

Atf İçin: Güzel, A. (2023). Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik Aktivitesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2809-2817.

To Cite: Güzel, A. (2023). Phytochemical Analysis and Antioxidant, Anticholinesterase and Antiatherogenic Activity of Hairy Tea (*Stachys lavandulifolia*). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2809-2817.

Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik Aktivitesi

Abdussamat GÜZEL^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Antioksidan aktiviteye sahiptir
- Kolinergik etkilidir
- Anti aterojeniktir

Anahtar Kelimeler:

- Antioksidan
- Asetilkolinesteraz
- Paraoksonaz
- *Stachys lavandulifolia*
- LC-MS/MS

ÖZET:

Stachys lavandulifolia Vahl. etnobotanikte önemli yeri olan Lamiaceae familyasına ait çiçekli bitki ailesindedir. Bu çalışmada bitkinin fitokimyasal kompozisyonu, asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu, antiaterosklerotik aktivite için paraoksonaz (hPON 1) inhibisyonu ve antioksidan kapasitesi araştırıldı. Fitokimyasal içerik LC-MS/MS sistemi ile enzim inhibisyonu ve antioksidan kapasite çalışmaları ise spektrofotometre ile belirlendi. *S. lavandulifolia* ekstraktlarının (metanol, hekzan ve su) antioksidan kapasitesi ABTS, DPPH, FRAP ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak belirlendi. *S. lavandulifolia* 'nın metanol ekstraktı AChE üzerinde önemli inhibisyon sergiledi (metanol ekstraktı için IC₅₀ değeri 0.105±0.17 mg/mL (R²:0.978)). Buna karşılık, *S. lavandulifolia*'nın metanol ve su ekstraktları hPON 1 üzerinde inhibisyon etkisi göstermedi. ABTS için en yüksek aktivite metanol ekstresinde %23.42 ve DPPH aktivitesi için metanol ekstresinde %50.07 olarak belirlendi. Metal indirgeme gücü deneyinde, FRAP su ekstraktı için 0.233±0.47 ve CUPRAC metanol ekstraktı için 0.587±1.52 absorbans olarak tespit edildi. Bitkinin metanol ekstraktında LC-MS/MS analizlerine göre luteolin, fumarik asit, kafeik asit, siringik asit, hidroksibenzoik asit, kuersetin, salisilik asit, gallik asit, kateşin hidrat ve asetohidroksamik asit saptanmıştır. Sonuç olarak, antioksidan, anti-aterojenik ve anti-nörodejeneratif özelliklere sahip olan *S. lavandulifolia*, Alzheimer hastalarında kullanılan sentetik ilaçlar yerine doğal bir ilaç olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Phytochemical Analysis and Antioxidant, Anticholinesterase and Antiatherogenic Activity of Hairy Tea (*Stachys lavandulifolia*)

Highlights:

- Has antioxidant activity
- It is cholinergic
- It is anti-atherogenic

Keywords:

- Antioxidant
- Acetylcholinesterase
- Paraoxonase
- *Stachys lavandulifolia*
- LC-MS/MS

ABSTRACT:

Stachys lavandulifolia Vahl. is a flowering plant family belonging to the Lamiaceae family, which has a great place in ethnobotany. In this study, the phytochemical composition, inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and paraoxonase (hPON 1) for antiatherosclerotic activity, and antioxidant capacity of the plant were investigated. Phytochemical content was determined by LC-MS/MS system, enzyme inhibition, and antioxidant capacity studies were determined by spectrophotometer. The antioxidant capacity of *S. lavandulifolia* extracts (methanol, hexane, and water) was determined by applying ABTS, DPPH, FRAP, and CUPRAC methods. The methanol extract of *S. lavandulifolia* exhibited significant inhibition of AChE (IC₅₀ value for methanol extract 0.105±0.17 mg/mL (R²:0.978)). In contrast, methanol and water extracts of *S. lavandulifolia* showed no inhibitory effect on hPON 1. The highest activity for ABTS was 23.42% in methanol extract and 50.07% for DPPH activity in methanol extract. In the metal-reducing power test, the absorbance was 0.233±0.47 for FRAP water extract and 0.587±1.52 for CUPRAC methanol extract. According to LC-MS/MS analysis, luteolin, fumaric acid, caffeic acid, syringic acid, hydroxybenzoic acid, quercetin, salicylic acid, gallic acid, catechin hydrate, and acetohydroxamic acid were determined in the methanol extract of the plant. In conclusion, *S. lavandulifolia*, which has antioxidant, anti-atherogenic, and anti-neurodegenerative properties, has the potential to be used as a natural medicine instead of synthetic drugs used in Alzheimer's patients.

¹ Abdussamat GÜZEL (Orcid ID: 0000-0001-7810-4510), İnönü Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Malatya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Abdussamat GÜZEL, e-mail: abdussamat.guzel@inonu.edu.tr

GİRİŞ

Bitkisel ilaçlara yönelimin artmasına paralel olarak, bilimsel çalışmalarda da tıbbi bitkiler yoğun ilgi görmektedir. Bunun nedeni olarak konvansiyonel yaklaşım ilaçlarının yan etkilerinin oluşu ileri sürülebilir. Tıbbi bitkilere potansiyel farmasötik özellik kazandıran ise şikimik asit yolu ve malonik asit yolundan sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Yapılan çalışmalarda sekonder metabolitlerin önemli bir üyesi olan fenolik bileşikler, terapötik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Karimi ve ark., 2015; Ekor, 2014; Verma ve Singh, 2008).

Fenolik bileşiklere biyoaktivite kazandıran, aromatik halka üzerindeki fonksiyonel hidroksil gruplarıdır. Bu hidroksil gruplarının sayısı ve konumu fenolik bileşiklerin biyoaktivite çeşitliliğini ortaya koymaktadır. Fenolik bileşiklerin bu özelliği ile kanser, ateroskleroz ve Alzheimer gibi hastalıkların patogeneğinde rol oynayan reaktif oksijen türleri detoksifiye edilir (Kim ve ark., 2020). Nörodejeneratif ve kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların birçok yan etkisi bilinmektedir. Bu nedenle tıbbi bitkilerdeki etken maddelerin karakterizasyonu ve efektif oldukları biyoaktivitelerin belirlenmesi önem arz etmektedir. Farmasötik etkiye sahip tıbbi bitkilerin kullanılması yan etkilerin ciddi bir oranda ortadan kaldırılması mümkün olabilir (Verma ve Singh, 2008).

Bilişsel ve davranışsal bir bozukluk olan ve daha çok yaşlı insanlarda görülen Alzheimer hastalığı, ilerleyici, kronik ve nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığının histopatolojik özelliklerine bakıldığında, sinaptik dejenerasyon, hipokampal nöronal kayıp, anöploidi, tau-hiperfosforilasyon, hücre dışı β -protein amiloid agregasyonu ve hücre içi nörofibriler yumaklardır (Swerdlow, 2007). Fakat Alzheimer hastalığı histopatolojik parametreleri şu anda yalnızca amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklardır. Parasempatik sinir sisteminin bir nörotransmitteri olan asetilkolin eksikliği, amiloid plak oluşumunun nedenlerinden biri olarak öne sürülmüştür. Kolinerjik etki yaklaşımında, hidrolitik enzim olan asetilkolinesteraz (AChE) sinapslardaki asetilkolin miktarını artırmak için inhibe edilir ve impuls iletimi sağlanmış olur (Avila, 2006). AChE inhibitörlerinin kolinerjik etkiyi arttırdığı ve dolayısıyla Alzheimer hastalarında terapötik etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır (Güzel ve ark., 2022). Ayrıca birçok çalışma, AChE inhibitörlerinin glokom hastalığında retinal ganglion hücrelerin oküler hipertansiyon hasarından yapısal olarak korunmasına yol açtığını göstermektedir (Almasieh ve ark., 2010).

Karaciğerde sentezlenen insan serum paraoksonaz-1 enzimi (arilesteraz, hPON1) bir ester hidrolazdır. Kalsiyuma bağımlı olan bu enzim, HDL ile ilişkili olup aterojenik lipid peroksitlerin etkilerini nötralize ederek ateroskleroz oluşumunu engeller. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, kardiyovasküler hastalıklarda HDL ve hPON1 değerleri düşük çıkmıştır (Chistiakov ve ark., 2017). Dolayısıyla kullanılan ilaçların veya tıbbi bitkilerin hPON1 enzimini inhibe etmesi problem oluşturmaktadır.

Stachys cinsi, Avrupa, Asya, Afrika, Avustralya ve Kuzey Amerika kıtalarında bulunan yaklaşık üç yüz tür ile Lamiaceae'nin çiçekli bitki ailesinin en büyük cinslerinden biridir. Türkiye Florası'nda 37'si endemik olmak üzere 86 *Stachys* cinsi bulunmaktadır (Özhatay ve Kültür, 2006; Bhattacharjee, 1980). *Stachys* cinslerinin fitokimyasal içeriklerinde fenolik ve flavonoid glikozitler (Miyase ve ark., 1996), terpenoidler ve steroidler (Yamamoto ve ark., 1994), flavonoid bileşenler (El-Ansari ve ark., 1991) gösterilmiştir. Ayrıca, *Stachys* cinsleri üzerine yapılan biyoaktivite çalışmalarında antiinflamatuvar, antitoksik, hipoazotemik, antihepatit, antibakteriyel ve antioksidan gibi çeşitli farmakolojik etkiler göstermiştir (Maleki ve ark., 2001). Bununla birlikte, etnobotanik açısından bazı *Stachys* cinsleri ateroskleroz, genital ve enflamatuvar tümörler, kanser ve ülser gibi hastalıkların

tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, *Stachys* cinlerinin çayı sedatif, antispazmodik, diüretik ve emmenagog aktivite gösterdiği için fitoterapi uygulamalarında kullanılmaktadır (Couladis ve ark, 2003). Daha önceki yapılan çalışmalarda *S. lavandulifolia*'nın feolik bileşikler arasında kinik asit ve klorojenik asit ana bileşikler olarak rapor edilmiştir (Bingol ve Bursal, 2018).

Bu çalışmada, *S. lavandulifolia* ekstralarının serbest radikal giderme (ABTS ve DPPH) ve indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC) gibi çeşitli antioksidan testleri kullanarak antioksidan aktivitesi ve AChE ve hPON 1 enzimlerine karşı inhibisyonu araştırılmıştır. Ayrıca, *S. lavandulifolia*'ın 26 fenolik bileşiğinin LC-MS/MS ile kantitatif ve kalitatif tayini yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitki Örnekleri

S. lavandulifolia, Temmuz 2022'de Adıyaman Çelikhane kasabasında toplandı (B7 38°05'16"K 38°20'35"D) ve Turgay Kolaç (İnönü Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu) tarafından tanımlanmıştır. İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumun'da kayıtlıdır (Kayıt No: TK 1354). Bitkinin herba kısmı distile su ile yıkandıktan sonra gölgede oda sıcaklığında kurutuldu.

Ekstraksiyon işlemleri

Kurutulmuş olan bitki bir öğütücü ile toz haline getirildikten sonra 5g numune 27°C'de maserasyon yöntemi kullanılarak 50 mL ekstraksiyon solventleri (metanol, su ve heksan) ile ayrı ayrı ekstre edildi. Elde edilen ekstrakt kâğıttan süzülde ve döner evaporatörde 40°C'de buharlaştırıldı. Hazırlanan 1 mg/mL'lik ekstrakt ile LS-MS/MS analizleri, antioksidan kapasite ve enzim inhibisyon çalışmaları yapıldı.

LC-MS/MS kromatografik koşulları

Seçilen 25 fenolik bileşiğın kalitatif ve kantitatif tayini, bir tandem MS cihazına (Shimadzu, Kyoto, Japonya) bağı bir Nexera model Shimadzu HPLC ile daha önce açıklanan yöntem kullanılarak gerçekleştirildi (Uğur ve Güzel, 2023; Uğur, 2022). ESI kaynağı ile donatılmış bir Shimadzu LCMS 8040 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresi kullanılarak MS tespiti yapıldı. LC-ESIMS/MS verileri, LabSolutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) tarafından toplandı ve işlendi. Analitleri ve Fitokimyasalları ölçmek için çoklu reaksiyon izleme (MRM) modları kullanıldı.

Radikal giderme aktivitesi

S. lavandulifolia ekstraktlarının kolorimetrik DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri Blois yöntemine (Blois, 1958) göre gerçekleştirilmiştir. ABTS katyon giderme testi, Re ve ark. (Re ve ark., 1999) tarafından uygulanan yöntemle göre gerçekleştirildi. Radikal giderme etkisi (%) = $[(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$

İndirgeme kapasitesi

S. lavandulifolia ekstraktlarının demir iyonları (Fe^{3+}) indirgeme analizleri, Oyaizu yönteminin modifiye bir versiyonu ile gerçekleştirilmiştir (Elmastaş ve ark., 2006; Oyaizu, 1986). *A. lithophila* ekstraktlarının Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme aktivitesi Apak ve arkadaşlarının bildirdiği yöntemle göre yapılmıştır (Apak ve ark., 2008).

Enzim inhibisyon etkileri

S. lavandulifolia'nın su ve metanol ekstraktlarının inhibitör etkileri AChE ve hPON1 enzimlerine karşı test edildi. Asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelerini değerlendirmek için Ellman'ın

yöntemi kullanıldı (Ellman ve ark., 1961). Ayrıca paraoksonaz inhibitör aktivitelerini göstermek için bir önceki çalışmamızdaki protokol kullanılmıştır (Güzel, 2023).

BULGULAR VE TARTIŞMA

S. lavandulifolia fitokimyasal analizi için yüksek seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle LC-MS/MS sistemi seçilmiştir. Çalışılan analitler için LOD, LOQ, lineer aralık ve R^2 belirlendi (Tablo 1). Fitokimyasal kompozisyonun LC-MS/MS ile belirlenmesi için *S. lavandulifolia* bitkisinin metanol ekstresi kullanıldı. *S. lavandulifolia* fenolik bileşiklerden luteolin $5677.31 \pm 13,94$ mg/kg, fumarik asit 4023.19 ± 7.34 mg/kg, kafeik asit 2042.65 ± 5.85 mg/kg, siringik asit 816.33 ± 6.53 mg/kg, hidroksibenzoik asit 109.58 ± 4.48 mg/kg, kuersetin 105.33 ± 3.75 mg/kg, salisilik asit 104.07 ± 4.21 mg/kg, gallik asit 66.98 ± 6.68 mg/kg, kateşin hidrat 25.10 ± 8.56 mg/kg ve asetohidroksamik asit 9.62 ± 2.24 mg/kg olarak ölçülmüştür. Resveratrol, floridzin dihidrat, oleuropein, protokatekuik asit, ellagik asit, mirisetin, 2-hidroksi-1,4-naftokinon, silimarin, bütein, kaempferol, alizarin, kurkumin ve timokinon LOQ altında bulundu ve vanilik asit ise saptanmadı (Çizelge 1).

Sekonder metabolitlerin bir üyesi olan fenolik bileşikler, yapılarındaki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve konumu ile biyoaktivite özelliği gösterir (Al-Mamary ve Moussa, 2021). Bundan dolayı fenolik bileşikler antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antimutajenik, antienflamatuar ve antikarsinojenik gibi biyoaktivitelere sahiptir (Owen ve ark., 2000). Flavonoidlerin bir üyesi olan luteolin, antioksidan, antikolinesteraz, anti-kanserojen, anti-prolatif, anti-inflamatuar, anti-aterosklerotik ve anti-alerjik etkilere sahiptir (Ahmadi ve ark., 2020). *S. lavandulifolia* ile ilgili daha önce yapılan LC-MS/MS çalışmasında bitkinin dekoksasyon ekstresinde luteolin 304 mg/kg bulunurken maserasyon tekniği ile yapılan bu çalışmada ise majör komponent olarak 5677.31 mg/kg bulunmuştur (Bahadori ve ark., 2020). Buradaki bu fark yüksek sıcaklıkta fenolik bileşiklerin yapısı bozulduğundan dekoksasyon ekstresinde Luteolin düşük çıkmıştır. Çok yönlü biyoaktiviteye sahip fumarik asit, sedef hastalığı, sarkoidoz, granülom, nekrobiyozis lipoidika ve malign melanom gibi deri hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca nöroprotektif, antioksidan, immünomodülatör ve antiinflamatuar etkileri vardır (Kaur ve ark., 2020). Bursal ve ark. rapor ettiğine göre *Stachys annua* fitokimyasal çalışmasında bitkinin su ekstresinde fumarik asit 309.5 mg/kg olarak ölçülmüştür (Bursal ve ark. 2020). *S. lavandulifolia* çalışmasında ise 4023.19 mg/kg bulunarak ikinci majör komponent olmuştur. Daha önce yapılan bir çalışmada kafeik asit, antioksidan, antienflamatuar, antiviral, anti-aterosklerotik ve antikanser özelliklere sahip bir fenolik bileşiktir (Gülçin, 2006). *S. lavandulifolia*'nın etanol (Bingol ve Bursal, 2018) ve dekoksasyon (Bahadori ve ark., 2020) ekstraktlarının LC/MS/MS çalışmasında sırasıyla 0.032 mg/kg ve 148 mg/kg olarak kafeik asit belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise metanol ekstresinde 2042.65 mg/kg olarak üçüncü majör komponent olarak kafeik asit bulunmuştur. Siringik asit, antioksidan, antimikrobiyal gibi biyomedikal sektörde kullanımlara sahip bir bileşiktir. Ayrıca antienflamatuar, antikanser, antidiyabet olmakla beraber kalp, karaciğer ve beyni koruyucu özelliklere de sahiptir. Daha önceki yapılan bir çalışmada *S. lavandulifolia*'nın dekoksasyon ekstresinde siringik asit 78 mg/kg olarak bulunurken bu çalışmada 816.33 mg/kg olarak metanol ekstresinde ölçülmüştür (Bahadori ve ark., 2020).

S. lavandulifolia ekstraktlarının (metanol, su ve heksan) antioksidan aktiviteleri için DPPH serbest radikal yakalama, ABTS katyon radikal temizleme, bakır indirgeme (CUPRAC) ve demir indirgeme (FRAP) testleri yapıldı. DPPH ve ABTS sonuçları yüzde radikal giderme aktivitesi olarak, CUPRAC ve FRAP sonuçları ise absorbans olarak ifade edildi.

Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik AktivitesiÇizelge 1. *S. Lavandulifolia*'nın Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS Yönteminde Kullanılan Analitik Parametrelerle Kantitatif Tayini

Bileşikler	Ahkonma zamanı (dak)	Prokesör iyon (m/z)	Ürün iyon (m/z)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Doğrusal regresyon	Doğrusal aralık (µg/L)	R ²	değer±sd mg/kg
Asetohidroksamik asit	0.406	76.15	58	6.90	23.01	y = 216.91x + 6165.8	20-750	0.99 89	9.62±2.24
Kateşin hidrat	2.532	291	139.1	2.05	6.84	y = 1717.9x - 563.99	10-750	0.99 88	25.10±8.56
Vanilik asit	2.762	168.95	65	84.78	282.6 1	y = 48.343x + 662.5	250-1000	0.99 93	-
Siringik asit	3.001	199.1	140.1	2.88	9.61	y = 112.03x + 1316.1	10-500	0.99 94	816.33±6.5 3
Resveratrol	3.606	229	135	41.83	139.4 3	y = 733.34x - 69955	250-1000	0.99 9	< LOQ
Fumarik asit	0.809	115.2	71.1	7.91	26.38	y = 100.9x - 1701.62	40-750	0.99 89	4023.19±7. 34
Gallik asit	1.278	169.1	124.9	3.92	13.06	y = 305.07x - 1859.3	10-100	0.99 81	66.98±6.68
Kafeik asit	2.836	179	135	2.87	9.58	y = 1227.2x - 5396.5	10-100	0.99 48	2042.65±5. 85
Phloridzin dihidrat	3.594	435.1	273.1	81.80	272.6 7	y = 120.23x - 9479.5	250-1000	0.99 89	< LOQ
Oleropin	3.567	539.1	377	7.17	23.90	y = 324.26x - 5388.8	40-750	0.99 97	< LOQ
Protokatekuik asit	3.556	181	108	2.76	9.20	y = 1382.2x - 4393.1	10-500	0.99 67	< LOQ
Salisilik asit	3.558	137.2	93	22.88	76.25	y = 3838.2x - 149277	75-1000	0.99 77	104.07±4.2 1
Ellagik asit	3.681	301.1	228.9	23.74	79.14	y = 18.841x + 911.46	100-1000	0.99 67	< LOQ
Mirisetin	3.644	317	179.1	4.34	14.45	y = 588.4x - 4990.6	20-500	0.99 87	< LOQ
2-hidroksi-1.4 naftakinon	3.664	173.1	145	2.07	6.91	y = 461.45x - 4553.8	10-500	0.99 89	< LOQ
Hidroksibenzoik asit	3.555	137.2	93.1	8.92	29.74	y = 3831.2x - 94423	40-500	0.99 96	109.58±4.4 8
Silymarin	3.996	481.1	453.1	8.00	26.70	y = 199.91x + 950.97	40-750	0.99 97	< LOQ
Kuersetin	3.891	301.1	150.9	7.79	25.98	y = 150.09x - 422.87	20-500	0.99 97	105.33±3.7 5
Naringenin	3.952	271	150.9	68.40	228.1 0	y = 700.8x - 26469	250-1000	0.99 97	82.54±5.37
Bütein	3.935	271	134.9	38.50	128.2 0	y = 62.943x - 2793	100-1000	0.99 6	< LOQ
Luteolin	4.069	285	150.9	6.40	21.40	y = 1389x - 40923	40-1000	0.99 88	5677.31±13 .94
Kaempferol	4.298	285	117	3.90	13.00	y = 62.513x - 821.08	20-1000	0.99 82	< LOQ
Alizarin	4.594	239	211	15.30	51.10	y = 26.512x - 1721	60-2000	0.99 91	< LOQ
Kurkumin	4.672	367.1	216.9	12.80	42.70	y = 1908.9x - 8252.1	40-1000	0.99 94	< LOQ
Timokinon	3.337	165	137	7.64	25.47	y = 349.23x - 2887.4	20-500	0.99 71	< LOQ

R²: determinasyon katsayısı, LOD: Belirleme sınırı LOQ : Tayin sınırı

Metanol ekstraktı, DPPH, ABTS ve CUPRAC testlerinde en yüksek aktivite gösterirken FRAP testinde su ekstraktı en yüksek aktivite gösterdi. Standartlara (BHA, BHT, Trolox) göre değerlendirilen antioksidan aktivite çalışmalarının sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir.

Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik AktivitesiÇizelge 2. *S. Lavandulifolia* Ekstrelerinin Radikal Giderici Ve Metal İndirgeme Aktivitesi

	DPPH [*] (0.2 mg/mL)	ABTS ⁺⁺ (0.2 mg/mL)	FRAP (0.2 mg/mL)	CUPRAC (0.2 mg/mL)
	% ^a		Absorbans ^b	
Metanol ekstresi	50.07±1.01	23.42±0.14	0.134± 0.58	0.587±1.52
Su ekstresi	49.95±0.52	15.96±0.25	0.233± 0.47	0.497±1.22
Hegzan eksresi	20.36±0.34	6.15±1.12	-	0.145± 0.32
BHA	76.22±3.62	93.65±4.71	1.625±0.38	2.002±0.85
BHT	43.40±3.26	58.21±2.66	1.034±0.23	2.287±1.06
TROLOX	85.35±3.12	90.03±3.07	0.928±0.26	2.025±0.98

BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen.

^aABTS ve DPPH radikal giderme aktivitesinin yüzdesi (%).

^bDeğerler absorbans olarak ifade edildi. Yüksek absorbans, yüksek metal iyonlarını (Fe³⁺ ve Cu²⁺) indirgeme kabiliyetini gösterir.

Oksidatif stres, dejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer, yaşa bağlı makula dejenerasyonu), romatizmal, pulmoner, sindirim, kardiyovasküler, metabolik ilerleyici kronik hastalıklar ve kanser gibi hastalıklarla bağlantılıdır (Liu ve ark., 2017). Antioksidan aktiviteye sahip şifalı bitki ekstraktlarının oksidatif stresin neden olduğu hastalıkları önlediği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Owen ve ark., 2000). Bu çalışmada, *S. lavandulifolia* ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, standart antioksidan olan BHT, BHA ve Trolox ile karşılaştırıldı. En çok tercih edilen spektrofotometrik giderme deneyleri ABTS ve DPPH yöntemleridir. Bu yöntemlerle bitkilerin radikali nötralize etme kapasiteleri belirlenir. Daha önceki yapılan DPPH çalışmasında *S. lavandulifolia* etanol ekstresinin BHT' ye benzer aktivite göstermiştir. *S. lavandulifolia*'nın etanol ve su ekstraktlarında ise ABTS, FRAP ve CUPRAC testleri standart antioksidanlardan düşük çıkmıştır (Bingol ve Bursal, 2018). Yeni yapılan bu çalışmada ise *S. lavandulifolia* metanol ve su ekstraktları BHT'den daha yüksek aktivite göstermiştir. ABTS, FRAP ve CUPRAC testlerinde ise *S. lavandulifolia* ekstraktlarının (metanol, su ve hegzan) standart antioksidanlardan düşük aktivite göstermiştir.

AChE ve hPON 1 enzimlerinin aktivitesini inhibe etmek için *S. lavandulifolia* ekstraktları kullanıldı. *S. lavandulifolia* metanol ekstraktı, AChE enzimine karşı önemli inhibisyon göstermiştir (Çizelge 3). hPON 1 enzimi ise *S. lavandulifolia* ekstraktları tarafından inhibe edilmedi.

Çizelge 3. *S. Lavandulifolia* Ekstrelerinin AChE ve hPON 1 Üzerindeki İnhibitör Etkisi

	AChE inhibisyonu		hPON1 inhibisyonu
	IC ₅₀ (mg/mL)	R ²	
Metanol ekstresi	0.105± 0.17	0.978	NI
Su ekstresi	NI	-	NI

NI: İnhibisyon yok

Alzheimer patogeneğinde öne çıkan parametrelere bakıldığında, artmış amiloid β agregatları ve azalmış asetilkolin nörotransmitterleridir. Aynı zamanda artan amiloid plakları kolinerjik kayıplara neden olmaktadır. Kolinerjik tedavi yaklaşımı asetilkolinesterazı inhibe ederek asetilkolinin sinapslarda daha uzun süre kalmasını sağlar. Böylece hastaların mental fonksiyonlarında kısmi düzelme olmasını sağlar. Nöroprotektif bir ajan olan donepezil gibi kolinerjik ilaçların yan etkileri bilinmektedir. Bu nedenle yan etkisi olmayan ilaç arayışları artmaktadır (Braak ve Del Tredici, 2011). Bu amaçla hem yan etkisi olmayan hem de kolinerjik etkilere sahip tıbbi bitkiler araştırma konusu olmuştur. Daha önceki yapılan bir çalışmada *S. lavandulifolia*'nın metanol ekstresi, 0.211 mg/mL'lik bir IC₅₀ değeriyle AChE inhibisyonu sergilerken bu çalışmada 0.105± 0.17 mg/mL'lik bir IC₅₀ değeriyle AChE inhibisyonu gösterdi (Tundis ve ark., 2015).

Vücutta oksidan ve antioksidan dengenin oksidan lehine olmasıyla gelişen oksidatif stresin, çeşitli hastalıklara ve kansere neden olduğu bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). İnsan vücudu, serbest radikalleri nötralize etmek için enzimatik mekanizmalara sahiptir. Enzimatik

antioksidan ailesine dahil olan paraoksonaz, lipid peroksidasyonunu önleyerek ateroskleroza bağlı kardiyovasküler hastalıkları önlemede önemli bir parametredir (Ferretti ve ark., 2004). *S. lavandulifolia* ekstrelerinin paraoksonaz ile muamelesinde inhibisyon gözlenmedi. Dolayısıyla *S. lavandulifolia*'nın ilaç ve çay olarak kullanılması ateroskleroz açısından bir risk oluşturmayacaktır.

SONUÇ

S. lavandulifolia ekstraktlarının DPPH•, ABTS•+, FRAP ve CUPRAC ile antioksidan aktiviteleri ve antikolinerjik ve antiateroskleroz ile ilişkili enzimlerin inhibisyon potansiyeli belirlendi. Sonuçlar, *S. lavandulifolia* ekstraktlarının önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koydu. Ayrıca, *S. lavandulifolia* metanol ekstresi AChE üzerinde güçlü inhibisyon göstererek kolinerjik etkili bir drog olduğunu gösterdi. *S. lavandulifolia* metanol ekstraktında luteolin, fumarik asit, kafeik asit, siringik asit, hidroksibenzoik asit, kuersetin, salisilik asit, gallik asit, kateşin hidrat ve asetohidroksamik asit içeren fenolik bileşiklerin miktarı belirlendi. Bu fenolik bileşikler, *S. lavandulifolia*'nın biyoaktiviteye sahip olmasında önemli rol alırlar.

KAYNAKLAR

- Ahmadi, S. M., Farhoosh, R., Sharif, A. , & Rezaie, M. (2020). Structure-antioxidant activity relationships of luteolin and catechin. *Journal of food science*, 85(2), 298–305.
- Al-Mamary, M. A. & Moussa, Z. (2021). Antioxidant activity: The presence and impact of hydroxyl groups in small molecules of natural and synthetic origin. *Antioxidants—Benefits, Sources, Mechanisms of Action*, 318–377.
- Almasieh, M., Zhou, Y., Kelly, M. E., Casanova, C., & Di Polo, A. (2010). Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell death & disease*, 1(2), e27–e27.
- Apak, R., Güclü, K., Özyürek, M., & Celik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413–419.
- Avila, J. (2006). Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS letters*, 580(12), 2922–2927.
- Bahadori, M. B., Zengin, G., Dinparast, L., & Eskandani, M. (2020). The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*)-profiling phenolic and antioxidant activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 36, 101134.
- Bhattacharjee, R. (1980). Taxonomic studies in *Stachys*. II. A new infrageneric classification of *Stachys* L. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh.
- Bingol, M. N., & Bursal, E. (2018). LC-MS/MS analysis of phenolic compounds and in vitro antioxidant potential of *stachys lavandulifolia* vahl. var. *brachydon* boiss. *International Letters of Natural Sciences*, (72).
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200. doi:10.1038/1811199a0
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2011). Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta neuropathologica*, 121(5), 589–595.
- Bursal, E., Taslimi, P., Gören, A. C., & Gülçin, İ. (2020). Assessments of anticholinergic, antidiabetic, antioxidant activities and phenolic content of *Stachys annua*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 28, 101711.

- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, 132, 19–27.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., & Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(2), 194–195.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177.
- El-Ansari, M. A., Abdalla, M. F., Saleh, N. A. M., Barron, D., & Le Quéré, J.-L. (1991). Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 30(4), 1169–1173.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Elmastaş, M., Gülçin, I., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. I., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Analytical Letters*, 39, 47–65. doi:10.1080/00032710500423385
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Busni, D., Rabini, R. A. & Curatola, G. (2004). Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2957–2962.
- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2–3), 213–220.
- Güzel, A. (2023). Relationship Between Phenolic Content Determined by LC-MS/MS and Antioxidant Capacity and Enzyme Inhibition of *Cyclotrichium Niveum* L. *Chemistry & Biodiversity*, e202300027.
- Güzel, A., Noma, S. A. A., Şen, B., Kazancı, A., Tok, T. T., Kolaç, T., & Gök, Y. (2022). Synthesis, Characterization and Inhibitor Properties of Benzimidazolium Salts Bearing 4-(methylsulfonyl)benzyl Side Arms. *Journal of Molecular Structure*, 134320. doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2022.134320
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Karimi, A., Majlesi, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of nephro pharmacology*, 4(1), 27.
- Kaur, G., Shivanandappa, T. B., Kumar, M., & Kushwah, A. S. (2020). Fumaric acid protect the cadmium-induced hepatotoxicity in rats: owing to its antioxidant, anti-inflammatory action and aid in recast the liver function. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(10), 1911–1920.
- Kim, T. Y., Leem, E., Lee, J. M., & Kim, S. R. (2020). Control of reactive oxygen species for the prevention of parkinson's disease: The possible application of flavonoids. *Antioxidants*, 9(7), 583.
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P. & Zuo, L. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

- Maleki, N., Garjani, A., Nazemiyeh, H., Nilfouroushan, N., Sadat, A. T. E., Allameh, Z. & Hasannia, N. (2001). Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2–3), 213–218.
- Miyase, T., Yamamoto, R. & Ueno, A. (1996). Phenylethanoid glycosides from *Stachys officinalis*. *Phytochemistry*, 43(2), 475–479.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10), 1235–1247.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. doi:10.5264/eiyogakuzashi.44.307
- Özhatay, N. & Kültür, Ş. (2006). Check-list of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey III. *Turkish Journal of Botany*, 30(4), 281–316.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Swerdlow, R. H. (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 2(3), 347.
- Tundis, R., Bonesi, M., Pugliese, A., Nadjafi, F., Menichini, F. & Loizzo, M. R. (2015). Tyrosinase, acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) and its major constituents. *Records of Natural Products*, 9(1), 81.
- Uğur, Y. (2022). Extraction and Quantification of Melatonin in Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) By Ultra-fast Liquid Chromatography Coupled to Fluorescence Detector (UFLC-FD), *Acta Chromatographica* (published online ahead of print 2022). <https://doi.org/10.1556/1326.2022.01052>
- Uğur, Y. & Güzel, A. (2023). Determination of phytochemical content by LC-MS/MS, investigation of antioxidant capacity, and enzyme inhibition effects of nettle (*Urtica dioica*). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 27(5), 1793–1800. https://doi.org/10.26355/eurrev_202303_31540
- Verma, S. & Singh, S. P. (2008). Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World*, 1(11), 347–350. doi:10.5455/vetworld.2008.347-350
- Yamamoto, R., Miyase, T. & Ueno, A. (1994). Stachyssonins I–VIII, new oleanane-type triterpene saponins from *Stachys riederi* Chamisso. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(6), 1291–1296.