T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELLEBORUS VESICARIUS EKSTRELERİNİN ÜREAZ ENZİM İNHİBİSYONU VE KANTİTATİF FENOLİK BİLEŞİK ANALİZİ

ZEYNEP KABASAKAL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MAHFUZ ELMASTAŞ

FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI
FARMAKOGNOZİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
EYLÜL/2025

İTHAF

“Filistin direnişine ithafen”

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana güvenerek engin bilgi ve deneyimiyle hem şahsıma hem de çalışmama her yönüyle katkı sağlayan kıymetli danışmanım Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda ve tez yazım sürecimde yol gösteren ve yardımcı olan tüm hocalarıma, arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi bünyesinde çalışan ekibe en içten teşekkürlerimi sunarım.

Güzel ahlaklı ve iyi eğitimli bir birey olmam için ellerinden geleni yapan; çalıştığım bitkiyi seçmemde de ilham kaynağı olan sevgili anne ve babama, beni kendi çocuklarından ayırmayarak her zaman yanımda olan değerli teyze ve enişteme, kardeşim bildiğim kuzenlerime ve özellikle bu süreç boyunca desteğini esirgemeyen Hamidiye Tıp Fakültesi öğrencisi kuzenim Fatma Ceyda KILIÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
RESİMLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. RANUNCULACEAE BİTKİ FAMİLYASI 3
2.1.1. *Helleborus* Cinsi 3
2.1.1.1. *Helleborus vesicarius* 6
2.2. ENDEMİK BİTKİ 7
2.3. ZEHİRLİ BİTKİLER 7
2.4. ENZİMLER 8
2.4.1. Üreaz Enzimi 8
2.4.1.1. Mikrobiyal Üreazlar ve Hastalık Oluşumu 9
2.4.2. Enzim İnhibisyonu 10
2.4.2.1. Reversibl (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu 10
2.4.2.2. İrreversibl (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu 11
2.4.3. Üreaz İnhibitörleri 11
2.5. FENOLİK BİLEŞİKLER 11
2.5.1. Flavonoidler 12
2.5.2. Fenolik Asitler 12
3. GEREÇ VE YÖNTEM 13
3.1. BİTKİ MATERYALİ 13
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASAL MALZEMELER 13
3.2.1. Kullanılan Cihazlar 13
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar 13
3.3. EKSTRELERİN HAZIRLANMASI 14
3.4. ÜREAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN GLUTAMAT DEHİDROGENAZ BAĞLANTILI YÖNTEM İLE BELİRLENMESİ 14

3.5. FENOLİK BİLEŞİKLERİN KROMATOGRAFİK KANTİTATİF ANALİZLERİ 17
3.6. KALİTATİF FİTOKİMYASAL BİLEŞİK ANALİZİ 18
3.6.1. Antrasen Türevlerinin Aranması 18
3.6.2. Flavon Türevlerinin Aranması 19
3.6.3. Saponin Aranması 19
3.6.4. Tanen Aranması 19
3.6.4.1. Gallik ve Kateşik Tanenin Ayrılması 19
3.6.5. Alkaloit Aranması 19
3.6.6. Kardiyoaktif Glikozitlerin Aranması 20
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 20
4. BULGULAR 21
4.1. EKSTRAKSİYON VERİMLERİ 21
4.2. ÜREAZ ENZİM İNHİBİSYONU BULGULARI 21
4.3. FENOLİK BİLEŞİKLERİN KROMATOGRAFİK KANTİTATİF ANALİZ BULGULARI 25
4.4. FİTOKİMYASAL KALİTATİF ANALİZ BULGULARI 26
4.4.1. Antrasen Türevlerinin Aranma Bulgusu 26
4.4.2. Flavon Türevlerinin Aranma Bulgusu 26
4.4.3. Saponin Aranma Bulgusu 26
4.4.4. Tanen Aranma Bulgusu 26
4.4.4.1. Gallik ve Kateşik Tanenin Ayrılma Bulgusu 26
4.4.5. Alkaloit Aranma Bulgusu 27
4.4.6. Kardiyoaktif Glikozitlerin Aranma Bulgusu 27
5. TARTIŞMA 28
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 32
KAYNAKLAR 33
EKLER 37

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Üreaz enzim inhibisyonu deney tüplerinin içerikleri 15

Tablo 3.2: Fenolik bileşik analizinde kullanılan pompa programı 17

Tablo 4.1: *Helleborus vesicarius* bitki ekstrelerinin ekstraksiyon verimleri..... 21

Tablo 4.2: Parametrik test sonuçları (% inhibisyon) 21

Tablo 4.3: Bitki ekstrelerinin fenolik bileşik içerikleri ve üreaz enzim inhibisyon ilişkisi 25

Tablo 4.4: Fitokimyasal kalitatif analiz bulguları..... 27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: *Helleborus* türlerinde bulunan saponinlerin iskelet formülleri 4

Şekil 2.2: Üreaz enziminin yapısı 9

Şekil 2.3: Ürenin üreaz enzimiyle hidrolizi 10

Şekil 2.4: Fenol'ün kimyasal yapısı 12

Şekil 3.1: Ürenin üreaz enzimiyle hidrolizi ve glutamat dehidrogenaz ile aktivite analizi 15

Şekil 4.1: Hidrokinon ve farklı konsantrasyonlardaki ekstre çözeltilerinin üreaz enzim inhibisyonu bulguları 23

Şekil 4.2: Hidrokinon ve ekstre çözeltilerinin 90,91 μg/mL'deki üreaz enzim inhibisyonu bulguları 24

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1: *Helleborus orientalis* bitkisi (Geyve/SAKARYA) 5

Resim 2.2: *Helleborus vesicarius* bitkisi (Türkoğlu/KAHRAMANMARAŞ) 6

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

ANOVA : Varyans Analizi

CO2 : Karbondioksit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

ΔAbs : Absorbans değişimi

EC : Enzim Kodu

$FeCl_3$: Demir (III) klorür

GLDH : Glutamat dehidrogenaz

H. vesicarius : *Helleborus vesicarius*

H. niger : *Helleborus niger*

H. orientalis : *Helleborus orientalis*

H. pylori : *Helicobacter pylori*

H_2SO_4 : Sülfürik asit

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kramatografisi

IARC : Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

IBM Corp. : International Business Machines Corporation

M.Ö. : Milattan Önce

NADH : Nikotinamid Adenin Dinükleotit

NAD^+ : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Yükseltgenmiş Formu

NaOH : Sodyum hidroksit

NH_3 : Amonyak

NY : New York

$Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot Pb(OH)_2$: Kurşun (II) subasetat

PDA : Fotodiyot Dizi Dedektörü

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

SD **:** Standart Sapma

Tukey's HSD **:** Tukey's Honest Significance Test

UV **:** Ultraviyole

Üreaz **:** Üre aminohidrolaz

HELLEBORUS VESICARIUS EKSTRELERİNİN ÜREAZ ENZİM İNHİBİSYONU VE KANTİTATİF FENOLİK BİLEŞİK ANALİZİ

ÖZET

Amaç: Üreaz enzimini inhibe edebilen doğal kaynaklı maddeler üreaz enziminin sebep olduğu hastalıklara karşı tedavi edici ajan olarak kullanılabilir. *Helleborus* türlerinin geleneksel tıpta mide ülseri tedavisinde kullanılmaları sebebiyle bakterilerin ürettiği üreaz enzimini inhibe etme potansiyaline sahip fitokimyasallar içermeleri muhtemeldir. Bu çalışmanın amacı endemik *Helleborus vesicarius*'un antiüreaz aktivitesini saptamak ve içerdiği fenolik bileşikleri kantitatif olarak analiz edip fenolik bileşiklerle antiüreaz aktivite arasında korelasyon kurmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bitkinin toprak üstü kısımlarından metanol, etanol ve hekzan çözücüleriyle 3 ayrı ekstre hazırlanmış ekstrelerin antiüreaz aktivitelerini tespit etmek için yöntem geliştirilip ticari bir üre test kiti kullanılarak spektrofotometrik olarak analiz yapılmıştır. Bitki ekstrelerinin fenolik bileşik içeriği kromatografik kantitatif analiz yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca yapılan kalitatif analizlerle bitkinin içerdiği sekonder metabolitler araştırılmıştır.

Bulgular: Üreaz enzim inhibisyonu analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılan hidrokinon (90,91 µg/mL), %96,3 oranında inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Test edilen bitki ekstreleri arasında en yüksek inhibisyon aktivitesi, aynı konsantrasyonda (90,91 µg/mL) uygulanan hekzan ekstresinde %36,89 olarak belirlenmiştir. Bunu %33,96 inhibisyon aktivitesi ile 45,45 µg/mL konsantrasyonda uygulanan hekzan ekstresi izlemiştir. Fenolik bileşik analizinde metanol ekstresinde 3,3250 mg/g kafeik asit, 0,0686 mg/g vanilik asit, 0,0683 mg/g gallik asit; etanol ekstresinde 1,0478 mg/g kafeik asit, 0,4537 mg/g vanilik asit, 0,0340 mg/g klorojenik asit, 0,1572 mg/g 4-hidroksibenzoik asit ve kalitatif analizlerde bitkinin saponin içerdiği tespit edilmiştir.

Sonuç: Ekstrelerin fenolik bileşik içeriklerinin düşük olduğu ve hekzan ekstresinin en yüksek antiüreaz aktivite gösterdiği görülmüştür. Ekstrelerin içerdiği fenolik bileşikler ile antiüreaz aktivite arasında bir korelasyon kurulamamıştır. Hekzan ekstresi fenolik bileşik içermediğinden bitkinin antiüreaz aktivitesinin fenolik

bileşiklerden değil saponinler gibi apolar yapılı bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Endemik, Fenolik, *Helleborus vesicarius*, Üreaz Enzim İnhibisyonu

UREASE ENZYME INHIBITION AND QUANTITATIVE PHENOLIC COMPOUND ANALYSIS OF HELLEBORUS VESICARIUS EXTRACTS

ABSTRACT

Aim: Natural compounds capable of inhibiting urease enzyme may serve as therapeutic agents against diseases caused by urease activity. Due to the traditional use of *Helleborus* species in gastric ulcer treatment, it is likely that they contain phytochemicals with the potential to inhibit bacterial urease enzymes. The aim of this study is to determine the anti-urease activity of the endemic *Helleborus vesicarius*, quantitatively analyze its phenolic compounds and establish a correlation between these phenolic compounds and anti-urease activity.

Materials and Methods: Three separate extracts were prepared from the aerial parts of the plant using methanol, ethanol and hexane solvents. A method was developed to determine the antiurease activity of the extracts and spectrophotometric analysis was conducted using a commercial urea test kit. The phenolic compound content of the plant extracts was determined using chromatographic quantitative analysis. Additionally, qualitative analyses were conducted to investigate the plant's secondary metabolites.

Results: In urease enzyme inhibition assays, the positive control hydroquinone (90.91 µg/mL) showed 96.3% inhibition activity. Among the tested plant extracts, the highest inhibition activity was observed in the hexane extract applied at the same concentration (90.91 µg/mL), with an inhibition rate of 36.89%. This was followed by the hexane extract applied at a concentration of 45.45 µg/mL, which exhibited 33.96% inhibition activity. In the phenolic compound analysis the methanol extract was found to contain 3.3250 mg/g of caffeic acid, 0.0686 mg/g of vanillic acid, 0.0683 mg/g of gallic acid; while the ethanol extract contained 1.0478 mg/g of caffeic acid, 0.4537 mg/g of vanillic acid, 0.0340 mg/g of chlorogenic acid, 0.1572 mg/g of 4-hydroxybenzoic acid and qualitative analyses revealed that the plant contains saponins.

Conclusion: The extracts were found to have low phenolic compound content, and the hexane extract exhibited the highest antiurease activity. No correlation was observed between the phenolic compounds present in the extracts and their antiurease

activity. Since the hexane extract does not contain phenolic compounds, the plant's antiurease activity is considered to be attributable not to phenolics, but rather to apolar compounds such as saponins.

Key Words: Endemic, Phenolic, *Helleborus vesicarius*, Urease Enzyme Inhibition

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bazı mikroorganizmalar insanlarda ve hayvanlarda üriner sistem ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları öncelikli olmak üzere birçok hastalığın oluşumunda etkili olan "üreaz" isimli bir enzim üretirler (1).

Bitkiler tarafından en yaygın olarak sentezlenen sekonder metabolitler fenolik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin antiüreaz, antiinflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik, antialerjik, antitrombotik, antimikrobiyal, antiviral ve antipatojenik gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bir çok bilimsel çalışma ile rapor edilmiştir (2,3).

Bazı bitkiler, doğal kaynaklı üreaz enzim inhibitörü özellikleri ile dikkat çekmektedir. Kimyasal sentez yoluyla elde edilen inhibitörlerin yanı sıra zengin fitokimyasal içerikleri sayesinde bitkiler, üreaz enzim inhibisyonu araştırmaları açısından önemli bir doğal kaynak oluşturmaktadır. Özellikle son yıllarda, *Helicobacter pylori*'ye (*H. Pylori*) karşı etkili tedavi stratejileri geliştirmek amacıyla çeşitli bitkisel ekstrelerin üreaz enzimine karşı inhibitör potansiyelleri araştırılmaktadır (4).

Bitkisel ekstrelerin bünyesinde birden fazla biyoaktif metabolit bulunması bu karışımların sinerjik etkilerle daha güçlü biyolojik aktivite göstermesine olanak tanımaktadır. Ayrıca, doğal bileşiklerin toksisite profilleri genellikle sentetik ilaçlara kıyasla daha düşük olabilir. Ancak bu durum, her doğal bileşiğin güvenli olduğu anlamına gelmez. Bitkisel kökenli bileşiklerin kompleks yapıları ve birden fazla metaboliti içermesi, bazı durumlarda istenmeyen etkilere veya farmakokinetik etkileşimlere de yol açabilir. Bu nedenle, doğal bileşiklerin potansiyel terapötik faydalarının yanı sıra güvenlilik profillerinin de deneysel ve klinik çalışmalarla ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir (5).

Dünyada en yaygın enfeksiyon etkenlerinden biri olan *H. Pylori* gastrit, mide ülseri ve mide kanseri gibi ciddi hastalıklarla ilişkilendirilmekte olup artan antibiyotik direnci nedeniyle eradikasyonu giderek zorlaşmaktadır (6). Bu nedenle antiüreaz aktivitesi olduğu bilinen fenolik bileşiklerin, *H. pylori* enfeksiyonuna karşı doğal bir tedavi alternatifi olarak değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır (3). Fenolik bileşikler, mide mukozasını çeşitli ülser yapıcı ajanlara karşı farklı mekanizmalarla

koruma potansiyeline sahiptir. Bu mekanizmalar arasında güçlü antioksidan aktiviteleri, reaktif oksijen türlerini (ROS) uzaklaştırma kapasiteleri, serbest radikal temizleme etkileri ve *H. Pylori*'nin mide ortamında hayatta kalması ile kolonizasyonunda kritik rol oynayan üreaz enzimini inhibe etme özellikleri yer almaktadır. Özellikle gallik asit, kafeik asit, kuersetin ve kateşin gibi fenolik bileşikler bu biyolojik etkileriyle dikkat çekmektedir (3,5).

Toksik etkili olmalarına rağmen *Helleborus* türleri, geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (7). Mikrobiyal üreaz aktivitesiyle bağlantılı olan mide ülseri bu hastalıklardan biridir. Bazı *Helleborus* türlerinin fenolik bileşik içerdikleri bilinmektedir. Yapılan bir çalışmayla *Helleborus purpurascens'*in polifenolik ekstrelerinin üreaz enzimini oldukça yüksek oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir (3,8).

Bu çalışmada *H. vesicarius'*un toprak üstü kısımlarının metanol, etanol ve hekzanla hazırlanan bitki ekstrelerine *in vitro* üreaz enzim inhibisyon analizi yapılarak fenolik bileşiklerinin kromatografik kantitatif analizi yapılacaktır. Ayrıca ön deneylerle bitkide hangi sekonder bileşiklerin mevcut olduğu kalitatif olarak analiz edilecektir. Üreaz enzim inhibisyon analizinde kullanılan yöntem bu çalışma sırasında geliştirilip optimize edilerek literatüre yeni bir uygulama yaklaşımı kazandırılacaktır. Geliştirilen bu yöntem ile elde edilen bulgular, ilgili bitki türünün biyolojik potansiyelinin daha ileri düzeyde araştırılmasına olanak sağlayacaktır. Özellikle aktif bileşiklerin izolasyonunu takiben, geliştirilen yöntem ile *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sayesinde bitkinin üreaz enzim inhibitörü olarak klinik kullanım potansiyeli ortaya konabilir. Ayrıca literatürde hakkında sınırlı bilgi ve çalışma bulunan ve dünya üzerinde sadece ülkemizin dar bir bölgesinde doğal olarak yayılış gösteren bu değerli endemik bitki türü üzerine yürütülen araştırma, hem fitokimyasal hem de farmakolojik açıdan literatüre anlamlı katkılar sunmayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RANUNCULACEAE BİTKİ FAMİLYASI

Ranunculaceae (Düğünçiçeğigiller) çiçekli bitkiler sınıfından, zehirli bitkileri barındıran bir familyadır. İki çenekli, ayrı taç yapraklı bitkilerin bulunduğu familyada çiçekler erdişi olmakla birlikte tek ya da toplu halde, çıplak veya çanak gibi bir bürüm içinde bulunurlar. Meyveleri kuru veya etlidir, tadı buruktur. Birçoğu yumru köklüdür. Tek ya da çok yıllık otsu, bazıları sarılıcı odunlu bitkilerden oluşmaktadır (9,10).

Dünya üzerinde 50 cins ve 2000 tür, ülkemizde 17 cins ve 200 türle varlığını sürdürmektedir (10). Bu familyaya dahil cinslere örnek olarak *Helleborus, Aconitum, Adonis, Clematis, Ranunculus, Delphinium, Hydrastis* verilebilir. *Helleborus, Clematis, Adonis, Delphinium ve Ranunculus* türleri süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir; *Helleborus, Aconitum, Hydrastis*'in bazı türleri ise tıbbi öneme sahiptir, halk ilacı olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanımları mevcuttur (11,12).

2.1.1. *Helleborus* Cinsi

Kireçtaşı topraklarda uzun ömürlü bitkilerin ve yaprak döken ağaçların yakınında yetişen, kışa dayanıklı, şubat-mart gibi çiçeklenen, 60 cm'ye kadar uzayabilen, çok yıllık, otsu bitkilerdir. Avrupa ve Batı Asya'nın farklı bölgelerinde çeşitli, Çin'de bir türle doğal yayılış gösteren *Helleborus*'ların 22 türü vardır (9,13).

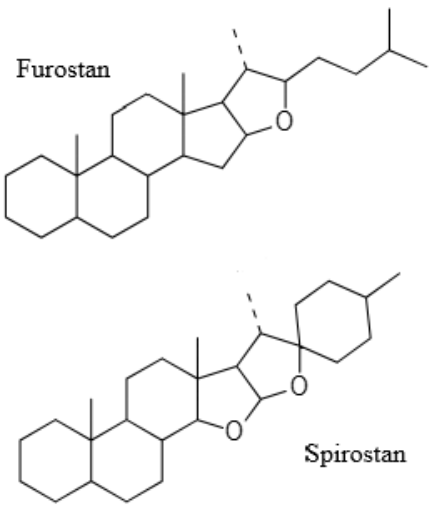
Helleborus türleri Avrupa'da çeşitli isimlerle anılmaktadır. Fakir bir çobanın Hz. İsa doğduğunda *Helleborus*'u hediye olarak götürdüğü bu sebeple Christmas Rose (Noel gülü), hava durumu tahmini için kullanıldıklarından Oracle Flower (kahin çiçeği), içerdikleri "protoanemonin" adlı maddenin hapşırık yapmasından dolayı Nieswurz (hapşırık otu) olarak anılmaktadırlar (14). *Helleborus*'lar gösterişli çiçekleriyle dikkat çektiğinden bazı türleri süs bitkisi sektöründe oldukça önemlidir (15).

Helleborus ekstrelerinde kalp glikozitleri, tiyoninler, saponinler, ekdisteroidler, reçineler, laktonlar ve mineraller tespit edilmiştir (13,16). *Helleborus* türleri kalp glikozitleri, saponin ve protoanemonin alkoloidi içerdiklerinden zehirlidir (17).

Yunanlılar *Helleborus*'ları eklem rahatsızlıklarında, diüretik, kusturucu, ishal yapıcı olarak ve cinnet tedavisinde kullanmışlardır (18). Yunan mitolojisinde bir kahinin, kralın kızını delilikten kurtarmak için *Helleborus* kullandığı geçmektedir. Galen'in histeri tedavisinde *Helleborus* türlerini kullandığı bilinmektedir (19). Bitkisel metabolitlerin merkezi sinir sistemi üzerine etki gösterebilmesi bitkilerin psikiyatrik rahatsızlıklarda kullanımlarına dayanak oluşturabilir (20).

Helleborus niger (*H. niger*) Avrupa'da doğal yayılış göstermekte ve süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Droğu "Rhizoma *Hellebori nigri*", "helleborin" isimli saponin içerir. "hellebrin" isimli kalp glikozitinden dolayı kalp kuvvetlendirici etkiye sahiptir bu sebeple kalp hastalıklarında kullanılmıştır. Ayrıca diüretik, pürgatif ve emetik olarak kullanılmıştır (21-23). Bu tür, Almanya'da homeopatide tümör tedavisinde adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada *H. niger* ve *Helleborus foetidus*'tan elde edilen ekstrelerin protoanemonin, saponinler ve polifenoller içermeleri sebebiyle kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğu tespit edilmiştir (17).

Helleborus türlerinin köklerinde bulunan saponinlerden 1976 yılında mide ülseri tedavisi için patentli bir formülasyon geliştirilmiştir (24). Saponinler antimikrobiyal aktiviteye sahip sekonder metabolitlerdir. Saponince zengin bitkiler antiüreaz, antimikrobiyal, antiprotozoal, antikarsinojenik, antioksidan, antiinflamatuvar gibi biyoaktivitelere sahiptir (25). *Helleborus*'larda bulunan furostan ve spirostan saponinlerinin genel iskelet formülleri Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1: *Helleborus* türlerinde bulunan saponinlerin iskelet formülleri (16)

*Helleborus odorus'*un antiparaziter ve müshil özelliği olup veterinerlik alanında birçok uygulaması vardır (26). *Helleborus thibetanus* Çin halk tıbbında sistit, üretrit ve yara tedavisinde kullanılmaktadır (27).

Ülkemizde doğal olarak 2 türü yetişir*: Helleborus orientalis* ve *Helleborus vesicarius* (*H. vesicarius*) (18). *H. orientalis* Yunanistan ve ülkemizin Karadeniz sahilleri boyunca ormanlık alanlarda ve çalılıklarda yetişen halk tarafından bohça otu, boynuz otu, danakıran, danabağırtan, kara çöpleme, siyah harbak gibi yöresel adlarla anılan *Helleborus* türüdür (28). Türe ait görüntü Resim 2.1'de verilmiştir.



Resim 2.1: *Helleborus orientalis* bitkisi (Geyve/SAKARYA)

H. orientalis'in insanlarda lohusa sancıları ve köklerinin diş ağrısında kullanıldığı bilinmektedir. Kuzey Anadolu köylerinde yaprak ve rizomları büyükbaş hayvanlarda ishal, yürüme bozuklukları, göğüs hastalıkları, bacak ödeminde ve daha bir çok hastalıkta çeşitli şekillerde (yedirmek, kuyruğa/kulağa takmak gibi) uygulanmaktadır (28-30). Bir aile büyüğüm bu türün köklerini geçmişte Geyve'de sığırların hastalıklarında kulağa implante ederek kullanmıştır. Kullandığı miktarın çok az olduğu ve bekletme süresinin sınırlı olduğu aksi halde hayvanı zehirleyebileceğini söylediği bilinmektedir. Farklı ülkelerde, çeşitli *Helleborus* türleriyle, çeşitli hayvanlar üzerinde köklerin implante edilmesiyle uygulamalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar bu yolla kullanımlarının başlıca immünositimülatör aktivite dolayısıyla faydalı olduğunu göstermiştir (31).

Yapılan bir çalışma *H. orientalis*'in antiinflamatuar ve antinosiseptif aktivitelerinin oldukça iyi olduğunu göstermiştir (32). Bir başka çalışma ise yaprak ve çiçeklerinin oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu ve yaprak ekstresinin DNA hasarını azalttığını göstermiştir (33).

2.1.1.1. *Helleborus vesicarius*: Dünyada sadece ülkemizde dar bir dağlık alanda Toroslar, Amanos dağları, Gaziantep, Kahramanmaraş çevresinde 550-1300 m yükseklikte yamaçlarda ve çalılıklarda yetişen yerel olarak "patlak otu" olarak adlandırılan endemik bir bitkidir (18,23). Çok yıllık otsu bir bitki olup 57 cm dolaylarında gövdeye ve 45-65 cm kazık köke sahiptir. 17-25 mm uzunluğunda yeşilli morlu kapitulum şeklinde dikkat çeken çiçekleri mayıs ayı civarında açar (34,35). Türe ait görüntü Resim 2.2'de verilmiştir.



Resim 2.2: *Helleborus vesicarius* bitkisi (Türkoğlu/KAHRAMANMARAŞ)

Bu tür hakkında yapılan kimyasal içerikli çalışmalar birkaç tane ile sınırlıdır, bu çalışmalar bitkinin toprak üstü kısımlarıyla yapılmıştır. *H. vesicarius'*un yüksek antioksidan potansiyale sahip olduğu (36), antimikrobiyal aktivitesinin oldukça yüksek olduğu (37), bitkinin yağ asitleri açısından zengin bir içeriğe sahip olduğu ve ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitelerinin orta veya iyi derecede olduğu (38) DNA koruyucu ve kanser önleyici etkiye sahip olduğu tespit edilmiş, kaspaz-3 aktivasyonu

yoluyla apoptozu indükleyebildiğinden doğal kanser tedavi ajanı olarak kullanılabileceği raporlanmıştır (39).

2.2. ENDEMİK BİTKİ

"Endemik" kelimesi sınırlı bir bölgede doğal olarak yayılış gösteren türleri ifade eder. Türkiye, üç bitki coğrafyasının kesiştiği zengin iklim ve jeolojik yapısıyla yaklaşık %33,5 endemizm oranına sahip, 10.000'den fazla çiçekli bitki türü ve 3.090 endemik bitki ile önemli bir endemik çeşitlilik merkezidir (40).

Dünyadaki bitki türlerinin yarısından fazlası endemiktir. Dünya Doğa Koruma Birliği'ne göre 28.000'den fazla bitki türü tehlike altındadır ve bu durum endemik bitkiler için daha ciddi bir sorundur (41). Türkiye'deki endemik bitkilerin yaklaşık yarısı yok olma riski taşımaktadır. Endemik türlerin korunması botanikte öncelikli çalışmalardandır (42).

2.3. ZEHİRLİ BİTKİLER

Zehirli bitkiler, ürettikleri kimyasal bileşiklerle (toksin) normal vücut fonksiyonlarını etkileyerek zehirlenmelere sebep olur (43,44). Bu maddeler glikozitler, alkaloitler, fitotoksinler, oksalatlar, tanen ve reçinelerdir (45).

Toksinler bitkilerin rizom, soğan, yumru, gövde, kök, yaprak, tohum ve meyve gibi bölümlerinde bulunabilir. Zehir miktarı çevre koşulları, bitkinin yaşı ve bulunduğu coğrafyaya bağlı olarak değişir. Organizmalar üzerindeki etkisi ise cinsiyet, yaş, ağırlık ve bağışıklık durumuna göre farklılık gösterir (46).

Bitkisel toksinler tarih boyunca avlanmada, idam cezalarında, savaşlarda ve tıbbi olarak kullanılmıştır (44,47). Bir kimyasal maddenin terapotik ve toksik etkileri arasında doza bağlı olarak ortaya çıkan farklar bulunmaktadır. Yani kullanılan miktara bağlı olarak bir bitki tedavi edici de zehirleyici de olabilmektedir (43). Paraselsus'un "***Tüm maddeler zehirdir, ilacı zehirden ayıran dozudur***." sözü bu bilgiyi destekler niteliktedir. Zehirli bitkiler yeni ilaç keşifleri için önemli kaynaklardır (44).

Bazı tarihçiler Büyük İskender'in *Helleborus* ile zehirlenerek öldürüldüğünü düşünmektedir. M.Ö. 585'te Yunan ordusunun, Kirrha şehrinin su kaynağına büyük miktarda ezilmiş *Helleborus* yaprağı ekleyerek halkı zehirlediği bilinmektedir (48). Galyalılar, *Helleborus* köklerinden elde ettikleri zehri oklarında kullanmıştır (18).

Ranunculaceae familyasındaki tüm bitkiler protoanemonin alkaloidi, *Helleborus* türleri ise kalp glikozitleri, saponin ve protoanemonin alkaloidi içerdiğinden zehirlidir (17,49). Protoanemonin sebebiyle bu bitkilerden çıkan sıvıya temas, ciltte kabarmaya yol açabilir. Bu madde antimikrobiyal etkisi nedeniyle tıbbi kullanıma da sahiptir (50).

Steroit glikozitler, kalp glikozitleri ve saponin glikozitleri olmak üzere ikiye ayrılır. Kalp glikozitleri kalp üzerinde etkili, saponinler ise alyuvarları parçalayarak hemoliz yapan toksik maddelerdir (51). *Helleborus* türleri "helleborin" adlı kalp glikoziti içerir. *Digitalis* yapraklarından elde edilen "digoksin" kalp yetmezliğinde ilaç olarak kullanılan, en bilinen kalp glikozitidir. Bu ilaç kalbin kasılma gücünü artırır, atım hızını düşürerek ritmi düzenler (52,53). Kalp glikoziti zehirlenmelerinde bradikardi, kalp bloğu, karın ağrısı, kusma ve ileri durumlarda ölüm görülebilir (52).

2.4. ENZİMLER

Canlılardaki biyomoleküller kendiliğinden kolayca reaksiyona giremezler. Canlılar kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve çoğunlukla protein yapısında olan "enzim" isimli maddeleri sentezleyip normal şartlarda gerçekleşmesi zor olan reaksiyonları hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleştirirler (54,55).

Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat denir. Enzimler, spesifik substratlarla etkileşerek tek tip kimyasal reaksiyonu kataliz eder. Enzimlerin aktif bölgesinde bulunan amino asit yan zincirleri substratla tamamlayıcı yapıya sahiptir. Bu bölgede enzim-substrat kompleksi oluşur, substrat ürüne dönüşür ve enzim tekrar serbest kalır (56).

Doğada 2000'nin üzerinde enzim bulunmaktadır. İlk keşfedildiklerinde etki ettikleri substratın sonuna genellikle **–az** eki eklenerek adlandırılmışlar sonra ise her enzime bir sistematik kod verilmiştir. Enzim kodları EC yazısından sonra kurallı dört adet rakamdan oluşmaktadır (54,55). Uluslararası enzim sınıflamasında enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayrılmıştır: Oksidoredüktaz, transferaz, hidrolaz, liyaz, izomeraz, ligaz (56).

2.4.1. Üreaz Enzimi

Üreaz (üre amidohidrolaz) hidrolaz kategorisinden EC 3.5.1.5 enzim kodlu, üre molekülünü hidroliz ederek karbondioksit (CO_2) ve amonyak (NH_3) oluşumunu

katalizleyen bir enzimdir (57,58). Nikel iyonları içerdiği tespit edilen ilk enzim olan üreaz (59) bakteriler, bitkiler, lifli mantarlar, algler ve birçok organizma tarafından sentezlenir ve doğada oldukça yoğun bulunur (60). Reaksiyonun gerçekleşmesi için substrat yani üre de doğada oldukça kolay bulunmaktadır (61). Üreaz enziminin yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir.



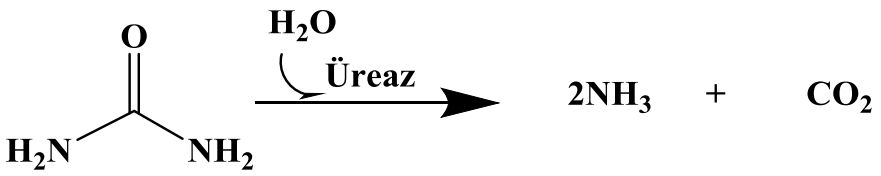
Şekil 2.2: Üreaz enziminin yapısı (62)

2.4.1.1. Mikrobiyal Üreazlar ve Hastalık Oluşumu: Üre, karaciğerde üretilen ve kan dolaşımıyla böbreklere taşınıp idrarla atılan organik bir moleküldür (63). Dolaşımdaki ürenin bir kısmı salgı sistemleriyle epitel yüzeylere taşınır (64). Üreaz enzimiyle üreyi parçalayan mikroorganizmalar insan ve hayvan vücutlarında yaygındır. Üre epitel yüzeylerde üreaz etkisiyle parçalanarak doku hasarına ve mikroorganizmaların tutunmasına yol açar, bu da özellikle üriner ve gastrointestinal enfeksiyonlar dahil birçok hastalığın gelişimine zemin hazırlar (65).

H. pylori dünya nüfusunun yarısından fazlasının mide epiteline kolonize olarak en yaygın enfeksiyonlara neden olan patojenlerden biridir. Enfekte bireylerde mide ülseri ve kanseri gibi ciddi hastalıkların gelişimine yol açabilmektedir (66,67). *H.pylori* üreazının oluşturduğu amonyağın mide epitelinde sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (68). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 1994 yılında *H. pylori*'yi mide kanseri için Grup-1 kanserojen (kesin kanserojen) olarak sınıflandırmıştır (69).

Midedeki yüksek asidik ortam *H. pylori* için zararlı olduğundan hafif alkali olan mukus tabakasının altına kamçısı yardımıyla yerleşir. Salgıladığı üreaz enzimiyle üreyi parçalar, açığa çıkan amonyak lokal pH'ı yükseltir ve bakterinin yaşamını

sürdürebileceği uygun bir mikroçevre oluşturur. Üreaz enzimi, bakterinin mide mukozasında yaşamını sürdürebilmesi ve kolonizasyonu için kritik rol oynar (70). Ürenin üreaz enzimiyle hidroliz reaksiyonu Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3: Ürenin üreaz enzimiyle hidrolizi

Bakteriyle enfekte olmuş ve belirti gösteren hastalarda antibiyotik kombinasyonları, proton pompası inhibitörleri, bizmut bileşikleri kullanılmaktadır fakat bakterinin geliştirdiği antibiyotik direnci sebebiyle enfeksiyonunun önüne geçilmesi oldukça zordur (71).

2.4.2. Enzim İnhibisyonu

Enzimin katalitik aktivitesini engelleyen "enzim inhibitörleri" enzime bağlanarak substrata olan bağlanmayı ve substratın ürüne dönüşümünü azaltır veya tamamen engeller. Sonuç olarak enzimin biyokimyasal reaksiyonu katalizleme yetisi azalır ya da tamamen durur. Enzim inhibitörleri iki şekilde inhibisyon yapmaktadır:

2.4.2.1. Reversibl (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu: Enzim inhibitörü bir enzime kovalent bağla bağlanmıyorsa geri dönüşümlü inhibisyon yapar. İnhibitör madde ortamdan uzaklaştırıldığında enzim aktivitesini yeniden kazanmaktadır (72,73).

2.4.2.1.a. Kompetitif (Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu: Substrata yapıca benzeyen inhibitör, serbest enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın bağlanmasını engeller (74). Bu durum, enzimin substrata olan ilgisini azaltır ve reaksiyona giren enzim sayısını düşürür. Ancak substrat konsantrasyonunun artırılması bu etkiyi ortadan kaldırabilir (73).

2.4.2.1.b. Nonkompetitif (Yarışmasız) Enzim İnhibisyonu: Substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanabilir. İnhibitör, aktif bölge dışında bir noktaya bağlanarak reaksiyon hızını düşürür. Genellikle enzimin fonksiyonel gruplarına geri

dönüşümlü bağlanır. Serbest enzim ya da enzim-substrat kompleksine etki eder, substratla yarışmaz (56).

2.4.2.1.c. Unkompetetif (Yarı Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu: İnhibitör molekülü sadece enzim-substrat kompleksine bağlanır (72).

2.4.2.2. İrreversibl (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu: İnhibitör molekülü, enzimin aktif bölgesine ya da aktif bölgeye yakın bir yere kovalent olarak bağlanır ve enzim-inhibitör kompleksini oluşturur. Enzim-inhibitör komplesi seyreltilirse enzim yeniden aktive olamaz (56).

2.4.3. Üreaz İnhibitörleri

Asetohidroksamik asit klinik kullanımdaki tek üreaz inhibitörüdür (73). Hidroksamik asit türevleri, imidazol yapısındaki bazı bileşikler ve fosforodiamidatların üreaz enzimini inhibe ettiği bilinse de bu bileşikler klinikte kullanıma uygun değildir. Yan etkisi az veya olmayan yeni üreaz inhibitörlerinin keşfi büyük önem taşımaktadır. Bu alandaki çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir (74).

2.5. FENOLİK BİLEŞİKLER

Bitkiler metabolik faaliyetleri sonucunda primer ve sekonder olmak üzere iki temel gruba ayrılan metabolitler sentezlemektedir. Primer metabolitler bitkinin temel yaşamsal süreçlerinde doğrudan rol oynayan bileşiklerdir. Sekonder metabolitler ise bitkinin yaşamı için doğrudan gerekli olmamakla birlikte çevresel stres faktörlerine karşı adaptasyonunda önemli işlevler üstlenir. Ayrıca biyolojik aktiviteleri nedeniyle farmasötik, kozmetik, tarım ve gıda sanayi gibi pek çok endüstriyel alanda önemli bir uygulama potansiyeline sahiptir (75,76).

Biyosentetik kökenlerine göre sekonder metabolitler üç ana gruba ayrılır: Fenolik bileşikler, alkaloitler ve terpenler. Bu gruplar arasında en genişini oluşturan fenolik bileşikler, yapılarında bir veya birden fazla hidroksil grubu taşıyan benzen halkası içeren organik moleküllerdir. Bitkiler tarafından patojenler, parazitler, virüsler ve çevresel stres etmenlerine karşı savunma amacıyla sentezlenirler (77,78).

Fenolik bileşikler fenol halkalarının sayısı, bu halkalar arasındaki karbon iskeleti ve bağlı fonksiyonel grupların türü ile konumuna göre alt sınıflara ayrılır. Bu sınıflandırma, bileşiklerin kimyasal yapıları ile biyolojik işlevleri arasındaki ilişkiyi

anlamada önemli bir temel oluşturur. Fenolik bileşikler başlıca fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, kumarinler, lignanlar, stilbenler, kinonlar ve kurkuminoidler olarak sınıflandırılır. Bu gruplar içinde flavonoidler ve fenolik asitler, bitkilerde en yaygın ve biyolojik aktiviteleri en çok incelenen alt sınıflardır (79,80).

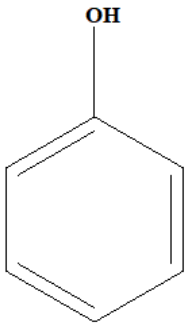
2.5.1. Flavonoidler

Flavonoidler polifenolik yapıya sahip bileşikler olup antioksidan, antiinflamatuvar ve kardiyoprotektif etkileriyle tanınırlar. Kimyasal yapılarına göre flavonoller (örn. kuersetin, kemferol, epikateşinler), flavonlar (örn. apigenin, luteolin), flavanonlar (örn. naringenin, hesperidin) ve izoflavonoidler olmak üzere alt gruplara ayrılırlar (79,80).

2.5.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, fenol halkasına bağlı karboksilik asit grubuna sahip bileşiklerdir. Yapılarına göre iki ana gruba ayrılırlar: hidroksibenzoik asit türevleri (örn. gallik asit, protokateşik asit, vanilik asit) ve hidroksisinamik asit türevleri (örn. kafeik asit, ferulik asit, sinnapik asit, p-kumarik asit). Bu bileşikler, antioksidan ve antienflamatuvar aktiviteleriyle öne çıkar (79,80).

Fenolik bileşiklerin içerdiği fenol'ün kimyasal yapısı Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4: Fenol'ün kimyasal yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

H. vesicarius toprak üstü kısımları 20.03.2024 tarihinde Kahramanmaraş ili Türkoğlu ilçesinde 550 m rakımda meşelik alanlardan toplanmış ve uygun şartlarda kurutulmuştur. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet İlçim tarafından tür tespiti yapılmış ve bitki üniversitenin herbaryumuna kaydedilmiştir. H. vesicarius Aucher HMKUH 785

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASAL MALZEMELER

3.2.1. Kullanılan Cihazlar:

- Rotary Evaporatör (Heidolph, Almanya)
- Orbital Çalkalayıcı (Oni lab, ABD)
- HPLC (Shimadzu, Japonya)
- UV1900i Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya)
- Hububat Öğütücü (Lavion, Türkiye)
- Vorteks (Velp, İtalya)
- Ultrasonik Su Banyo (ISOLAB, Almanya)

Kullanılan cihazlar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık Fakültesi Fitoterapi Araştırma Laboratuvarı'na aittir.

3.2.2. Kullanılan Kimyasallar:

- Etanol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Hekzan (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Metanol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Üre (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Hidrokinon (Acros organics, ABD)
- Üre test kiti (Bioanalitic Diagnostic Industry, Türkiye)
- Kurşun (II) subasetat (ISOLAB, Almanya)
- Kloroform (ISOLAB, Almanya)

- Toluen (ISOLAB, Almanya)
- Demir (III) klorür (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sülfürik asit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Tuzlu jelatin çözeltisi
- Shibata belirteci: Eşit hacimlerde derişik hidroklorik asit, su ve etanol
- Bouchardat belirteci: İyot+Potasyum iyodür+Su
- Dragendorf belirteci: Bizmut karbonat+Hidrojen klorür+Potasyum iyodür+Su

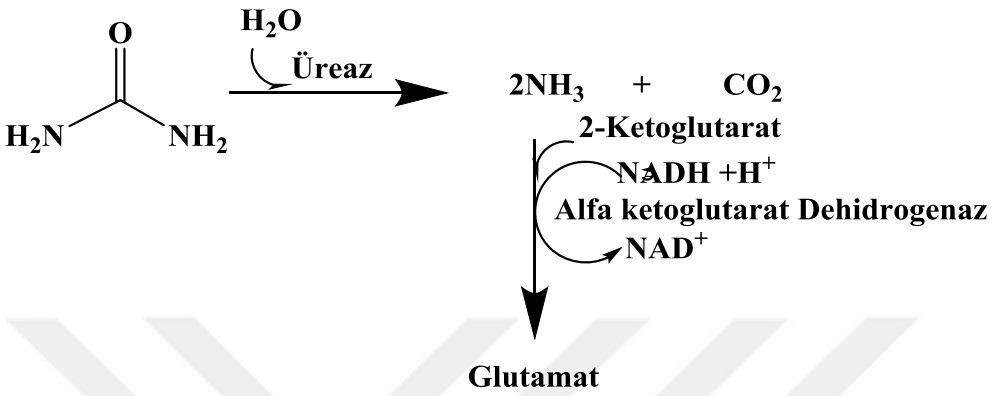
3.3. EKSTRELERİN HAZIRLANMASI

Ekstre hazırlamak için üç farklı erlene 25 g öğütülmüş drog alındı. Her bir örneğin üzerine ayrı ayrı 300 mL metanol, etanol ve hekzan çözücüleri ilave edildi. Erlenlerin ağızları kapatılarak karışımlar oda sıcaklığında iki saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süre sonunda çözücü kısmı darası alınmış balonlara aktarıldı. Ardından posa üzerine aynı çözücüden tekrar 300 mL ilave edildi. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlandı (EK-1). Daha sonra çözücüler rotary evaporatör ile düşük basınç altında uzaklaştırıldı ve ekstre verimleri hesaplandı. Balonlardaki maddenin üzerine kendi çözücülerinden ilave edilip ultrasonik banyo yardımıyla balondan ayrılıp darası alınmış kavanozlara aktarıldı. Kavanozlar etüvde 40 °C'de bekletilerek kurutuldu. Böylece metanol, etanol ve hekzan ekstreleri elde edildi ve ekstreler daha sonra analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.4. ÜREAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN GLUTAMAT DEHİDROGENAZ BAĞLANTILI YÖNTEM İLE BELİRLENMESİ

Üreaz enzim inhibisyonu ticari üre test kiti kullanılarak spektrofotometrik olarak analiz edildi. Üreaz enzimi, substratı olan üreyi hidrolize ederek amonyak (NH_3) ve karbondioksit (CO2) oluşumunu katalizlemektedir. Açığa çıkan amonyak, glutamat dehidrogenaz (GLDH) enziminin katalizörlüğünde 2-ketoglutarat ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid ($NADH+H^+$) ile reaksiyona girerek glutamat oluşumuna neden olur. Bu eşlenik reaksiyon sırasında NADH, NAD^+ formuna oksitlenmektedir. NADH, 340 nm dalga boyunda karakteristik absorbans göstermektedir. Reaksiyon süresince NADH konsantrasyonundaki azalma spektrofotometrik olarak absorbans azalması şeklinde izlenebilmektedir (81). Absorbans değişimi (ΔAbs), üreaz enziminin mevcut koşullardaki aktivitesinin hesaplanmasında doğrudan kullanılmakta ve

potansiyel inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine olanak tanımakta ve inhibisyon oranının kantitatif olarak belirlenmesine imkân sağlamaktadır. Analizi açıklayıcı denklem Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1: Ürenin üreaz enzimiyle hidrolizi ve glutamat dehidrogenaz ile aktivite analizi

Üreaz enzim inhibisyonu analizi için madde miktarları değiştirilerek çeşitli denemelerle en uygun şartlar belirlenip yöntem optimizasyonu yapıldı. Üre test kitinin prospektüsündeki talimata göre R1 reaktifi R2 reaktifinin 4 katı hacimde kullanıldı (81). Her bir ekstreden ve referans inhibitör olarak kullanılan hidrokinondan 1mg/mL konsantrasyonunda stok çözeltiler ve substrat olarak 200 mM üre çözeltisi hazırlandı. Ekstre stok çözeltileri hazırlarken metanol ekstresi için çözücü olarak metanol, etanol ve hekzan ekstreleri için etanol kullanıldı. Ekstre çözeltileri naylon şırınga ucu filtre (0,45 µm por gözeneği) yardımı ile süzüldü. İlgili deney tüpüne her bir tüp için gerekli madde ve stok çözeltilerden, üre çözeltisi hariç Tablo 3.1'de gösterilen miktarlarda eklendi (EK-2).

Tablo 3.1: Üreaz enzim inhibisyonu deney tüplerinin içerikleri

Deney Tüpleri	R1	R2	D. S	H sç	H1 sç	H2 sç	H3 sç	Üre sç
Kontrol	400 µL	100 µL	500 µL					100 µL
Kontrol Körü		100 µL	900 µL					100 µL
H 90,91 µg/mL (p.k)	400 µL	100 µL	400 µL	100 µL				100 µL

Tablo 3.1 (devam)

H 90,91 µg/mL (p.k.k)		100 µL	800 µL	100 µL			100 µL
H1 90,91 µg/mL (n.)	400 µL	100 µL	400 µL		100 µL		100 µL
H1 90,91 µg/mL (n.k)		100 µL	800 µL		100 µL		100 µL
H1 45,45 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	450 µL		50 µL		100 µL
H1 45,45 µg/mL (n.k)		100 µL	850 µL		50 µL		100 µL
H1 22,73 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	475 µL		25 µL		100 µL
H1 22,73 µg/mL (n.k)		100 µL	875 µL		25 µL		100 µL
H1 9,09 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	490 µL		10 µL		100 µL
H1 9,09 µg/mL (n.k)		100 µL	890 µL		10 µL		100 µL
H2 90,91 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	400 µL			100 µL	100 µL
H2 90,91 µg/mL (n.k)		100 µL	800 µL			100 µL	100 µL
H2 45,45 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	450 µL			50 µL	100 µL
H2 45,45 µg/mL (n.k)		100 µL	850 µL			50 µL	100 µL
H2 22,73 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	475 µL			25 µL	100 µL
H2 22,73 µg/mL (n.k)		100 µL	875 µL			25 µL	100 µL
H2 9,09 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	490 µL			10 µL	100 µL
H2 9,09 µg/mL (n.k)		100 µL	890 µL			10 µL	100 µL
H3 90,91 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	400 µL			100 µL	100 µL
H3 90,91 µg/mL (n.k)		100 µL	800 µL			100 µL	100 µL
H3 45,45 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	450 µL			50 µL	100 µL
H3 45,45 µg/mL (n.k)		100 µL	850 µL			50 µL	100 µL
H3 22,73 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	475 µL			25 µL	100 µL
H3 22,73 µg/mL (n.k)		100 µL	875 µL			25 µL	100 µL
H3 9,09 µg/mL (n)	400 µL	100 µL	490 µL			10 µL	100 µL
H3 9,09 µg/mL (n.k)		100 µL	890 µL			10 µL	100 µL

R1: R1 Reaktifi (NADH). R2: R2 Reaktifi (üreaz tamponu). D.S: Distile su. H; H1, H2, H3; Üre sç: Hidrokinonun; metanol, etanol, hekzan ekstrelerinin; ürenin stok çözeltileri. H: Hidrokinon, H1, H2, H3: Metanol, etanol, hekzan ekstreleri. p.k: pozitif kontrol. p.k.k: pozitif kontrol körü. n: numune. n.k: numune körü.

Hazırlanan tüpler enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için 37 °C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Kontrol, hidrokinon ve numune tüplerinden birine ve ona karşılık gelen kör tüpüne 100 uL 200 mM üre çözeltisi ilave edilip vortekslendikten hemen sonra UV spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca kinetik modda NADH absorbansı okundu (EK-3). Enzim aktivitesinin zamana bağlı değişiminden üreaz enzim inhibisyon yüzdesi hesaplandı.

Üreaz enzim inhibisyon yüzdesi hesaplama formulü:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - \left(\frac{A_0 - A_5}{A_0} \times 100\right)$$

Formülde:

A_0: Reaksiyon başlangıcındaki absorbans değeri,

A_5: Reaksiyonun 5. dakikasındaki absorbans değeridir.

3.5. FENOLİK BİLEŞİKLERİN KROMATOGRAFİK KANTİTATİF ANALİZLERİ

Bitki ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin kantitatif analizi için Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus model yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı (HPLC) ve dedektör olarak fotodiyot dedektörü (PDA) kullanıldı. Analizlerde kolon olarak fenilheksil 3 µm, 4,6 mm × 150 mm boyutlarında (GL Sciences InterSustain, Japonya) C6 ters faz kolonu kullanıldı. Mobil faz sistemi mobil faz A olarak %0,1 formik asit içeren su, mobil faz B olarak ise asetonitril olmak üzere 2 çözücüden oluştu. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 30 °C'de sabit tutuldu ve mobil faz akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlandı. Pompa programı Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2: Fenolik bileşik analizinde kullanılan pompa programı

Dakika	Mobil Faz B (%)	Mobil Faz A (%)
0,01	5	95
7	9,5	90,5

Tablo 3.2 (devam)

20	17	83
35	40	60
40	0	100
40,01	Bitiş	

Her bir ekstre ve standart fenolik bileşik için 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözeltiler hazırlandı. Standart çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ve bu grafikler doğrultusunda ekstrelerin içerdiği fenolik bileşik miktarları kantitatif olarak belirlendi. Sonuçlar mg/g ekstre cinsinden verildi. Analizlerde toplam 15 farklı fenolik bileşik standart olarak kullanıldı. Bu bileşikler: 4-hidroksibenzoik asit, apigenin 7-glikozit, epikateşin, ferulik asit, gallik asit, kafeik asit, kikorik asit, klorojenik asit, kuersetin, naringenin, *p*-kumarik asit, rutin, salisilik asit, sinnamik asit ve vanilik asittir. Her bir fenolik bileşik, kendine özgü maksimum absorbans dalga boyunda değerlendirildi.

3.6. KALİTATİF FİTOKİMYASAL BİLEŞİK ANALİZİ

Kalitatif analizlerde drog olarak bitkinin toprak üstü kısımları kullanıldı. %5'lik infüzyon hazırlamak için 5 g toz drog üzerine 100 mL sıcak su eklendi ve karışım 30 dakika sıcak su banyosunda bekletildi, soğutuldu ve filtre kağıdından süzülerek infüzyon elde edilip antrasen, flavon, saponin ve tanen aranmasında kullanıldı.

Kardiyoaktif glikozitlerin aranmasında kullanılmak üzere etanol ekstresi için 1 g toz drog üzerine 10 mL %70'lik etanol eklendi ve karışım 5 dakika su banyosunda bekletildi. Ardından filtre kağıdından süzülerek süzüntü elde edilip süzüntüye 1 mL %10'luk kurşun (II) subasetat ($Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot Pb(OH)_2$) çözeltisi ilave edilip iyice karıştırıldı ve tekrar süzülüp çözelti pigmentlerden arındırıldı, süzüntü 10 mL kloroform ile ekstre edildi ve kloroformlu faz kardiyoaktif glikozitlerin teşhisi için kullanıldı (82).

3.6.1. Antrasen Türevlerinin Aranması

İnfüzyondan 10 mL alınıp 5 damla derişik sülfürik asit (H_2SO_4) eklendi. Karışım glikozitlerin hidrolizi için 15 dakika 80 °C sıcak su banyosunda bekletildi, soğutuldu ve 5 mL toluen eklenerek kuvvetlice çalkalandı. Oluşan toluenli faz bir pipet yardımıyla

dikkatlice başka bir tüpe aktarıldı, 3 mL %10'luk amonyak (NH_3) çözeltisi ilave edildi ve kırmızı bir rengin oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Bu renk değişimi bitkide antrasen türevlerinin varlığına işaret eder (82).

3.6.2. Flavon Türevlerinin Aranması

İnfüzyondan 5 mL alınıp 5 mL Shibata belirteci (eşit hacimlerde derişik hidroklorik asit, su ve etanol) eklendi. Ardından bir miktar saf magnezyum metal tozu ilave edildi. Karışımda turuncu, pembe veya mor renkte bir değişim olup olmadığına bakıldı. Bu renk değişimleri Siyanidin/Shibata reaksiyonunun gerçekleştiğini ve dolayısıyla bitkide flavon türevlerinin varlığını gösterir (82).

3.6.3. Saponin Aranması

Bir deney tüpüne 10 mL infüzyon alındı. Tüp baş parmakla kapatılıp yatay pozisyonda 30 saniye boyunca kuvvetle çalkalandı ve dinlenmeye bırakıldı. 15 dakika sonra tüpte en az 1 cm yükseklikte kalıcı bir köpük oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Belirtilen köpüğün oluşumu bitkide saponin varlığına işaret eder (82).

3.6.4. Tanen Aranması

İnfüzyondan 10 mL alınıp üzerine 2 mL tuzlu jelatin çözeltisi (sodyum klorür ile doyurulmuş %1'lik jelatin çözeltisi) eklendi ve krem renkli bir çökelek oluşup oluşmaması incelendi. Belirtilen çökeleğin oluşumu bitkide tanen varlığına işaret eder (82).

3.6.4.1. Gallik ve Kateşik Tanenin Ayrılması: 5 mL infüzyon üzerine 3 damla %5'lik demir (III) klorür ($FeCl_3$) çözeltisi eklendi. Karışımın rengi gözlemlenerek, mavi-siyah (gallik tanen) ya da esmer-zeytin yeşili (kateşik tanen) bir renk değişiminin meydana gelip gelmediğine bakıldı. Belirtilen renk değişimlerinin oluşması bitkide tanen mevcudiyetini ve bu tanenlerin türünü gösterir (82).

3.6.5. Alkaloit Aranması

Tüketme yöntemiyle alkaloit varlığı incelendi. 1 gram toz drog, 10 mL %3'lük sülfürik asit (H_2SO_4) çözeltisi ile karıştırıldı ve bu karışım su banyosunda 20 dakika kaynatılarak tüketildi, soğutuldu ve süzülerek süzüntü elde edildi. Bu süzüntüye 5 mL %10'luk amonyak (NH_3) çözeltisi ilave edildi ve karışım, ayırma hunisinde iki kez 10

mL eter ile ekstrakte edildi. Elde edilen eterli kısımlar birleştirilip su banyosu üzerinde yoğunlaştırıldı. Kalan kısım 5 mL 1 N sülfürik asit (H_2SO_4) ile çözüldü. Bu asitli çözeltide özel tanı reaktifleriyle alkoloitlerin varlığı araştırıldı. 1 mL asitli çözelti üzerine Bouchardat belirteci (iyot + potasyum iyodür + su) eklenerek esmer-kırmızı bir renk oluşup oluşmadığına bakıldı. 1 mL asitli çözelti üzerine Dragendorf belirteci (bizmut karbonat + potasyum iyodür + hidroklorik asit + su) eklenerek turuncu-kırmızı bir renk oluşup oluşmadığına bakıldı. Bu renk değişiminin oluşması bitkide alkaloit varlığına işaret eder (82).

3.6.6. Kardiyoaktif Glikozitlerin Aranması

Etanollü ekstrenin kloroformlu fazı alınıp ikiye bölündü. 1. ve 2. bölüm iki kapsüle alınarak su banyosunda yoğunlaştırıldı. Kapsülün birinde kalan artık üzerine 1 ml etanol ilave edilip çözüldü. Çözelti üzerine 2 damla % 6'lık sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ve 2 damla Kedde Reaktifi ilave edilip erguvan kırmızısı renk oluşumu takip edildi. Bu renk oluşumu kardiyoaktif glikozit varlığını gösterir. İkinci kapsüle 2 mL demir (III) klorür'ün glasiyel asetik asitteki %5'lik çözeltisi ilave edildi. Oluşan çözelti, bir deney tüpündeki 2 mL derişik sülfürik asit çözeltisine tüpün kenarından dikkatle sızdırılıp eklendi. İki tabaka arasında kırmızı-kahverengi halka oluşumu incelendi. Bu halkanın oluşumu Keller-Kliani reaksiyonunun gerşekleştiğini ve bu reaksiyonun gerçekleşmesi bitkinin kardiyoaktif glikozit içerdiğini gösterir (82).

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Üreaz enzim inhibisyonu deneylerinde elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Tüm değişkenlerin normal dağılım gösterdiği belirlendikten sonra gruplar arası karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA sonucunda anlamlı fark saptanan değişkenlerde, farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Tukey HSD post-hoc testi uygulandı. Parametrik test sonuçları mean ± SD olarak ifade edildi. Tüm analizlerde $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. EKSTRAKSİYON VERİMLERİ

Bu çalışmada *H. vesicarius*'un toprak üstü kısımlarından 3 farklı ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan ekstrelerin ekstraksiyon verimleri hesaplanmıştır. Elde edilen ham ekstrelerin ekstraksiyon verimlerine ilişkin veriler Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1: *Helleborus vesicarius* bitki ekstrelerinin ekstraksiyon verimleri

Çözücü	Ekstraksiyon Verimi (%)
Metanol	30,16
Etanol	17,36
Hekzan	5,12

4.2. ÜREAZ ENZİM İNHİBİSYONU BULGULARI

Üreaz enzim inhibisyonu deneyleri 3 tekrarlı yapılmış, verilerin istatistiksel analizi sonucunda tüm gruplar arasında üreaz enzim inhibisyon oranları açısından istatistiksel açıdan anlamlı farklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Sonuçların aritmatik ortalama (mean) ve standart sapma (SD) verileri Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2: Parametrik test sonuçları (% inhibisyon)

Deney Grupları	Mean ± SD	Deney Grupları	Mean ± SD
Kontrol	20,6033 ± 2,81230	**H2 45,45 µg/mL**	30,3033 ± 1,24340
H 90,91 µg/mL	96,2967 ± 1,04711	**H2 22,73 µg/mL**	30,1333 ± 1,30715

Tablo 4.2 (devam)

H1 90,91 µg/mL	21,4667 ± 1,48194	**H2 9,09 µg/mL**	28,4100 ± 3,18360
H1 45,45 µg/mL	27,6467 ± 2,49608	**H3 90,91 µg/mL**	36,8900 ± 5,03685
H1 22,73 µg/mL	22,6900 ± 2,68554	**H3 45,45 µg/mL**	33,9567 ± 1,69901
H1 9,09 µg/mL	28,1700 ± 0,82867	**H3 22,73 µg/mL**	31,7500 ± 3,20955
H2 90,91 µg/mL	33,5267 ± 0,42099	**H3 9,09 µg/mL**	28,7200 ± 0,94303

H: Hidrokinon; H1, H2 ve H3 sırasıyla metanol, etanol ve hekzan ekstrelerini ifade etmektedir.

İstatistiksel analiz verilerinde gruplar arası ikili karşılaştırmalar incelendiğinde:

Kontrol ile metanol 9,09 µg/mL ($p=0,028$), etanol 90,91 µg/mL ($p<0,001$), etanol 45,45 µg/mL ($p=0,002$), etanol 22,73 µg/mL ($p=0,002$), etanol 9,09 µg/mL ($p=0,020$), hekzan 90,91 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 45,45 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 22,73 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 9,09 µg/mL ($p=0,014$) ekstreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Hidrokinon 90,91 µg/mL ile metanol 90,91 µg/mL ($p<0,001$), metanol 45,45 µg/mL ($p<0,001$), metanol 22,73 µg/mL ($p<0,001$), metanol 9,09 µg/mL ($p<0,001$), etanol 90,91 µg/mL ($p<0,001$), etanol 45,45 µg/mL ($p<0,001$), etanol 22,73 µg/mL ($p<0,001$), etanol 9,09 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 90,91 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 45,45 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 22,73 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 9,09 µg/mL ($p<0,001$) ekstreleri ve kontrol ($p<0,001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

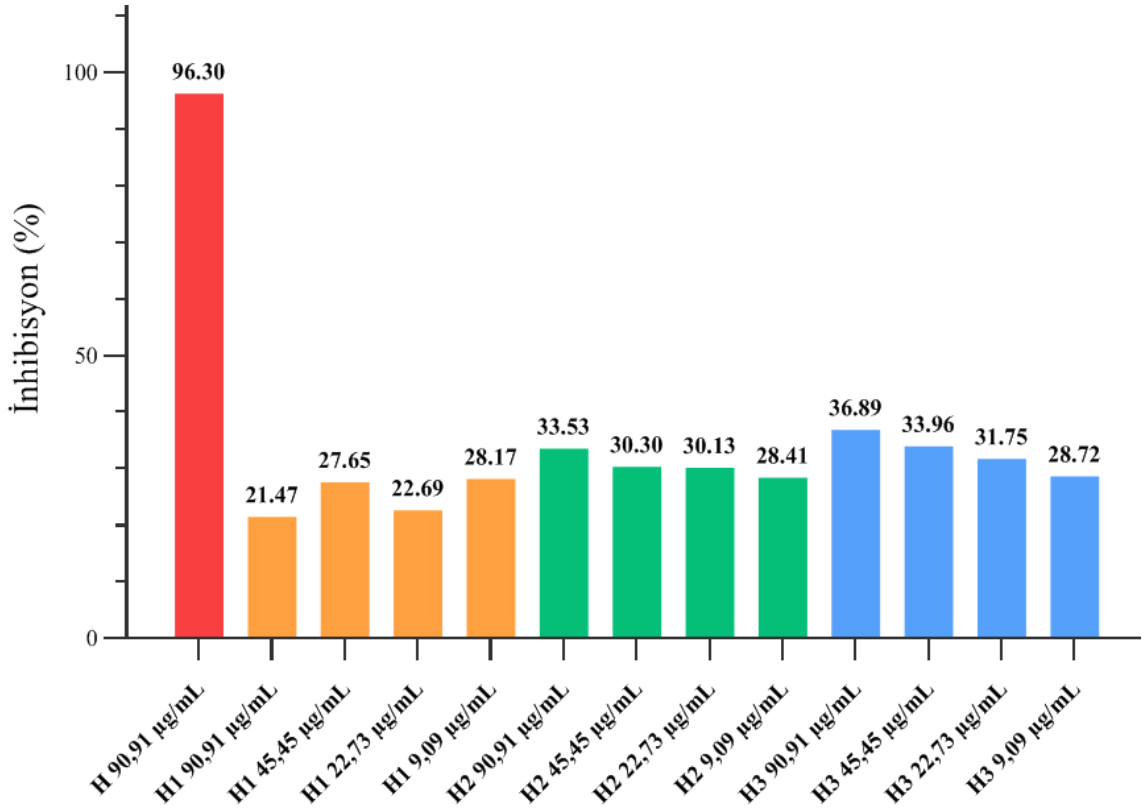
Metanol 90,91 µg/mL ile etanol 90,91 µg/mL ($p<0,001$), etanol 45,45 µg/mL ($p=0,005$), etanol 22,73 µg/mL ($p=0,007$), hekzan 90,91 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 45,45 µg/mL ($p<0,001$), hekzan 22,73 µg/mL ($p=0,001$), hekzan 9,09 µg/mL ($p=0,040$) ekstreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Metanol 22,73 µg/mL ile etanol 90,91 µg/mL, etanol 45,45 µg/mL ($p=0,026$), etanol 22,73 µg/mL ($p=0,032$), hekzan 90,91 µg/mL ($p<0,001$), 45,45 µg/mL hekzan ($p<0,001$) ve 22,73 µg/mL hekzan ($p=0,004$) ekstreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Etanol 9,09 µg/mL ile hekzan 90,91 µg/mL ekstresi (p=0,09) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Hekzan 90,91 µg/mL ile 45,45 µg/mL metanol (p=0,003), 9,09 µg/mL metanol (p=0,006), 9,09 µg/mL etanol (p=0,009) ve 9,09 µg/mL hekzan ekstreleri (p=0,013) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

İn vitro üreaz enzim inhibisyon çalışması sonucunda elde edilen % inhibisyon değerleri Şekil 4.1'deki grafikte sunulmuştur.



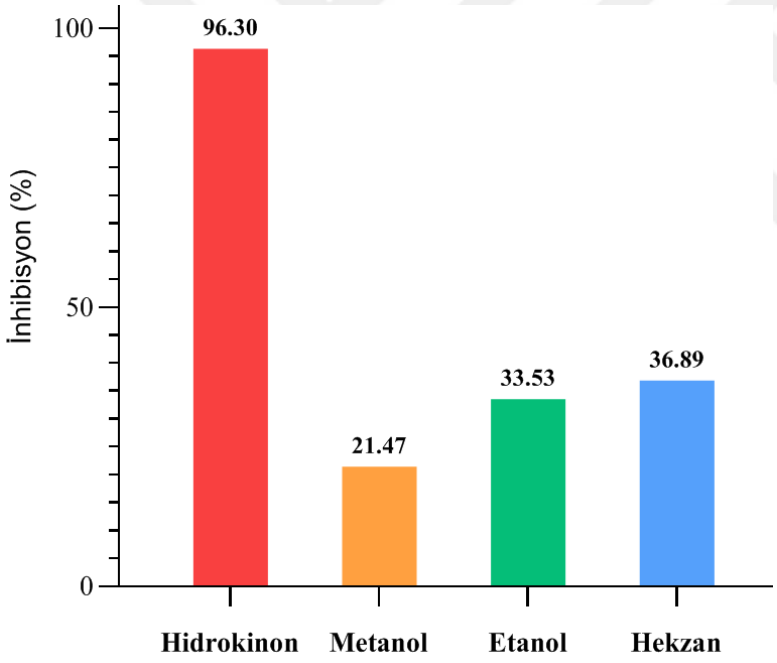
H: Hidrokinon; H1, H2 ve H3 sırasıyla metanol, etanol ve hekzan ekstrelerini ifade etmektedir.

Şekil 4.1: Hidrokinon ve farklı konsantrasyonlardaki ekstre çözeltilerinin üreaz enzim inhibisyonu bulguları

Çalışmada metanol, etanol ve hekzan ekstrelerinin her biriyle 4 farklı konsantrasyon kullanılarak üreaz enzim inhibisyonu deneyleri yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan hidrokinon (90,91 µg/mL) %96,3 ile güçlü bir inhibitör aktivite göstermiştir. Bu durum kontrol-standart ile kıyaslananarak kullanılan test sisteminin güvenirliliği kesinleştirilmiştir. Ekstrelere ait inhibisyon bulguları

değerlendirildiğinde en yüksek inhibisyon aktivitesinin %36,89 ile hekzan ekstresinin en yüksek konsantrasyonunda (90,91 µg/mL) olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla %33,96 ile hekzan ekstresinin ikinci yüksek konsantrasyonu (45,45 µg/mL), %33,53 ile etanol ekstresinin en yüksek konsantrasyonu (90,91 µg/mL) takip etmiştir. En düşük inhibisyon aktivitesi %21,47 ile metanol ekstresinin en yüksek konsantrasyonda olduğu durumda (90,91 µg/mL) gözlenmiştir. Hekzan ve etanol ekstrelerinde artan konsantrasyonla artan inhibisyon aktiviteleri gözlenmiştir. Metanol ekstresinde inhibisyon aktivitelerinin değişimi konsantrasyon değişimiyle doğru orantılı değildir ve inhibisyon aktiviteleri diğer ekstrelerin sonuçlarından düşüktür.

90,91 µg/mL konsantrasyon uygulamalarında farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerin üreaz enzim inhibisyon oranlarına ait grafik Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2: Hidrokinon ve ekstre çözeltilerinin 90,91 µg/mL'deki üreaz enzim inhibisyonu bulguları

Pozitif kontrol olarak kullanılan hidrokinon 90,91 µg/mL konsantrasyonda, %96,3'lük inhibisyon oranı ile güçlü bir üreaz inhibitörü olduğunu bir kez daha doğrulamıştır. Hekzan ekstresi %36,89'luk inhibisyon oranı ile ekstreler arasında en yüksek inhibisyonu göstermiştir. Bu sonuç bitkinin hekzan ile çözünebilen apolar yapılı

lipofilik bileşiklerinin, üreaz enzim aktivitesini baskılamada daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Etanol ekstresi %33,53'lük inhibisyon değeri ile hekzan ekstresine yakın bir etki göstermiştir. Bu durum hem polar hem apolar bileşenleri çözebilen etanolün (yarı polar) inhibitör etkinlik açısından dengeli bir bileşik profili taşıdığını göstermektedir. Metanol ekstresi ise %21,47 ile en düşük inhibisyonu göstermiştir. Bu bulgu, metanol ile ekstrakte edilen daha çok polar fitokimyasalların, üreaz enzimi üzerinde sınırlı inhibitör etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

4.3. FENOLİK BİLEŞİKLERİN KROMATOGRAFİK KANTİTATİF ANALİZ BULGULARI

Bitki ekstreleri, 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanarak HPLC cihazına verilmiştir. Analizler toplam 15 farklı standart fenolik bileşik için gerçekleştirilmiştir. Her bir standart bileşik için farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur ve bu grafikler yardımıyla fenolik bileşiklerin ekstrelerdeki miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, mg/g ekstre cinsinden hesaplanmıştır. HPLC analizlerine ait kromatogram görüntüleri EK 4–EK 5'te verilmiştir.

H. vesicarius'tan metanol (polar), etanol (yarı polar) ve hekzan (apolar) çözücüleri ile elde edilen ekstrelerin belirli fenolik bileşik içerikleri ve bu ekstrelerin en yüksek konsantrasyonda (90,91 µg/mL) kullanıldığı durumdaki üreaz enzimi inhibisyon kapasiteleri Tablo 4.3'te karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Tablo 4.3: Bitki ekstrelerinin fenolik bileşik içerikleri ve üreaz enzim inhibisyon ilişkisi

Ekstre	Tespit Edilen Fenolik Bileşik(ler)	Toplam Fenolik İçerik (mg/g ekstre)	İnhibisyon (%)
Metanol	Kafeik asit (3,3250 mg/g) Vanilik asit (0,0686 mg/g) Gallik asit (0,0683 mg/g)	3,4619	21,47
Etanol	Kafeik asit (1,0478 mg/g) Vanilik asit (0,4537 mg/g) 4-Hidroksibenzoik asit (0,1572 mg/g) Klorojenik asit (0,0340 mg/g)	1,6927	33,53
Hekzan	Tespit edilebilen fenolik bileşik yok	0,0000	36,89

Metanol ekstresi kafeik asit (3,3250 mg/g), vanilik asit (0,0686 mg/g), gallik asit (0,0683 mg/g) içermekte olup 90,91 µg/mL konsantrasyonda %21,47 ile düşük düzeyde üreaz inhibisyonu göstermiştir. Etanol ekstresi kafeik asit (1,0478 mg/g), vanilik asit (0,4537 mg/g), 4-hidroksibenzoik asit (0,1572 mg/g) ve klorojenik asit (0,0340 mg/g) içermekte olup bu içeriklere rağmen 90,91 µg/mL konsantrasyonda %33,53 oranında inhibisyon göstermektedir. Hekzan ekstresi ise hiçbir fenolik bileşik içermemesine rağmen 90,91 µg/mL konsantrasyonda %36,89 ile en yüksek inhibisyon oranına sahiptir.

4.4. FİTOKİMYASAL KALİTATİF ANALİZ BULGULARI

Kalitatif analizlerde sonuçlar aranan maddelerin varlığı veya yokluğu açısından kesin ve güvenilir sonuçlar vermemekle birlikte drogta, aranan maddelerden sadece saponinlerin mevcut olduğu tespit edilmiştir. Deney sonuçlarına ait görüntüler EK 6-EK 14'te verilmiştir.

4.4.1. Antrasen Türevlerinin Aranma Bulgusu

Kırmızı renk oluşmadığından droğun antrasen türevleri içermediği düşünülmektedir.

4.4.2. Flavon Türevlerinin Aranma Bulgusu

Turuncu, pembe ya da mor renkte bir değişim olmadığından drogta flavon türevlerinin olmadığı düşünülmektedir.

4.4.3. Saponin Aranma Bulgusu

Yüksekliği 1 cm olan kalıcı bir köpük oluştuğundan drogta saponinlerin bulunduğu düşünülmektedir.

4.4.4. Tanen Aranma Bulgusu

Krem renkli bir çökelek oluşmadığından droğun tanen bileşiklerini içermediği düşünülmektedir.

4.4.4.1. Gallik ve Kateşik Tanenin Ayrılma Bulgusu: Droğun, mavi-siyah renk değişimi olmadığından gallik tanen ve esmer-zeytin yeşili renk değişimi olmadığından kateşik tanen içermediği düşünülmektedir.

4.4.5. Alkaloit Aranma Bulgusu

İki ayrı deneyden birincisinde esmer-kırmızı renk ve ikincisinde de turuncu-kırmızı renk oluşmadığından droğun alkaloit içermediği düşünülmektedir.

4.4.6. Kardiyoaktif Glikozitlerin Aranma Bulgusu

Kapsülde erguvan kırmızısı renk oluşmadığından, tüpte ise iki tabaka arasındaki yüzeyde kırmızı-kahverengi bir halka oluşmadığından droğun kardiyoaktif glikozit içermediği düşünülmektedir.

Fitokimyasal kalitatif analizlere ait bulgular Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4: Fitokimyasal kalitatif analiz bulguları

Sekonder Metabolitler	Mevcut Olanlar
Antrasen Türevleri	
Flavon Türevleri	
Saponin	+
Tanen	
Alkaloit	
Kardiyoaktif Glikozit	

5. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında *H.vesicarius* türünün toprak üstü kısımlarının üç farklı polaritedeki çözücüyle hazırlanan ekstrelerinin *in vitro* üreaz enzim inhibisyonu aktiviteleri ve kantitatif fenolik bileşik içerikleri antiüreaz aktivite ile fenolik bileşikler arasında korelasyon kurma amacıyla çalışılmıştır. Ayrıca çalışmada droğun içerdiği sekonder metabolitler kalitatif olarak incelenmiştir.

Helleborus türlerinin geleneksel tıpta mide ülseri tedavisinde kullanıldıkları bilinmektedir. Bu hastalık mikrobiyal üreaz aktivitesi ile bağlantılıdır. Fenolik bileşiklerin üreaz enzimini inhibe etme potansiyaline sahip oldukları bilinmektedir. Yapılan bir çalışmayla *Helleborus purpurascens*'in polifenolik ekstrelerinin %95,6 ile oldukça yüksek üreaz enzim inhibisyon aktivitesine sahip olduğu raporlanmıştır (3).

Literatürde bu endemik bitki türü hakkında oldukça az çalışma ve bilgi bulunmaktadır ve halk ilacı olarak kullanımına dair kesin bir bilgi yoktur. Bu çalışma dünya üzerinde sadece ülkemizin dar bir alanında doğal olarak yayılış gösteren *H. vesicarius* hakkında biyolojik aktivite çeşitliliği ve fitokimyasal içeriğini ortaya koyan önemli bir özgünlüğe sahiptir. Literatürde daha önce bu türle yapılmış üreaz enzim inhibisyon aktivite çalışması bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmanın bu alandaki ilk ve özgün veri setini sunmaktadır. Ayrıca üreaz enzim inhibisyonu deneylerinde kullanılan yöntem, çalışma boyunca yapılan denemeler neticesinde oturtulmuş ve literatüre yeni bir yöntem kazandırılmıştır.

Çalışmada, hazırlanan ekstrelerde kullanılan çözücü türüne bağlı olarak ekstraksiyon verimlerinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek verim, %30,16 ile metanol ekstresinde elde edilmiş olup bu durum metanolün yüksek polaritesi sayesinde bitkisel matriksten polar ve yarı polar bileşikleri etkin şekilde çözebilme kapasitesine bağlanabilir. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda %17,36 oranında verim elde edilmiştir. Bu durum, etanolün hem polar hem de kısmen apolar karakter taşıyan amfipatik bir çözücü olması nedeniyle, bitkisel matriksteki çeşitli polarite düzeylerine sahip bileşikleri orta düzeyde çözebilme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşılık hekzan gibi apolar bir çözücü kullanıldığında

ekstraksiyon verimi %5,12 ile oldukça düşük bulunmuş; bu da hekzanın yalnızca apolar bileşenlerin ekstraksiyonunda etkili olmasından dolayı *H. vesicarius*'un fitokimyasal profili dikkate alındığında sınırlı çözünürlük sunduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen veriler çalışmada kullanılan çözücülerin kimyasal doğasının, bitkisel materyalin fitokimyasal içeriğine bağlı olarak ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

Çalışmada metanol, etanol ve hekzan ekstrelerinin her biriyle 4 farklı konsantrasyon kullanılarak üreaz enzim inhibisyon analizi deneyleri yapılmıştır. Hidrokinon 90,91 µg/mL konsantrasyonda %96,3 inhibisyon oranı ile güçlü bir üreaz inhibitörü olarak referans kabul edilmiştir. Ekstre çözeltilerinin inhibisyon oranları ise çözücü tipine ve reaksiyon ortamı olan tüplerdeki konsantrasyona göre değişmiştir.

Metanol ekstresinin üreaz enzim inhibisyonu etkinliği 90,91 µg/mL konsantrasyonda %21,47; 45,45 µg/mL konsantrasyonda %27,65; 22,73 µg/mL konsantrasyonda %22,69 ve 9,09 µg/mL konsantrasyonda %28,17'dir. Bu sonuçlar, metanol ekstresinin düşük düzeyde inhibitör etkinlik gösterdiğini ve doz-bağımlı bir artış trendi ortaya koymadığını göstermektedir. İnteraktif biyolojik etkinliğin belirgin olmaması, metanol ile çözünebilen bileşiklerin bu bağlamda sınırlı etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Etanol ekstresi ile elde edilen inhibisyon oranları 90,91 µg/mL konsantrasyonda %33,53; 45,45 µg/mL konsantrasyonda %30,3; 22,73 µg/mL konsantrasyonda %30,13 ve 9,09 µg/mL konsantrasyonda %28,41 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar etanol ekstresinin metanol ekstresine kıyasla daha belirgin bir üreaz inhibitörü potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca inhibisyon oranları konsantrasyon azalsa bile göreceli olarak stabil seyretmiştir. Bu durumda, etanol ile ekstrakte edilen bileşiklerin enzim inhibisyonu açısından daha aktif olduğu ve belirli bir konsantrasyon aralığında doygunluğa ulaşabileceği düşünülmektedir.

Hekzan ekstresinde üreaz inhibisyonu en yüksek düzeye ulaşmış ve 90,91 µg/mL konsantrasyonla yapılan denemede %36,89 olarak kaydedilmiştir. Takip eden konsantrasyonlarda (45,45 µg/mL: %33,96; 22,73 µg/mL: %31,75; 9,09 µg/mL: %28,72) de nispeten yüksek inhibisyon etkinliği gözlemlenmiştir. Özellikle 90,91 µg/mL konsantrasyon uygulamasında gözlemlenen %36,89'luk inhibisyon oranı, *H.vesicarius*'ta lipofilik bileşiklerin (örneğin saponin, steroidler, triterpenoidler

türevleri) üreaz enzimi üzerine anlamlı inhibitör etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

HPLC analizinde 15 fenolik bileşik standart olarak kullanılmış ve bu fenolik bileşiklerin ekstrelerdeki miktarı tespit edilmiştir. HPLC bulgularına göre metanol ekstresi fenolik bileşik olarak kafeik asit (3,3250 mg/g), vanilik asit (0,0686 mg/g) ve gallik asit (0,0683 mg/g) içermektedir. Etanol ekstresi kafeik asit (1,0478 mg/g), vanilik asit (0,4537 mg/g), klorojenik asit (0,0340 mg/g) ve 4-hidroksibenzoik asit (0,1573 mg/g) içermektedir. Metanol ekstresi 3,4619 mg/g fenolik bileşik içeriğiyle en yüksek fenolik bileşik içeren ekstre olmasına rağmen 90,91 µg/mL konsantrasyonda %21,47 ile oldukça düşük düzeyli üreaz inhibisyonu göstermiştir. Etanol ekstresi 1,6927 mg/g fenolik bileşik içermektedir fakat 90,91 µg/mL konsantrasyonda %33,53 inhibisyon göstermektedir. Hekzan ekstresi ise hiçbir fenolik bileşik içermemesine rağmen 90,91 µg/mL konsantrasyonda %36,89 ile en yüksek inhibisyon oranına sahiptir. Bu sonuçlar, fenolik bileşiklerin varlığına rağmen enzim inhibisyon potansiyelinin sınırlı kaldığını ve fenolik bileşiklerle antiüreaz aktivite arasında doğrudan bir korelasyon olmadığını ortaya koymaktadır. Hekzan ekstresinin en yüksek inhibisyon göstermesi antiüreaz aktivitenin fenolik içerikten ziyade hekzanda çözünen lipofilik, non-fenolik bileşiklerle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu bileşikler steroidler, terpenoidler veya yağ asidi türevleri olabilir.

Çalışma kapsamında yapılan kalitatif analizlerde bitkinin toprak üstü kısımlarında sekonder metabolitlerden saponin bulunmuştur. *Helleborus* rizomlarının saponince oldukça zengin olduğu bilinmektedir (83,84). *Helleborus*'ların rizomlarında bulunan saponinlerden ülser tedavisi için bir formülasyon geliştirildiği de bilinmektedir (24). Bu bağlamda hekzan ekstresinin yüksek antiüreaz aktivite göstermesine sebep olan bileşiklerin saponinler olduğu düşünülebilir.

Saponinler bitkilerin mikrop ve böceklerden korunmak amacıyla sentezledikleri steroid ya da triterpenoid yapıda lipofilik bir çekirdek ve bir ya da daha fazla karbonhidrat yan zinciri bulunduran glikozitlerdir. Saponince zengin bitkilerin antiüreaz, antimikrobiyal, antiprotozoal, hipokolesterolemik, antikarsinojenik, antihipertansif, antioksidan ve antiinflamatuvar gibi birçok biyoaktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (25).

İleri çalışmalarda hekzan ekstresi aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmalarına tabi tutulmalı, aktif bileşiklerin yapısı aydınlatılarak olası inhibitör mekanizmaları araştırılmalıdır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

HPLC sonuçlarına göre etanol ekstresinde kafeik asit, vanilik asit, klorojenik asit ve 4-hidroksibenzoik asit; metanol ekstresinde kafeik asit, vanilik asit ve gallik asit bulunmaktadır. Bu sonuçlar *H.vesicarius*'un toprak üstü kısımlarının fenolik bileşik içeriğinin iyi olmadığını göstermektedir. Ekstrelerin içerdiği fenolik bileşikler ile üreaz enzim inhibisyonu aktiviteleri arasında korelasyon kurulamamıştır. Hekzan ekstresinde herhangi bir fenolik bileşiğe rastlanmamıştır, hekzan apolar yapıda olup fenolik bileşikler polar olduğundan bu beklenen bir sonuçtur.

Üreaz enzim inhibisyonu analizi için metanol, etanol ve hekzan ekstre çözeltileri ile 4 farklı konsantrasyonda yapılan deneylerde hekzan ekstresinin kullanıldığı en yüksek konsantrasyonda tüm ekstrelerin tüm konsantrasyonları arasında en yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Hekzan ekstresinin tüm konsantrasyonları diğer ekstrelerin aynı konsantrasyonlarından daha yüksek inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Hekzan ekstresi hiçbir fenolik bileşik içermemesine rağmen antiüreaz aktivite açısından daha başarılıdır. Kalitatif analizlerde *H.vesicarius*'un toprak üstü kısımlarının saponin içerdiği tespit edilmiştir. Saponinler apolar yapılı bileşiklerdir ve hekzanda çözünürler. Bu sebeplerle bitkinin üreaz enzim inhibisyonu aktivitesinden başlıca sorumlu bileşiklerin saponinler olabileceğini düşünmekteyiz.

Daha sonraki çalışmalarda ekstrelerden saponinlerin izolasyonu ve bunların inhibitör potansiyelinin bireysel olarak farklı yöntemlerle de test edilmesi ardından elde edilen verilerin *in vivo* olarak doğrulanması ve biyolojik aktivitenin mekanizmasının moleküler düzeyde (enzim bağlanma bölgeleri, in silico modelleme) incelenmesi bu çalışmanın kapsamını genişletip bu bitkinin doğal üreaz enzim inhibitörü olarak kullanılma potansiyeli hakkında daha net bilgiler verecektir.

Ayrıca daha sonraki çalışmalar, bitkinin toprak üstü kısımlarına göre daha yoğun saponin içerdiği düşünülen rizom kısmıyla yapılarak daha başarılı antiüreaz aktivite sonuçları elde edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Burne, R. A., & Chen, Y. Y. M. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. Microbes and Infection, 2(5), 533-542.
2. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition, 79(5), 727-747.
3. Paun, G., Litescu, S. C., Neagu, E., Tache, A., & Lucian Radu, G. (2014). Evaluation of Geranium spp., Helleborus spp. and Hyssopus spp. polyphenolic extracts inhibitory activity against urease and α-chymotrypsin. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 29(1), 28-34.
4. Dilmaç, E., Sucu, M., Günbatan, T., & Gürbüz, İ. (2023). Rize'den Toplanan Altı Bitkinin İn Vitro Üreaz İnhibe Edici ve Antioksidan Aktivitesi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi, 13(1), 98-106.
5. Mugale, M. N., Dev, K., More, B. S., Mishra, V. S., Washimkar, K. R., Singh, K., ... & Chattopadhyay, N. (2024). A comprehensive review on preclinical safety and toxicity of medicinal plants. Clinical Complementary Medicine and Pharmacology, 4(1), 100129.
6. Kusters, J. G., Van Vliet, A. H., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clinical microbiology reviews, 19(3), 449-490.
7. Čakar, J., Haverić, A., Haverić, S., Maksimović, M., & Parić, A. (2014). Cytotoxic and genotoxic activity of some Helleborus species. Natural Product Research, 28(12), 883-887.
8. Kumar, V. K., & Lalitha, K. G. (2017). Pharmacognostical and phytochemical studies of Helleborus niger L root. Ancient science of life, 36(3), 151-158.
9. Yıldız, B. ve Aktoklu, E. (2010). Sistemetik Botanik (İlkin Karasal Bitkilerden Bir Çeneklilere). Palme Yayıncılık, Ankara
10. Tırman, F. (1987). Tabii Çiçekler Morfolojisi ve Yapma Çiçekçilikte Kullanılan Kalıplar. Konya: Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kız Sanat Eğitim Yüksekokulu Yayınları
11. Frohne, D, & Pfänder, H, J. (2005). Poisonous Plants: A Handbook for Pharmacists, Doctors, Toxicologists, Biologists and Veterinarians. 2nd ed. Cambridge: Timber Press.
12. Foster, S., & Hobbs, C. (2002). Field Guide to Western Medicinal Plants and Herbs. Boston: Houghton Mifflin Company.
13. Meiners, J., Debener, T., Schweizer, G., & Winkelmann, T. (2011). Analysis of the taxonomic subdivision within the genus Helleborus by nuclear DNA content and genome-wide DNA markers. Scientia horticulturae, 128(1), 38-47.
14. Helleborus Gold Collection. *2024 Curiosities And Legends*. (İnternette) 2024, Erişim 24.11.2024 https://www.helleborus.de/en/plant-facts/curiosities-and-legends
15. Dhooghe, E., Sparke, J., Oenings, P., Van Paemel, T., Van Labeke, M. C., & Winkelmann, T. (2018). Helleborus. In Ornamental crops (pp. 439-452). Cham: Springer International Publishing.
16. Maior, M. C., Dobrotă, C. (2013): Natural compounds with important medical potential found in Helleborus sp. Cent. Eur. J. Biol., De Gruyter Open Access 8: 272-285
17. Müller, M. B., Stintzing, F. C., Manukyan, A., & Schink, M. (2023). Comparison of cytotoxicity, saponin, and protoanemonin contents of medicinal plant extracts from Helleborus niger L. and Helleborus foetidus L. Phytomedicine Plus, 3(2), 100424.
18. Güley, M. (1960). MEMLEKETİMİZDE YETİŞEN HELLEBORUS'LAR. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *7*(03), 114-123.
19. Tasca, C., Rapetti, M., Carta, M. G., & Fadda, B. (2012). Women and hysteria in the history of mental health. Clinical practice and epidemiology in mental health: CP & EMH, 8, 110.
20. Gomes N.G.M., Campos M.G., Órfão J.M.C., Ribeiro C.A.F., 2009. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery, Prog. Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry, 33, 1372–1389.
21. Gümüşçü, A., & Gümüşçü, G. (2011). Zehirli Bitkiler-II. Ziraat Mühendisliği, (357), 42-46.
22. Roth, L., Daunderer, M., Kormann, K. 1984. Giftpflanzen-Pflanzengifte, Vorkommen, Wirkung, Therapie. Limburger Vereinsdruckerei GmbH, 6250, Limburg/Lahn 4.

23. TANKER, N., & BİNGÖL, F. (1984). Türkiye'de Yetişen Helleborus L. Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar. J. Fac. Pharm. Ankara, 14, 25.
24. Isaac, O. (1976). U.S. Patent No. 3,956,491. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office

25. Küçükkurt, İ., & Fidan, A. F. (2008). Saponinler ve bazı biyolojik etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, *1*(1), 89-96.

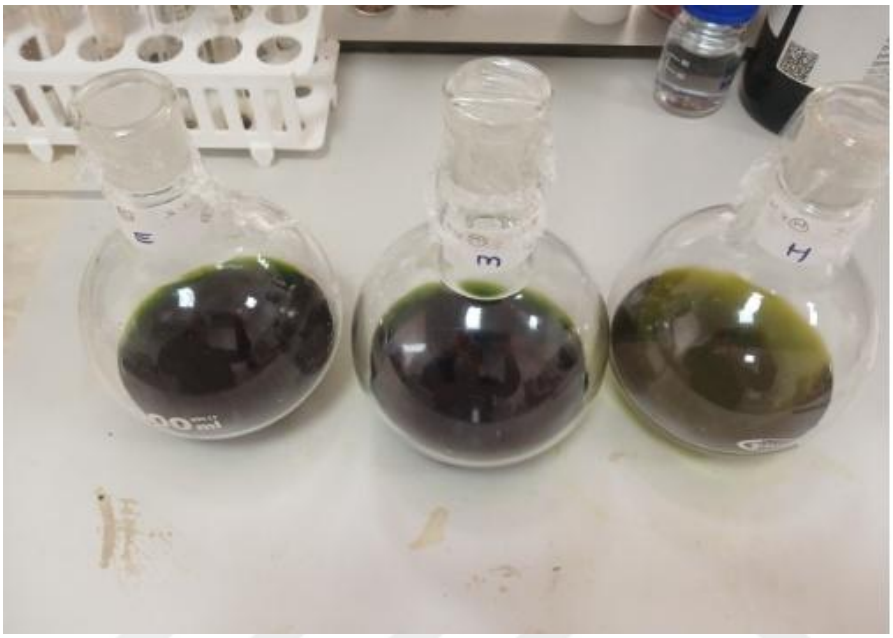
26. Pascual-Villalobos, M.J., Robledo, A. (1998). Screening for anti -insect activity in Mediterranean plants. Industrial Crops and Products, 8, 183-194
27. Yang, F. Y., Su, Y. F., Wang, Y., Chai, X., Han, X., Wu, Z. H., & Gao, X. M. (2010). Bufadienolides and phytoecdystones from the rhizomes of Helleborus thibetanus (Ranunculaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 38(4), 759-763.
28. ÖZTÜRK, D. (2020). Helleborus orientalis lam.(Ranunculaceae) türünün çiçek, tohum ve meyve yapısının incelenmesi. ISPEC Journal of Agricultural Sciences, 4(4), 997-1005.
29. Kızılarslan, Ç. (2008). İzmit Körfezi'nin güney kesiminde etnobotanik bir araştırma. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.
30. Baytop , T., Malkoç , G., "Helleborus orientalis Lam . var. hirsutus (Schiffn) Hay . Kök - leri Üzerinde Araştırmalar", İstanbul Ecz. Fak. Mec. I, 18 (1965).
31. Olah, D. I., Brudaşcă, G. F., Pall, E., Cerbu, C. G., Niculae, M., Guranda, S., & Spînu, M. (2017). A review of the unspecific therapy with Helleborus spp. in laboratory and farm animals.
32. Erdemoglu, N., Küpeli, E., & Yeşilada, E. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. Journal of ethnopharmacology, 89(1), 123-129.
33. Öztürk, M., Bulduk, İ., Korcan, S. E., Liman, R., Çoban, F. K., Kargıoğlu, M., & Konuk, M. (2019). Total phenolics, flavonoids contents, antioxidant activity and DNA protective effect of lenten rose (Helleborus orientalis). Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, 1(4), 1-12.
34. Davis P H(1965). Flora of Turkeyandthe East AegeonIslands,Vol. 1, Edinburgh University Press, Edinburgh
35. Elkiran, O. (2023). The comparative morphological, anatomical and palynological studies on the genus Helleborus (Ranunculaceae) growing in turkey. Pak. J. Bot, 55(2), 539-547.
36. Mohammed, F. S., Çınar, G., Yigit, S. S., Akgül, H., & Dogan, M. (2020). Antioxidant and Oxidant Status of Endemic Helleborus vesicarius. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 8(9), 2008-2010.
37. Memiş, M., & Bülbül, A. S. (2023). DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ENDEMIC VERONICA CINEREA LESS AND HELLEBORUS VESICARIUS AUCHER EX BOISS. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 16(2), 61-67.
38. Karabulut, T. (2014). Helleborus vesicarius (Ranunculaceae) bitkisinin içerdiği uçucu yağların tayini ve farklı ekstrelerinin antimikrobiyel aktiviteleri/Helleborus niger vesicarius (Ranunculaceae) determination of essential oils contained in the aqueous leaf extract in rodents and different ekstrelerinin antimicrobial activities (Doctoral dissertation).
39. ALTIPARMAK-ULBEGI, G., OZSOY, N., KULTUR, S., MELIKOGLU, G., & AKSOY-SAGIRLI, P. (2025). Biological activities of Helleborus vesicarius: Cytotoxicity, induction of apoptosis and antioxidant potential. *Journal of Research in Pharmacy*, *29*(3).
40. Kaya, Y., & Aksakal, Ö. (2005). Endemik Bitkilerin Dünya Ve Türkiye"deki Dağılımı. Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 7(1), 85-99.
41. IUCN. *2024 Red List of Threatened Species*. Fransa: International Union for the Conservation of Nature (İnternette) 2024, Erişim 24.11.2024, https://www.iucnredlist.org/statistics
42. DAYAN, S., GÜLER, N., ARDA, H., ÇOLAK, A., & AYTAÇ, A. YOK OLMAKTA OLAN ENDEMİK Bellevalia edirnensis ÖZHATAY & MATHEW (ASPARAGACEAE)'İN MEVCUT YAYILIŞI VE KORUMA STATÜSÜ.
43. Joardar, S. (2022). Poisonous Plants of Nadia District, West Bengal, India. Plant Archives, 22(1),397-402.
44. Güner, U. (2014). Toksikoloji. Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, 2, 186-189.
Yılmaz, H., Akpınar, E., Yılmaz ,H., 2006. Peyzaj Mimarlığı Çalışmalarında Kullanılan Bazı Süs Bitkilerinin Toksikolojik Özellikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 1: 82-95.
45. Enari, L., 1982. Poisonous Plants of Southern California. County of Los Angles, Department of Arboreta and Botanic Gardens Arcadia, California.
46. Muca, B., Yildirim, B., Oezcelik, S., & Koca, A. (2012). Isparta's(Turkey) poisonous plants of public access places. Biological Diversity and Conservation, 5(1), 23-30.
47. Ameri, A. (1998). The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system. Progress in neurobiology, 56(2), 211-235
48. Acepnow. *2020* Toxicology Answer: What Flower Did the Greek Army Use Against a City? (İnternette) 2020, 29 Nisan. Erişim 29.01.2025, https://www.acepnow.com/article/toxicology-answer-what-flower-did-the-greek-army-use-against-a-city/

49. Foster, S., & Hobbs, C. (2002). Field Guide to Western Medicinal Plants and Herbs. Boston: Houghton Mifflin Company.,
50. Müller, M. B., Bertrams, J., & Stintzing, F. C. (2020). Stability of protoanemonin in plant extracts from Helleborus niger L. and Pulsatilla vulgaris Mill. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 188, 113370.
51. Bakırel, T. (1998). VETERİNER TOKSİKOLOJİ YÖNÜNDEN TRAKYA BÖLGESİ'NİN ZEHİRLİ BİTKİLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALARI. Trakya BölgesPndeki Zehirli Bitki Türlerinin Yöredeki Yayılışları ile İçerdikleri Etken Maddelerin Kalitatif Yönden Saptanması. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 28(1), 125-142.
52. Frohne, D, & Pfänder, H, J. (2005). Poisonous Plants: A Handbook for Pharmacists, Doctors, Toxicologists, Biologists and Veterinarians. 2nd ed. Cambridge: Timber Press.
53. Novartis. *2013 Digoxin Tablet Prospektüsü*. (İnternette) 2013, 5 Ağustos. Erişim 30.11.2024, ttps://www.novartis.com/tr-tr/sites/novartis_tr/files/Digoxin_Tablet_KT_0250mg_05082013.pdf
54. CAMPBELL, M. K., Biochemistry, Saunders College Publishing, Chicago, 1991.
55. KEHA, E. E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, 92- 139, Erzurum, 2004.
56. Harvey, R. A. (2007). Lippincott Biyokimya (Ulukaya E, Çev) Ankara: Nobel Tıp.
57. Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H., & Nakamura, M. (2000). Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, Morus alba. Phytochemistry, 53(3), 325-330.
58. Mobley, H.L.T. ve Hausinger, R.P. (1989). Microbial ureses: Significance, regulation, and molecular characterization. Microbiological Reviews, 53, 85-108.
59. Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1984). Jack bean urease: the first nickel enzyme. Journal of molecular catalysis, 23(2-3), 263-292.
60. Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 59(1-3), 9-21.
61. LUBBERS, M.W., RODRIGUES, S.B., HONEY, N.K., THORNTON, R.J., 1996, Purification and characterization of urease from Schizosaccharomyces pombe, Canadian Journal of Microbiology, 42, 132-140.
62. Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., & Karplus, P. A. (1995). The crystal structure of urease from Klebsiella aerogenes. *Science*, *268*(5213), 998-1004.
63. McLean, R. J., Nickel, J. C., Cheng, K. J., Costerton, J. W., & Banwell, J. G. (1988). The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract. CRC Critical reviews in microbiology, 16(1), 37-79.
64. Golub, L. M., Borden, S. M., & Kleinberg, I. (1971). Urea content of gingival crevicular fluid and its relation to periodonal disease in humans. Journal of Periodontal Research,
65. Burne, R. A., & Chen, Y. Y. M. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*, *2*(5), 533-542.
66. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984;1:1311–1315. doi: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6.
67. Deen, N. S., Huang, S. J., Gong, L., Kwok, T., & Devenish, R. J. (2013). The impact of autophagic processes on the intracellular fate of Helicobacter pylori: more tricks from an enigmatic pathogen?. Autophagy, 9(5), 639-652.
68. Smoot, D. T., Mobley, H. L., Chippendale, G. R., Lewison, J. F., & Resau, J. H. (1990). Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. Infection and immunity, 58(6), 1992-1994.
69. Schistosomes , liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1–241
70. Yılmaz Ö, Okçu N. Helicobacter pylori ve gastrointestinal sistemle ilişkili hastalıklar. Atatürk Üniversitesi Tıp Dergisi 2006;38:13-7.
71. Copeland, R. A. (2023). Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. John Wiley & Sons.
72. BİNGOL, G., 1977, Vitaminler ve Enzimler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitap Serisi No: 46, Ankara
73. Günbatan, T., Salihoğlu, E. M., Gürbüz, İ., Akaydın, S., & Akaydın, G. (2023). BAZI DÜZCE HALK İLAÇLARININ KİMOTRİPSİN, ÜREAZ İNHİBE EDİCİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 47(2), 637-649.
74. Modolo LV, ve ark. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. J Adv Res 2015;6(1):35-44.

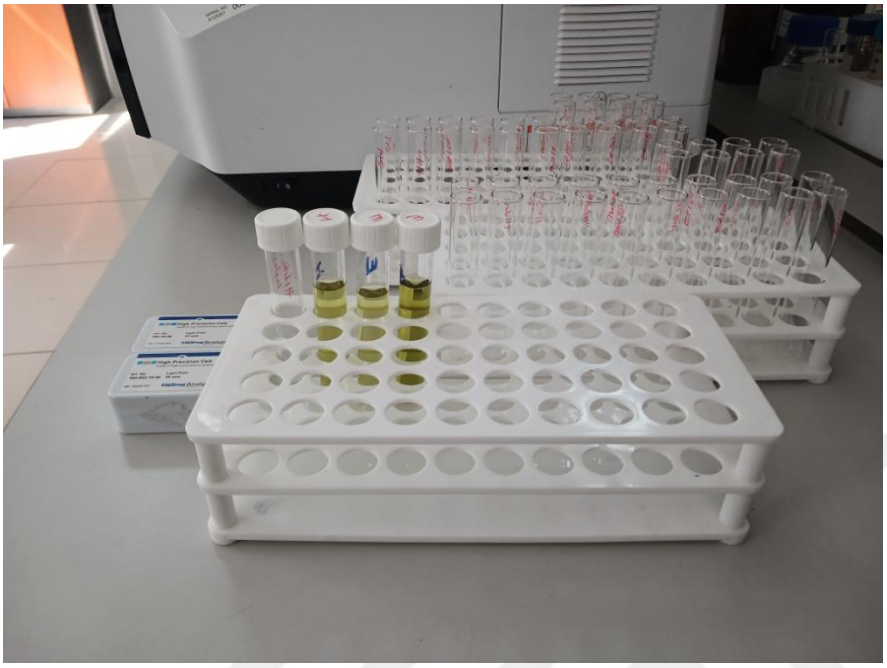
75. Jain, C., Khatana, S., & Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. Int. J. Pharm. Sci. Res, 10(2), 494-504.
76. Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O. (2021). Sekonder metabolitler. Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 35(1), 203-215.
77. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313-7352.
78. Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. Nutrition Reviews, 72(7), 429-452.
79. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727-747.
80. Gan, R. Y., Chan, C. L., Yang, Q. Q., Li, H. B., Zhang, D., Ge, Y. Y., ... & Corke, H. (2019). Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. In Sprouted grains (pp. 191-246). AACC International Press.
81. Bioanalytic. *2017 Enzymatic in vitro test for the quantitative determination of urea in human serum, plasma and* urine. Bioanalitic Diagnostic Industry (İnternette) 2017, Ocak. Erişim 30.12.2024, https://www.bioanalytic.com.tr/_files/ugd/b85acf_8322cbd040754fd282c2f4d9ca9be354.pdf
82. Baytop T. 1980. Farmarkognozi Ders Kitabı-I (3. Basım). İstanbul: Fatih Yayınevi Matbaası.
83. Watanabe, K., Sakagami, H., & Mimaki, Y. (2005). Four new steroidal saponins from the rhizomes of Helleborus orientalls. *Heterocycles-Sendai Institute of Heterocyclic Chemistry*, *65*(4), 775-786.
Rosselli, S., Maggio, A., Bruno, M., Spadaro, V., Formisano, C., Irace, C., ... & Mascolo, N. (2009).
84. Furostanol saponins and ecdysones with cytotoxic activity from Helleborus bocconei ssp. intermedius. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *23*(9), 1243-1249.

EKLER

EK-1.Bitki Ekstraksiyonları



EK-2.Üreaz Enzim İnhibisyonu Deneyi

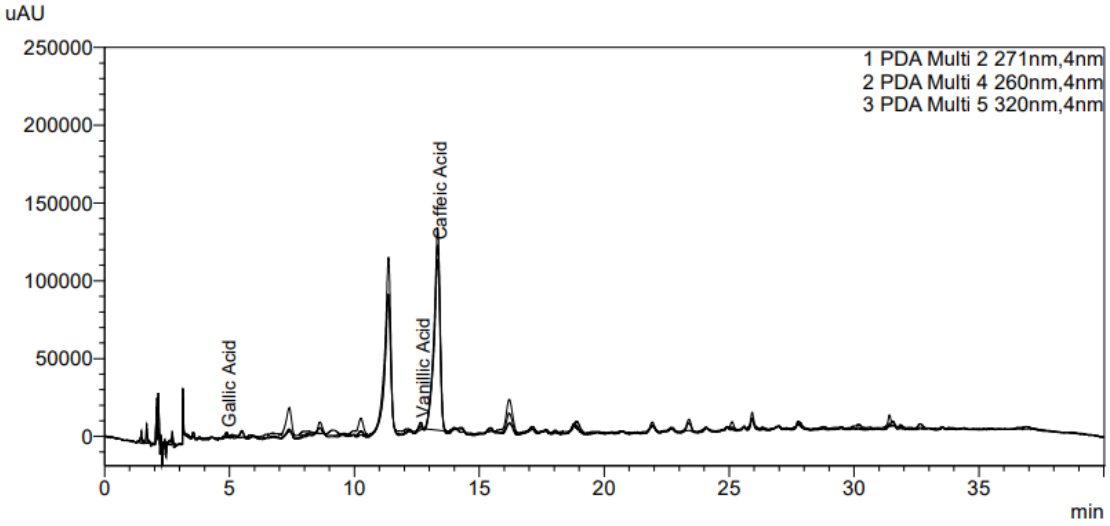


EK-3.Üreaz Enzim İnhibisyonu Deneyi



EK-4.Metanol Ekstresinin Kromatogramı

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 271nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	4,892	33814	3464	1,031	mg/L	Gallic Acid
Total		33814	3464			

PDA Ch4 260nm

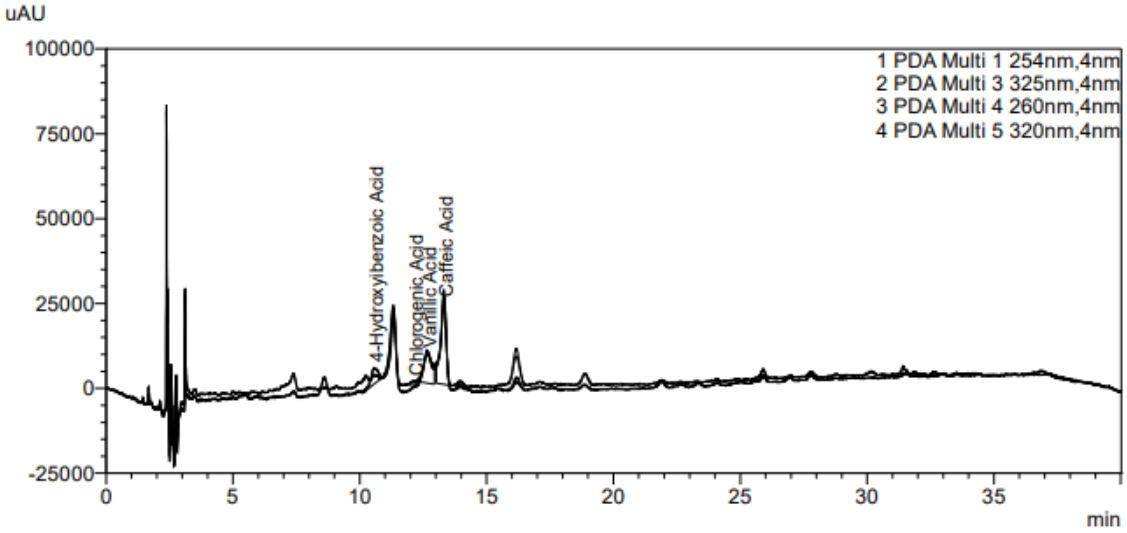
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	12,657	48899	4723	1,036	mg/L	Vanillic Acid
Total		48899	4723			

PDA Ch5 320nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	13,335	2066677	119000	50,159	mg/L	Caffeic Acid
Total		2066677	119000			

EK-5.Etanol Ekstresinin Kromatogramı

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	10,577	89529	4716	1,365	mg/L	4-Hydroxyibenzoic Acid
Total		89529	4716			

PDA Ch3 325nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	12,136	9828	986	0,295	mg/L	Chlorogenic Acid
Total		9828	986			

PDA Ch4 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	12,661	185903	8800	3,939	mg/L	Vanillic Acid
Total		185903	8800			

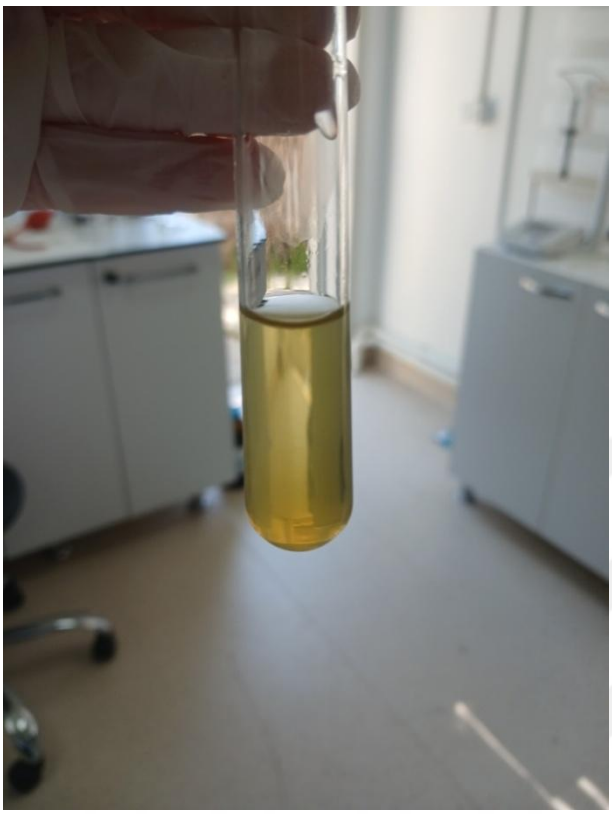
PDA Ch5 320nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name
1	13,317	374819	24348	9,097	mg/L	Caffeic Acid
Total		374819	24348			

EK-6.Antrasen Türevlerinin Aranması



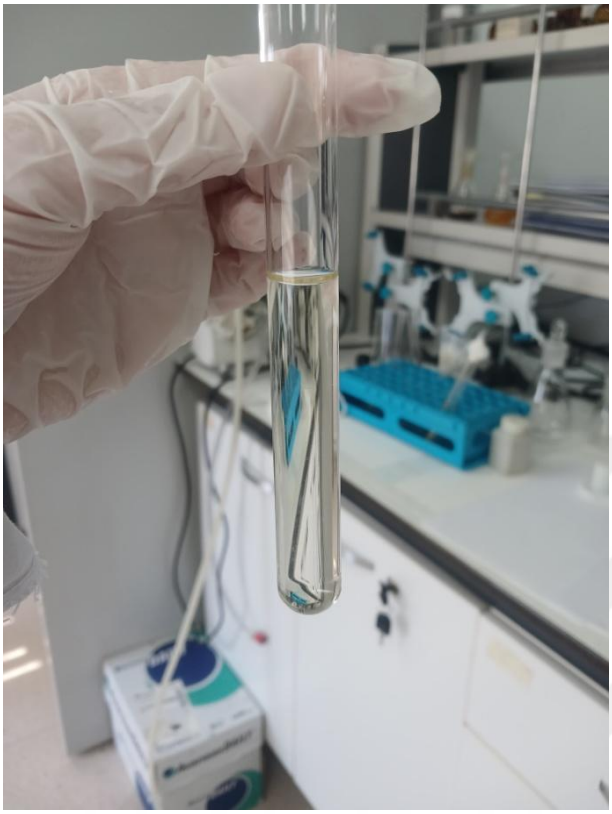
EK-7.Flavon Türevlerinin Aranması



EK-8.Saponin Aranması



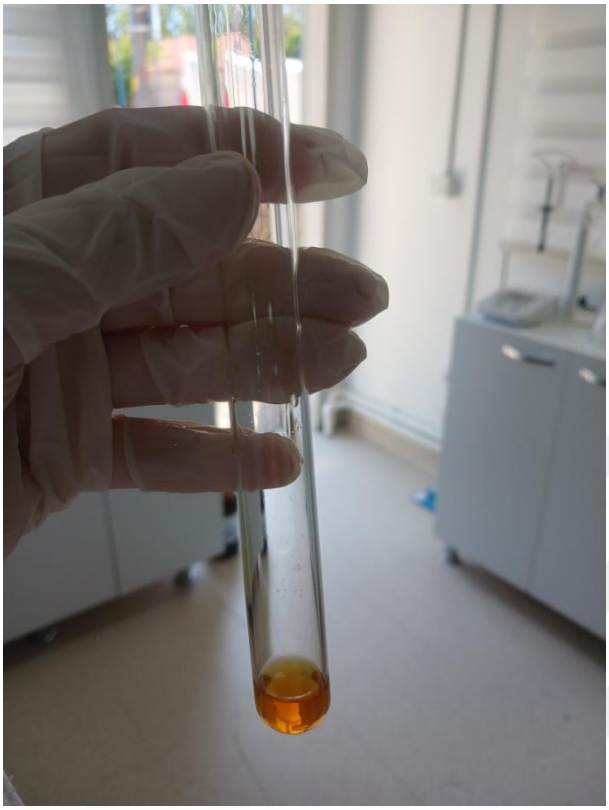
EK-9.Tanen Aranması



EK-10.Gallik ve Kateşik Tanenin Ayrılması



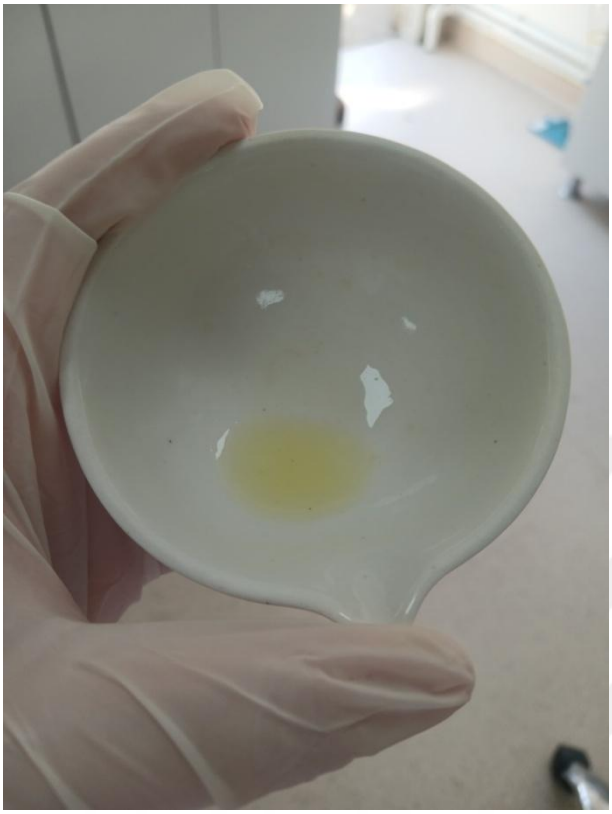
EK-11.Alkaloit Aranması



EK-12.Alkaloit Aranması



EK-13.Kardiyoaktif Glikozit Aranması



EK-14.Kardiyoaktif Glikozit Aranması

