

Rize’den Toplanan Altı Bitkinin *In Vitro* Üreaz İnhibe Edici ve Antioksidan Aktivitesi*

In Vitro Urease Inhibitory and Antioxidant Activity of Six Plants Collected from Rize

Elif Dilmaçⁱ, Melike Sucuⁱⁱ, Tuğba Günbatanⁱⁱⁱ, İlhan Gürbüz^{iv}

ⁱDoktora öğrencisi, Eczacı, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AD.
https://orcid.org/0000-0002-1905-2658

ⁱⁱDoktora öğrencisi, Uzman Eczacı, Başkent Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AD.
https://orcid.org/0000-0002-7594-5178

ⁱⁱⁱDr. Öğr. Üyesi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AD.
https://orcid.org/0000-0002-1138-3145

^{iv}Prof. Dr., Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AD.
https://orcid.org/0000-0002-3670-0899

Öz

Giriş ve amaç: Üreaz enzimi, *Helicobacter pylori* nedenli peptik ülserin tedavisi için yeni ilaç adayları bileşiklerin hedeflerinden biri haline gelmiştir. Bu çalışmada Rize’den toplanan altı yabancı bitkinin [*Daphne pontica* L., *Lotus corniculatus* L., *Lythrum salicaria* L., *Medicago sativa* L., *Potentilla reptans* L. ve *Senecio leucanthemifolius* subsp. *vernalis* (Waldst. & Kit.) Greuter] üreaz enzimini inhibe edici aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte peptik ülserin önlenmesinde rol oynayan mekanizmalardan biri olan antioksidan aktiviteleri belirlenmiş, toplam fenol ve flavonoid içerikleri de tespit edilmiştir.

Yöntem: Bitkiler Rize Merkez ve İkizdere ilçesinden toplanıp %80’lik etanol ekstraktları hazırlanmış ve üreaz enzimini inhibe edici aktiviteleri belirlenmiştir. Hazırlanan ekstraktların antioksidan aktivitesi DPPH, ABTS ve CUPRAC testleri ile tespit edilmiş, toplam fenol ve flavonoid miktar tayinleri yapılmıştır.

Bulgular: *In vitro* testler sonucunda *S. leucanthemifolius* subsp. *vernalis*’in %80 etanol ekstresi üreaz enzimini düşük oranda inhibe ederken (%13,7) diğer çalışılan ekstraktların daha kuvvetli (% 24,6 ve %31,3 arasında değişen oranlarda) inhibe ettiği görülmüştür. Çalışılan ekstraktların genel olarak kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek toplam fenol ve flavonoid içerikleri sırasıyla *L. salicaria* ve *L. corniculatus*’da tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmaya dâhil edilen bitkilerin genel olarak üreaz enzimini belirli bir düzeyde inhibe ettiği belirlenmiştir. *D. pontica*, *L. salicaria* ve *P. reptans* yüksek antioksidan aktivite, toplam fenol ve flavonoid içerikleri ile öne çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Üreaz, *Daphne pontica*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Medicago sativa*, *Potentilla reptans*

ABSTRACT

Introduction: The urease enzyme has become one of the targets of new drug candidate compounds for the treatment of peptic ulcer caused by *Helicobacter pylori*. In this study, it was aimed to determine the urease enzyme inhibitory activity of six wildy grown plants [*Daphne pontica* L., *Lotus corniculatus* L., *Lythrum salicaria* L., *Medicago sativa* L., *Potentilla reptans* L. and *Senecio leucanthemifolius* subsp. *vernalis* (Waldst. & Kit.) Greuter] collected from Rize. In addition, their antioxidant activities, one of the mechanisms that play a role in the prevention of peptic ulcer, and total phenol and flavonoid contents were also determined.

Methods: Plants were collected in Rize Center and İkizdere district, 80% ethanol extracts were prepared from their aerial parts and their urease enzyme inhibitory activity was determined. The antioxidant activities of the prepared extracts were determined with DPPH, ABTS and CUPRAC tests, and their total phenol and flavonoid amounts were determined.

Results: As a result of *in vitro* tests, 80% ethanol extract of *S. leucanthemifolius* subsp. *vernalis* was seen to inhibit urease enzyme at a low rate (13,7%); while other studied extracts moderately inhibited it more strongly (at rates varying between 24,6% and 31,3%). It was determined that studied extracts generally have strong antioxidant activity. The highest total phenol and flavonoid contents were detected in *L. salicaria* and *L. corniculatus*, respectively.

Conclusion: It was determined that the plants included in the study generally inhibited the urease enzyme at a certain level. *D. pontica*, *L. salicaria* and *P. reptans* stood out with their high antioxidant activity, total phenol and flavonoid contents. Although very strong urease inhibitory activity was not observed with extracts; compounds, that could be isolated by bioactivity guided fractionation studies or their derivatives, could possibly show strong urease inhibitory activity and new urease inhibitory compounds could be found.

Key words: Urease, *Daphne pontica*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Medicago sativa*, *Potentilla reptans*

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi 2023; 13 (1):98-106

DOI: 10.31020/mutfd.1184609

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 10 Ekim 2022; Kabul Tarihi - Accepted: 06 Aralık 2022

İletişim - Correspondence Author: Tuğba Günbatan <tugbagunbatan@gazi.edu.tr>

Giriş

Gastrit, peptik ülser ve mide kanseri gibi hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen *Helicobacter pylori*, dünya nüfusunun neredeyse yarısını etkileyen en yaygın enfeksiyona neden olan bakteridir.¹ Bu bakteri duodenal ülser etiolojisinin %95'inden; gastrik ülser etiolojisinin ise %70-85'inden sorumlu olup Dünya Sağlık Örgütü tarafından tip-1 kanserojen olarak belirlenmiştir.² *H. pylori* ayrıca B12 vitamini eksikliği, açıklanamayan demir eksikliği anemisi ve idiopatik trombositopenik purpura gibi hastalıkların sebebi de olabilmektedir.³ Bakterinin ürettiği üreaz enziminin böbrek taşı, pyelonefrit gibi hastalıkların oluşumunda da rol oynadığı belirlenmiştir.⁴ *H. pylori* ile enfekte ve semptom gözlenen hastaların ilk basamak tedavisinde proton pompası inhibitörleri, antibiyotik kombinasyonları ve bizmut bileşikler kullanılırken, semptom gözlenmeyenlerde kısa zamanda yeniden enfekte olma riski nedeniyle genellikle tedaviye gerek duyulmamaktadır. Oldukça sık rastlanılan *H. pylori* enfeksiyonu, tüm bu tedavi seçeneklerine rağmen antibiyotik direnci nedeniyle halen önemli bir sağlık sorunudur.³

H. pylori'nin midedeki kuvvetli asit pH'da yaşamını sürdürebilmesi için mukus tabakasına ulaşması gerekmektedir. Bakterinin sahip olduğu kamçı ve salgıladığı üreaz enzimi mukus tabakasına ulaşmasını sağlamaktadır.¹ Üreaz enzimiyle mide epitel hücreleri tarafından salgılanan üreyi amonyağa parçalar ve açığa çıkan amonyak midenin pH'sında artışa neden olup bakterinin yaşaması için uygun bir ortam sağlar.^{1,2} Yani üreaz enzimi *H. pylori*'nin mide dokusunda yaşaması ve kolonizasyonu için hayati öneme sahiptir. Dolayısıyla üreaz enzimi *H. pylori* nedenli peptik ülserin tedavisi için yeni ilaç adaylarının hedeflerinden biridir. Bu nedenle etkili, ucuz, yan etkisi olmayan veya çok daha az olan üreaz inhibitörlerinin keşfi, yeni antiülser ilaçların geliştirilmesi için önemli bir araştırma konusudur.

H. pylori dışındaki bazı bakterilerin ürettiği üreaz enziminin de insan vücudunda yine çeşitli sağlık sorunlarına yol açtığı bilinmektedir. Örneğin ağız boşluğunda yaşayan bir bakteri olan *Streptococcus salivarius* tarafından da üretilen üreaz, diş plağı ve diş taşı oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca zatürre, böbrek taşı, idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* gibi üreolitik bakteriler de üreaz üretmektedir.⁵ Üreaz inhibitörleri insan sağlığı dışında tarımda mahsul veriminin artırılması açısından da önemlidir. Topraktaki bakteriler veya bitkiler tarafından üretilen üreaz nedeniyle açığa çıkan amonyak, bitkilere ve toprağa zarar vermektedir. Bunu önlemek amacıyla tarımda N-(n-butil) tiyofosforik triamit (NBPT) gibi üreaz inhibitörleri kullanılmaktadır.⁶ Dolayısıyla yeni üreaz inhibitörlerinin keşfi, bu alandaki kullanım için de önemli bir alternatif olabilecektir.

Yapılan çalışmalar sonucu fosfordiamidatlar, hidroksamik asit türevleri ve imidazol yapısında üreaz enzimini inhibe eden bileşikler bulunsa da bunların klinik kullanıma uygun olmadıkları tespit edilmiştir. Bu nedenle üreaz inhibitörleri arayışı son zamanlarda hız kazanmıştır.⁷ Üreaz inhibitörü araştırmalarında sentez kimyasının yanı sıra, bitkiler tahmin dahi edilemeyecek kadar zengin ve çeşitli fitokimyasal içerikleri ile son derece önemli bir kaynak teşkil etmektedir. Öncelikle uygun yöntemlerle bitkiler üzerinde aktivite tarama çalışmaları yapılarak üreaz inhibitörü etkilerinin araştırılması gereklidir. Tarama çalışmalarından elde edilecek sonuçlar ışığında, yeterli düzeyde aktivite görülen bitkilerde bu aktiviteden sorumlu bileşik veya bileşiklerin özellikle biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama teknikleri kullanılarak tespit edilmesi gereklidir. Böylece yeni üreaz inhibitörlerini elde edilmesi mümkündür. Ardından yapılacak detaylı araştırmalarla bulunan bileşiklerin daha ileri kademelere taşınması ve böylece ilaç olarak tedavide yer alması muhtemeldir.

Reaktif oksijen türleri normal metabolik süreçte oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi kararsız moleküllerdir. Miktarlarının normalden yüksek olması veya hücresel antioksidan kapasitede azalma gibi durumlarda lipid peroksidasyonuna ve doku hasarına yol açabilmektedir. Yapılan çalışmalar bu oksidatif hasarın gastrik ülser patojenezinde de önemli role sahip olup

antioksidan etkili bileşiklerin gastrik ülserlerde koruyucu role sahip olduklarını göstermiştir.^{8,9} Dolayısıyla üreaz inhibitörü aktivitenin antioksidan aktivite ile desteklenmesi tercih edilen bir durumdur.

Anlaşılabacağı gibi temel ve kritik kademe, üreaz inhibitörü aktivite tarama çalışmalarının yapılmasıdır. Bu anlamda Rize’den toplanan 6 bitkinin [*Daphne pontica* L., *Lotus corniculatus* L., *Lythrum salicaria* L., *Medicago sativa* L., *Potentilla reptans* L. ve *Senecio leucanthemifolius* subsp. *vernalis* (Waldst. & Kit.) Greuter] etanol ekstresi hazırlanarak üreaz enzim inhibitörü aktiviteleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Ayrıca peptik ülser başta olmak üzere pek çok hastalığın önlenmesinde rol oynayan mekanizmalardan biri olan antioksidan aktiviteleri de yine *in vitro* yöntemlerle belirlenmiş, toplam fenol ve flavonoit içerikleri tespit edilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Kimyasallar

Jack bean üreaz (Tip-III toz, 15.000-50.000 ünite/g katı, Sigma-Aldrich), etanol (96% Tekkim), üre (ACS, Reag. Ph Eur., Merck), EDTA (susuz, kristal BioReagent, hücre kültürü için uygun, Sigma-Aldrich), lityum klorit (ACS reagent $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), fenol (ACS Reag. Ph Eur, GR for analysis, Merck), sodyum nitroprussit dihidrat (purrum p.a. $\geq 98,0\%$, Fluka), sodyum hipoklorit (%6-14 aktif klorit, Merck), tiyöüre (Reagent Plus® $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich), sodyum dihidrojen fosfat (Emprove® expert. Ph Eur, BP, USP, Merck), disodyum hidrojen fosfat (Ph. Eur, BP, 98,5-101%, Sigma-Aldrich), rutin (Merck), gallik asit (97,5-102,5%, Sigma-Aldrich), bakır(II) klorit (ACS reagent, $\geq 99,0\%$, Merck), sodyum karbonat (ACS reagent, susuz, $\geq 99,5\%$ Sigma-Aldrich), alüminyum klorit (reagent grade, 98%, Sigma-Aldrich), Folin Ciocalteu reaktifi (Sigma-Aldrich), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (97%, Sigma-Aldrich), potasyum persülfat (ACS reagent, $\geq 99,0\%$, Merck), amonyum asetat (EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur Merck), neokuproin ($\geq 98\%$ Sigma-Aldrich), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu ($\geq 98\%$ Sigma-Aldrich).

Bitki materyali

Bitkiler Rize’nin Merkez ve İkizdere ilçelerinden temin edilmiş, toplanma tarihleri, toplandığı lokaliteler **Tablo 1**’de verilmiştir. Bitkilerin bilimsel isimlerinin tayini Prof. Dr. Hayri Duman (Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi) tarafından yapılmış ve herbaryum örnekleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu’nda (GUEF) muhafaza edilmektedir.

Tablo 1. Çalışmada yer alan bitkiler, GUEF numaraları, toplandıkları lokalite ve toplanma tarihleri.

Bitki	Familya	GUEF no	Toplandığı tarih	Lokalite
<i>Daphne pontica</i> L.	Thymelaeaceae	3636	04.07.2020	A8; Rize, İkizdere, Aşağı Anzer Yaylası (Çiçekli Köyü) Rakım: 2800 m
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Fabaceae	3638	04.07.2020	A8; Rize, İkizdere, Aşağı Anzer Yaylası (Çiçekli Köyü) Rakım: 2800 m
<i>Lythrum salicaria</i> L.	Lythraceae	3647	02.07.2020	A8; Rize, Merkez, Gülbahar Mah., Rakım: 20-25 m
<i>Medicago sativa</i> L.	Fabaceae	3651	02.07.2020	A8; Rize, Merkez, Gülbahar Mah., Rakım: 20-25 m
<i>Potentilla reptans</i> L.	Rosaceae	3643	04.07.2020	A8; Rize, İkizdere, Aşağı Anzer Yaylası (Çiçekli Köyü) Rakım: 2800 m
<i>Senecio leucanthemifolius</i> subsp. <i>vernalis</i> (Waldst. & Kit.) Greuter	Asteraceae	3633	04.07.2020	A8; Rize, İkizdere, Aşağı Anzer Yaylası (Çiçekli Köyü) Rakım: 2800 m

Ekstraksiyon yöntemi

Bitkilerin toprak üstü kısımları gölgede kurutulmuş ve bitki değirmeninde kaba toz olacak şekilde öğütülmüştür. Daha sonra her bitki örneğinden 1'er gram alınmış ve 15'er mL %80'lik etanolle orbital

çalkalayıcıda 24 saat boyunca çalkalanarak masere edilmiştir. Süre sonunda ekstreler süzölmüş ve maserasyon işlemi aynı şekilde 10'ar mL %80'lik etanolle ikişer kez daha tekrar edilmiştir. Her bitkiden ayrı ayrı elde edilen ekstreler kendi içinde birleştirilip alçak basınç altında 45°C'yi geçmeyen sıcaklıkta evapore edilerek kurutulmuştur.

Üreaz inhibe edici aktivite tayini

Üreaz aktivitesi, indofenol yöntemi kullanılarak amonyak üretiminin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. İlk olarak mikropolanın kuyucuklarına 25'er µL jack bean üreaz enzim solüsyonu (10 U/mL) ve 5'er µL test örneği (%80 etanol içinde) konulup 30°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklara 55'er 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'er µL fenol rejanı (%1 a/h fenol ve %0,005 a/h sodyum nitroprusit) ve 70'er µL alkali rejanı (%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 absorbandsdaki artış ölçülmüştür. Kontrol ve referans deneylerinde test örneği yerine sırasıyla %80'lik etanol ve tiyoüre kullanılmıştır. Deneyler üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.¹⁰ Yüzde inhibisyon aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

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

A_{test}: Test örneğinin absorbanı

A_{kontrol}: Kontrolün absorbanı

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivite tayini

Mikropolanın kuyucuklarına test örneğinden (%80'lik etanol içinde) 150'şer µL ve 1x10⁻³ M DPPH çözeltilisinden (metanol içinde) 50'şer µL konulup 30 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından absorbanlar 517 nm'de ölçülmüştür. Kontrol deneyinde test örneği yerine %80'lik etanol konulmuştur. Standart antioksidan ajan olarak gallik asit (%80'lik etanol içinde) kullanılmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır. Yüzde inhibisyonlar aşağıdaki formülden hareketle hesaplanmıştır.¹¹

$$\text{Yüzde inhibisyon} = [(A_0 - A_n)] / (A_0) \times 100$$

A₀, kontrolün absorbanı; A_n, örneğin absorbanı

Bakır (II) indirgenme antioksidan kapasitenin (CUPRAC) tayini

İlk olarak standart antioksidan bileşik olarak kullanılan gallik asitten seri dilüsyon (%80'lik etanol içinde) hazırlanmıştır. Mikropolanın kuyucuklarına 27'er µL test örneği (%80'lik etanol içinde) veya farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerinden gerekli olan konulmuştur. Daha sonra her bir kuyucuğa sırasıyla 27'er µL su, 50'şer µL 10⁻² M CuCl₂ çözeltilisi, 50'şer µL amonyum asetat tamponu (1 M, pH 7,0), 50 µL neokuproin çözeltilisi (7,5 x 10⁻³ M, %96'lık etanol içinde) konulmuş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 450 nm'deki absorbanlar köre karşı ölçülmüştür. Deney sonucunda gallik asit çözeltileri ile elde edilen absorbanlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Örneklerin deney sonucunda verdiği absorban ve gallik asit ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinin eğiminin denkleminde hareketle sonuçlar "mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru ekstre" cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır.¹²

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 çözeltilisi 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 çözeltilisi kullanılmadan önce 3:1 oranında fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Standart

antioksidan olarak kullanılan gallik asitten (%80'lik etanol içinde) seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Mikroplakanın kuyucuklarına 100'er µL test örneği (%80'lik etanol içinde) veya farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltisi ve 100'er µL ABTS çözeltisi konulmuştur. Kontrol olarak test örneği/gallik asit çözeltisi yerine %80'lik etanol 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 GAE/g kuru ekstre" cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır.¹³

Toplam flavonoit miktar tayini:

Toplam flavonoit miktarının tayini "alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi" ile belirlenmiştir.¹⁴ Bu yöntemde ilk olarak rutinden (%80 etanol içinde) bir seri dilüsyon hazırlanmıştır. Test örnekleri %80 etanolde çözülmüştür. Mikroplakanın kuyucuklarına 20'şer µL test örneği veya farklı konsantrasyondaki rutin çözeltilerinden gerekli olan konulmuştur. Üzerine 60'ar µL %75'lik etanol, 10'ar µL %10'luk alüminyum klorür, 10'ar 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 toplam flavonoit miktarı "mg rutin eşdeğeri (RE)/g ekstre" cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir.¹⁴

Toplam fenol miktar tayini:

Gallik asitten (%80 etanol içinde) seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Test örnekleri %80 etanolde çözülmüştür. Mikroplakanın kuyucuklarına 10'ar µL örnek veya gallik asit çözeltisi konulmuştur. Üzerine 150'şer µL su, 10'ar µL Folin Ciocalteu reaktifi, 30'ar µL %20'lik sodyum karbonat çözeltisi eklenip 40°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 765 nm'deki absorbanslar ölçülmüş ve gallik asit çözeltileri ile elde edilen absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilip kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Gallik asit ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle test örneklerinin toplam fenol miktarı "mg GAE /g ekstre" cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir.¹⁵

Bulgular ve tartışma

Bitkilerden elde edilen %80'lik etanol ekstralarının miktarları, verimleri, toplam fenol ve flavonoit içerikleri Tablo 2'de verilmiştir. En yüksek toplam fenol içeriği *L. salicaria*'da ($157,1 \pm 0,9$ mg GAE /g), toplam flavonoit içeriği ise *L. corniculatus*'da ($114,7 \pm 1,1$ mg RE/g) tespit edilmiştir (**Tablo 2**). Çalışılan ekstraların üreaz inhibe edici aktiviteleri ise Tablo 3'te sunulmuştur. Tablo 3'ten anlaşılacağı üzere tüm ekstralarda üreaz inhibe edici etki görülmüş olmakla birlikte en düşük etki *S. leucanthemifolius* subsp. *vernalis*'den hazırlanan ekstrede görülmüştür (**Tablo 3**).

Tablo 2. Çalışılan bitki ekstralarının miktarları, ekstraksiyon verimleri, toplam fenol ve flavonoit içerikleri.

Bitki	Ekstre miktarı (mg)	Ekstre verimi (% g/g)	Toplam fenol ^a	Toplam flavonoit ^b
<i>D. pontica</i>	251,9	25,2	$120,3 \pm 1,1$	$81,1 \pm 0,8$
<i>L. corniculatus</i>	285,0	28,5	$56,7 \pm 1,2$	$114,7 \pm 1,1$
<i>L. salicaria</i>	225,0	22,5	$157,1 \pm 0,9$	$18,1 \pm 1,5$
<i>M. sativa</i>	194,5	19,5	$26,7 \pm 1,1$	$19,9 \pm 1,4$
<i>P. reptans</i>	266,0	26,6	$91,3 \pm 1,1$	$97,1 \pm 1,4$
<i>S. leucanthemifolius</i> subsp. <i>vernalis</i>	272,0	27,2	$33,3 \pm 1,1$	$29,3 \pm 1,1$

^a mg GAE /g ± standart sapma (n=3)

^b mg RE /g ± standart sapma (n=3)

Tablo 3. Çalışılan bitki ekstralarının üreaz inhibe edici ve antioksidan aktivite sonuçları.

Bitki	Üreaz inhibe edici aktivite ^a (%±S.S. ^b)	Antioksidan aktivite		
		DPPH (% inhibisyon ± S.S.) ^c	ABTS (mg GAE/g ± S.S.)	CUPRAC (mg GAE/g ± S.S.)
<i>D. pontica</i>	29,2 ± 1,1****	89,2 ± 0,6****	105,4 ± 3,2	108,0 ± 5,9
<i>L. corniculatus</i>	24,6 ± 0,4****	79,8 ± 0,9****	50,3 ± 4,8	48,7 ± 1,8
<i>L. salicaria</i>	28,1 ± 0,2****	89,6 ± 0,5****	122,4 ± 1,1	163,5 ± 9,7
<i>M. sativa</i>	31,3 ± 1,1****	43,1 ± 1,7****	18,3 ± 2,9	15,9 ± 0,9
<i>P. reptans</i>	26,1 ± 0,6****	89,4 ± 0,5****	62,1 ± 1,1	69,3 ± 9,4
<i>S. leucanthemifolius</i> subsp. <i>vernalis</i>	13,7 ± 1,4*	65,6 ± 0,7****	18,1 ± 1,7	28,1 ± 3,2
Tiyoüre ^d	100,0 ± 0,0**** IC ₅₀ : 64,4 ± 0,9 µM	-	-	-
Gallik asit	-	100,0 ± 0,0****	-	-

^a 100,0 µg/mL konsantrasyondaki % inhibisyon

^b Standart sapma (n=3)

^c 1000 µg/mL konsantrasyondaki inhibisyon

^d Standart üreaz inhibitörü, 25 µg/mL konsantrasyonda

[*p < 0,05; ****p < 0,0001]

Ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin tespitinde DPPH, CUPRAC ve ABTS yöntemleri kullanılmıştır (**Tablo 3**). Bunlardan DPPH, metanolde çözündüğünde 517 nm'de maksimum absorbanza sahip mor renkte çözelti meydana getiren oda sıcaklığında kararlı bir serbest radikaldir. Ancak bir antioksidan molekülün varlığında indirgenerek mor rengini kaybeder.¹⁶ Çalışılan ekstralar bu yöntemde genel olarak kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olup DPPH radikalini %43,1 ile %89,6 arasında değişen oranlarda inhibe etmiştir (**Tablo 3**). Benzer şekilde ABTS yönteminde, mevcut ABTS radikal katyonunun antioksidan ile etkileşimi sonrası 414, 417, 645, 734 veya 815 nm'deki maksimum absorpsiyonundaki azalma tespit edilir.¹⁷ CUPRAC yöntemi ise, kromojenik bis (neokuproin) bakır (II) kompleksinin polifenoller gibi antioksidanlar tarafından bakır(I)-neokuproine indirgenmesiyle 450 nm'deki absorbanstaki artışın ölçülmesine dayalı bir yöntemdir.¹⁸ Bitkilerdeki flavonoidler, fenolik asitler, tanenler gibi fenolik bileşikler hidrojen donörü olarak davranarak DPPH, ABTS radikallerini ve bis (neokuproin) bakır (II) kompleksini indirgeyebilmektedir. Dolayısıyla bitkilerdeki fenol ve flavonoid içeriğindeki artışla bakır (II) indirgenme antioksidan kapasitenin, DPPH ve ABTS radikalini süpürücü aktivite ile paralel olması beklenmektedir.^{16, 18, 19} Bu çalışmada da daha düşük fenol ve flavonoid içeriğine sahip olduğu tespit edilen *M. sativa* ve *S. leucanthemifolius* subsp. *vernalis*'in, denenen tüm antioksidan aktivite tayini yöntemlerinde düşük aktivite göstermesi bunu tamamen destekler niteliktedir. Diğer bitkilerden hazırlanan ekstralar ise yine toplam fenol ve toplam flavonoid tayini sonuçları ile uyumlu olarak uygulanan tüm antioksidan aktivite tayini yöntemlerinde oldukça yüksek aktivite göstermiştir (**Tablo 2 ve Tablo 3**).

Yaptığımız literatür taraması sonucunda bu araştırmaya dahil olan bitkilerin üreaz enzimi üzerindeki etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkemizde 'tıbbi hevhumla' olarak bilinen²⁰ *L. salicaria*, İran ve Romanya gibi farklı ülkelerde geleneksel olarak gastrointestinal hastalıklar, dizanteri, diyare, bağırsak iltihabı gibi rahatsızlıklarda kullanılmaktadır.^{21,22} Manayı ve arkadaşları, bu bilgiden hareketle bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırladıkları %80 metanol ekstresinin *H. pylori*'yi 17 mm inhibisyon zonu ile düşük oranda inhibe ettiğini belirlemiştir.²³ Bizim araştırmamızda da bitkinin %80 etanol ekstresi %28 oranında üreaz enzimini inhibe etmiştir (**Tablo 3**). Bu bulgular, *L. salicaria* bitkisinin *H. pylori* nedenli peptik ülserde etkili olabileceğini düşündürmekteyse de, daha ileri deneylere ihtiyaç vardır. Manayı ve arkadaşlarının, antioksidan aktivite test sonuçları (DPPH radikalini 13,5 µg/mL IC₅₀ değeriyle inhibe ederek E vitamininden kuvvetli radikal süpürücü aktivite göstermiştir) da bu görüşü destekler niteliktedir. Araştırmacılar hazırlanan ekstrenin toplam fenol ve flavonoid içeriğini de sırasıyla 331 µg GAE/mg ve 5,8 µg kersetin eşdeğeri/mg olarak hesaplamıştır. *L. salicaria*'dan hazırlanan farklı ekstraların antioksidan aktiviteleri, toplam fenol ve flavonoid içerikleri başka

araştırmacılar tarafından da incelenmiştir. 2020 yılında Srećković ve ark.'nın yaptıkları çalışmada yine aynı bitkinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin toplam fenol içeriği 201,5 mg GAE/g, toplam flavonoit içeriği ise 43,3 mg kersetin eşdeğeri/g olarak hesaplanmıştır. Çalışmada DPPH ve ABTS yöntemleri ile yapılan antioksidan aktivite testlerinde ise inhibisyon değerleri (IC₅₀) sırasıyla 15,7 ile 23,4 µg/mL olarak bulunmuştur.²⁴ Benzer bir araştırmada aynı bitkinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin toplam fenol ve flavonoit içerikleri sırasıyla 311,8 mg GAE/g ve 346,6 mg kateşol eşdeğeri/g olarak hesaplanmıştır. Ayrıca 200 µg/mL konsantrasyonda DPPH radikalini %96,2 oranında inhibe ettiği belirtilmiştir.²⁵ İncu 2021 yılındaki araştırmasında, bitkinin toprak üstü kısımlarının su ekstresinin toplam fenol içeriğini %16,3 bulmuş, 1 mg/mL konsantrasyonda DPPH radikalini %92 oranında inhibe ettiğini belirtmiştir.²⁶ Bir başka çalışmada ise yine aynı bitkinin toprak üstü kısımlarının %80 metanol ekstresinin toplam fenol içeriğinin 331 µg GAE/mg; toplam flavonoit içeriğinin ise 5,8 µg kersetin eşdeğeri/mg olduğu hesaplanmıştır.²⁷ Lopez ve ark. toprak üstü kısımlarının metanol ve su ekstresinin antioksidan aktivitesini DPPH testi ile araştırdığında, metanol ekstresinin 4,8 µg /mL IC₅₀ değeriyle butil hidroksi toluen (BHT) ve askorbik asitten yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu; su ekstresinin ise 22,5 µg/mL IC₅₀ değeriyle BHT'ye yakın antioksidan aktivite gösterdiğini tespit etmiştir.¹⁶ Görülebileceği gibi literatürde *L. salicaria* üzerinde oldukça fazla antioksidan etki, toplam fenol/flavonoit içeriği hakkında veri bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların gerek birbirleri ile gerekse de bizim sonuçlarımızla kıyaslandığında (**Tablo 2 ve Tablo 3**) ortaya çıkan farkların deneysel yöntem/hesaplamalarda esas alınan referans madde farklılıkları, ekstraksiyon yöntemi, bitkinin toplama zamanı ve toplama bölgesindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği akla gelmektedir.

Ülkemizde "Reşatın otu, sürünücü beşparmak otu, büyük hastalıklar otu" adları ile bilinen *P. reptans*'ın yapraklarından hazırlanan infüzyon, Kayseri'nin Pınarbaşı ilçesinde mide ağrısında halk ilacı olarak kullanılmaktadır.²⁸ Halk arasındaki bu kullanımından yola çıkılarak bitkinin antiülserojenik aktivitesi daha önce çalışma grubumuz tarafından araştırılmış olup yapraklarının dekoksilyonunun 870 mg/kg dozda sıçanlarda ülser oluşumunu %99,4 oranında inhibe ettiği görülmüştür.²⁹ Şimdiki araştırmamızda ise bitkinin toprak üstü kısımlarının %80'lik etanol ekstresinin %26 oranında üreaz inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir (**Tablo 3**). Bu sonuçlar bitkinin *H. pylori*'nin üreaz enzimi üzerinde de belirli bir etki gösterdiğini, farklı mekanizmalarla peptik ülser üzerinde etki gösterebileceğini ve peptik ülser tedavisinde umut vaat eden bir halk ilacı olabileceğini ortaya koymaktadır. Uysal ve arkadaşları da bitkinin antioksidan aktivitesinin yanı sıra, toplam fenol ve flavonoit içeriklerini araştırmıştır. Araştırmacılar toprak üstü kısımlarından ayrı ayrı hazırlanan etil asetat, metanol ekstresileri ve dekoksilyonun toplam fenolik içeriklerini sırasıyla 42,1, 111,6 ve 135,7 mg GAE/g olarak hesaplamıştır. Toplam flavonoit içeriklerinin ise yine aynı sıra ile 25,1, 37,9 ve 30,5 mg RE/g olduğu görülmüştür. Söz konusu ekstresilerin DPPH radikalini 119,5 ile 331,9 mg troloks eşdeğeri/g aralığında değişen değerlerde inhibe ettiği anlaşılmıştır. ABTS testinde 2,1 ile 4,5 mg troloks eşdeğeri/g; CUPRAC testinde ise 263,3 ile 131,1 mg troloks eşdeğeri/g aralığında antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.³⁰ Çalışmada kullanılan referans maddelerin bizim kullandıklarımız ile farklı olması, farklı sonuçların başlıca nedenleri arasında görülebilir. Bununla birlikte polarite açısından bizim ekstreimize yakın olan metanol ekstresinin toplam fenol içerik sonucu bizim bulgularımıza yakinken, toplam flavonoit içeriğinin (**Tablo 2**) farklı bulunmasının nedeninin yine bu deneyde kullanılan tayin yöntemindeki farklılıktan kaynaklanabileceği söylenebilir.

"Gazelboynuzu, boynuzlu yonca, yalancı bezelye" gibi farklı yerel adları olan *L. corniculatus*'un toprak üstü kısımlarının Doğu Anadolu Bölgesi'nde mide ağrısı, karın ağrısı başta olmak üzere hemoroit, böbrek ağrısı gibi hastalıklarda halk ilacı olarak kullanıldığı kayıtlıdır.³¹ Üreaz enzimi üzerinde tespit ettiğimiz inhibisyonun (%24,6) (**Tablo 3**), halk arasında mide ağrısındaki kullanımını desteklemekle birlikte yeterli olmadığı ve bu konuda daha ileri araştırmaların yapılmasının gerekliliğini ortaya koyduğu açıktır. Bitkinin antioksidan kapasitesi daha önce araştırılmış olup toprak üstü kısımlarından hazırlanan etilasetat, metanol ve su

ekstresinin toplam fenolik içeriği sırasıyla 15,5, 19,9 ve 23,2 mg GAE/g; toplam flavonoit içeriği sırasıyla 17,5, 21,1 ve 16,2 mg RE/g olarak hesaplanmıştır. DPPH testinde 17,1, 31,94 ve 56,84 mg troloks eşdeğeri/g antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. ABTS testinde 96,4, 140,3 ve 306,1 mg troloks eşdeğeri/g; CUPRAC testinde ise 69,8, 80,4 ve 77,8 mg troloks eşdeğeri/g antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.³² Literatürde sonuçların hesaplanmasında kullanılan referans maddelerin aynı olmaması ve dolayısıyla kullanılan yöntemlerdeki farklılıklar başta olmak üzere yukarıda değinilen diğer hususlar da göz önüne alındığında, yöntem açısından gereken homojenlik bulunmadığından söz konusu literatürle kıyaslamak uygun görülmemiştir.

M. sativa, yine peptik ülseri akla getiren hastalıklarda etnofarmakolojik kullanımı olan bitkiler arasındadır.^{33,34} Çalışmamızda yer alan diğer bitkilere göre daha yüksek üreaz inhibe edici aktivite göstermiştir (%31,3) (**Tablo 3**). Bir diğer çalıştığımız bitki olan *D. pontica* da yine benzer düzeyde (%29,2) üreaz inhibisyonu göstermiştir (**Tablo 3**). Bununla birlikte bu bitkilerin *H. pylori* üzerindeki etkileri ve muhtemel antiülserojenik aktivitesi farklı mekanizmalarla da araştırılmalıdır.

Rize'den toplanan altı bitkinin (*D. pontica*, *L. corniculatus*, *L. salicaria*, *M. sativa*, *P. reptans* ve *S. leucanthemifolius* subsp. *vernalis*) üreaz inhibe edici ve antioksidan aktivitesi, toplam fenol/flavonoit içeriklerinin tespit edildiği bu çalışmada, hazırlanan %80'lik etanol ekstratlarının *in vitro* yöntemle üreaz enzimini genel olarak anlamlı bir derecede inhibe ettiği ilk kez belirlenmiştir. *D. pontica*, *L. salicaria* ve *P. reptans* yüksek antioksidan aktivite, toplam fenol ve flavonoit içerikleri ile öne çıkmıştır. Ekstre bazında ele alındıklarında çok kuvvetli üreaz inhibe edici aktivite gözlenmesi de, ekstratlerde aktiviteye neden olan bazı bileşik veya bileşiklerin olduğu aşikârdır. Aktivitenin düşük olması, ekstre içinde yer alan aktif bileşik veya bileşiklerin konsantrasyonunun çok düşük olmasından kaynaklanabilir. Biyoaktivite ile yönlendirilen saflaştırma gibi daha ileri çalışmalarla fraksiyonlamalar esnasında, içerikteki bileşikler farklı fraksiyonlarda yoğunlaşacağı için bazı alt fraksiyonlarda çok kuvvetli aktivite ve bu fraksiyonlardan çok kuvvetli aktif bileşik veya bileşikler izole edilebilir. Dolayısıyla öncelikle aktivitenin nispeten daha yüksek olduğu *M. sativa*, *D. pontica* ve *L. salicaria* üzerinde en azından birkaç kademeyi kapsayacak iyi planlanmış biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bilgi

Çalışmada çıkar çatışması bulunmamaktadır. Bu çalışma XXIV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı'nda (2022, Ankara) poster olarak sunulmuştur.

Araştırmacı Katkı Oranı Beyanı

Elif Dilmaç: Fikir, veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, makale yazımı

Melike Sucu: Veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, makale yazımı

Tuğba Günbatan: Veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, kaynak taraması, makale yazımı

İlhan Gürbüz: Fikir, veri işleme, yorum, danışmanlık/denetleme, makale yazımı, eleştirel inceleme

Kaynaklar

1. Gürbüz ED, Yılmaz Ö. Helicobacter pylori'nin yaşam stratejisi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2011;41(2):49-56.
2. Yılmaz Ö, Okçu N. Helicobacter pylori ve gastrointestinal sistemle ilişkili hastalıklar. Atatürk Üniversitesi Tıp Dergisi 2006;38:13-7.
3. Korona-Glowniak I, ve ark. The in vitro activity of essential oils against Helicobacter pylori growth and urease activity. Molecules 2020;25(3).
4. Upadhyay LSB. Urease inhibitors: a review. Indian J Biotech 2012;11:381-8.
5. Svane S, ve ark. Inhibition of urease activity by diferent compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. Sci Rep 2020;10:8503.
6. Matczuk D, Siczek A. Effectiveness of the use of urease inhibitors in agriculture: a review. Int Agrophys 2021;35:197-208.

7. 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.
8. Tandon R, ve ark. Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma. *Indian J Physiol Pharmacol* 2004;48(1):115-8.
9. Ray PD, ve ark. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012;24(5):981-90.
10. Khan KM, ve ark. Synthesis and urease enzyme inhibitory effects of some dicoumarols. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004;19(4):367-71.
11. Matthaus B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J Agr Food Chem* 2002;50:3444-52.
12. Apak R, ve ark. 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. *J Agr Food Chem* 2004;52:7970-81.
13. Gülçin İ. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* 2007;32(3):431-8.
14. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res* 1998;37:99-105.
15. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 1965;16:144-58.
16. López V, ve ark. Screening of Spanish medicinal plants for antioxidant and antifungal activities. *Pharm Biol* 2008;46(9):602-9.
17. İlyasov IR, ve ark. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int J Mol Sci* 2020; 21(3).
18. Apak R, ve ark. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007;12(7):1496-547.
19. Dawidowicz AL, Olszowy M. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *Eur Food Res Technol* 2013;236(6):1099-105.
20. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 2nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999.
21. Miraldi E, Ferri S, Mostaghimi V. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *J Ethnopharmacol* 2001;75:77-87.
22. Tiță I, Mogoșanu GD, Tiță MG. Ethnobotanical inventory of medicinal plants from the south-west of Romania. *Farmacia* 2009;57(2):141-56.
23. Manayi A, ve ark. Biological activity and microscopic characterization of *Lythrum salicaria* L. *DARU J Pharm Sci* 2013;21:61.
24. Srećković N, ve ark. *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) as a promising source of phenolic compounds in the modulation of oxidative stress: Comparison between aerial parts and root extracts. *Ind Crop Prod* 2020;155.
25. Türker AU, ve ark. Evaluation of some traditional medicinal plants: phytochemical profile, antibacterial and antioxidant potentials. *Romanian Biotechnol Lett* 2021;26(2):2499-510.
26. Iancu IM. Phytochemical Evaluation and Cytotoxicity Assay of *Lythri Herba* Extracts. *Farmacia* 2021;69(1):51-8.
27. Vafi F, ve ark. Burn wound healing activity of *Lythrum salicaria* L. and *Hypericum scabrum* L. *Wounds* 2016;28(12):448-58.
28. Özkan AMG, Koyuncu M. Traditional medicinal plants used in Pınarbaşı area (Kayseri-Turkey). *Turk J Pharm Sci* 2005;2(2):63-83.
29. Gürbüz İ, ve ark. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pınarbaşı (Kayseri, Turkey). *J Ethnopharmacol* 2005;101:313-8.
30. Uysal S, ve ark. Cytotoxic and enzyme inhibitory potential of two *Potentilla* species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and their chemical composition. *Front Pharmacol* 2017;8:290.
31. Altundağ E, Öztürk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc Behav Sci* 2011;19:756-77.
32. Yerlikaya S, ve ark. Investigation of chemical profile, biological properties of *Lotus corniculatus* L. extracts and their apoptotic-autophagic effects on breast cancer cells. *J Pharm Biomed Anal* 2019;174:286-99.
33. Erarslan ZB, Kültür Ş. Ethnoveterinary medicine in Turkey: a comprehensive review. *Turk J Vet Anim Sci* 2019;43(5):555-82.
34. Bora KS, Sharma A. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharm Biol* 2011;49(2):211-20.