılıkları gibi nedenler olabileceği düşünülmelidir.

Çalışmaya dâhil edilen bitkiler arasında *T. orientalis* kuvvetli kimotripsin inhibe edici aktivite göstermesiyle ön plana çıkmıştır. Bu aktivitenin taşıdığı hangi sekonder metabolitten kaynaklandığı bilinmemekle birlikte bitki üzerinden yapılan fitokimyasal çalışmalar son derece kısıtlıdır. Ancak bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarının β-karoten, likopen, flavonoit, antosiyanin taşıdığı belirlenmiştir [37]. Bu sebeple taşıdığı terpen ve fenolik bileşiklerin bu aktiviteye katkı sağlayabileceği akla gelmektedir. Literatür taramamız sonucunda *T. orientalis*'in toplam fenol, toplam flavonoit içeriği ve antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği daha eski tarihli bir çalışmaya rastlanılmıştır. Bu çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından %80 etanol ekstresinin 82.1 mg pirokateşol eşdeğeri/g ekstre toplam fenol ve 3.63 mg K.E./g ekstre değerinde flavonoit içeriğine sahip olduğu, DPPH radikalini 100 µg/ml konsantrasyonda yaklaşık %47 oranında inhibe ettiği belirtilmiştir [38]. Kullanılan birimin farklı olması nedeniyle fenol ve flavonoit içerikleri bizim çalışmamızla kıyaslanamamıştır. Ancak antioksidan aktivitede gözlenen farklılığın kullanılan ekstraksiyon çözücüsü, bitkinin toplandığı lokasyon, çalışılan konsantrasyonlar gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği akla gelmektedir.

T. longicaulis de antioksidan aktivite ve yüksek flavonoit içeriği ile dikkat çeken bitkilerden biridir. Daha önce yapılan çalışmalarda da kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [39,40]. Bu çalışmalardan ilkinde toprak üstü kısımlarından hazırlanan %70 etanol ekstresinin 25 µg/ml konsantrasyonda %87.82 DPPH radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir [39]. Aynı yıl yapılan bir başka çalışmada ise metanol ekstresi ve infüzyonunun fenol içerikleri 188.98 ve 119.43 mg G.A.E./g ekstre; flavonoit içerikleri ise 21.43 ve 11.43 mg R.E./g ekstre olarak hesaplanmıştır. DPPH testinde 3.6 µg/ml konsantrasyonda %65.28 ve %54.37 inhibisyon göstermiştir [40].

Araştırmamızda *O. vulgare* su ve metanol ekstraları 50 µg/ml konsantrasyonda düşük üreaz inhibe edici aktivite göstermiştir (sırasıyla %19.71 ve %22.11 inhibisyon). Hanganu ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada ise bitkinin toprak üstü kısımlarının %70 etanol ekstresinin 200 µg/ml konsantrasyonda üreaz enzimini %90.47 oranında inhibe ettiği sonucuna varmıştır. Yine aynı çalışmada total fenol içeriği ise 89.21 mg G.A.E./g ekstre olarak hesaplanmıştır [41]. Söz konusu çalışmada üreaz inhibe edici aktivitenin tespiti için bizim yöntemimizden (indofenol metodu) [13] oldukça farklı olarak Nessler Reajanı kullanılmıştır. Total fenol içeriğinin belirlenmesi için ise kullandığımız Lowry metodu [19,20] yerine sadece sodyum karbonat ve Folin Ciocalteu Reajanın kullandığı bir yöntemi tercih etmişlerdir. Dolayısıyla bizim çalışmamızda tespit edilen üreaz inhibe edici aktivite ve fenol içeriklerinden farklı sonuçların elde edilmesinin sebebinin kullanılan yöntemlerdeki bu farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bitkinin *H. pylori* üzerindeki aktivitesi de daha önce araştırılmıştır. Bu çalışmalardan birinde %70 metanol ekstresinin 15 klinik *H. pylori* izolatu üzerindeki aktivitesi değerlendirilmiş ve 0.625 ile ≥ 5 mg/ml arasında değişen MİK değerleri ile çalışılan *H. pylori* suşları üzerinde orta derecede bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [42]. Bir diğer çalışmada ise klonlanan ve ticari *O. vulgare*'nin dekoksasyonu ve %60 etanol ekstresinin fenolik içeriğinin 35.43 ile 55.35 mg G.A.E./g ekstre değerleri arasında değiştiği; %1'lik çözeltilsinin (1 g bitki/100 mL çözücü) DPPH testinde %80-82, ABTS testinde ise %65-95 arasında değişen radikal süpürücü aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada hazırlanan ekstraların *H. pylori* üzerindeki etkisi de araştırılmış ve disklere emdirilen 50 ile 200 µg aralığında değişen total fenol içeriğine sahip ekstraların 10 ile 23 mm arasında değişen inhibisyon zonları ile anti- *H. pylori* aktivite sergilediği belirlenmiştir [43]. Daha önceki çalışmalardan elde edilen bulgular da dikkate alındığında *O. vulgare*'nin *H. pylori* üzerindeki etkisinin kısmen üreaz enzim inhibisyonundan kaynaklanmakla birlikte antioksidan aktivite gibi farklı mekanizmaların da rol oynayabileceği akla gelmiştir. Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama, doz-cevap ilişkisi gibi daha ileri çalışmalarla bu bitkiden *H. pylori* pozitif ülserlerde umut vaat edebilecek sekonder metabolitlere ulaşılması mümkün olabilir.

Düze'de halk ilacı olarak kullanılan yedi bitkinin [*Dioscorea communis*, *Mentha longifolia* subsp. *thyphoides*, *Origanum vulgare*, *Rubus ulmifolius*, *Salvia tomentosa*, *Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis*, *Trachystemon orientalis*] kimotripsin ve üreaz enzimlerini inhibe edici aktivitelerinin ve total fenol-flavonoit içeriklerinin tespit edildiği bu çalışmada, *D. communis* köklerinden hazırlanan metanol ekstresinin çok yüksek olmasa da dikkate değer üreaz inhibitörü aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *R. ulmifolius* metanol ekstresi ve *T. orientalis* su ekstresi de kimotripsin enzimi üzerinde önemli derecede inhibisyon sergilemeleriyle ön plana çıkmıştır. Dolayısıyla bu bitkiler üzerinde biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama, yapı aktivite, doz cevap ilişkisi çalışmaları gibi kapsamlı araştırmaların yapılması halinde ülser başta olmak üzere obezite, pankreatit gibi rahatsızlıkların tedavisinde umut vaat edebilecek ilaç aday-adayı moleküllerinin tespiti mümkün olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma kısmen finansal olarak TÜBİTAK (TBAG-108T253) tarafından desteklenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: T.G., E.S., İ.G., S.A.; Tasarım: T.G., E.S., İ.G., S.A.; Denetim: İ.G., S.A.; Kaynaklar: İ.G., S.A.; Malzemeler: İ.G., S.A.; Veri Toplama ve/veya İşleme: T.G., E.S., G.A.; Analiz ve/veya Yorumlama: T.G., E.S., İ.G., S.A., G.A.; Literatür Taraması: T.G., E.S.; Makalenin Yazılması: T.G., E.S.; Kritik İnceleme: T.G., E.S., İ.G., S.A., G.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Amtul, Z., Kausar, N., Follmer, C., Rozmahel, R.F., Atta-Ur-Rahman, Kazmi, S.A., Shekhani, M.S., Eriksen, J.L., Khan, K.M., Choudhary, M.I. (2006). Cysteine based novel noncompetitive inhibitors of urease(s)-Distinctive inhibition susceptibility of microbial and plant ureases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 6737-6744. [\[CrossRef\]](#)
2. Mobley, H.L.T., Hausinger, R.P. (1989). Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1), 85-108. [\[CrossRef\]](#)
3. Matczuk, D., Siczek, A. (2021). Effectiveness of the use of urease inhibitors in agriculture: a review. *International Agrophysics*, 35, 197-208. [\[CrossRef\]](#)
4. Modolo, L.V., Souza, A.X.D., Horta, L.P., Araujo, D.P., Fatima, A.D. (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 6, 35-44. [\[CrossRef\]](#)
5. Legerská, B., Chmelová, D., Ondrejovič, M. (2020). TLC-Bioautography as a fast and cheap screening method for the detection of α -chymotrypsin inhibitors in crude plant extracts. *Journal of Biotechnology*, 313, 11-17. [\[CrossRef\]](#)
6. Gitlin-Domagalska, A., Maciejewska, A., Debowski, D. (2020). Bowman-Birk inhibitors: Insights into family of multifunctional proteins and peptides with potential therapeutical applications. *Pharmaceuticals*, 13, 421. [\[CrossRef\]](#)
7. Al-Awadhi, F.H., Law, B.K., Paul, V.J., Luesch, H. (2017). Grassystatins D–F, Potent aspartic protease inhibitors from marine Cyanobacteria as potential antimetastatic agents targeting invasive breast cancer. *Journal of Natural Products*, 80(11), 2969-2986. [\[CrossRef\]](#)
8. Awosika, T., Aluko, R.E. (2019). Enzymatic pea protein hydrolysates are active trypsin and chymotrypsin inhibitors. *Foods*, 8(6), 200. [\[CrossRef\]](#)
9. Shi, X.Z., Zhao, X.F., Wang, J.X. (2008). Molecular cloning and expression analysis of chymotrypsin-like serine protease from the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 589-597. [\[CrossRef\]](#)
10. Cid-Gallegos, M.S., Corzo-Ríos, L.J., Jiménez-Martínez, C., Sánchez-Chino, X.M. (2022). Protease inhibitors from plants as therapeutic agents- A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77, 20-29. [\[CrossRef\]](#)
11. Kårlund, A., Paukkonen, I., Gómez-Gallego, C., Kolehmainen, M. (2021). Intestinal exposure to food-derived protease inhibitors: digestion physiology- and gut health-related effects. *Healthcare*, 9, 1002. [\[CrossRef\]](#)
12. Gürbüz, İ., Özkan, A.M.G., Akaydin, G., Salihoğlu, E., Günbatan, T., Demirci, F., Yeşilada, E. (2019). Folk medicine in Düzce province (Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 43(6), 769-784. [\[CrossRef\]](#)
13. Khan, K.M., Iqbal, S., Lodhi, M.A., Maharvi, G.M., Perveen, S., Choudhary, M.L., Atta-Ur-Rahman, Chohan, Z.H., Supuran, C.T. (2004). Synthesis and urease enzyme inhibitory effects of some dicoumarols. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(4), 367-371. [\[CrossRef\]](#)
14. Cannell, R.J., Kellam, S.J., Owsianka, A.M., Walker, J.M. (1988). Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Medica*, 54, 10-14. [\[CrossRef\]](#)
15. Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3444-3452. [\[CrossRef\]](#)
16. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981. [\[CrossRef\]](#)
17. Gülçin, İ. (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32(3), 431-438. [\[CrossRef\]](#)
18. Woisky, R.G., Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37, 99-105. [\[CrossRef\]](#)
19. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158. [\[CrossRef\]](#)
20. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [\[CrossRef\]](#)
21. Farahnaz, N., Eftekhari, F., Habibi, Z., Massarrat, S., Malekzadeh, R. (2009). Antibacterial activity of twenty Iranian plant extracts against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 12(2), 105-111. [\[CrossRef\]](#)
22. Bakr, R.O., Tawfike, A., El-Gizawy, H.A., Tawfik, N., Abdelmohsen, U.R., Abdelwahab, M.F., Alshareef, W.A., Fayed, S.M., El-Mancy, S.M.S., El-Fishawy, A.M., Abdelkawy, M.A., Fayed, M.A.A. (2021). The metabolomic analysis of five *Mentha* species: Cytotoxicity, anti-*Helicobacter* assessment, and the

- development of polymeric micelles for enhancing the anti-Helicobacter activity. RSC Advances, 11, 7318-7330. [\[CrossRef\]](#)
23. Gul, H., Abbas, K., Qadir, M.I. (2015). Gastro-protective effect of ethanolic extract of *Mentha longifolia* in alcohol- and aspirin-induced gastric ulcer models. Bangladesh Journal of Pharmacology, 10, 241-245. [\[CrossRef\]](#)
 24. Özen, T., Telci, İ., Gül, F., Demirtaş, İ. (2018). A comprehensive study on phytochemical contents, isolation and antioxidant capacities in wild mint, *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides*. Moroccan Journal of Chemistry, 6(4), 601-614. [\[CrossRef\]](#)
 25. Bahadori, M.B., Zengin, G., Bahadori, S., Dinparast, L., Movahhedine, N. (2018). Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha* (Stapf) Briq.). International Journal of Food Properties, 21(1), 183-193. [\[CrossRef\]](#)
 26. Elansary, H.O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Klimek-Szczykutowicz, M., El-Ansary, D.O., Mahmoud, E.A. (2020). Polyphenol profile and antimicrobial and cytotoxic activities of natural mentha piperita and *Mentha longifolia* populations in Northern Saudi Arabia. Processes, 8(479). [\[CrossRef\]](#)
 27. Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., Rossi, C. (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. International Journal of Antimicrobial Agents, 34, 50-59. [\[CrossRef\]](#)
 28. Gudej, J., Tomczyk, M. (2004). Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus L.* Species. Archives of Pharmacal Research, 27(11), 1114-1119.
 29. Talukdar, S., Ghosh, K. (2019) Differential inhibition of digestive proteases by tannin in two size groups of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton): A biochemical and zymography study. Aquaculture Research, 50, 449-456. [\[CrossRef\]](#)
 30. Liu, J., Hsu, F., Tsai, J., Chan, P., Liu, J., Thomas, G.N., Tomlinson, B., Lo, M., Lin, J. (2003). Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. Life Sciences, 73, 1543-1555. [\[CrossRef\]](#)
 31. Slavova, I., Tomova, T., Kusovska, S., Chukova, Y., Argirova, M. (2022). Phytochemical constituents and pharmacological potential of *Tamus communis* rhizomes. Molecules 27, 1851. [\[CrossRef\]](#)
 32. Ismail, M., Hussain J., Khan A., Khan A. L., Ali L., Khan F., Khan A.Z., Niaz U., Lee I. (2012). Antibacterial, antifungal, cytotoxic, phytotoxic, insecticidal, and enzyme inhibitory activities of *Geranium wallichianum*. Evidence -Based Complementary and Alternative Medicine 2012, 305906. [\[CrossRef\]](#)
 33. Belkhiri, F., Baghiani, A., Boumerfeg, S., Charef, N., Khennouf, S., Arrar, L. (2015). In vitro antioxidant and antibacterial activities of *Tamus communis* L. root extracts from Algeria. International Journal of Current Research, 7(05), 15621-15627.
 34. Amraoui, N., Mayouf, N., Charef, N., Baghiani, A., Arrar, L. (2019). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-arthritis activities of methanol extract of *Tamus communis* L. roots. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 18(7), 1499-1506. [\[CrossRef\]](#)
 35. Dinçer, C., Tontul, İ., Çam, İ.B., Özdemir, K.S., Topuz, A., Nadeem, H.Ş., Ay, S.T., Göktürk, R.S. (2013). Phenolic composition and antioxidant activity of *Salvia tomentosa* Miller: effects of cultivation, harvesting year, and storage. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37, 561-567. [\[CrossRef\]](#)
 36. Demir, E., Turfan, N., Özer, H., Üstün, N.Ş., Pekşen, A. (2020). Nutrient and bioactive substance contents of edible plants grown naturally in Salıpazarı (Samsun). Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 19(1), 151-160. [\[CrossRef\]](#)
 37. Özen, T. (2010). Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. Grasas y Aceites, 61(1), 86-94. [\[CrossRef\]](#)
 38. Kindl, M., Blazekovic, B., Bucar, F., Vladimir-Knezevic, S. (2015). Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 403950. [\[CrossRef\]](#)
 39. Öztürk, N. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of the different extracts from *Thymus longicaulis* C Presl. subsp. *longicaulis* var. *longicaulis* and *T. longicaulis* C. Presl. subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* growing in Turkey. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 28(2), 465-472.
 40. Hanganu, D., Benedec, D., Olah, N.K., Ranga, F., Mirel, S., Tiperciuc, B., Oniga, I. (2020). Research on enzyme inhibition potential and phenolic compounds from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*. Farmacia, 68(6), 1075-1080. [\[CrossRef\]](#)
 41. Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Basayiannis, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H. (2003). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. Journal of Ethnopharmacology, 88, 175-179. [\[CrossRef\]](#)

42. Chun, S.S., Vattem, D.A., Lin, Y.T., Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Process Biochemistry, 40, 809-816. [\[CrossRef\]](#)