

Araştırma Makalesi/Research Article

***Tribulus Terrestris* Bitkisinin Farklı Ekstraktlarının Antioksidan ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Determination of Antioxidant and Some Biochemical Properties of Different Extracts of Tribulus Terrestris

Nazrin NAVROZLU¹, Müslüm KUZU²

Öz: Amaç: Bu çalışmada demir Tribulus terrestris (demir diken) bitkisinden elde edilen farklı ekstraktların (petrol eteri, kloroform, metanol, etanol) antioksidan ve toplam fenolik madde miktarını belirlendi. Gereç ve Yöntem: Ekstraktların antioksidan aktiviteleri CUPRAC, FRAP, DPPH ve ABTS yöntemleriyle incelendi. Bunun yanında asetilkolin esteraz (AChE) ve bütirilkolin esteraz (BChE) aktiviteleri üzerine etkileri in vitro olarak değerlendirildi. Bulgular: Elde edilen bulgulara göre toplam fenolik madde miktarı en fazla olan ekstraktın metanol ekstraktı olduğu görüldü (63,59±4,33 µg gallik asit/mg ekstrakt). CUPRAC indirgeme kapasitesi bakımından standart antioksidanlara kıyasla düşük olmakla birlikte ekstraktlar arasında en güçlü etkiye metanol ekstraktının olduğu belirlendi. FRAP yöntemine göre yine metanol ekstraktı 1,47 µmol Fe²⁺/mg ekstrakt değeri ile en yüksek indirgeme kapasitesine sahipti. Benzer sonuçlar radikal giderme etkilerinde de görüldü. Hem DPPH hem de ABTS yöntemlerine göre radikal giderme kapasitesi en yüksek olan metanol ekstraktı idi. DPPH yöntemine göre 24,39 µg/mL IC₅₀ değeri ile, ABTS yöntemine göre ise 0,47 µg/ µg ekstrakt değerleri ile bu etkiyi gösterdi. Enzim inhibisyon sonuçlarına bakıldığında AChE enzimi için 17,29 µg/mL, BChE için 18,23 µg/mL IC₅₀ değeri ile en güçlü inhibisyon etkisinin yine metanol ekstraktına sahip olduğu görüldü. Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre demir diken bitkisinden elde edilen ekstraktların antioksidan etki gösterdiği, AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi ile Alzheimer hastalığı tedavisinde bir seçenek olabileceği noktasında ön bilgiler elde edilmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Asetilkolin esteraz, Bütirilkolin esteraz, Tribulus terrestris.

Abstract: Objective: This study determined the antioxidant and total phenolic substance amounts of different extracts (petroleum ether, chloroform, methanol, ethanol) obtained from the iron Tribulus terrestris plant. Methods: Antioxidant activities of the extracts were examined using CUPRAC, FRAP, DPPH, and ABTS methods. In addition, its effects on acetylcholine esterase (AChE) and butyrylcholine esterase (BChE) activities were evaluated in vitro. Results: According to the findings, methanol extract had the highest total phenolic substance amount (63.59±4.33 µg gallic acid/mg extract). In terms of CUPRAC reducing capacity, it was determined that methanol extract had the most substantial effect among the extracts, although it was lower than standard antioxidants. According to the FRAP method, methanol extract had the highest reduction capacity with a 1.47 µmol Fe²⁺/mg extract value. Similar results were seen with radical scavenging effects. It was the methanol extract with the highest radical scavenging capacity, according to DPPH and ABTS methods. It showed this effect with an IC₅₀ value of 24.39 µg/mL according to the DPPH method and an extract value of 0.47 µg/µg according to the ABTS method. When the enzyme inhibition results were examined, it was seen that the methanol extract had the most potent inhibition effect with an IC₅₀ value of 17.29 µg/mL for the AChE enzyme and 18.23 µg/mL for BChE. Conclusions: According to the results obtained, evidence was obtained that the extracts obtained from the iron thistle plant have an antioxidant effect and may be an option in the treatment of Alzheimer's disease with their inhibition effect on AChE and BChE enzyme activities.

Keywords: Antioxidant, Acetylcholine esterase, Butyrylcholine esterase, Tribulus terrestris.

¹Yüksek Lisans Öğrencisi, Karabük Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, ORCID: 0009-0003-5341-9948, nezr.rin@gmail.com

²MSc Student, Karabük University, Postgraduate Education Institute

³Sorumlu Yazar Prof. Dr., Karabük Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, ORCID: 0000-0002-1375-7673, muslumkuzu@karabuk.edu.tr
Prof. Dr., Karabük University, Faculty of Health Sciences

Giriş

Son zamanlarda araştırmacıların dikkati tıbbi bitkiler üzerine yoğunlaşmış ve bazı biyolojik etkilerinin ortaya konması için yapılan araştırma sayıları giderek artmıştır. Bu bitkilerin ihtiva ettikleri fenolik ve flavonoidler gibi sekonder metabolitleri sayesinde oksidatif stres kaynaklı bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabilmesi ortaya konmuştur (Taşkın vd., 2022). Normal metabolik faaliyetlerin bir sonucu olarak da ortaya çıkabilecek olan reaktif nitrojen ve oksijen türlerinin, bunun yanında serbest radikallerin gideriminde antioksidanlar büyük önem taşır. Bu nedenle yaşlanma, kanser, kalp damar hastalıkları kanser, inflamasyon gibi hastalıkların gelişiminde merkezi rol alan serbest radikallerin neden olduğu hasarlara karşı antioksidanlar koruma sağlar (Budak ve Öztürk Sarıkaya, 2022). Doğal antioksidanlar büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklardan elde edilir. Bitkilerden elde edilen bu içeriklerde bulunan antioksidanlar, elde edilen bitkinin türüne, elde edilme yöntemine ve yetiştiği yerin özelliklerine göre değişiklik gösterebilmektedir ve içerikleri bitki türüne, çeşitliliğine, ekstraksiyon ve/veya işleme yöntemlerine ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişir (Zehiroğlu ve Öztürk Sarıkaya, 2019).

Antioksidanlar Alzheimer hastalığının (AD) dahil olduğu majör dejeneratif hastalıkların geciktirilmesinde veya önlenmesinde çok önemli bir rol oynar (Topal ve Gulcin, 2020). Beyinde asetilkolin (ACh) ve bütirilkolin (BCh), sırasıyla asetilkolin esteraz (AChE) ve bütirilkolin esteraz (BChE) enzimleri tarafından hidrolitik olarak parçalanır. AChE, AD'den mustarip hastalarda beyin dokusunda BChE'den daha yaygın olarak bulunur. Temporal lob ve hipokampusta AChE aktivitesi AD'nin ilerlediği durumlarda normale oranla %67, BChE aktivitesi ise %165 kadar artış bildirilmiştir (Durmaz vd., 2023). AD'nin ana nedenlerden biri kolinerjik iletim defektleridir. Bu nedenle AD tedavisindeki yaklaşımlardan biri kolinerjik iletimi artıran asetilkolinesteraz inhibitörlerinin (AChEI'ler) kullanımı olmuştur. Bu amaçla kullanılan inhibitörlerden biri takrin'dir. Ancak takrin için ciddi hepatotoksik etkilerinin yanında mide bulantısı, kusma, kilo kaybı, mide rahatsızlığı, ajitasyon, deri döküntüsü, ishal ve titreme gibi durumlara neden olduğu bildirilmiştir. Halihazırda kullanılan ilaçlar için de yan etkilerinin olduğu ifade edilmektedir (Topal ve Gulcin, 2020).

Demir diken (Tribulus terrestris), Zygophyllaceae familyasına ait ve 20 üyesi bulunan Tribulus cinsi bir bitkidir. Bitki tek başına tek bir terapötik ajan olarak veya birçok bileşik formülasyonunun gıda takviyesinin ana veya alt bileşeni olarak kullanılır (Chhatre vd., 2014). Bu bitki yüzlerce yıldır geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin ana aktif fitokimyasalları arasında flavonoidler, alkaloidler, saponinler, lignin, amidler

ve glikozitler bulunmaktadır (Shahid vd., 2016). Daha önce yapılan çalışmalarda bu bitkinin farklı kısımlarından elde edilen ekstraktların afrodisyak (Singh vd., 2012), antiürolitik (Anand vd., 1994), immünomodülatör (Tilwari vd., 2011), antidiyabetik (Amin vd., 2006), antihiperlipidemik (Khan vd., 2011), vazodilatör ve antihipertansif (Phillips vd., 2006) gibi birçok özellikleri ortaya konmuştur.

Doğal olarak yetenekli organizmalar olan bitkilerin ihtiva ettikleri fitokimyasallar gıda ilaç ve kozmetik başta olmak üzere endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekstraksiyon işlemleri, bitki materyallerinin ihtiva ettikleri önemli doğal molekülleri ayırmak için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir (Aydın vd., 2021). Bitkilerden elde edilen farklı ekstraktlardaki antioksidan kapasitelerin belirlenmesi fizyolojik olarak fonksiyonlarının kanıtlanabilmesi için oldukça önemlidir (Budak ve Öztürk Sarıkaya, 2022). Yapılan bu çalışmada da demir diken bitkisinin yaprak ve çiçek kısımlarını içeren preparatlardan etanol, metanol, kloroform ve petrol eteri çözücüleri kullanılarak maserasyon yöntemi ile ekstraktları elde edilmesi, elde edilen bu ekstraktların toplam fenolik madde içeriği, FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile indirgeme yetenekleri, DPPH[•] ve ABTS^{•+} radikal giderme kapasitelerinin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca ekstraktların in vitro olarak AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi.

Gereç ve Yöntem

Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan etanol, kloroform ve petrol eteri Isolab (Isolab Laborgeräte GmbH, Germany)'dan, Folin-Ciocalteu's phenol, FeCl₃ Merck'ten (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), diğer çözücü ve kimyasallar Sigma'dan (Sigma-Aldrich, Germany) ticari olarak analitik saflıkta satın alınmıştır. Enzimler yine ticari olarak Sigma'dan temin edildi.

Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan demir diken bitkisi Azerbaycan'ın Bakü şehrinde bir aktardan ticari olarak satın alındı.

Ekstraksiyon İşlemi

Öğütücü kullanılarak bitkiden 50 g alınarak öğütülmüştür. Her birini 5g olmak üzere 4 erlene alınmış ve üstüne 50 mL çözücü eklenmiştir. 24 saat boyunca karanlıkta ve ağzı kapalı olarak bekletildi. Burada çözelti olarak etanol, methanol, petrol eteri ve kloroform kullanılmıştır. Ekstreler Whatman tipi süzgeç kâğıdından süzülerek işlemler beş defa tekrarlandı. Elde edilen ve bitki içeriklerini ihtiva eden çözeltide çözücüler rotary evaporatör

ile uzaklaştırıldı. Böylece dört farklı çözücü ile demir diken metanol (DTM), etanol (DTE), kloroform (DTK) ve petrol eteri (DTP) ekstraktlar elde edildi.

Toplam Fenolik Madde Tayini

Bu çalışmada hazırladığımız bitki ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi (Singleton vd., 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit (GA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda gallik asit kullanılarak yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafik yardımıyla bitki ekstraktlarından bulunan toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri cinsinden verildi.

FRAP İndirgeme Kapasitesi Tayini

İlk olarak 0,3 M sodyum asetat tamponu (pH: 3,6), 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridil)-s-triazine (TPTZ) çözeltisi, 20 mM FeCl₃, 2 mM FeSO₄ çözeltileri hazırlandı. Tampon çözelti, TPTZ ve FeCl₃ çözeltilerinin sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılması sonucu çalışma çözeltisi elde edildi. 2 mM FeSO₄ çözeltisi ile 593 nm'de absorbans ölçümleri yapılarak standart bir grafik elde edildikten sonra numuneler için de en az üç farklı konsantrasyonda ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlar mg ekstrakt/ μ mol Fe²⁺ eşdeğeri olarak verildi (Sachett vd., 2021).

CUPRAC İndirgeme Kapasitesi Tayini

Bu metotta daha önce bildirilen yöntemin kısmen modifiye edilmiş hali kullanıldı. Buna göre hazırladığımız bitki eksterelerinden farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40 μ g) tüplere alındı. Üzerine 0,25 mL CuCl₂ çözeltisi (0,01 M), 0,25 mL etanolik neokuprin çözeltisi ve 0,25 mL CH₃COONH₄ tampon çözeltileri (1 M) eklendi. 30 dakika karanlıkta beklettikten sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. (Ak ve Gülçin, 2008). Ölçüm değerleri troloks, gallik asit ve bütilhidroksianisol (BHA) gibi standart antioksidanlar ile kıyaslanarak sonuçlar verildi.

ABTS⁺ Radikal Giderme Kapasitesi Tayini

ABTS⁺ radikal giderimi etkisi Re vd. (1999)'nin belirttiği şekilde yapıldı. Buna göre 7 mM ABTS ve 245 mM amonyum persülfat hazırlandıktan sonra sırasıyla 100:1 oranında karıştırılarak ABTS⁺ radikali hazırlandı. 12 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 734 nm'de absorbası yaklaşık 700 olacak şekilde bu çözelti seyreltilerek kullanıldı. Burada troloks standart olarak kullanıldı ve en az beş farklı konsantrasyonda ölçümler yapılarak standart eğri elde edildi. Ekstraktlarda ise en az üç farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Sonuçlar troloks eşdeğeri olarak verildi.

DPPH• Radikal Giderme Kapasitesi Tayini

DPPH• radikal giderme kapasitesinin belirlenmesinde Blois'in yöntemi kullanıldı (Blois, 1958). 2,24 mg/mL konsantrasyonda 2,2-Difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) çözeltisi taze olarak etanol kullanılarak hazırlandı. Ölçümler 517 nm'de yapıldı. Ekstrakt yerine etanol kullanılarak yapılan ölçüm sonucu %100 alınarak ekstrakt içeren ölçümler neticesinde elde edilen sonuçlar için % Absorbans değerleri belirlendi. Bu değerler kullanılarak %Absorbans-[Ekstrakt] grafiği çizilerek %50'nin altına inen ekstraktlar için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Enzim Aktivite Ölçümü

AChE ve BChE enzim aktiviteleri Ellman vd. (1961) tarafından bildirilen metodun kısmi modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Buna göre asetiltiyokolin iyodür ve 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik) kullanılarak 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

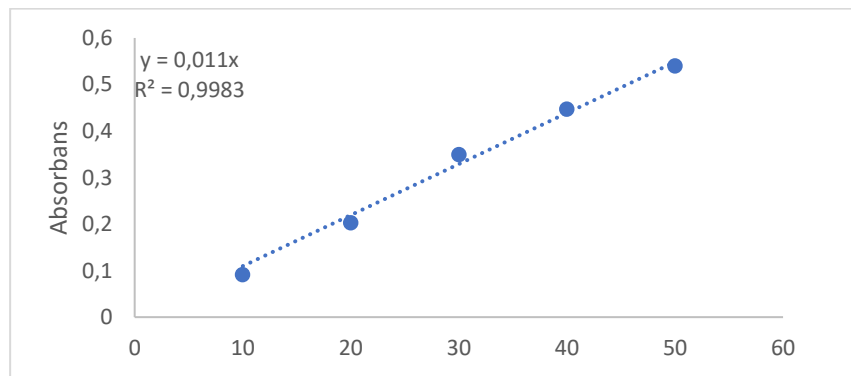
Kinetik Çalışmalar

Çalışma kapsamında elde edilen ekstraktların AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması için en az beş farklı konsantrasyondan aktivite ölçümleri yapıldı. Kontrol ölçümleri %100 alınarak farklı ekstrakt konsantrasyonlarında yapılan ölçümlerin % aktiviteleri hesaplandı. Ekstrakt konsantrasyonuna karşılık % Aktivite grafikleri çizilerek %50 aktivitenin altına düşen ölçümler için IC₅₀ değerleri hesaplandı (Akyol ve Kuzu, 2017).

Bulgular

Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları

Ekstraktlardaki toplam fenolik madde içeriği spektrofotometrik olarak belirlendi ve gallik asit eşdeğeri cinsinden verildi (Tablo 1). Gallik asit hesaplanmasında hazırlanan standart grafik kullanıldı (Şekil 1). Buna göre toplam fenolik madde içeriği en fazla olan metanol ekstraktı idi.



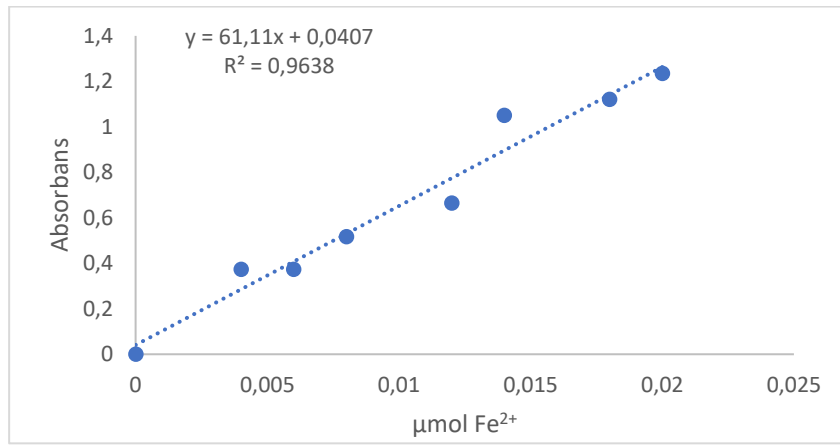
Şekil 1. Gallik Asit Hesaplanmasında Kullanılan Standart Grafik

Tablo 1: Ekstraktların Toplam Fenolik Madde İçerikleri

Ekstrakt	Toplam Fenolik Madde (μg gallik asit/mg ekstrakt)
DTE	53,84 \pm 3,34
DTM	63,59 \pm 4,33
DTK	46,87 \pm 12,69
DTP	8,3 \pm 2,15

İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları

Ekstraktlarda indirgeme kapasitesi FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile belirlendi. FRAP tayini sonuçları $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg ekstrakt cinsinden verildi. Hesaplamalarda Fe^{2+} için hazırlanan standart grafik kullanıldı (Şekil 2).

**Şekil 2.** Fe^{2+} Eşdeğeri Hesaplamasında Kullanılan Standart Grafik

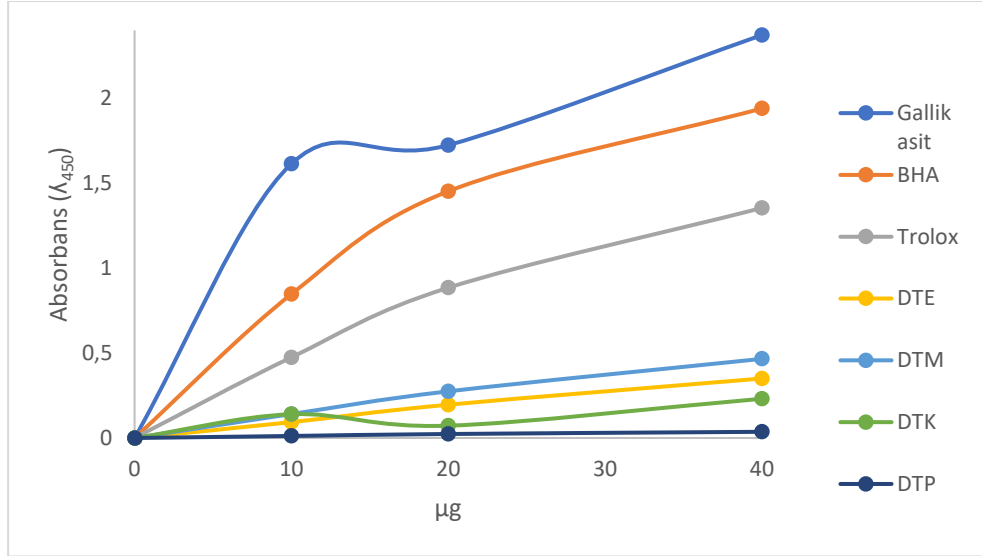
FRAP yöntemine göre indirgeme kapasitesi en yüksek ekstraktın DTM olduğu görüldü (Tablo 2).

Tablo 2: Ekstraktların FRAP Analizi Sonuçları

Ekstrakt	Fe^{2+} eşdeğeri ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg ekstrakt)
DTE	0,84
DTM	1,47
DTK	0,62
DTP	0,027

CUPRAC yöntemi ile belirlenen indirgeme kapasiteleri troloks, GA ve BHA standart antioksidanları ile karşılaştırılarak verildi. Her standart antioksidan ve ekstrakt için üç farklı konsantrasyondan ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre 30 μg ihtiva eden kuyucuklardaki ölçümler kıyaslandığında CUPRAC yöntemine göre indirgeme kapasiteleri GA>BHA>Troloks>DTM>DTE>DTK>DTP şeklinde idi. Buna göre ekstraktlar içinde

CUPRAC yöntemine göre en yüksek indirgeme kapasitesine sahip ekstraktın DTM olduğu görüldü (Şekil 3).



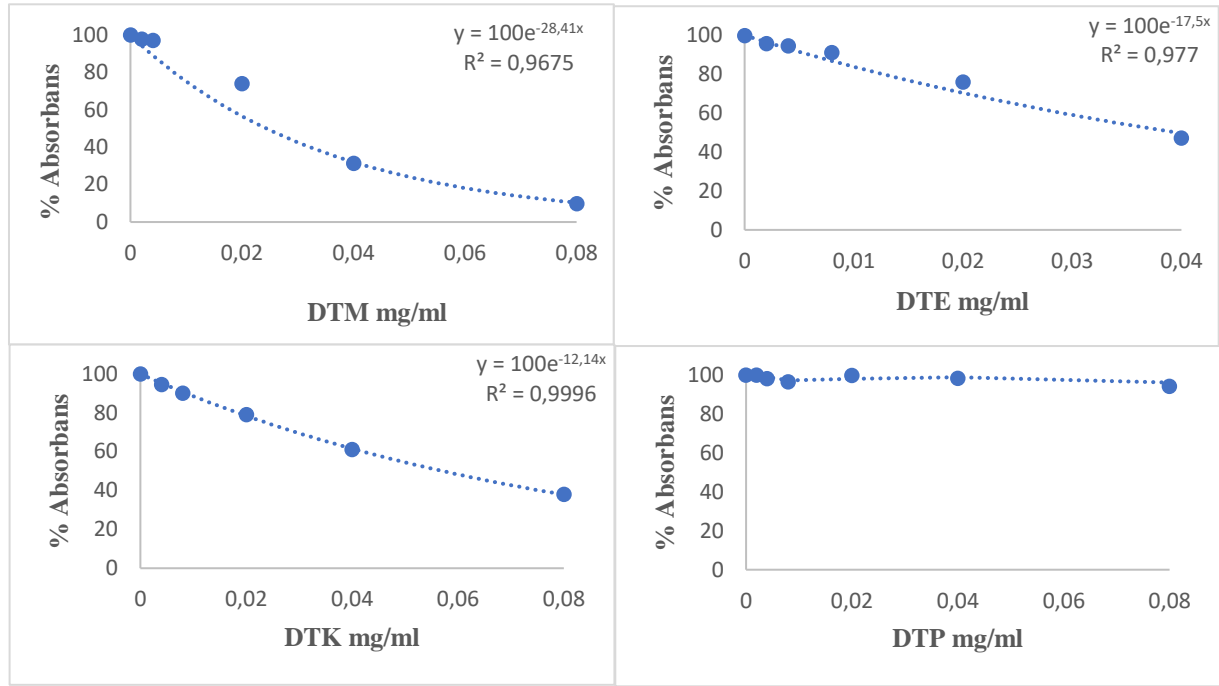
Şekil 3. CUPRAC Yöntemine Göre İndirgeme Kapasiteleri

Radikal Giderme Kapasitesi Tayini Sonuçları

Çalışma kapsamında elde edilen ekstraktların DPPH[•] ve ABTS^{•+} radikal giderme kapasiteleri incelendi. DPPH radikal giderme aktivitesinin belirlenmesi amacıyla en az beş farklı ekstrakt konsantrasyonunda ölçümler yapıldı. Kontrol ölçümüne göre absorbans değerini yarıdan daha aza düşüren ekstraktlar için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Buna göre DTM ekstraktının 24,39 µg/mL IC₅₀ değeri ile en güçlü DPPH[•] radikali giderme kapasitesine sahip olduğu görüldü. Buna karşın DTP ekstraktının DPPH[•] radikal giderme aktivitesine sahip olmadığı belirlendi (Tablo 3, Şekil 4).

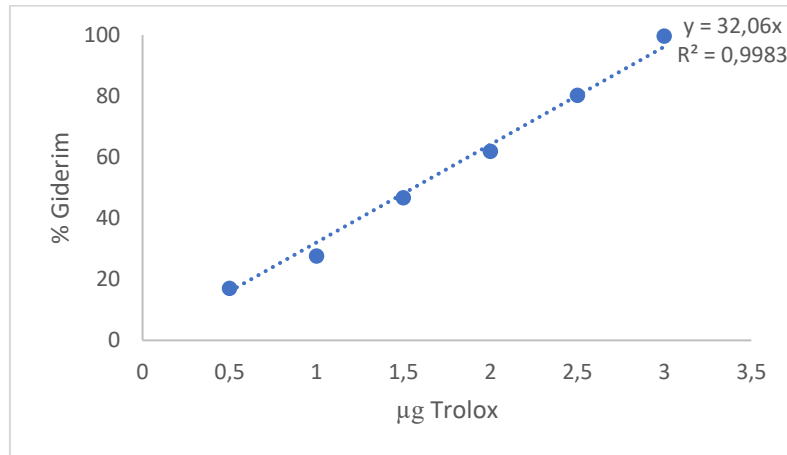
Tablo 3: Ekstraktların DPPH[•] Radikal Giderme Aktivitelerine Ait IC₅₀ Değerleri

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/mL)
DTE	39.6
DTM	24.39
DTK	57.09
DTP	-



Şekil 4. Ekstraktların DPPH• Radikal Giderme Kapasiteleri

Ekstraktlarda ABTS^{•+} radikal giderme etkileri belirlenerek sonuçlar troloks eşdeğeri olarak verildi. Bu amaçla ilk önce troloks standart grafiği hazırlandı (Şekil 5) ve grafik denkleminde numuneler için troloks eşdeğerleri hesaplandı. Elde edilen verilere göre ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi en yüksek olan ekstraktın DTM, en düşük olduğu ekstraktın ise DTP olduğu belirlendi (Tablo 4).



Şekil 5. Trolox Standart Grafiği

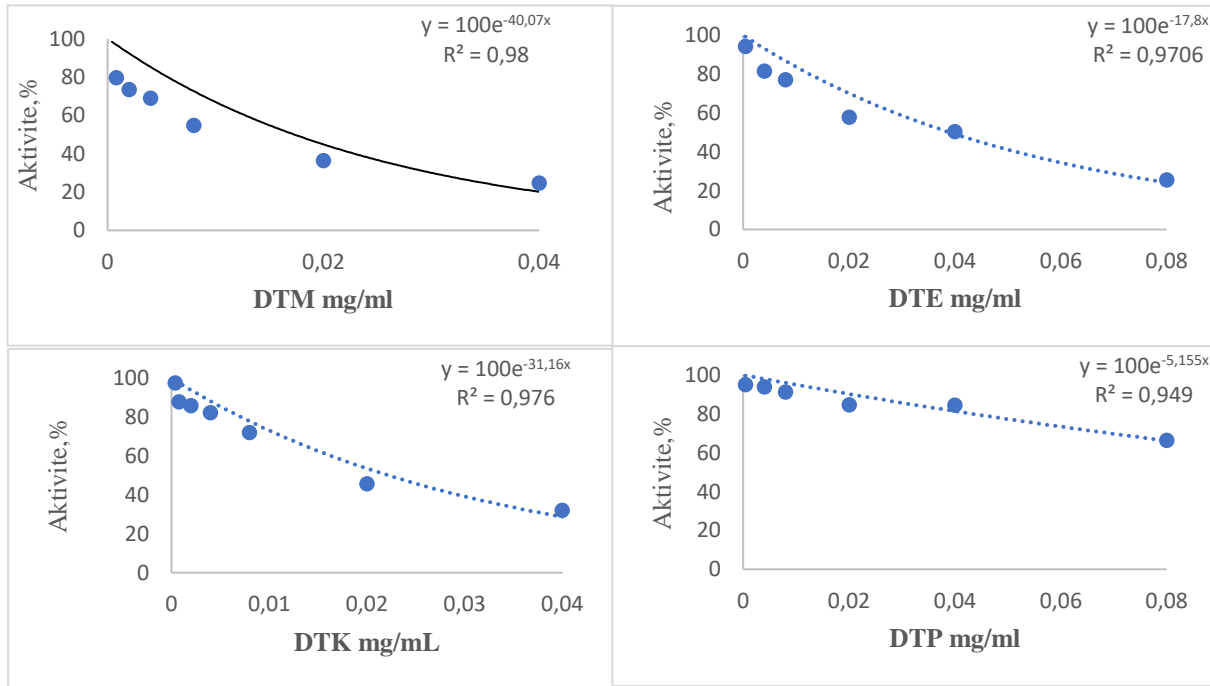
Tablo 4: Ekstraktların ABTS⁺ Radikal Giderme Aktivitelerine Ait Trolox Eşdeğerleri

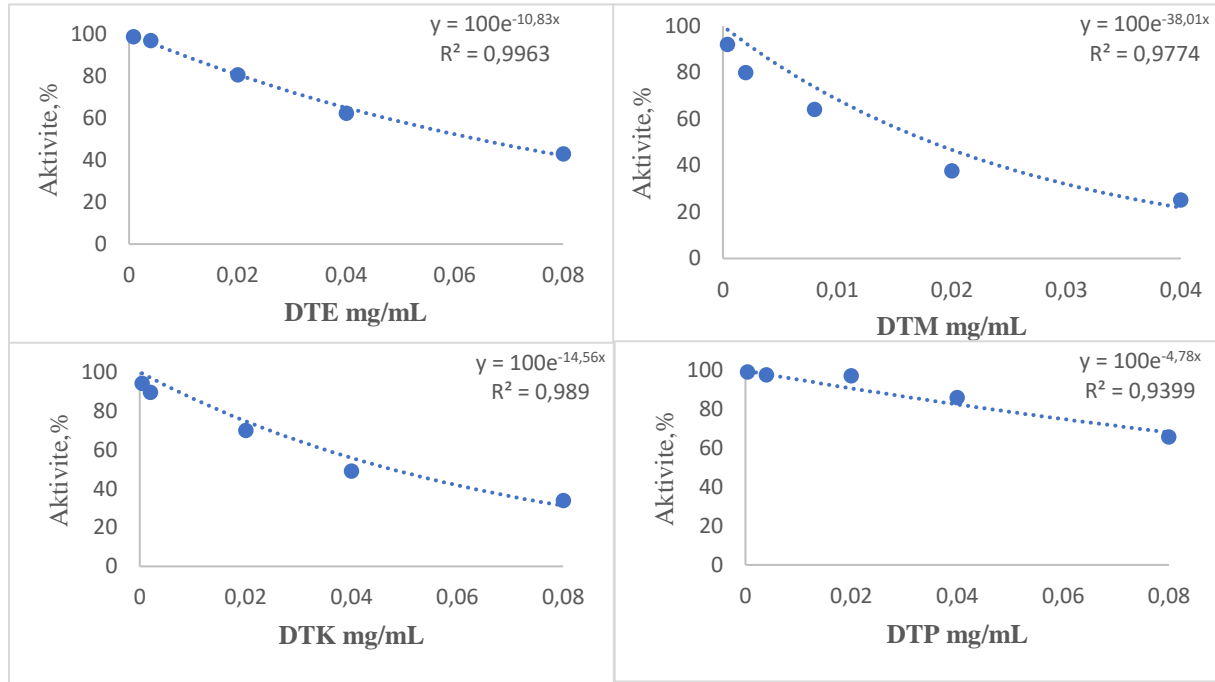
Ekstrakt	Trolox Eşdeğeri (µg/ µg ekstrakt)
DTE	0,385
DTM	0,47
DTK	0,283
DTP	0,0787

Ekstraktların AChE ve BChE Aktiviteleri Üzerine Etkileri

Ekstraktların AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla en az beş farklı ekstrakt konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılarak % Aktivite – ekstrakt konsantrasyonu grafikleri çizildi. Grafik denklemleri kullanılarak inhibisyon etkisi gösteren ekstraktlar için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre ekstraktların AChE enzimi inhibisyonuna ait IC₅₀ değerleri DTM için 17,29 µg/mL, DTK için 22,24 µg/mL ve DTE için 38,94 µg/mL şeklinde idi. Ayrıca DTP ekstraktının DTP 0-80 µg/mL konsantrasyonu aralığında inhibisyon etkisine bakıldığında aktiviteyi %33,54 inhibe ettiği, %50 aktivitenin altına düşülemediğinden DTP için IC₅₀ değeri hesaplanmadı (Şekil 6).

Ekstraktların BChE enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde inhibisyon etkisi en güçlü olan ekstraktın 18,23 µg/mL IC₅₀ değeri ile DTM'nin olduğu görüldü. DTK ekstraktı için bu değer 47,6 µg/mL iken DTE ekstraktı için 64,25 µg/mL şeklinde idi. 0-80 µg/mL konsantrasyon aralığında % Aktivite değeri %50'nin altına düşmediğinden DTP için IC₅₀ değeri hesaplanamadı (Şekil 7).

**Şekil 6.** AChE Enzimi Üzerine İnhibisyon Gösteren DT Ekstreleri İçin Aktivite (%) Grafikleri



Şekil 7. BChE Enzimi Üzerine İnhibisyon Gösteren DT Ekstreleri İçin Aktivite (%) Grafikleri

Tartışma

Çalışma kapsamında demir diken bitkisinin yaprak ve çiçek kısımları karıştırılarak hazırlanan preparatlardan metanol, etanol, kloroform ve petrol eteri çözücülerini kullanılarak maserasyon yöntemi ile ekstraktları elde edildi. Elde edilen bu ekstraktlarda toplam fenolik madde tayini yapıldı. Ayrıca FRAP ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak indirgeme kapasiteleri, DPPH ve ABTS radikal giderme yöntemleri kullanılarak da radikal giderme kapasiteleri incelendi. Ayrıca ekstraktların kolinerjik sistemin önemli bileşenleri olan AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine in vitro etkileri incelendi. % Aktivite-[ekstrakt] grafikleri çizilerek inhibisyon etkisi gösterenler ekstraktlar için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Bitkisel ekstraktlarda bulunan fitokimyasallar benzersiz fonksiyonel gruplara sahip biyoaktif maddelerdir. Bu fitokimyasallar antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve immün sistemi uyarıcı özelliklere sahiptir. Bitkisel ekstraktlar polifenolik bileşikler başta olmak üzere polisakkaritleri, alkaloidleri ve saponinleri içerir (Piao vd., 2023). Yapılan çalışmada demir diken bitkisinde elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde tayini yapıldı ve gallik asit eşdeğeri olarak sonuçlar verildi. En yüksek fenolik madde içeriğine sahip ekstraktın DTM olduğu ve 63,59±4,33 µg gallik asit/mg ekstrakt eşdeğeri olduğu bulundu. Zheleva-Dimitrova vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada demir diken bitkisinin ticari olarak satılan üç farklı preparatında toplam fenolik madde miktarı belirlenmiş ve pirogallol eşdeğeri olarak vermişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre en yüksek preparatın bir mg ekstraktın 31,7 µg

pirogallol eşdeğeri olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonucun toplam fenolik madde ile FRAP analizleri arasındaki korelasyonu ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da antioksidan kapasiteler ve toplam fenolik madde içerikleri açısından bir uyumun olduğu görülmektedir.

Demir diken bitki ekstraktlarının FRAP ve CUPRAC indirgeme kapasitelerine bakıldığında her iki yöntemle göre de indirgeme kapasitesi en yüksek ekstraktın 1,47 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ ekstrakt değeri ile DTM olduğu görüldü. Ancak Abbas ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada demir diken bitkisi metanol ekstraktının 4,1 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ ekstrakt eşdeğeri olduğunu bildirmişlerdir (Abbas vd., 2022). Bu değer bizim elde etmiş olduğumuz değerle kıyaslandığında fazla olduğu görülmektedir. Bir diğer çalışmada ise Türkiye-Nevşehir bölgesinden toplanan bitkinin maserasyon yöntemi ile etil asetat, metanol ve su ekstraktları elde edilmiş ve CUPRAC indirgeme aktivitesi troloks eşdeğeri olarak verilmiştir. Buna göre metanol ekstraktı CUPRAC indirgeme gücü açısından etil asetatın ikinci sırada yer almış ve $60,21 \pm 1,64$ mg troloks eşdeğeri/g ekstrakt olarak vermişlerdir (Uysal vd., 2023). Bizim elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre de metanol ekstraktı diğer ekstraktlara kıyasla daha yüksek CUPRAC indirgeme kapasitesine sahiptir. Tian vd. (2019) de Tribulus terrestris yapraklarından elde edilen etanol ekstraktlarının hafif bir antioksidan aktivite gösterdiğini, ilaç ve gıda endüstrileri için doğal, çevresel ve sağlıklı antioksidanların araştırılması ve geliştirilmesi için aday olabileceğini ifade etmişlerdir (Tian vd., 2019).

Yapılan çalışmada hem DPPH hem de ABTS radikal giderme yöntemlerinde en yüksek radikal giderme kapasitesine sahip ekstraktın DTM olduğu görüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda polaritesi daha yüksek çözücüler ile radikal temizleme potansiyeline sahip olduğuna inanılan polar fonksiyonel gruplarına polifenolik yapıların ekstraksiyonunun daha fazla olduğuna atfedilebileceği ifade edilmektedir. Çünkü bu tür fitokimyasalların hidrojen iyonları vererek reaktif oksijen türlerinin süpürülmesini ve böylece sağlığa zararlı zincir reaksiyonlarının önlediği bildirilmektedir (Amorati ve Valgimigli, 2016). Abbas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise demir diken metanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktivitesine ilişkin IC_{50} değerinin 332,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğu bildirilmiştir (Abbas vd., 2022). Bizim çalışmamızda ise elde edilen metanol, etanol ve kloroform ekstraktları sırasıyla 24,36, 39,6 ve 57,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IC_{50} değerleriyle daha güçlü radikal süpürücü etkiye sahip olduğu görüldü. Bunun nedeni bitkinin yetiştiği yere, ortama ve toplanma zamanı, kurutma proseslerindeki farklılıklara bağlı olarak bitki içeriğindeki fitokimyasal türü ve miktarının değişiklik gösterebileceği ile açıklanabilir. Uysal ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ABTS radikal giderme

aktivitesini maserasyon yöntemi ile elde ettikleri etil asetat ve metanol ekstraktlarında belirlemişler ve sırasıyla, $26,85 \pm 0,82$ ve $37,75 \pm 0,74$ mg troluks/g ekstrakt olarak vermişlerdir (Uysal vd., 2023). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre ise metanol ekstraktı $0,47$ mg troluks/mk ekstrakt olarak bulundu. Buna göre ABTS radikal giderme aktivitesinin çalışmamızda elde edilen ekstrakta daha fazla olduğu söylenebilir. Uysal ve arkadaşları ekstraktların sahip oldukları antioksidan kapasitelerini fenolik madde içeriklerine atfetmişlerdir. Gerçekten de kendilerinin yapmış oldukları çalışmada metanol ekstraktı toplam fenolik madde içeriğinin $18,61$ mg gallik asit/g ekstrakt olarak vermişler bizim elde ettiğimiz ekstrakta ise bu değer $63,59$ mg gallik asit/g ekstrakt idi. ABTS radikal giderme aktivitesindeki bu artış toplam fenolik madde içeriği ile de doğrulanmış oldu.

AD patolojisini açıklamada bir teori olarak antioksidan aktivite ile inflamatuvar yanıtlardan kaynaklanan ve bunları şiddetlendiren oksidatif stres arasındaki dengesizlik öne sürülmüş, halihazırda bu teorini doğruluğu üzerinde kanıtlar vardır. Bu kanıtlar AD nörodejenerasyonuna yol açan yavaş olaylar zincirinin suçluları olarak oksidasyon ve inflamasyona işaret etmektedir (Korcowska-Laçka vd., 2023). Oksidatif strese bağlı nörodejeneratif bozuklukların da dahil olduğu birçok hastalığın tedavisinde antioksidan kullanımının faydalı etkileri daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konduğu bilinmektedir çalışmalarda araştırılmış ve olumlu sonuçlar ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra sentetik ilaç kullanımına ait yan etkilerin bildirilmesi, bitkisel ürünlere ulaşılabilirliğin daha kolay olması ve sürdürülebilirlik açısından ilaç ve sağlık ürünlerinin geliştirilmesinde bitkisel kaynaklar büyük önem arz etmektedir (Çomaklı vd., 2023). Dünya çapında toplumlara ve sağlık sistemlerine önemli bir yük getiren AD'nin patogenezi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri geliştirmek önemlidir. Bu nedenle AD klinik tedavisinde hedef enzimler olan AChE ve BChE enzimlerine yönelik yeni ve güçlü inhibitörlerin keşfedilmesi gerekliliği ifade edilmektedir (Çomaklı vd., 2024). Yapılan çalışmada elde edilen bitki ekstraktlarının kolinerjik sistemin önemli bileşenleri olan AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlara göre DTP ekstraktı hariç diğer ekstraktların her iki enzim üzerine de kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Her iki enzim için en güçlü inhibisyon etkisine sahip ekstraktın AChE için $17,29$ $\mu\text{g/mL}$, BChE için $18,23$ $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile DTM olduğu görüldü. Daha önce yapılan bir çalışmada Pekin'de bir firmadan ticari olarak satın alınan demir diken bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının AChE için IC_{50} değerinin 5 mg/mL 'den yüksek bulunduğu ifade edilmiştir (Song vd., 2020). Bir diğer çalışmada ise Yalova civarında toplanan bitkinin kloroform:metanol (1:1) ekstraktının AChE ve BCHE

enzimlerini 1 mg/mL konsantrasyonda sırasıyla %37,89 ve %78,32 inhibe ettiği bildirilmiştir (Orhan vd, 2004). *Terminalia citrina* bitkisi su ve etanol ekstraktının enzimler üzerine etkileri incelenmiş, AChE ve BChE için su ekstraktı IC₅₀ değerleri sırasıyla 130,90 mg/mL ve 279,70 mg/mL, etanol ekstraktı IC₅₀ değerleri 94,87 mg/mL ve 262,55 mg/mL olarak bildirilmiştir (Özler vd., 2023). Başka bir çalışmada ise *Aegle marmelos* yapraklarından elde edilen metanol ekstraktının 200 µg/mL derişimde AChE enzimini %35,78 inhibe ettiği belirlenmiştir (Asaduzzaman vd., 2014). Bu çalışmalarla kıyaslandığında bizim elde etmiş olduğumuz ekstraktların her iki enzim için de daha kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği söylenebilir.

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak yapılan çalışma kapsamında demir diken bitkisinin metanol, etanol, kloroform ve petrol eteri ekstraktlarının toplam fenolik madde tayinleri ve antioksidan kapasiteleri belirlenmiş, AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Böylece ekstraktların AD hastalığı tedavisinde kullanılabilirliği için ön veriler ortaya konmuştur. Bununla birlikte ekstraktların içeriğinde bulunan fitokimyasalların karakterize edilerek etken maddelerin belirlenebilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca in vivo deneyler ile etkinliklerinin belirlenmesi de önem arz etmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Yazar Katkıları: Fikir: MK; Tasarım/Dizayn: NN, MK; Denetleme: MK; Veri toplanması ve/veya işleme: NN, MK; Analiz ve/veya yorum: NN, MK; Literatür Taraması: NN; Yazıyı yazan: NN, MK; Eleştirel inceleme: MK

Hakem Değerlendirmesi: İç/Dış bağımsız.

Kaynaklar

- Abbas, M. W., Hussain, M., Akhtar, S., Ismail, T., Qamar, M., Shafiq, Z., & Esatbeyoglu, T. (2022). Bioactive compounds, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, and toxicity assessment of *Tribulus terrestris*— in vitro and in vivo studies. *Antioxidants*, 11(6), 1160. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11061160>
- Ak, T., & Gülçin, I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological interactions*, 174(1), 27-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>
- Akyol, H., & Kuzu, M. (2017). In vitro effects of some heavy metal ions on cytosolic thioredoxin reductase purified from rainbow trout gill tissues. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26, 4677-4683.
- Amin, A. M. R., Lotfy, M., Shafiullah, M., & Adeghate, E. (2006). The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1084(1), 391-401. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1372.005>
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2018). Methods to measure the antioxidant activity of phytochemicals and plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3324-3329. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01079>
- Anand, R., Patnaik, G. K., Kulshreshtha, D. K., & Dhawan, B. N. (1994). Activity of certain fractions of *Tribulus terrestris* fruits against experimentally induced urolithiasis in rats. *Indian journal of experimental biology*, 32(8), 548-552. <https://europemc.org/article/med/7959935>
- Asaduzzaman, M., Uddin, M. J., Kader, M. A., Alam, A. H. M. K., Rahman, A. A., Rashid, M., ... & Sadik, G. (2014). In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and the antioxidant properties of *Aegle marmelos*

- leaf extract: implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*, 14(1), 1-10. <http://dx.doi.org/10.1111/psyg.12031>
- Aydın, F. G., Türkoğlu, E. A., Kuzu, M., & Taşkın, T. (2021). In vitro carbonic anhydrase inhibitory effects of the extracts of *Satureja cuneifolia*. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 8(4), 1146-1150. <http://dx.doi.org/10.30910/turkjans.980819>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Budak, B., & Öztürk Sarıkaya, S. B. (2022). Spirulina: Properties, Benefits and Health-Nutrition Relationship. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11(4), 1654-1662. <http://dx.doi.org/10.37989/gumussagbil.1200004>
- Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D., & Sathaye, S. (2014). Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Pharmacognosy reviews*, 8(15), 45. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.125530>
- Çomaklı, V., Aygül, İ., Sağlamtaş, R., Kuzu, M., Demirdağ, R., Akincioğlu, H., ... & Gülçin, İ. (2024). Assessment of Anticholinergic and Antidiabetic Properties of Some Natural and Synthetic Molecules: an In Vitro and In Silico Approach. *Current Computer-aided Drug Design*, 20(5), 441-451. <http://dx.doi.org/10.2174/1573409919666230518151414>
- Çomaklı, V., Sağlamtaş, R., Kuzu, M., Karagöz, Y., Aydın, T., & Demirdağ, R. (2023). Enzyme Inhibition and Antioxidant Activities of *Asparagus officinalis* L. and Analysis of Its Phytochemical Content by LC/MS/MS. *Chemistry & Biodiversity*, 20, e202201231, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202201231v>
- Durmaz, L., Gulçin, İ., Taslimi, P., & Tüzün, B. (2023). Isofraxidin: Antioxidant, Anti-carbonic Anhydrase, Anti-cholinesterase, Anti-diabetic, and in Silico Properties. *ChemistrySelect*, 8(34), e202300170. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202300170>
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Khan, S., Kabir, H., Jalees, F., Asif, M., & Naquvi, K. J. (2011). Antihyperlipidemic potential of fruits of *Tribulus terrestris* linn. *IJBR*, 1, 98-101. <http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.79>
- Korczyńska-Łącka, I., Słowikowski, B., Piekut, T., Hurla, M., Banaszek, N., Szymanowicz, O., ... & Dorszewska, J. (2023). Disorders of Endogenous and Exogenous Antioxidants in Neurological Diseases. *Antioxidants*, 12(10), 1811. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox12101811>
- Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M. I., & Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 57-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.016>
- Özler, E., Topal, F., Topal, M., & Öztürk Sarıkaya, S. B. (2023). LC-HRMS Profiling and Phenolic Content, Cholinesterase, and Antioxidant Activities of *Terminalia citrina*. *Chemistry & Biodiversity*, 20, e202201250, 1-8. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201250>
- Phillips, O. A., Mathew, K. T., & Oriowo, M. A. (2006). Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 104(3), 351-355. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.027>
- Piao, M., Tu, Y., Zhang, N., Diao, Q., & Bi, Y. (2023). Advances in the Application of Phytochemical Extracts as Antioxidants and Their Potential Mechanisms in Ruminants. *Antioxidants*, 12(4), 879. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox12040879>
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Sachett, A., Gallas-Lopes, M., Conterato, G. M. M., Herrmann, A. P., & Piato, A. (2021). Antioxidant activity by FRAP assay: in vitro protocol. *Protocols*, <http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.btqrnmv6>
- Shahid, M., Riaz, M., Talpur, M. M., & Pirzada, T. (2016). Phytopharmacology of *Tribulus terrestris*. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 30(3), 785-788.
- Singh, S., Nair, V., & Gupta, Y. K. (2012). Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. In sexually sluggish male albino rats. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3(1), 43-47. <http://dx.doi.org/10.4103/0976-500X.92512>
- Song, X., Wang, T., Guo, L., Jin, Y., Wang, J., Yin, G., ... & Zeng, L. (2020). In Vitro and In Vivo Anti-AChE and antioxidative effects of *Schisandra chinensis* extract: a potential candidate for Alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2804849, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/2804849>
- Taşkın, T., Kahvecioğlu, D., Türkoğlu, E. A., Doğan, A., & Kuzu M (2022). In vitro biological activities of different extracts from *Alcea dissecta*. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 12(1), 53-60. <http://dx.doi.org/10.33808/clinexphealthsci.787845>

- Tian, C., Chang, Y., Zhang, Z., Wang, H., Xiao, S., Cui, C., & Liu, M. (2019). Extraction technology, component analysis, antioxidant, antibacterial, analgesic and anti-inflammatory activities of flavonoids fraction from *Tribulus terrestris* L. leaves. *Heliyon*, 5(8), e02234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02234>
- Tilwari, A., Shukla, N. P., & Devi, P. U. (2011). Effect of five medicinal plants used in Indian system of medicines on immune function in Wistar rats. *African Journal of Biotechnology*, 10(73), 16637-16645. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.2168>
- Topal, M., & Gulcin, İ. (2022). Evaluation of the in vitro antioxidant, antidiabetic and anticholinergic properties of rosmarinic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102417>
- Uysal, S., Senkardes, I., Jekő, J., Cziáky, Z., & Zengin, G. (2023). Chemical characterization and pharmacological profile of *Tribulus terrestris* extracts: A novel source of cosmeceuticals and pharmaceuticals. *Biochemical Systematics and Ecology*, 107, 104600. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2023.104600>
- Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of food science and technology*, 56, 4757-4774. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>
- Zheleva-Dimitrova, D., Obreshkova, D., & Nedialkov, P. (2012). Antioxidant activity of *Tribulus terrestris*-a natural product in infertility therapy. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4(4), 508-511. <http://dx.doi.org/10.1016/J.CLL.2006.06.007>