

Carduus nutans L.'m LC-MS/MS ile Fitokimyasal Analizi, Antioksidan, Antidiyabetik, Antiglukom ve Anti-Alzheimer Etkileri

Leyla GÜVEN^{1*}, Adem ERTÜRK², Buse Sultan TURAN³, Yusuf KAYA⁴

^{1,3}Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 25240 Erzurum, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 25240 Erzurum, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240 Erzurum, Türkiye

¹ <https://orcid.org/0000-0002-3189-6415>

² <https://orcid.org/0000-0002-1750-1966>

³ <https://orcid.org/0009-0001-1096-0449>

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-3702-1895>

*Sorumlu yazar: leyla.guven@atauni.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi:

Geliş tarihi: 30.03.2024

Kabul tarihi: 15.06.2024

Online Yayınlanma: 16.09.2024

Anahtar Kelimeler:

Carduus nutans

Antioksidan aktivite

Enzim inhibisyonu

LC-MS/MS analizi

ÖZ

Carduus nutans L. (Asteraceae), halk arasında "Eşek dikenini" olarak bilinir ve kökleri cüzzam ve kabızlık tedavisinde, yaprakları ise sıtma tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada *Carduus nutans* metanol ekstraktı (MECN) antioksidan aktivitesi ve enzim inhibisyon etkileri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Antioksidan deneylerinden üçü Fe^{3+} , Cu^{2+} ve Fe^{3+} -TPTZ indirgeme deneyi olup sırasıyla 20 $\mu\text{g/mL}$ 'de ki absorbansları λ_{700} : 0,470, λ_{450} : 0,521 ve λ_{593} : 0,671'dir. Diğer antioksidan deneyleri ise DPPH, ABTS ve DMPD radikalleri süpürme deneyi olup IC_{50} değerleri sırasıyla 115,52 $\mu\text{g/mL}$, 37,71 $\mu\text{g/mL}$, 85,47 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. MECN'nin asetilkolinesteraz (AChE), α -glikozidaz (α -gli) ve karbonik anhidraz I-II (KA I-II) enzimlerine karşı inhibisyon etkilerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 3,28 $\mu\text{g/mL}$, 8,37 $\mu\text{g/mL}$, 18,74 $\mu\text{g/mL}$ ve 21,83 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. MECN'nin toplam fenolik madde miktarı 153,83 $\mu\text{g/g}$ GAE, toplam flavonoid madde miktarı ise 221,0 $\mu\text{g/g}$ KE'dir. Ayrıca MECN'nin LC-MS/MS analizi yapılmış 7,07 $\mu\text{g/g}$ fumarik asit, 2,72 $\mu\text{g/g}$ kinik asit, 1,09 $\mu\text{g/g}$ klorojenik asit majör madde olarak tespit edilmiştir. *C. nutans* metanol ekstraktı yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve AChE, α -gli ve KA I-II enzimlerine karşı iyi bir inhibisyon etkisine sahiptir.

Phytochemical Analysis of *Carduus nutans* L. via LC-MS/MS, Antioxidant, Antidiabetic, Antiglaucoma and Anti-Alzheimer's Effects

Research Article

Article History:

Received: 30.03.2024

Accepted: 15.06.2024

Published online: 16.09.2024

Keywords:

Carduus nutans

Antioxidant activity

Enzyme inhibition

LC-MS/MS analysis

ABSTRACT

Carduus nutans L. (Asteraceae) is popularly known as "Eşek dikenini" and its roots are used in the treatment of leprosy and constipation, and its leaves are used in the treatment of malaria. In the study, antioxidant activity and enzyme inhibition effects of *Carduus nutans* methanol extract (MECN) were determined spectrophotometrically. Three of the antioxidant assays are Fe^{3+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} -TPTZ reduction experiments, and their absorbances at 20 $\mu\text{g/mL}$ are λ_{700} :0,470, λ_{450} : 0,521, and λ_{593} : 0,671, respectively. Other antioxidant assays are DPPH, ABTS and DMPD radical scavenging experiments and IC_{50} values are 115,52 $\mu\text{g/mL}$, 37,71 $\mu\text{g/mL}$, and 85,47 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The

IC₅₀ values of the inhibitory effects of MECN against acetylcholinesterase (AChE), α -glucosidase (α -gly) and carbonic anhydrase I-II (CA I-II) are 3,28 μ g/mL, 8,37 μ g/mL, 18,74 μ g/mL, and 21,83 μ g/mL, respectively. The total phenolic substance amount of MECN is 153,83 μ g/g GAE, and total flavonoid substance amount is 221,0 μ g/g QE. Additionally, LC-MS/MS analysis of MECN was performed and 7,07 μ g/g fumaric acid, 2,72 μ g/g quinic acid and 1,09 μ g/g chlorogenic acid were determined as major components. *C. nutans* methanol extract has high antioxidant activity and a good inhibition effect against AChE, α -gly, and CA I- II enzymes.

To Cite: Güven L., Ertürk A., Turan BS., Kaya Y. *Carduus nutans* L.'ın LC-MS/MS ile Fitokimyasal Analizi, Antioksidan, Antidiyabetik, Antiglokem ve Anti-Alzheimer Etkileri. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2024; 7(4): 1702-1721.

1. Giriş

Carduus cinsi çok yıllık bir bitki olup Asteraceae (Compositae) familyasına aittir. Asteraceae familyası 32913 tür 1911 cins içerir ve tohumlu bitkiler içerisindeki en büyük familyadır. *Carduus* cinsinin ayırt edici karakteristik özellikleri; yapraklarının diken karakterleri, fillari, involukrum, sipsela, testa, korolla ve papusa ait özellikleridir (Davis, 1970, Kadereit ve Jeffrey, 2007). *Carduus* cinsi Dünya üzerinde 100 Türkiye'de ise 11'i alttörü olan 27 taksaya sahiptir, bu türlerin 9 tanesi endemiktir (*C. lanuginosus*, *C. olympicus* alttür *olympicus*, *C. olympicus* alttür *hypoleucus*, *C. nutans* alttür *trojanus*, *C. nutans* alttür *falcato-incurvus*, *C. onopordioides* alttür *turcicus*, *C. amanus*, *C. acanthoides* alttür *sintenisii*, *C. rechingeranus*) (Al-Shammari ve ark., 2015, Tübives, 2024).

C. nutans L. halk arasında "Eşek dikeni" adıyla bilinir ve Asteraceae familyasının diğer temsilcileri gibi lezzetleri ve biyolojik etkileri nedeniyle geleneksel tıpta yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Türk halk tıbbında karaciğer ve böbrek hastalıklarında, prostatta, bronşitte, cüzzamda, kabızlıkta ve sıtmada tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Kozyra ve ark., 2022). Ayrıca bitki antioksidan, antipiretik, hipotansif ve diüretik olarak da tercih edilmektedir (Deliorman Orhan ve ark., 2002, Zheleva-Dimitrova ve ark., 2011). Avrasya kökenli olan *C. nutans* ağırlıklı olarak geleneksel ve modern tıpta idrar söktürücü olarak, karaciğer hastalıklarının tedavisinde, sindirim sistemi rahatsızlıklarının tedavisinde, romatizmal tedavilerde, soğuk algınlığı tedavisinde çiğ olarak veya pişirilerek kullanılmaktadır. Bitki antikanser, antiviral, antispazmotik, antibakteriyel, antiinflamatuvar etkileriyle de bilinmekte ve kullanılmaktadır. *Carduus* cinsine ait bitki türleri fumarik asit, kinik asit, klorojenik asit, luteolin, apigenin, benzoik asit, gallik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, p-kumarik asit, naringin gibi fenolik ve flavonoid bileşikler içermektedir (Kozyra ve ark., 2019).

Oksidatif stres, serbest radikallerin vücutta kontrol edilememesiyle artar ve DNA/RNA ve protein gibi bio-relevant moleküller ile reaksiyona girerek hücrede hasara sebep olurlar. Serbest radikaller, en dıştaki atomik orbitallerinde çift oluşturmamış kararsız bileşiklerdir. Antioksidanlar, serbest radikallere elektron vererek onları nötralize eder ve serbest radikallerin yapılarındaki eşlenmemiş elektronu rezonans yapılarında stabilize ederler. Böylece reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücreye zarar vermesini engeller. Oksidatif stres, nörodejeneratif, enflamatuar, kardiyovasküler, immünolojik, endokrinolojik ve onkolojik hastalıklarla ilişkilidir (Bursal ve ark., 2019, Gulcin ve Alwasel, 2023, Koca ve ark., 2023).

Diabetes mellitus (DM), mutlak veya göreceli insülin eksikliğinden kaynaklanan kronik bir metabolizma bozukluğudur. Yemek sonrası veya açlık durumunda hiperglisemi ile karakterizedir ve şiddetli formuna ketozis ve protein kaybı eşlik eder. Ayrıca retinopati, nöropati ve periferik damar yetersizliği gibi komplikasyonlarla da ilişkilidir (Ahamad ve ark., 2011). Yaşam tarzı değişiklikleri ve ekonomik gelişime bağlı olarak diyabet her geçen gün daha sık rastlanılan bir hastalık olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 2000-2016 yılları arasında DM sebebiyle erken ölümlerde %5 civarında bir artış olmuş ve DM 2019'da ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sıraya gelmiştir (Kaplan ve ark., 2023). DM'de, glukozun bağırsaktan emiliminde ve metabolizmasında etkili olan enzimleri inhibe eden bileşikler tedavide önemli bir rol oynar. α -Glikozidaz, disakkaritleri ve nişastayı parçalayan, ince bağırsağın fırçasmsı sınırında bulunan pankreatik bir enzimdir (Riyaphan ve ark., 2021). α -Glikozidaz enzimlerinin inhibisyonu sayesinde glukoz emilimi geciktirilmekte ve kan şekeri regülasyonu sağlanmaktadır (Karagecili ve ark., 2023b).

Karbonik anhidraz (KA) enzimi, yapısında çinko içeren, su ve karbondioksinin proton ve bikarbonata geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden, pH regülasyonunu sağlayan bir metalloenzimdir (Güven ve ark., 2023b) mide, göz, böbrek gibi organlarda sıvı dengesini korumaktadır (Şenol ve ark., 2023).

Alzheimer hastalığı (AH), patolojik olarak senil amioid plaklar ve tau fibriller tarafından oluşturulan nörofibriler yumaklar, sinaps hasarı, nöron enflamasyonu, ve beyinde atrofi ile karakterize olan nörodejeneratif hastalıktır (Öztürk ve Karan, 2009, Şenol ve ark., 2023). Hastalık, hafıza kaybı, unutkanlık gibi bilişsel ve zihinsel fonksiyonlarda gerileme, dikkat problemi, konuşma güçlüğü, depresyon, uyku problemi, günlük yaşama uyum sağlayamama gibi klinik bulgularla ortaya çıkmaktadır (Keleş ve Özalevli, 2018). AH, insidansı ve prevalansı 1990'dan 2019 yılına kadar sırasıyla %148 ve %161 artmıştır, 2050 yılına kadar 152 milyon insanın AH'dan mustarip olacağı öngörülmektedir (Li ve ark., 2022). AH oksidatif stres, asetilkolin (ACh) eksikliği, enflamasyon ve varlığı hastalığın ortaya çıkmasıyla bağlantılıdır (Karagecili ve ark., 2023a). Kolinerjik hipoteze göre sinir bilgilerini öğrenme ve kolinerjik aktiviteyi arttıran önemli bir nörotransmitter olan ACh miktarının oluşumu AH'ye sebep olmaktadır (Demir ve Türkan, 2022). Mevcut tedaviler hastalığın ilerlemesini AChE inhibitörü ilaçların kullanılmasıyla durdurmayı ve azaltmayı amaçlamaktadır ancak yeterli değildir (Adali ve ark., 2020).

Oksidatif stresin neden olduğu kanser, AH, DM, glokom, gibi hastalıklarda kullanılacak tıbbi bitkiler ve etkiden sorumlu etken maddelerin keşfi, hastalıkların engellenmesi ve önlenmesi için önemlidir. Bundan dolayı çalışmamızda halk arasında da tıbbi amaçlı kullanılan *Carduus nutans*'ın antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, metabolik hastalıklarda muhtemel etkisinin ortaya koyulması ve kimyasal analizinin yapılması amaçlanmaktadır. Yapılan bu çalışmayla literatürde var olan eksiklik *Carduus nutans*'ın biyolojik aktiviteleri ve kimyasal karakterizasyonunun açıklanması ile doldurulacaktır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Carduus nutans L.'ın toprak üstü kısımları 24 Haziran 2018 tarihinde Erzurum Şenyurt köyü, Radar çevresi yol kenarı 40° 10' 23" K 41° 30' 20" D koordinatlarından 2460 m rakımdan Dr. Leyla Güven tarafından toplanmıştır. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi'nden Prof. Dr. Yusuf Kaya tarafından teşhis edilmiştir. AUEF 1387 herbaryum numarasıyla Atatürk Üniversitesi, Biyoçeşitlilik Bilim Müzesinde kaydedilmiştir. (Şekil 1)



Şekil 1. *Carduus nutans* (Resimleyen Dr. Leyla Güven)

2.2. LC-MS/MS Çalışması

LC-MS/MS, fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin gözlemlenebildiği çok fonksiyonlu bir uygulama tekniğidir. Referans standartlar Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) temin edilmiştir. Amonyum format, formik asit, aseton ve metanol Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır. Ultra saf su elde etmek için Sartorius (Goettingen, Almanya) Arium Pro Ultra saf su sistemi kullanılmıştır. Cihazın UPLC kısmı bir otomatik örnekleyici (Agilent 1260 Infinity G1329B ALS), bir ikili pompa (Agilent 1260 Infinity G1312B (600 bar)), bir gaz giderici (Agilent 1260 Infinity G4225A HiP) ve bir termostatlı kolon (Agilent 1290 Infinity TCC G1316C) dan oluşmaktadır. Fenolik bileşiklerin kromatografik ayırımı 30 °C kolon sıcaklığında, C18 ters faz analitik kolon (Zorbax SB-C18 (4,6x100 mm, 3,5 µm, ABD) üzerinde, % 0,1 formik asit içeren su (A) ve % 0,1 formik asit içeren asetonitrilden (B) oluşan mobil faz karışımının gradient elüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşikler çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak ölçülmüştür. Spesifik öncü fitokimyasalın fragman iyon geçişlerine taranmasına dayanarak, MRM yöntemi fenolik bileşiklerin seçici tespiti ve miktar tayini için optimize edilmiştir. Bütün fenolik bileşikler için 50-1300 m/z kütle aralığında Collision enerjileri optimum fitokimyasal parçalanma ve istenen ürün iyonlarının maksimum iletimi için optimize edilmiştir. Veri toplama işlemini kontrol etmek için Agilent MassHunter Workstation (Agilent)

kullanılmıştır. 30 fenolik bileşik için spesifik polarite $[M - H]^-$ olarak belirlenmiştir (Güven ve ark., 2023a).

2.3. Ekstraksiyon İşlemi

C. nutans toprak üstü kısmı güneş görmeyen ve kuru bir ortamda kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Ardından 20 gr toz halindeki bitkiye 500 mL metanol ilave edilmiş ve gece boyunca bekletilmiştir. Maserasyondan sonra 25 °C'de 24 saat boyunca karıştırıcı ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt süzölmüş ve süzöntü alçak basınç altında 40°C'de 120 rpm'de (Heidolph VV2000, Schwabach, Germany) evapore edilmiştir. Elde edilen ekstraktın verimi %16,24'dir ((Elde edilen ekstrakt miktarı/Kuru bitki materyali miktarı)x100). Ekstrakt deney gününe kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir (Miloglu ve ark., 2023).

2.4. Antioksidan Aktivite Deneyleri

2.4.1. $Cu^{2+} - Cu^+$ İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC Metodu)

MECN Cu^{2+} indirgeme kapasiteleri Gülçin metodunun küçük bir modifikasyonu ile incelenmiştir (Gülçin, 2008). Bunun için tüplere farklı konsantrasyonlarda (10-30 μ L) hazırlanan MECN ve standartlar pipetlendikten sonra sırasıyla; 0,01 M 500 μ L $CuCl_2$ çözeltisi, $7,5 \times 10^{-3}$ 500 μ L neokuprin çözeltisi ve 500 μ L tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Toplam hacmi 4 mL olacak şekilde tüplere distile su eklenmiştir. Üç farklı konsantrasyonda üç tekrar yapılarak ölçüme hazır hale getirilmiştir. Yarım saat karanlıkta inkübe edilmiş ve 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçülmüş ve kaydedilmiştir (Inci ve ark., 2023).

2.4.2. $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ İndirgeme Kapasitesi

$Fe^{3+} - Fe^{2+}$ indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu'nun (Oyaizu, 1986, Gulcin, 2020) uyguladığı yöntemin küçük bir modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Çakmakçı ve ark., 2023). Deneyde 1 mg/mL'lik konsantrasyonda stok çözelti ve standart çözeltiler (10-30 μ L) deney tüplerine katılmış ve hacmi saf suyla 750 μ L'ye tamamlanmıştır. Her bir tüpe 1 mL fosfat tamponu ve 1 mL %1'lik $[K_3Fe(CN)_6]$ ilave edilerek, 50 °C'de yarım saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüplere 1 mL TCA ve 250 μ L $FeCl_3$ ilavesi yapıp vorteksle iyice karıştırılmıştır. Üç ayrı konsantrasyonda üç tekrar yapılmıştır. Son olarak köre karşı 700 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

2.4.3. $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ TPTZ İndirgeme Kapasitesi (FRAP Metodu)

MECN ve standart çözeltilerin FRAP indirgeme kapasitelerinin tespiti için 10-30 μ L MECN tampon çözelti ile hacimleri 500 μ L'ye tamamlanmıştır. Tüplerinin her birine 2250 μ L $FeCl_3$ çözeltisi, 2250 μ L FRAP çözeltisi eklenmiştir. Tüpler vorteks yardımıyla iyice karıştırılmış, yarım saat karanlıkta bekletilmiş ve ardından absorbans değerleri 593 nm'de ölçülmüştür (Bursal ve ark., 2019).

2.4.4. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali (DPPH) Giderme Kapasitesi

DPPH aktivite tayini Blois metoduna (Blois, 1958) göre modifiye edilerek uygulanmıştır. Deneş tüplerine farklı konsantrasyonlarda ayarlanan (10-30 µL) stok çözeltiler ve standart çözeltiler eklenmiştir. Hacimleri etanol ile 2 mL'ye tamamlanmıştır. Sonrasında numune tüplerine 1 mM'lık DPPH· serbest radikal çözeltisi 500 µL ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla iyice karışması sağlanmıştır. Kontrol olarak hazırlanan tüplere 2 mL etanol ve 0,5 mL DPPH· radikal çözeltisi konulmuştur. 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra absorbans değerleri 517 nm'de köre karşı okunmuştur. Ekstrelerin DPPH giderme kapasitesi IC₅₀ olarak hesaplanmıştır (Gulcin ve Alwasel, 2023).

2.4.5. 2,2-Azino-bis(3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) radikali (ABTS⁺) Giderme Kapasitesi

ABTS⁺ aktivite tayini MECN ve standart çözeltiler farklı konsantrasyonlarda (10-30 µL) tüplere aktarılmış ve hacimler etanol ile tamamlanmıştır. ABTS radikallerini oluşturmak için 2,45 mM persülfat çözeltisi ve 2 mM ABTS çözeltisi karıştırılmıştır. Ardından ABTS⁺⁺ radikalinin absorbansı, 734 nm'de 0,750 ± 0,030 nm'ye ayarlanmıştır. Daha sonra tüm tüplere ABTS⁺⁺ radikal çözeltisi eklenmiş ve vortekslenmiştir. Yarım saat inkübasyon sonunda etanoldan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbansları kaydedilmiştir. Ekstrelerin ABTS giderme kapasitesi IC₅₀ olarak hesaplanmıştır (Re ve ark., 1999, Kiziltas ve ark., 2022b).

2.4.6. N, N'-Dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür radikali (DMPD⁺) Giderme Kapasitesi

DMPD⁺ aktivite tayini için MECN ve standart çözeltilerin farklı konsantrasyonları (10-30 µL) distile su ile 0,5 mL'ye tamamlanmıştır. DMPD⁺ radikal katyon çözeltisi 0,2 mL 0.05 M FeCl₃ çözeltisi eklenerek elde edilmiştir. Tüm tüplere radikal DMPD⁺ 1 mL ilave edilmiş ve 20 dakika inkübasyon sonrası 505 nm'de köre karşı ölçüm alınmıştır. Ekstrelerin DMPD giderme kapasitesi IC₅₀ olarak hesaplanmıştır. (Fogliano ve ark., 1999, Güven ve ark., 2024).

2.5. Enzim İnhibisyon Testleri

2.5.1. AChE İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi

MECN'nin AChE inhibisyon üzerindeki etkisi, spektrofotometrik olarak Ellman metodunun (Ellman ve ark., 1961) modifiye edilmesiyle belirlenmiştir (Kucukoglu ve ark., 2019). Asetilkolin iyodat (AChI) ve 5,5'-Dithio-bis(2-nitro-benzoic) asit (DTNB), enzimatik reaksiyonda kullanılan substratlardır. 100 M, 50 µL Tris/HCl tamponu (pH 8,0), 390 µL numune ve 10 µL AChE karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Ardından, substratları içeren solüsyonların herbirinden 25 µL eklenmiştir. Karışımda DTNB, parçalanma ürünü olan tiyokolinle reaksiyona girmekte, sarı renge sahip 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan sarı rengin 412 nm dalga boyunda absorbansı kaydedilmiştir. AChE inhibisyon etkileri IC₅₀ olarak hesaplanmıştır.

3.5.2. α -Glikozidaz İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi

MECN'nin α -glikozidaz enzim inhibitör etkisi *p*-nitrofenil-D-glikopiranozit (p-NPG) substratı kullanılarak yapılmıştır (Tao ve ark., 2013). İlk olarak, 50 μ L fosfat tamponu (pH 7,4), 10 μ L enzim solüsyonu (0,15 U/mL) ve 20–100 μ L numune karıştırılmıştır. Daha sonra, reaksiyonun başlaması için substrat eklenmiş ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Absorbanslar spektrofotometrik olarak 405 nm'de ölçülmüştür. α -Glikozidaz inhibisyon etkileri IC₅₀ olarak hesaplanmıştır.

3.5.3. KA I-II izoenzimi İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

MECN'nin KA enzim inhibisyon etki deneyinde, KA I-II izoenzimleri, human eritrositlerinin santirifüj edilmiş ve oluşan serumunun Sepharose-4B-L-Tyrosin-sülfanilamid afinite kromatografi tekniği kullanılarak saflaştırılmasıyla elde edilmiştir. Elde edilen elüatlar 280 nm'de spektrofotometre kontrol edilerek kaydedilmiştir. Enzim inhibisyon etki deneyinde *p*-nitrofenolat substrat olarak kullanılmıştır. Reaksiyon sonucu oluşan *p*-nitrofenolat iyonunun 3 dakikada gerçekleşen absorbans farklılıkları 348 nm'de spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. KA I-II enzim inhibisyon etkileri IC₅₀ olarak hesaplanmıştır. (Göcer ve ark., 2017).

3.6. Toplam Fenolik Tayini ve Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi

Bitki numunesinin toplam fenolik içerikleri için 0,5 mL bitki ekstraktı, 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ve 0,5 mL %1 Na₂CO₃ karıştırılmış ve karışım vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında, karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 760 nm'de absorbans ölçülmüştür. 1 gr *C. nutans* metanol ekstraktının fenol miktarı, mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilmiştir (Singleton ve ark., 1999). Fenolik madde miktarı için kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 0,0009x$, $r^2 = 0,9983$ şeklinde hesaplanmıştır.

Toplam flavonoid içeriği tayini için 1,5 mL etanol, 0,5 mL *C. nutans* metanol ekstraktı, %10 1,5 mL Al(NO₃)₃, 0,5 mL, 1 M CH₃COOK ve 2,3 mL distile su karıştırılmıştır. Karışımların absorbansları, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra 415 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak kuarsetin kullanılmıştır. Flavonoid miktarları ekstraktın gramı başına miligram kuarsetin eşdeğeri (KE)/g olarak hesaplanmıştır (Gulcin ve ark., 2019). Flavonoid madde miktarı için kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 0,0031x$, $r^2 = 0,9977$ şeklinde hesaplanmıştır.

3.7. İstatistiksel analiz

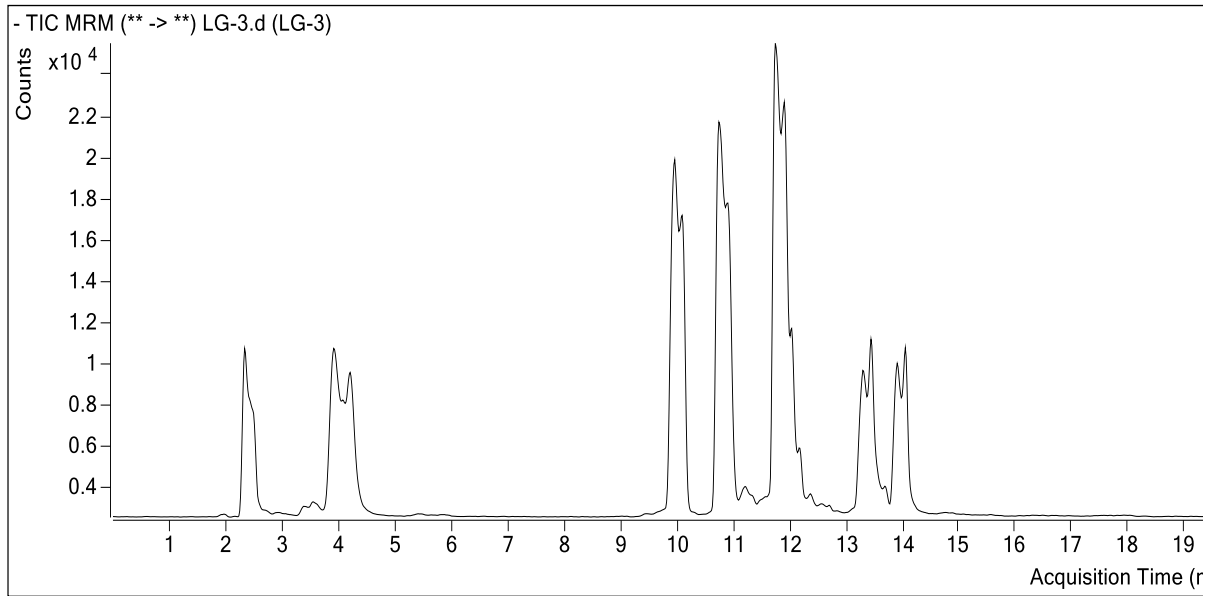
İstatistiksel analizler GraphPad Prism (10.0, demo versiyon) programında tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc Tukey testi kullanılarak yapılmıştır. %95 güven aralığında $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.Bulgular ve Tartışma

3.1. LC-MS/MS Analiz Sonuçları

MECN'nin LC-MS/MS analizinde 7,07 µg/g fumarik asit; 2,72 µg/g kinik asit; 1,09 µg/g klorojenik asit; 0,077 µg/g luteolin; 0,037 µg/g apigenin; 0,014 µg/g 4-OH-Benzoik asit; 0,008 µg/g gallik asit; 0,006 µg/g ferulik asit; 0,0046 µg/g rosmarinik asit; 0,0014 µg/g *p*-kumarik asit; 0,0005 µg/g naringin bulunmuştur. *C. nutans*'ta majör olarak fumarik asit, kinik asit ve klorojenik asit tespit edilmiştir. LC-MS/MS analizinde MECN'nin kromatogram görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir.

Carduus türlerinin fenolik bileşiklerinin LC-MS/MS analizi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde farklı içerikler dikkat çekmektedir. Yapılan bir çalışmada *C. pycnocephalus* subsp. *albidus* bitkisinin 10,75 µg/L kinik asit; 0,11 µg/L protokatekuik asit; 6,19 µg/L klorojenik asit; 0,02 µg/L protokatekuik aldehit; 0,02 µg/L kafeik asit; 0,02 µg/L *p*-kumarik asit; 0,07 µg/L salisilik asit; 0,75 µg/L sinarosit; 0,07 µg/L rutin; 0,07 µg/L izokersitrin; 0,03 µg/L hesperidin; 0,36 µg/L kozmosin; 0,84 µg/L astragalin; 0,02 µg/L kuarsetin; 0,13 µg/L naringenin; 0,28 µg/L luteolin; 0,03 µg/L kemferol ve 0,24 µg/L apigenin içerdiği yapılan LC-MS/MS analiz çalışmasında görülmüştür (Yılmaz, 2020). *Carduus* cinslerinin incelendiği diğer bir çalışmada ise izoramnetin-3-glikozit, kemferol-3-ramnoglikozit, luteolin-7-glikozit, luteolin-7-glukuronit, apigenin-7-glikozit, kaempferol-3-rutinozit, kemferol-3-ramnoglikozit, apigenin, luteolin ve beş fenolik asit (neoklorojenik, klorojenik, kafeik, protokatekuik ve *p*-hidroksibenzoik asit) tespit edilmiştir (Kozyra ve ark., 2019).



Şekil 2. Geliştirilen LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilen MECN kromatogramı

Majör olarak tespit edilen fumarik asit, trans bütendioik yapısında bir asittir. Fumarik asitin ester bazlı ilaçları multipl skleroz ve sedef hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Mrowietz ve ark., 2018). Akçaağaç şurubu üzerinde yapılan bir çalışmada da fumarik asitin antifungal, antioksidatif, antialzheimer, antikanser, antidiyabetik etkileri gözlenmiştir (Akao ve Kurado, 1991, Mohammed ve ark., 2023).

İkinci majör madde olan kinik asit, klorojenik asitin hidrolizi ile oluşan, suda çözünen, sentetik kristalli bir asittir. Büyük ve renksiz prizmalar halinde kristalize olur. Aynı zamanda yeni ilaçların sentezi için de önemli bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda kinik asitin gastrointestinal sistemdeki nikotinamid ve triptofan sentezinde besinsel destek sağladığı görülmüştür. Kinik asit türevlerinin nöroprotektif, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliği olduğu bildirilmiştir (Kocaoğlu, 2014).

Üçüncü majör madde olan klorojenik asit, bitkinin yapısında doğal olarak bulunan bir fenolik bileşiktir. Antioksidan, antibakteriyel ve antiviral özellikleri vardır. Kahve, enginar yaprağı, kayısı yaprağı, patlıcan, kivi ve erikte de yaygın olarak bulunmaktadır. Uygun maliyetli ve çevre dostu üretim koşulları olduğu için ilaç endüstrisinde de ilgi görmektedir (Atıcı ve Bulduk, 2020). Akut inflamatuvar ağrı üzerinde antinosiseptif etkisi olduğu ve nöroprotektif olduğu bildirilmiştir (Kocaoğlu, 2014).

Bu çalışmalara göre majör olarak bulunan bu maddeler *C. nutans* bitkisinin benzer özellik göstermesine neden olabilir. Mevcut çalışmada antioksidan ve enzim inhibisyon özelliklerine bakılmış daha ilerleyen çalışmalarda muhtemel diğer farmakolojik özelliklerin de araştırılması gerekmektedir.

3.2. Antioksidan Aktivite

C. nutans metanol ekstraktının (MECN) antioksidan aktivitesi 6 farklı metotla belirlenmiştir, sentetik antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır. Şekil 3A ve 4, Tablo 1’de de görüldüğü gibi MECN etkili bir Fe³⁺-indirgeme yeteneğine sahiptir. MECN’nin ve pozitif kontrollerin Fe³⁺ indirgeme potansiyeli, 700 nm'deki absorbans değerleri 10, 20, 30 µg/mL konsantrasyonlarda ölçülerek belirlenmiş ve 20 µg/mL'de absorbans değerleri şu şekilde sıralanmıştır: BHA (λ₇₀₀: 0,850)> MECN (λ₇₀₀: 0,470)> BHT (λ₇₀₀: 0,417)> Troloks (λ₇₀₀:0,416)> α-Tokoferol (λ₇₀₀: 0,366). MECN ekstraktı 20 µg/mL'de Fe³⁺ indirgeme etkisi pozitif kontrol α-Tokoferol'den anlamlı olarak daha yüksektir (p<0,05), BHT tüm dozlarda ekstrakt ve diğer standart antioksidanlara göre anlamlı olarak farklıdır. (p<0,0001), (Şekil 4).

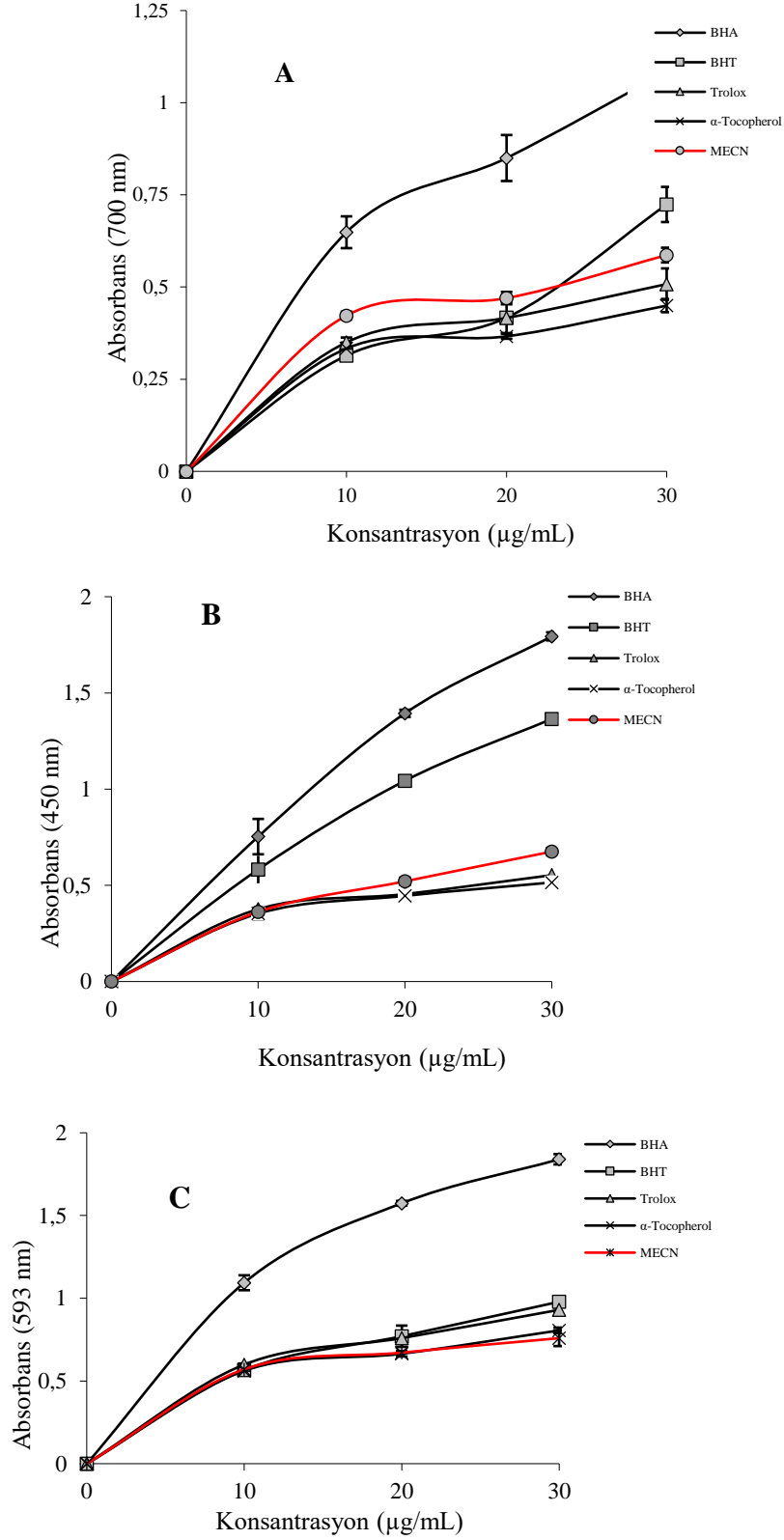
MECN 10-30 µg/mL konsantrasyonlarında bakır iyonlarının (Cu²⁺) indirgeme yeteneği 450 nm'de ölçülmüş ve Cu²⁺ iyonlarının indirgeme kapasitesi, konsantrasyonla orantılı olarak arttığı görülmüştür. 20 µg/mL'deki absorbans değerleri karşılaştırılınca şu şekilde sıralanmıştır: BHA (λ₄₅₀: 1,394)> BHT (λ₄₅₀: 1,044)> MECN (λ₄₅₀: 0,521)> Troloks (λ₄₅₀: 0,455)> α-Tokoferol (λ₄₅₀: 0,445) (Şekil 3B, 4 ve Tablo 1). MECN ekstraktı 20 µg/mL'de Cu²⁺ indirgeme etkisi pozitif kontrol olarak kullanılan α-Tokoferol'den anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır (p<0,05) (Şekil 4).

MECN ve pozitif kontrollerin (20 µg/mL) Fe³⁺-TPTZ azaltıcı etkilerinin de doza bağlı olduğu (10-30 µg/mL) bulunmuştur. MECN ve pozitif kontrollerin Fe³⁺-TPTZ indirgeme yeteneği şu şekilde sıralanmıştır: BHA (λ₅₉₃:1,574)> BHT (λ₅₉₃:0,770)> Troloks (λ₅₉₃:0,759)> MECN (λ₅₉₃:0,671)> α-Tokoferol (λ₅₉₃: 0,665) (Şekil 3C, 4 ve Tablo 1). MECN ekstraktının 20 µg/mL'de Fe³⁺-TPTZ azaltıcı etkisi pozitif kontrol olarak kullanılan Troloks, BHA ve BHT α-Tokoferol'den anlamlı olarak farklıdır (Şekil 4).

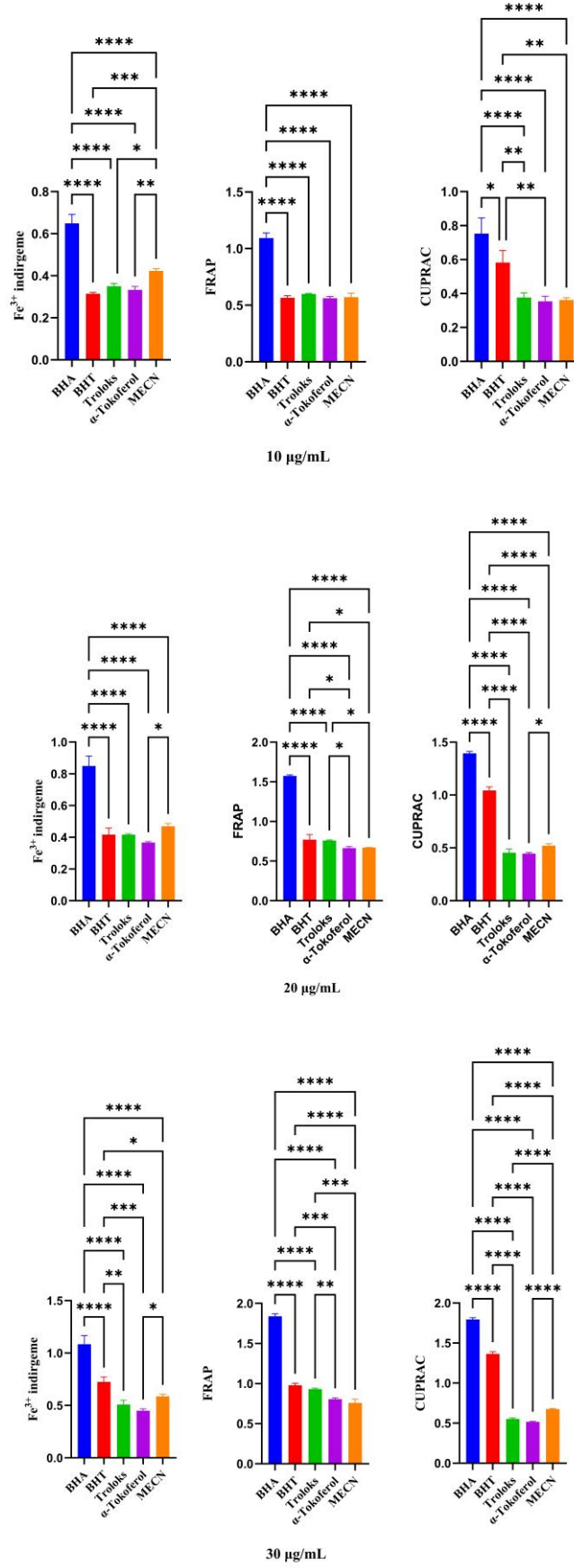
Tablo 1. *C. nutans* metanol ekstraktının ve pozitif kontrollerin 10-30 µg/mL'de Fe³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺-TPTZ iyonlarını indirgeme yetenekleri

Antioksidan numuneler	Fe ³⁺ indirgeme			
	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	r ²
BHA	0,649±0,04	0,850±0,06	1,084±0,08	0,9823
BHT	0,314±0,01	0,417±0,04	0,724±0,04	0,9676
Troloks	0,350±0,01	0,416±0,01	0,508±0,04	0,9677
α-Tokoferol	0,333±0,01	0,366±0,01	0,450±0,01	0,9470
MECN	0,423±0,01	0,470±0,01	0,587±0,04	0,9497
	Cu ²⁺ indirgeme (CUPRAC)			
	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	r ²
BHA	0,753±0,09	1,394±0,01	1,794±0,02	0,9996
BHT	0,582±0,07	1,044±0,03	1,365±0,02	0,9999
Troloks	0,376±0,02	0,455±0,03	0,553±0,01	0,9712
α-Tokoferol	0,353±0,03	0,445±0,01	0,515±0,01	0,9818
MECN	0,362±0,01	0,521±0,02	0,675±0,01	0,9921
	Fe ³⁺ -TPTZ indirgeme (FRAP)			
	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	r ²
BHA	1,094±0,04	1,574±0,01	1,840±0,03	0,9960
BHT	0,566±0,01	0,770±0,06	0,979±0,02	0,9875
Troloks	0,599±0,01	0,759±0,01	0,930±0,01	0,9794
α-Tokoferol	0,562±0,01	0,665±0,01	0,806±0,01	0,9670
MECN	0,571±0,03	0,671±0,01	0,759±0,04	0,9703

*BHA: Bütihidroksianisol, BHT: Bütihidroksitoluen, MECN: *Carduus nutans* metanol ekstraktı



Şekil 3. Standart antioksidanların ve MECN'nin **A.** Fe^{3+} indirgeme, **B.** Cu^{2+} indirgeme (CUPRAC) ve **C.** Fe^{3+} -TPTZ indirgeme (FRAP) yetenekleri



Şekil 4. Standart antioksidanların ve MECN'nin Fe^{3+} indirgeme, CUPRAC ve FRAP indirgeme yeteneklerinin istatistiksel olarak kıyaslanması (*: p<0,05, ***: p<0,0002, ****: p<0,0001)

MECN ve standart antioksidanların DPPH serbest radikal süpürme yetenekleri IC₅₀ değerleri hesaplanarak belirlenmiş, konsantrasyon artışı karşısında radikal süpürme yeteneği de arttığı görülmüştür. Düşük IC₅₀ değeri yüksek radikal süpürme kabiliyetini göstermektedir. DPPH[•] radikal temizleme deneyinde, hem ekstraktın hem de standart antioksidanların azalan IC₅₀ değerleri şu şekilde sıralanmıştır: MECN 115,52 µg/mL (r²: 0,9892), BHT 28,88 µg/mL (r²: 0,9893), Troloks 15,75 µg/mL (r²: 0,9763), BHA 8,35 µg/mL (r²: 0,9839) ve α-Tokoferol 5,21 µg/mL (r²: 0,9913). (Şekil 5A ve Tablo 3)

Mevcut çalışmada değerlendirilen ikinci radikal yakalama testi, DMPD^{•+} giderme aktivitesidir. Ekstraktın ve standart antioksidanların konsantrasyona bağlı olarak (10, 20, 30 µg/mL) radikal süpürme aktivitesi belirgin bir şekilde artmıştır. MECN ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri şu şekilde sıralanmıştır: MECN 85,47 µg/mL (r²: 0,9996), BHA 49,51 µg/mL (r²: 0,9816), ve Troloks 27,73 µg/mL (r²: 0,9951) şeklinde hesaplanmıştır. (Şekil 5B ve Tablo 3)

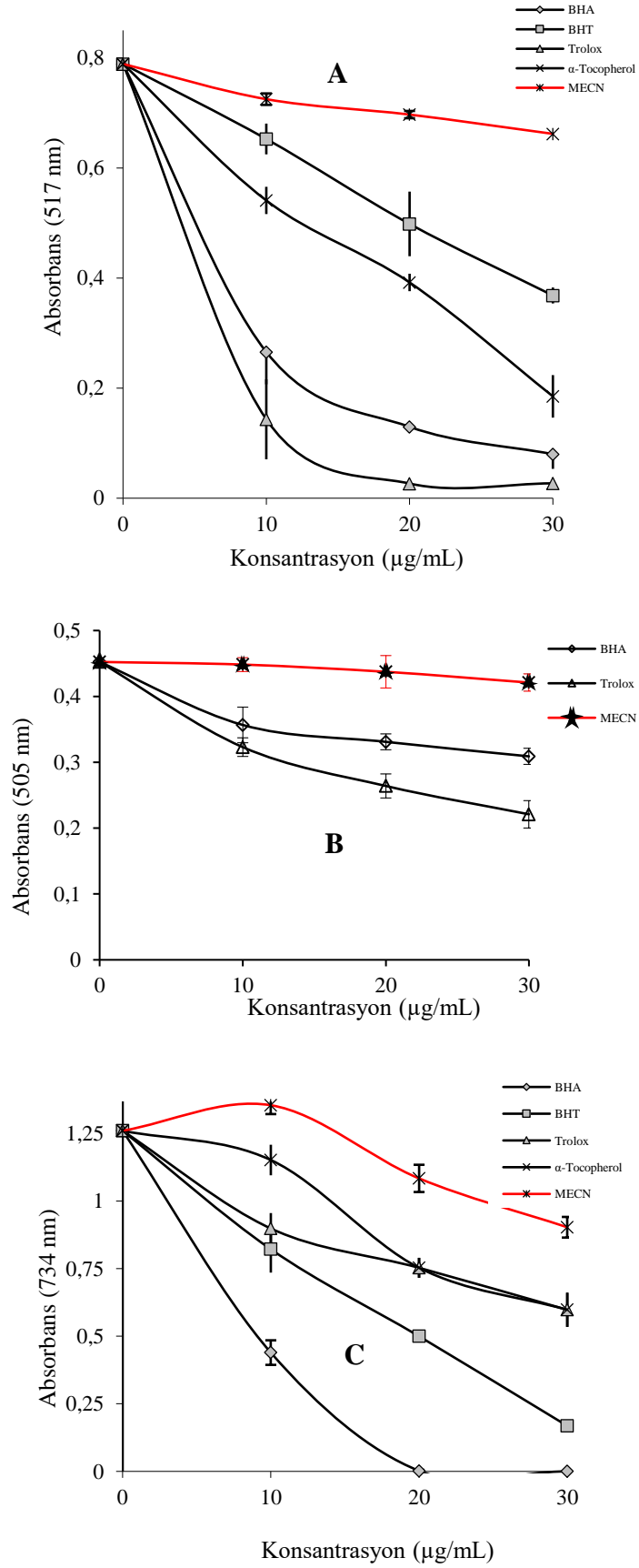
Son olarak çalışmada antioksidan testi olarak MECN'nin ABTS radikal süpürme aktivitesi tespit edilmiştir. MECN ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri şu şekilde sıralanmıştır: MECN 37,71 µg/mL (r²: 0,9105), Troloks 27,51 µg/mL (r²: 0,9516), BHT 15,76 µg/mL (r²: 0,9988), BHA 7,07 µg/mL (r²: 0,9999). (Şekil 5C, Tablo 3). Ayrıca MECN tüm radikal süpürme deneylerine göre standart antioksidanlara göre anlamlı olarak farklıdır (p<0,0001).

Literatürdeki mevcut çalışmalar incelendiğinde diğer *Carduus* türlerinin de etkili antioksidan aktivitelere sahip olduğu görülmüştür. Zheleva-Dimitrova ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada beş farklı *Carduus* türü üzerinde antioksidan özellik araştırılmıştır. Türlerin DPPH süpürme aktivitelerinin %95,6 -%91,4 arasında, ABTS süpürme aktivitelerinin %97,0-%89,3 arasında ve FRAP indirgeme yeteneklerinin 86,4-114,0 mM TE/g kuru ağırlık arasında olduğu bildirilmiştir. Kozyra ve ark. (2019) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Carduus* cinslerinin metanol ekstraktlarının DPPH radikal giderme aktivitesinin EC₅₀ = 0,46 mg/mL- 0,80 mg/mL olduğu bildirilmektedir. Çalışmalar farklı parametreler üzerinden değerler verildiği için mevcut çalışma ile kıyaslama zor olsa da *C. nutans*'ın diğer türlere göre iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir.

Tablo 3. *C. nutans* metanol ekstraktı ve pozitif kontroller için DPPH[•], ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} süpürme yeteneği için IC₅₀ (µg/mL) değerleri.

Antioksidanlar	DPPH [•] süpürücü etki		ABTS ^{•+} süpürücü etki		DMPD ^{•+} süpürücü etki	
	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²
BHA	8,35	0,9839	7,07	0,9999	49,51	0,9816
BHT	28,88	0,9893	15,76	0,9988	-	-
α-Tokoferol	5,21	0,9913	24,43	0,9893	-	-
Troloks	15,75	0,9763	27,51	0,9516	27,73	0,9951
MECN	115,52*	0,9892	37,71*	0,9105	85,47*	0,9996

*BHA: Bütilhidroksianisol, BHT: bütilhidroksitoluen, MECN: *Carduus nutans* metanol ekstraktı
*MECN standart antioksidanlara göre anlamlı olarak farklıdır (p<0,0001).



Şekil 5. *C. nutans* metanol ekstraktı ve pozitif kontrollerin radikal süpürücü etkileri. **A.** DPPH[•] süpürme yeteneği, **B.** DMPD^{•+} süpürme yeteneği, **C.** ABTS^{•+} süpürme yeteneği

3.2. Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriği

MECN fenolik ve flavonoid bileşiklerin toplam miktarı sırasıyla 153,83 µg/g gallik asit eşdeğeri (GAE) ve 221,0 µg/g kuarsetin eşdeğeri (KE) olarak belirlenmiştir.

Carduus türlerinin etanol ekstraktlarının fenolik bileşiklerin toplam miktarının araştırıldığı bir çalışmada 8,34-10,26 mg/g kuru ekstrakt gallik asit eşdeğeri (GAE) bildirilmektedir (Dimitrova-Dyulgerova ve ark., 2015).

3.3. Enzim İnhibisyon Çalışmaları

Mevcut çalışmada MECN'nin α -glikozidaz, AChE ve KA I-II enzimlerine karşı inhibisyon etkilerinin IC₅₀ değerleri, grafik çizilerek hesaplanmış ve Tablo 4'de gösterilmiştir. MECN'nin sindirim enzimlerinden biri olan α -glikozidaz enzimine karşı inhibisyon etkisinin IC₅₀ değeri 8,37 µg/mL (r^2 : 0,9987), pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun IC₅₀ değeri ise 22800 nM (r^2 : 0,9922) olarak hesaplanmıştır. MECN pozitif kontrollere göre anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,0001$). DM'yi önlemede etkili yaklaşımlardan birinin α -glikozidaz ve α -amilaz enzim inhibisyonu olduğu bilinmektedir. *C. lanuginosus*'un farklı ekstraktları üzerinde yapılan bir çalışmada tip 2 diyabetin anahtar enzimlerini inhibe ettiği görülmüştür. Veriler ekstraktların güçlü bir α -amilaz (50,7–190,8 mmol ACAE/g ekstrakt) ve α -glikozidaz (2,7–8,8 mmol ACAE/g ekstrakt) inhibitör etkileri olduğunu göstermiştir (Özcan, 2021).

Her geçen gün artan yaşlı nüfus ve beraberinde getirdiği AH insidansındaki yükseklik bu hastalığa karşı alternatif, yeni kaynakların bulunmasını gerekli kılmaktadır. MECN'nin AChE enzimine karşı inhibisyon etkisi IC₅₀ değeri 3,28 µg/mL (r^2 : 0,9934)'dir ve Tablo 4'te gösterilmiştir. MECN pozitif kontrollere göre anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,0001$). Sonuçlar MECN'nin AH için yeni alternatif bir ürün olması yönünde ümit vermektedir.

Vücudumuzun birçok metabolik faaliyetinde görev alan, pH'yı ayarlayan, kemik rezorbsiyonunu sağlayan, vücut iç basıncını dengeleyen KA enzimi fazla çalıştığında glokom, epilepsi, obezite, kanser gibi hastalıklara sebep olabilmektedir (Taslimi ve ark., 2016, Supuran, 2018). Sistemik karbonik anhidraz inhibitörü ilaçlar çeşitli yan etkilere sahiptir. Bundan dolayı yeni KA I-II inhibitörü ilaçlara ekonomik ve daha etkili doğal ürünlerin eklenmesi gerekmektedir (Scozzafava ve Supuran, 2014). Mevcut çalışmada MECN etkili bir KA I-II inhibisyon etkisine sahip olduğu, hesaplanan IC₅₀ değerleriyle Tablo 4'te gösterilmiştir. KA I enzim inhibisyonunda MECN'nin IC₅₀ değeri 18,74 µg/mL (r^2 : 0,9896) ve pozitif kontrol olarak kullanılan Asetazolamitin 99,00 nM (r^2 : 0,9825) gibi IC₅₀ değerlerine sahiptir. KA-II enzim inhibisyonunda MECN'nin IC₅₀ değeri 21,83 µg/mL (r^2 : 0,9938) ve pozitif kontrol olarak kullanılan Asetazolamitin 87,95 nM (r^2 : 0,9940) gibi IC₅₀ değerlerine sahiptir. MECN pozitif kontrollere göre anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,0001$).

Tablo 4. MECN α -glikozidaz (α -Gli), asetilkolinesteraz (AChE), karbonik anhidraz I-II (KA I-II) izoenzimlerine karşı inhibitör değerleri

Numuneler	IC ₅₀							
	AChE	r ²	α -Gli	r ²	KA I	r ²	KA II	r ²
MECN (μ g/mL)	3,28*	0,9934	8,37*	0,9987	18,74*	0,9896	21,83*	0,9938
Asetazolamit ^a (nM)	-	-	-	-	99,00	0,9825	87,95	0,9940
Takrin ^b (nM)	5,97	0,9706	-	-	-	-	-	-
Akarboz ^c (nM)	-	-	22800	0,9922	-	-	-	-

MECN: *Carduus nutans* metanol ekstraktı, ^a KA I ve KA II inhibisyonu için pozitif kontrol (Kiziltas ve ark., 2022a), ^b AChE inhibisyonu için pozitif kontrol (Kiziltas ve ark., 2022a), ^c α -gli inhibisyonu için pozitif kontrol (Durmaz ve ark., 2022), *MECN pozitif kontrollere göre anlamlı olarak farklıdır (p<0,0001).

4. Sonuçlar

Carduus türleri tıbbi etkileri nedeniyle ve zengin doğal içeriğiyle yüzlerce yıldır geleneksel olarak kullanılmaktadır. *C. nutans* toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktında LC-MS/MS analizine göre fumarik asit, kinik asit, klorojenik asit, luteolin, apigenin, 4-OH-benzoik asit, gallik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, *p*-kumarik asit tespit edilen bileşenlerdir. Yapılan çalışmayla, *C. nutans*'ın fenolik bileşikler açısından zengin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *C. nutans* metanol ekstraktının antioksidan aktivitesi, indirgeme gücü ve radikalleri temizleme yetenekleriyle gösterilmiştir. Bunun yanında AChE, α -glikozidaz ve KA I-II gibi çeşitli enzimleri inhibe ettiği ortaya koyulmuştur. *C. nutans*, içerdiği fenolik ve flavonoidler sayesinde sık görülen DM, AH ve glokom gibi nörodejeneratif, hormonal ve metabolik hastalıkların tedavisinde, ayrıca gıda ve ilaç endüstrisinde doğal bir ürün olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Biyolojik aktivitelerinin detaylı bir şekilde ilk kez değerlendirilmesinin yanında *C. nutans*'ın ümit vaat eden biyolojik aktivitesinin potansiyel mekanizmalarının keşfedilmesi ve aktivitelerden sorumlu sekonder bileşiklerin fenolik, non-fenolik bileşiklerin sinerjistik etkisinin sonucu mu olduğu ilerleyen çalışmalarda *in vivo*, *in vitro* ve *in silico* aydınlatılmalıdır.

Teşekkür

Çalışmanın yapılmasında danışmanlık yapan ve laboratuvar imkanlarının kullanılmasını sağlayan Prof. Dr. İlhami Gülçin'e teşekkürlerimizi sunarız.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynakça

- Adali A., Yirün A., Koçer Gümüsel B., Erkekoğlu Ü. The possible effects of biological agents on the development of Alzheimer's disease. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University 2020; 44(1): 167-187.
- Ahamad J., Naquvi KJ., Mir SR., Ali M., Shuaib M. Review on role of natural α -glucosidase inhibitors for management of diabetes mellitus. International Journal of Biomedical Research 2011; (2): 374-380.
- Akao M., Kuroda K. Antifungal activity of fumaric acid in mice infected with *Candida albicans*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1991; 39(11): 3077-3078.
- Al-Shammari LA., Hassan WHB., Al-Youssef HM. Phytochemical and biological studies of *Carduus pycnocephalus* L. Journal of Saudi Chemical Society 2015; 19(4): 410-416.
- Atıcı Y., Bulduk İ. Optimization the ultrasonic assisted extraction of chlorogenic acid from the artichoke (*Cynara Scolymus*) leaf with response surface methodology and total phenolic contents. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry 2020; 48(2): 147-157.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958; 181(4617): 1199-1200.
- Bursal E., Aras A., Kılıç Ö., Taslimi P., Gören AC., Gülçin İ. Phytochemical content, antioxidant activity, and enzyme inhibition effect of *Salvia eriophora* Boiss. & Kotschy against acetylcholinesterase, α -amylase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes. Journal of Food Biochemistry 2019; 43(3): e12776.
- Çakmakçı S., Gülçin İ., Gündoğdu E., Ertem Öztekin H., Taslimi P. The comparison with commercial antioxidants, effects on colour, and sensory properties of green tea powder in butter. Antioxidants 2023; 12(8): 1522.
- Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press 1970; 3.
- Deliorman Orhan D., Yeşilada E., Ergun F., Tsuchiya K., Takaishi Y. The antioxidant activity of the extracts and fractions from *Carduus nutans* L. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2002; 19: 61-66.
- Demir Z., Türkan F. Asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzimlerinin alzheimer hastalığı ile ilişkisi. Journal of the Institute of Science and Technology 2022; 12(4): 2386-2395.
- Dimitrova-Dyulgerova I., Zhelev I., Mihaylova D. Phenolic profile and in vitro antioxidant activity of endemic Bulgarian *Carduus* Species. Pharmacognosy Magazine 2015; 11(4): S575-579.
- Durmaz L., Kiziltas H., Guven L., Karagecili H., Alwasel S., Gulcin İ. Antioxidant, antidiabetic, anticholinergic, and antiglaucoma effects of magnoflorine. Molecules 2022; 27(18): 5902.
- Ellman GL., Courtney KD., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 1961; 7(2): 88-95.

- Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; 47(3): 1035-1040.
- Göcer H., Akıncioğlu A., Göksu S., Gülçin İ. Carbonic anhydrase inhibitory properties of phenolic sulfonamides derived from dopamine related compounds. *Arabian Journal of Chemistry* 2017; 10(3): 398-402.
- Gulcin I., Kaya R., Goren A.C., Akincioglu H., Topal M., Bingol Z., Cetin Çakmak K., Ozturk Sarikaya SB., Durmaz L., Alwasel S. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. *International Journal of Food Properties* 2019; 22(1): 1511-1526.
- Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology* 2020; 94(3): 651-715.
- Gulcin İ., Alwasel S.H. DPPH radical scavenging assay. *Processes* 2023; 11(8): 2248.
- Gulçin I. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2008; 23(6): 871-876.
- Güven L., Erturk A., Koca M., Gulcin I. Phenolic compounds of *Phlomis tuberosa* by LC–MS/MS-determination of antioxidant activity, molecular docking, and enzyme inhibition profiles. *ChemistrySelect* 2023a; 8(48): e202303101.
- Güven L., Erturk A., Miloğlu FD., Alwasel S., Gulcin İ. Screening of antiglaucoma, antidiabetic, anti-alzheimer, and antioxidant activities of *Astragalus alopecurus* Pall—analysis of phenolics profiles by LC-MS/MS. *Pharmaceuticals* 2023b; 16(5): 659.
- Güven L., Ertürk A., Yılmaz MA., Alwasel S., Gülçin İ. *Alchemilla pseudocartalinica* Juz: phytochemical screening by UPLC-MS/MS, molecular docking, anti-oxidant, anti-diabetic, anti-glaucoma, and anti-Alzheimer effects. *Records of Natural Products* 2024; 18(2): 251-272.
- Inci H., Izol E., Yılmaz MA., İlkaya M., Bingöl Z., Gülçin I. Comprehensive phytochemical content by LC/MS/MS and anticholinergic, antiglaucoma, antiepilepsy, and antioxidant activity of apilarnil (*Drone Larvae*). *Chemistry & Biodiversity* 2023; 20(10): e202300654.
- Kadereit JW., Jeffrey C. *The families and genera of vascular plants*, Springer 2007.
- Kaplan ABU., Cetin M., Bayram C., Yildirim S., Taghizadehghalehjoughi A., Hacimuftuoglu A. *In vivo* evaluation of nanoemulsion formulations for metformin and repaglinide alone and combination. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2023; 112(5): 1411-1426.
- Karagecili H., İzol E., Kirecci E., Gulcin İ. Determination of antioxidant, anti-alzheimer, antidiabetic, antiglaucoma and antimicrobial effects of zivzik pomegranate (*Punica granatum*) -; A chemical profiling by LC-MS/MS. *Life* 2023a; 13(3): 735.

- Karagecili H., Yılmaz MA., Ertürk A., Kiziltas H., Güven L., Alwaseel SH., Gulcin İ. Comprehensive metabolite profiling of Berdav propolis using LC-MS/MS: determination of antioxidant, anticholinergic, antiglaucoma, and antidiabetic effects. *Molecules* 2023b; 28(4): 1739.
- Keleş E., Özalevli S. Alzheimer's disease and treatment approaches. *İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi* 2018; 3(2): 39-42.
- Kiziltas H., Bingol Z., Goren AC., Pinar S.M., Ortaakarsu AB., Alwaseel SH., Gulcin İ. Comprehensive metabolic profiling of *Acantholimon caryophyllaceum* using LC-HRMS and evaluation of antioxidant activities, enzyme inhibition properties and molecular docking studies. *South African Journal of Botany* 2022a; 151: 743-755.
- Kiziltas H., Goren AC., Alwaseel SH., Gulcin İ. Sahlep (*Dactylorhiza osmanica*): Phytochemical analyses by LC-HRMS, molecular docking, antioxidant activity, and enzyme inhibition profiles. *Molecules* 2022b; 27(20): 6907.
- Koca M., Gülçin İ., Üç EM., Bilginer S., Aydın AS. Evaluation of antioxidant potentials and acetylcholinesterase inhibitory effects of some new salicylic acid-salicylamide hybrids. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2023; 20(7): 1535-1543.
- Kocaoğlu E. Kinik asidin sitotoksik/genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin sağlıklı akciğer epitel hücre hatlarında belirlenmesi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi sayfa no:8, Bursa, Türkiye, 2014.
- Kozyra M., Komsta Ł., Wojtanowski K. Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from inflorescences of *Carduus* sp. *Phytochemistry Letters* 2019; 31: 256-262.
- Kozyra M., Kukula-Koch W., Szymański M. Phenolic composition of inflorescences of *Carduus nutans* L. *Chemistry & Biodiversity* 2022; 19(3): e202100827.
- Kucukoglu K., Gul H.I., Taslimi P., Gulcin I., Supuran CT. Investigation of inhibitory properties of some hydrazone compounds on hCA I, hCA II and AChE enzymes. *Bioorganic Chemistry* 2019; 86: 316-321.
- Li X., Feng X., Sun X., Hou N., Han F., Liu Y. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2022; 14.
- Miloglu FD., Akpınar A., Güven L., Demirkaya AK., Gundogdu G., Nalcı KA., Hacimuftuoglu A. Evaluation the effects of *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoplicatum* on an *in-vitro* wound model using human dermal fibroblast cells. *International Journal of Low Extremity Wounds* 2023; 22(2): 401-408.
- Mohammed F., Sibley P., Abdulwali N., Guillaume D. Nutritional, pharmacological, and sensory properties of maple syrup: A comprehensive review. *Heliyon* 2023.
- Mrowietz U., Morrison P.J., Suhrkamp I., Kumanova M., Clement B. The pharmacokinetics of fumaric acid esters reveal their *in vivo* effects. *Trends in Pharmacological Sciences* 2018; 39(1): 1-12.

- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 1986; 44(6): 307-315.
- Özcan K. Determination of biological activity of *Carduus lanuginosus*: an endemic plant in Turkey. *International Journal of Environmental Health Research* 2021; 31(1): 45-53.
- Öztürk GB., Karan MA. Physiopathology of Alzheimer's disease. *Klinik Gelişim* 2009; 22(3): 36-45.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 26(9): 1231-1237.
- Riyaphan J., Pham DC., Leong MK., Weng CF. *In silico* approaches to identify polyphenol compounds as α -glucosidase and α -amylase inhibitors against type-II Diabetes. *Biomolecules* 2021; 11(12): 1877.
- Scozzafava A., Supuran CT. Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. In: Frost S., McKenna R. (eds). *Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications*. Subcellular Biochemistry, Dordrecht: Springer 2014; 75, 349-359.
- Singleton VL., Orthofer R., Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer L. (ed.). *Oxidants and antioxidants, part A. Methods in Enzymology*, New York: Academic Press 1999; 299, 152-178.
- Supuran CT. Carbonic anhydrases and metabolism. *Metabolites* 2018; 8(2): 25.
- Şenol H., Çelik Turgut G., Şen A., Sağlamtaş R., Tuncay S., Gülçin İ., Topçu G. Synthesis of nitrogen-containing oleanolic acid derivatives as carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research* 2023; 32(4): 694-704.
- Tao Y., Zhang Y., Cheng Y., Wang Y. Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography* 2013; 27(2): 148-155.
- Taslimi P., Gulcin I., Ozgeris B., Goksu S., Tumer F., Alwasel SH., Supuran CT. The human carbonic anhydrase isoenzymes I and II (hCA I and II) inhibition effects of trimethoxyindane derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry* 2016; 31(1): 152-157.
- Tübives. *Carduus* sp." Retrieved 16.05.2024, 2024, from <http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=karsilastir>.
- Yilmaz MA. Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Industrial Crops and Products* 2020; 149: 112347.
- Zheleva-Dimitrova D., Zhelev I., Dimitrova-Dyulgerova I. Antioxidant activity of some *Carduus* species growing in Bulgaria. *Free Radicals and Antioxidants* 2011; 1(4): 15-20.