

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL
İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

VOLKAN AY
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ALTAY
II. Danışman: Doç. Dr. Hüseyin AKŞİT

TEZ JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. Ahmet ALTAY
Doç. Dr. Samed ŞİMŞEK
Dr. Öğretim Üyesi Deniz İRTEM KARTAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ERZİNCAN, 2026

© 2026 [Volkan AY]. Tüm hakları saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Ahmet ALTAY danışmanlığında, Volkan Ay tarafından hazırlanan bu çalışma 04/06/2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul oybirliği 04/06/2026 ile kabul edilmiştir.

Başkan: Dr. Öğretim Üyesi Deniz İRTEM KARTAL

İmza:

Üye : Prof. Dr. Ahmet ALTAY

İmza:

Üye : Doç. Dr. Samed ŞİMŞEK

İmza:

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunun 04/06/2026 tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası

“*Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 04/05/2026

(İmza)

Volkan AY

ÖZET

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum*
**BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ
VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

VOLKAN AY

**Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ALTAY

II.Danışman: Doç. Dr. Hüseyin AKŞİT

2026, 87 sayfa

Bu çalışmada, Erzincan ili, Refahiye ilçesi, Sakaltutan Dağı'ndan toplanan endemik *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisinin biyolojik aktiviteleri ve fitokimyasal içeriği araştırılmıştır. Bitkinin toprak üstü kısmının metanol maserasyonu ile ham ekstrakt (HAE) elde edilmiştir. HAE'nin antioksidan kapasitesi; toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarı, DPPH• radikal giderme aktivitesi ve demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri sırasıyla 95,89±0,56 mg GAE/g ekstre ve 49,71±0,86 mg QE/g ekstre olarak belirlenmiştir. DPPH• giderme aktivitesine ait IC₅₀ değeri 55,15±1,29 µg/mL, FRAP değeri ise 107,20±0,12 mg TE/g ekstre olarak saptanmıştır. Antidiyabetik potansiyel α-glukozidaz, anti-Alzheimer potansiyel ise asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri üzerinden değerlendirilmiştir. α-Glukozidaz, AChE ve BChE enzimleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri sırasıyla 40,76±3,96 µg/mL, 46,20±3,10 µg/mL ve 53,31±2,20 µg/mL olarak bulunmuştur. Sitotoksik aktivite insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerinde MTT yöntemi kullanılarak incelenmiş ve IC₅₀ değeri 9,80 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sekonder metabolitlerin izolasyonunda Sephadex LH-20 ve silika jel kolon kromatografileri ile preparatif HPLC tekniklerinden yararlanılmıştır. bileşikler izole edilmiştir. İzole edilen klorojenik asit, naringenin kalkan-4'-O-glukozid, luteolin ve 5,5"-biflavanon türevi naringenin-

7,7"-di-O-glukozid bileşiklerinin yapıları tek ve iki boyutlu nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90, DEPT-135, COSY, HSQC ve HMBC) ve kütle spektrometrisi verileri kullanılarak aydınlatılmıştır. Elde edilen bulgular, HAE'nin güçlü antioksidan, enzim inhibitörü ve sitotoksik aktiviteler sergilediğini, ayrıca içerdiği fenolik ve flavonoid bileşikler nedeniyle doğal biyoaktif ajanların geliştirilmesinde önemli bir kaynak olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*, saflaştırma, sitotoksisite, antioksidan, anti-Alzheimer, antidiyabet.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE PHYTOCHEMICAL CONTENT AND INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum*

VOLKAN AY

Master's Thesis, Erzincan Binali Yıldırım University,
Institute of Science and Technology,
Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Ahmet ALTAY

Co-advisor: Doç. Dr. Hüseyin AKŞİT

2026, 87 pages

This thesis investigated the biological activities and phytochemical profile of the methanolic extract obtained from the endemic plant *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* collected from Sakaltutan Mountain in Refahiye, Erzincan, Türkiye. The aerial parts of the plant were extracted by methanol maceration to obtain the crude extract (HAE). Antioxidant activity was evaluated by determining total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), DPPH• radical scavenging activity, and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The extract exhibited a TPC of 95.89 ± 0.56 mg GAE/g extract and a TFC of 49.71 ± 0.86 mg QE/g extract. The IC₅₀ value for DPPH• scavenging activity was 55.15 ± 1.29 µg/mL, while the FRAP value was 107.20 ± 0.12 mg TE/g extract. The antidiabetic and anti-Alzheimer potentials of HAE were assessed through α-glucosidase, acetylcholinesterase (AChE), and butyrylcholinesterase (BChE) inhibition assays, yielding IC₅₀ values of 40.76 ± 3.96 , 46.20 ± 3.10 , and 53.31 ± 2.20 µg/mL, respectively. Cytotoxic activity against the A549 human lung carcinoma cell line was determined by the MTT assay, with an IC₅₀ value of 9.80 µg/mL. Phytochemical investigations using Sephadex LH-20 and silica gel column chromatography, followed by preparative HPLC, resulted in the isolation of chlorogenic acid, naringenin chalcone-4'-O-glucoside, luteolin, and naringenin-7,7''-di-O-glucoside. Structural elucidation was achieved using 1D/2D NMR and

HR-MS analyses. These findings indicate that HAE is a promising source of bioactive compounds with significant antioxidant, enzyme inhibitory, and cytotoxic activities.

Keywords: *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*, Purification, Cytotoxicity, Antioxidant, Anti-Alzheimer, Antidiabetic.

TEŞEKKÜR

Başta kıymetli danışmanlarım Prof. Dr. Ahmet ALTAY ve Doç. Dr. Hüseyin AKŞİT'e, süreç boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Samed ŞİMŞEK ile Sevgi ALTIN'a, ayrıca desteklerini esirgemeyen Betül HARURLUOĞLU ve Fen Bilimleri Enstitü Müdürümüz Prof. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Volkan AY

Nisan, 2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
EKLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Araştırmanın Amacı	1
1.2. Araştırmanın Özgün Değeri ve Kapsamı	2
2. GENEL BİLGİLER VE KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Bitkinin Tanıtılması	3
2.1.1. Morfolojik karakteristikler	3
2.1.2. Yayılış ve ekolojik özellikler	5
2.1.3. Geleneksel etnobotanik kullanım ve önemi	6
2.2. Ekstraksiyon Teknikleri	7
2.2.1. Maserasyon (Soğuk ekstraksiyon)	7
2.2.2. Perkolasyon (Süzme yöntemi)	8
2.2.3. Soxhlet ekstraksiyonu (Sıcak ekstraksiyon)	8
2.2.4. Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE)	8
2.3. Sekonder Metabolitler	8
2.3.1. Terpenler (Terpenoidler)	9
2.3.1.1. Terpenlerin sınıflandırılması.....	9
2.3.2. Azotlu bileşikler	10
2.3.2.1. Azotlu bileşiklerin sınıflandırması	11
2.3.3. Fenolik bileşikler	12
2.3.3.1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırması	12
2.4. Biyolojik Aktiviteler	14
2.4.1. Antioksidan aktivite ve toplam fitokimyasal içerik	15
2.4.2. Antidiyabetik aktivite	15
2.4.3. Anti-Alzheimer aktivite (Antikolinesteraz Etki)	16
2.4.4. Antikanser ve sitotoksik aktivite	16

2.4.5. Diğer biyolojik ve farmakolojik etkiler	16
2.5. İzolasyon ve Saflaştırma	17
2.5.1. Kromatografik süreçler	17
2.5.2. Yapı aydınlatma	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar	19
3.2. Biyolojik Aktivite Testlerinde Kullanılan Kimyasallar ve Standartlar	20
3.3. Kromatografik Ayrım, İzolasyon ve Saflaştırmada Kullanılan Maddeler	21
3.4. Hücre Kültürü ve Sitotoksikite Çalışmalarında Kullanılan Maddeler.....	22
3.5. Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi	22
3.5.1. Ekstraksiyon işlemi	23
3.6. Antioksidan Yöntemler	24
3.6.1. Toplam fenolik madde miktarı (TPC)	25
3.6.2. Toplam flavonoid madde miktarı (TFC)	26
3.6.3. Serbest radikal giderme DPPH• aktivitesi	27
3.6.4. Demir III iyonu indirgeyici antioksidan güç kapasite testi	28
3.7. Antidiyabetik Yöntemler	29
3.8.1. α -Glukozidaz inhibisyon testi	30
3.8. Anti-Alzheimer Yöntemleri	30
3.8.1. Asetilkolinesteraz inhibisyon testi	32
3.8.2. Bütirikolinesteraz inhibisyon testi	32
3.9. Antikanser Yöntemleri	34
3.9.1. Hücre kültürü çalışmaları	35
3.9.2. Hücre proliferasyon testi çalışmaları	36
3.10. Saflaştırma ve Analiz Yöntemleri	38
3.10.1. Fraksiyonlandırma ve saflaştırma	40
3.10.1.1. İlk fraksiyonlandırma ve sonrasında uygulanan işlemler	40
3.10.2. Saflaştırma basamakları ve uygulamaları	42
4. BULGULAR	45
4.1. Antioksidan Çalışma Bulguları	45
4.2. Antidiyabet ve Anti-Alzheimer Çalışma Bulguları	46
4.3. Antikanser Çalışma Bulguları	48
4.4. Saflaştırma Çalışmalarının Bulguları	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55

5.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriği	56
5.2. Antioksidan Aktivite	57
5.3. Antidiyabetik Aktivite	59
5.4. Anti-Alzheimer Aktivite	60
5.5. Antikanser Aktivite	61
5.6. İzolasyon ve Yapısal Aydınlatma	64
6. ÖNERİLER	66
KAYNAKÇA	67
EKLER	71
ÖZGEÇMİŞ	87

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Helichrysum arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> 'un taksonomik hiyerarşisi	3
Tablo 2. Türkiye florasında yayılış gösteren endemik <i>Helichrysum</i> taksonları	6
Tablo 3. Bitkisel sekonder metabolitlerin biyosentetik ve yapısal matrisi	14
Tablo 4. Kullanılan teknik cihazlar ve donanımlar	19
Tablo 5. Saflaştırma işlem akışı	42
Tablo 6. HAE'nin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine yönelik gerçekleştirilen TPC, TFC, DPPH• ve FRAP analizlerinden elde edilen sonuçlar	45
Tablo 7. HAE ve standart inhibitörlerin AChE, BChE ve α -glukozidaz enzimlerine karşı gösterdikleri inhibitör aktivitelere ait IC ₅₀ değerleri.....	46
Tablo 8. HAE'nin A-549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki verileri	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Helichrysum arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> müze arşivi herbaryum örneği.....	4
Şekil 2. <i>Helichrysum arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> 'un kurutulmuş teşhis örneği.....	5
Şekil 3. Terpenoid yapıtaşı izopren ve türeyen mentol molekülü	10
Şekil 4. Azotlu bileşikler yapıtaşı piridin ve ondan türeyen nikotin alkaloidi.....	11
Şekil 5. Fenolik bileşik olan fenol ve ondan türeyen gallik asit molekülü.....	13
Şekil 6. <i>Helichrysum arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> ekstraktı.....	24
Şekil 7. Gallik asit eşdeğerlik	26
Şekil 8. Toplam fenolik madde miktarı ölçüm öncesi pleyt görüntüsü.....	26
Şekil 9. Kuersetin eşdeğerlik	27
Şekil 10. Toplam flavonoid madde miktarı ölçüm öncesi pleyt görüntüsü.....	27
Şekil 11. Troloks standart	28
Şekil 12. Serbest radikal giderme ölçüm öncesi pleyt görüntüsü.....	28
Şekil 13. Demir III iyonu indirgeme ölçüm öncesi pleyt görüntüsü	29
Şekil 14. Akarboz standart	30
Şekil 15. Takrin AChE değerler	33
Şekil 16. Takrin BChE değerler	33
Şekil 17. MTT tuzunun formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu.....	37
Şekil 18. İlaçlama sonrası pleyt görüntüsü.....	37
Şekil 19. ELISA ölçüm öncesi pleyt görüntüsü	38
Şekil 20. Fitokimyasal izolasyon, saflaştırma ve yapı tayini süreçlerine ait şema.....	39
Şekil 21. TLC plaka örnek görüntüsü.....	41
Şekil 22. Sefadeks kolon yürütme görüntüsü	41
Şekil 23. Elüatlarda fiziki ayırım örnek görüntüsü.....	42
Şekil 24. TLC plaka saflık kontrol örnek görüntüsü	42
Şekil 25. Saflaştırılan numunelerin fiziksel görünümleri ve kristal/toz formları.....	43
Şekil 26. HAE ve standart antioksidanların yüzde serbest radikal giderimi.....	46
Şekil 27. HAE'nin doz-bağımlı α -glukozidaz inhibisyonu.....	47
Şekil 28. HAE'nin doz-bağımlı AChE inhibisyonu.....	48
Şekil 29. HAE'nin doz-bağımlı BChE inhibisyonu.....	48
Şekil 30. A549 canlı hücre mikroskop görüntüsü.....	49
Şekil 31. A549 ölü hücre mikroskop görüntüsü.....	49
Şekil 32. HAE'nin HPLC profili	50
Şekil 33. Preparatif HPLC uygulama öncesi profil	50

Şekil 34. Preparatif HPLC uygulama sonrası profil	51
Şekil 35. Klorojenik asit yapısı	52
Şekil 36. Luteolin yapısı	52
Şekil 37. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid yapısı	53
Şekil 38. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid yapısı	54

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Klorojenik asit NMR spektrum 1.....	71
Ek 2. Klorojenik asit NMR spektrum 2.....	71
Ek 3. Klorojenik asit NMR spektrum 3.....	72
Ek 4. Klorojenik asit NMR spektrum 4.....	72
Ek 5. Klorojenik asit NMR spektrum 5.....	73
Ek 6. Klorojenik asit NMR spektrum 6.....	73
Ek 7. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid NMR spektrum 1.....	74
Ek 8. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid NMR spektrum 2.....	74
Ek 9. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid NMR spektrum 3.....	75
Ek 10. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid NMR spektrum 4.....	75
Ek 11. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid NMR spektrum 5.....	76
Ek 12. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid NMR spektrum 6.....	76
Ek 13. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid NMR spektrum 1.....	77
Ek 14. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid NMR spektrum 2.....	77
Ek 15. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid NMR spektrum 3.....	78
Ek 16. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid NMR spektrum 4.....	78
Ek 17. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid NMR spektrum 5.....	79
Ek 18. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid NMR spektrum 6.....	79
Ek 19. Luteolin NMR spektrum 1.....	80
Ek 20. Luteolin NMR spektrum 2.....	80
Ek 21. Luteolin NMR spektrum 3.....	81
Ek 22. Luteolin NMR spektrum 4.....	81
Ek 23. Luteolin NMR spektrum 5.....	82
Ek 24. Luteolin NMR spektrum 6.....	82
Ek 25. HAE'nin ana fraksiyon 1 HPLC profili.....	83
Ek 26. HAE'nin ana fraksiyon 2 HPLC profili.....	83
Ek 27. HAE'nin ana fraksiyon 3 HPLC profili.....	83
Ek 28. HAE'nin ana fraksiyon 4 HPLC profili.....	84
Ek 29. HAE'nin ana fraksiyon 5 HPLC profili.....	84
Ek 30. HAE'nin ana fraksiyon 6 HPLC profili.....	84
Ek 31. HAE'nin ana fraksiyon 7 HPLC profili.....	85
Ek 32. HAE'nin ana fraksiyon 8 HPLC profili.....	85
Ek 33. HAE'nin ana fraksiyon 9 HPLC profili.....	85

Ek 34. HAE'nin ana fraksiyon 10 HPLC profili.....	86
Ek 35. HAE'nin ana fraksiyon 11 HPLC profili.....	86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AChE	Asetilkolinesteraz
BChE	Bütirilkolinesteraz
COSY	Korelasyon spektroskopisi
DEPT	Bozulmamış polarizasyon transferi ile distorsiyonsuz geliştirme
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent deneyi
FRAP	Ferrik indirgeyici antioksidan güç
HAE	<i>Helichrysum arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> ekstraktı
HMBC	Heteronükleer çoklu bağ korelasyonu
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSQC	Heteronükleer tek kuantum korelasyonu
IC₅₀	Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
İTK	İnce tabaka kromatografisi
LDTM	Londra Doğa Tarihi Müzesi
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMR	Nükleer manyetik rezonans
TFC	Toplam flavonoid madde miktarı
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TPC	Toplam fenolik madde miktarı

1. GİRİŞ

İnsanlık medeniyetinin başlangıcından bu yana doğa, yalnızca temel gereksinimlerin karşılandığı bir saha değil, aynı zamanda hastalıkların tedavisinde başvurulmuş en köklü ve kapsamlı şifa kaynağı olmuştur. Bitkilerin sentezlediği karmaşık kimyasal yapılar, asırlar boyunca geleneksel tıp pratiklerinin merkezinde yer almış; günümüzde ise modern ilaç araştırmaları için vazgeçilmez birer moleküler taslak haline gelmiştir. Teknolojik imkanların ve analitik yöntemlerin gelişmesi, bitkisel dokularda gizli kalan bu değerli bileşenlerin yapısal formüllerinin çözülmesine ve biyokimyasal etkilerinin bir zeminde kanıtlanmasına olanak sağlamaktadır. Yerkürenin biyolojik çeşitliliğini yansıtan tıbbi bitkiler, ürettikleri sekonder metabolitler vasıtasıyla canlı sistemler üzerinde çok yönlü etkiler meydana getirirler. Bahsi geçen bu moleküller, bitki bünyesinde yalnızca yapısal birer bileşen niteliği taşımayıp, değişken çevresel koşullara ve dış kaynaklı stres faktörlerine karşı geliştirilen aktif birer biyokimyasal yanıt teşkil etmektedir (Harborne, 1993). Sahip olduğu coğrafi konum sayesinde endemik bitki türleri bakımından cazibe niteliği taşıyan ülkemiz, henüz literatüre kazandırılmamış pek çok biyoaktif maddeyi bünyesinde barındırmaktadır. Anadolu florasındaki bu potansiyelin bilimsel yönden aydınlatılması, geleneksel birikimin evrensel tıp verilerine dönüştürülmesine imkan tanımaktadır. Bilimsel ekseninde yürütülen araştırmalar, doğanın moleküler mimarisini anlamlandırmanın ötesinde, gelecekte geliştirilecek yeni nesil tedavi yaklaşımları için de stratejik birer keşif zemini hazırlamaktadır.

1.1. Araştırmanın Amacı

Günümüzde, başta sağlık sektörü olmak üzere insan ihtiyaçlarına yönelik doğal kaynaklı ürünlerin kullanımında ivme kazanan bir artış söz konusudur. Bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşiklerin yapı-fonksiyon ilişkilerinin saptanması, modern biyokimya ve farmakognozi çalışmalarının temel eksenini oluşturmaktadır. Sunulan bu tez çalışması kapsamında, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisinden elde edilen metanol ekstresinin biyolojik aktivite profili kapsamlı biçimde irdelenmiştir. Araştırmanın temel hedefleri arasında; serbest radikallerin tetiklediği oksidatif stresini minimize ederek kronik rahatsızlıkların önlenmesinde kritik rol oynayan antioksidan kapasitenin belirlenmesi yer almaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Ayrıca, tokluk kan şekeri seviyesi kontrolünde stratejik öneme sahip enzimlerin baskılanması üzerinden antidiyabetik potansiyel (Kwon ve ark., 2008) ve Alzheimer hastalığının patolojisiyle ilişkilendirilen enzimlerin inhibisyonu aracılığıyla nöroprotektif etkiler değerlendirilmiştir (Ellman ve ark., 1961; Orhan ve ark., 2016). Çalışmanın bir diğer ayağını ise, hücre proliferasyonunu ve kontrolsüz çoğalmayı hedef alan sitotoksik aktivite

analizleri oluşturmaktadır (Riss ve ark., 2016). Bahsi geçen süreç içerisinde ise biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılması; kromatografik ayırma yöntemleri ile gelişmiş spektroskopik analizlerin entegre edildiği çok basamaklı bir metodolojiyle gerçekleştirilerek, elde edilen verilerin biyolojik yanıtlarla bağdaştırılması hedeflenmiştir (Sarker ve Nahar, 2012).

1.2. Araştırmanın Özgün Değeri ve Kapsamı

Helichrysum cinsi, geleneksel halk tıbbında yaygın kullanımı ve barındırdığı zengin fitokimyasal çeşitlilik nedeniyle farmakognozide öncelikli bir yere sahiptir. Mevcut literatür verileri, bu cinsin fenolik bileşikler, terpenoidler gibi sekonder metabolitlerce zengin olduğunu kanıtlamaktadır (Appendino ve ark., 2007; Lourens ve ark., 2008). Söz konusu biyoaktif bileşenlerin, hücresel düzeyde serbest radikal süpürücü özellikleri ve enzim inhibisyon kapasiteleri, bitkinin terapötik değerini belirleyen temel unsurlar olarak değerlendirilmektedir. Bu bileşenlerin sergilediği antiinflamatuvar, antikanser ve antimikrobiyal gibi etkiler, bitkisel kaynaklı moleküllerin modern ilaç geliştirme süreçlerindeki biyouyumluluk avantajını ön plana çıkarmaktadır (Czinner ve ark., 2001; Newman ve Cragg, 2020). Türkiye florasına özgü endemik bir alt tür olan *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* üzerine gerçekleştirilen bilimsel çalışmaların literatürde oldukça sınırlı düzeyde kalması, bu çalışmayı özgün kılmaktadır. Anadolu'nun bu yerel gen kaynağının moleküler düzeyde incelenmesi, hem bitki sistematığına dair kimyasal verilerin tamamlanması hem de henüz tanımlanmamış biyoaktif moleküllerin keşfedilmesi açısından temel bir fırsat sunmaktadır. Bu çalışma, söz konusu cinsin diğer üyeleri üzerinde elde edilen güçlü biyoaktif verilerden hareketle, endemik bu alt türün de benzer şekilde zengin fitolojik içeriğe sahip olduğu varsayımı üzerine inşa edilmiştir. Bu hipotez çerçevesinde araştırma, hedef taksonun sekonder metabolit profilini bütünüyle ortaya koymayı ve bitki ekstraktından saf bileşiklerin elde edilmesini odak noktası olarak belirlemiştir. Bitkisel dokulardan izole edilecek etkin maddelerin çok yönlü biyoaktivite profillerinin taranması, bu yerel endemik alt türün farmakolojik potansiyelini ilk kez bu kapsamda literatüre kazandıracaktır. Böylelikle, bitkinin içerdiği majör ve minör fraksiyonların kimyasal zenginliği, gelecekteki tıbbi değerlendirmeler için biyokimyasal bir referans teşkil edecektir. Elde edilen *in vitro* sonuçlar, bitkinin farmakolojik değerini anlamlandırmak adına mutlak bir zemin oluştursa da; verilerin klinik platformlara taşınabilmesi için ileri düzey moleküler araştırmalara ve biyoyararlanım *in vivo* çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yönüyle çalışma, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisi üzerine yapılacak daha kapsamlı araştırmalar için gerekli olan ilk sistematik veri setini sunarak literatüre somut bir katkı sağlamayı hedeflemektedir.

2. GENEL BİLGİLER VE KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde, araştırmanın temelini oluşturan *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* taksonunun botanik ve ekolojik özellikleri, bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin kimyasal sınıflandırılması ve bu bileşiklerin izolasyon, saflaştırma işlemlerinde kullanılan kromatografik ve spektroskopik yöntemlerin temel prensipleri ele alınacaktır.

2.1. Bitkinin Tanıtılması

Helichrysum arenarium (L.) Moench subsp. *erzincanicum* P.H. Davis ve Kupicha, Asteraceae (Compositae) familyasına ait, çok yıllık (perennial) ve tabanda odunsu, üst kısımlarda ise otsu yapıda bir taksondur. Bitki, genellikle 20 cm ile 80 cm arasında değişen boylara ulaşmakta olup, yere yakın (asendan veya dik) gelişim gösteren bir büyüme formuna sahiptir.

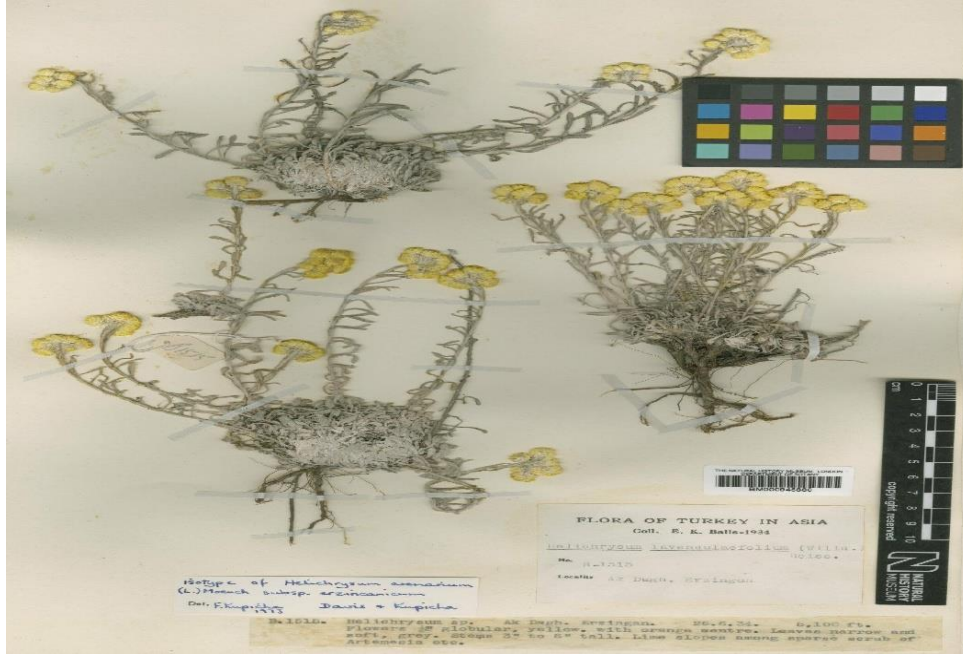
Tablo.1 *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*'un taksonomik hiyerarşisi

<u>Hiyerarşik Basamak</u>	<u>Takson</u>
Alem (Regnum)	Plantae
Bölüm (Divisio)	Tracheophyta
Sınıf (Classis)	Magnoliopsida
Takım (Ordo)	Asterales
Aile (Familia)	Asteraceae (Compositae)
Alt Aile (Subfamilia)	Asteroideae
Oymak (Tribus)	Gnaphalieae
Cins (Genus)	<i>Helichrysum</i> Mill.
Tür (Species)	<i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench
Alt Tür (Subspecies)	<i>Helichrysum arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> P.H. Davis ve Kupicha

2.1.1. Morfolojik karakteristikler

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* taksonunun gövdesi ve yaprakları, tüm yüzeyi kaplayan yoğun, gümüşü-beyaz renkli, keçemsi tüylerle (tomentoz indumentum) karakterizedir. Gövde yapısı, yoğun yan dallanma oluşturacak şekilde dallanmış olup bu durum bitkiye kompakt bir görünüm kazandırır. Yapraklar dar, lineer formda olup yine yoğun tüy tabakası ile kaplıdır. Bu morfolojik özellikler, özellikle yüzey alanını kaplayan trikomlar (tüyler), türün

yüksek su kaybı ve yoğun ışık şiddeti gibi kurak çevre koşullarına adaptasyonunda kritik bir fiziksel bariyer görevi üstlenmektedir. Taksonun dünya literatüründeki ilk resmi tescilini ve morfolojik sınırlarını somutlaştırmak adına, Londra Doğa Tarihi Müzesi arşivinde muhafaza edilen orijinal izotip örneği en temel referans materyali (Balls, 1934 ile Davis ve Kupicha, 1973) olarak Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* müze arşivi
herbaryum örneği

Doğal ortamında Haziran ayı civarında çiçeklenmeye başlayan takson, morfolojik floristik çalışmalarda kurutulmuş olan herbaryum materyali olarak incelenmektedir (Şekil 1). Bitki kurutulmuş olsa dahi, çiçek tablalarını saran koruyucu pulların (involukrum brakteler) canlı sarı renginden ve yapısal bütünlüğünden hiçbir şey kaybetmemesi, bu endemik alt türün en dikkat çekici ve ayırt edici taksonomik karakterlerinden biridir. Botanik literatüründe "scarious" (parşömenimsi/kuru-zarımsı) olarak tanımlanan bu brakteler, nem oranının sıfıra yaklaştığı durumlarda bile formunu koruyarak çiçek durumunu dış etkilere korumaktadır (Davis, 1975; Georgiadou ve ark., 1980). Sentromerik bir çiçek tablası üzerinde kümelenen kapitulunlar, taksonun generatif üreme başarısında ve tozlaşma biyolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Cinsin adını aldığı ve halk arasında "ölmez çiçek" olarak bilinmesine yol açan bu kalıcı floral morfoloji, taksonun kemotaksonomik kararlılığı ile de doğrudan ilişkilidir. Çiçeklenme döneminin sonuna doğru olgunlaşan aken tipi meyveler ve bunların üzerindeki papus (tüy demeti) yapıları ise, türün rüzgar vasıtasıyla tohum dağılımını gerçekleştirmesine olanak tanıyan diğer önemli morfolojik parametrelerdir (Davis, 1975). Yukarıda bahsi geçen kuru

halde bile *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*'un oldukça canlı göründüğüne dair ilgili bilgi, destekleyici olarak literatürdeki çalışmalarından görsel olarak (Kaya, 1722) teze yansıtılmıştır.



Şekil 2. *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*'un kurutulmuş teşhis örneği

2.1.2. Yayılış ve ekolojik özellikler

Helichrysum cinsi, dünya genelinde yaklaşık 600 türle temsil edilen, geniş bir coğrafi yayılışa sahip taksonlardan biridir. Bu cinsin biyoçeşitliliği özellikle Güney Afrika ve Akdeniz havzasında yoğunlaşmıştır. Türkiye florası, bu cinsin çeşitliliği açısından stratejik bir merkez konumundadır; ülkemizde bu cinse ait 30'un üzerinde takson bulunmakta olup, bu taksonların yaklaşık 20'si Türkiye'ye özgü (endemik) statüsündedir. Çalışmanın konusunu oluşturan *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*, Doğu Anadolu bölgesine, özellikle Erzincan ve yakın çevresine özgü dar yayılışlı bir endemik alt türdür. Ekolojik tercihler bakımından bu takson; genellikle 1300 ile 2500 metre arasındaki yüksek rakımlarda, kalkerli yamaçlarda, taşlık alanlarda ve alpin step ekosistemlerinde gelişim göstermektedir. Literatürde sıklıkça vurgulandığı üzere; yüksek rakımlı habitatların beraberinde getirdiği düşük nem, şiddetli rüzgar ve yüksek ışık yoğunluğu gibi ekstrem çevresel faktörler, bitkilerde biyosentetik yollarla aktif hale getirerek sekonder metabolit üretimini teşvik etmektedir (Gobbo-Neto ve Lopes, 2007). Taksonun yetiştiği Refahiye Sakaltutan Dağı gibi yüksek rakımlı ve zorlu ekolojik koşulların, bitkinin fitokimyasal profilinin zenginleşmesinde ve biyoaktif bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda birikmesinde doğrudan belirleyici olduğu kabul edilmektedir. Bu stres faktörleri, bitkinin sadece morfolojik olarak değil, biyokimyasal olarak da bulunduğu çevreye mükemmel bir adaptasyon sağlamasına olanak tanır. Bu doğrultuda, zorlu bir habitata sahip bu alt türün sekonder metabolit profilinin ve biyoaktif potansiyelinin belirlenmesi, literatürdeki verilerin tamamlanmasına katkı sağlayacaktır.

Tablo 2. Türkiye florasında yayılış gösteren endemik *Helichrysum* taksonları

<u>Endemik Takson Adı</u>	<u>Genel Yayılış Alanı (Bölge/Şehir)</u>
<i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i>	Doğu Anadolu (Erzincan)
<i>H. arenarium</i> subsp. <i>rubicundum</i>	Doğu ve İç Anadolu
<i>H. arenarium</i> subsp. <i>pallasii</i>	Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu
<i>H. noeanum</i>	İç Anadolu (Ankara, Çankırı)
<i>H. chionophilum</i>	İç ve Doğu Anadolu
<i>H. heywoodianum</i>	İç Anadolu (Konya, Karaman)
<i>H. siculum</i>	Güney Anadolu (Antalya, Mersin)
<i>H. pamphylicum</i>	Batı ve Güney Anadolu (Antalya)
<i>H. unispicatum</i>	Doğu Anadolu (Van, Hakkari)
<i>H. orbicularifolium</i>	İç ve Doğu Anadolu (Sivas, Malatya)
<i>H. peshmenianum</i>	Güney Anadolu (Antalya, Isparta)
<i>H. compactum</i>	Batı Anadolu (Aydın, İzmir)
<i>H. plicatum</i> subsp. <i>isauricum</i>	Güney Anadolu (Toros Dağları)
<i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i>	Doğu Anadolu (Artvin, Erzurum)
<i>H. pallasii</i> var. <i>vvedenskyi</i>	Doğu Anadolu Bölgesi
<i>H. goulandriorum</i>	Marmara Bölgesi (Balıkesir)
<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i>	Akdeniz Kıyıları
<i>H. proteoides</i>	Doğu Anadolu (Hakkari)
<i>H. kotschy</i>	Güney ve Doğu Anadolu
<i>H. oocephalum</i>	İç Anadolu Bölgesi (Kayseri)

Listelenen bu taksonlar (Tablo 2), Anadolu'nun farklı coğrafi alanlarına ve iklim özelliklerine göre çeşitlilik gösteren bir dağılım sergilemektedir. Gerçekleştirilen literatür taramaları ayrıca bitkilerin yetiştiği farklı habitat koşullarına bağlı olarak fitolojik içeriklerinin, büyük farklılıklar gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

2.1.3. Geleneksel etnobotanik kullanım ve önemi

Helichrysum türleri, çiçeklerinin kuruduktan sonra bile canlı sarı rengini koruması nedeniyle halk arasında “Altın Otu” veya “Ölmez Çiçek” isimleriyle bilinen köklü bir şifa kaynağıdır. Anadolu'nun pek çok bölgesinde olduğu gibi Erzincan yerelinde de bu bitkinin kurutulmuş çiçekli dalları, geleneksel olarak suyla kaynatılarak (dekoksasyon) veya sıcak suda demlenerek (infüzyon) hazırlanan bir çay şeklinde tüketilmektedir. Bu hazırlama yöntemiyle elde edilen sıvının, güçlü idrar söktürücü etkisi sayesinde özellikle böbrek kumlarını döktüğü ve safra kesesindeki taşların vücuttan atılmasına yardımcı olduğu kabul edilir. Aynı demleme usulüyle

hazırlanan çayın mideyi rahatlatıcı özellikleri nedeniyle yemeklerden sonra içilmesiyle hazımsızlığın giderildiği, mide yanmalarının hafifletildiği ve gastrit şikayetlerini yatıştırdığı bilinmektedir. Bitkinin haricen kullanımında ise çiçeklerin zeytinyağı içerisinde bekletilmesiyle elde edilen karışımlar veya hazırlanan lapalar, yara ve yanıkların üzerine sürülerek doku yenilenmesini hızlandırmak ve iltihabı gidermek amacıyla uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Günümüzde bu zengin etnobotanik birikim, cinsin çeşitli birçok türüne ait kuru çiçek topluluklarının paketlenerek “Altın Otu Çayı” adı altında ticari bir ürün olarak yaygın şekilde satışa sunulmasına zemin hazırlamıştır. Aktarlarda ve marketlerde “şifalı bitki çayı” olarak yaygınlaşan ticari potansiyel, bitkinin içerdiği sekonder metabolitlerin bilimsel yöntemlerle aydınlatılması gerekliliğini daha da arttırmaktadır.

2.2. Ekstraksiyon Teknikleri

Bitkisel materyallerde bulunan biyoaktif bileşenlerin analiz edilebilir hale getirilmesi sürecinde atılan ilk adım ekstraksiyon işlemidir. Bu yöntem, bitki matrisi içerisinde hapsolmuş olan hedef sekonder metabolitlerin, uygun bir çözücü sistemi aracılığıyla dokulardan ayrıştırılarak sıvı faza aktarılması prensibine dayanır. Ekstraksiyonun temel amacı, karmaşık bitki yapısındaki istenmeyen maddeleri eleyerek, üzerinde kalitatif ve kantitatif çalışmalar yapılabilecek konsantre bir özüt elde etmektir. Söz konusu süreç; bitki dokularının mekanik olarak parçalanması, çözücünün hücre boşluklarına nüfus etmesi, hedef moleküllerin çözünerek hücre dışına difüzyonu gibi karmaşık basamaklardan oluşur, Uygulanacak yöntemin ve kullanılacak çözücünün seçimi; izole edilmesi planlanan maddelerin polariteleri, molekül ağırlıkları ve ısıl kararlılıkları özelliklerine göre dikkatle belirlenmektedir.

2.2.1. Maserasyon (Soğuk ekstraksiyon)

Maserasyon, bitki materyalinin oda sıcaklığında ve belirli zaman dilimlerinde çözücü içerisinde bekletilmesiyle gerçekleştirilen bir yöntemdir. İşlem, çözücünün bitki dokularına sızarak hücre içerisindeki bileşenleri çözmesi ve oluşan konsantrasyon farkı sayesinde bu maddelerin dış ortama yayılması mekanizmasıyla yürütülür. Bu esnada ortamın düzenli olarak karıştırılması, yüzeydeki doygunluğu kırarak difüzyon verimliliğini maksimize eder. Isı gerektirmeyen bir işlem olduğu için özellikle termolabil (ısıya duyarlı) yapıdaki sekonder metabolitlerin kimyasal bütünlüğünü korumada en güvenilir teknik olarak kabul edilmektedir. Literatürde maserasyon, bitki hücrelerindeki hassas bağların kopmasını engelleyen ve termal bozunma riskini engelleyen temel “soğuk ekstraksiyon” metodu olarak tanımlanmaktadır. İşlem sonunda süzme ve presleme yoluyla elde edilen maserat, bitkinin biyoaktif profilini yansıtan zengin bir içerik

sunar. Düşük maliyeti ve farklı çözücü sistemlerine olan yüksek adaptasyonu, bu yöntemi fitokimyasal araştırmaların vazgeçilmez bir başlangıç basamağı haline getirmiştir.

2.2.2. Perkolasyon (Süzme yöntemi)

Bu yöntemde bitki materyali “perkolatör” adı verilen özel bir sütun düzeneğine yerleştirilir ve çözücünün yerçekimi etkisiyle bu materyalin üzerinden yukarıdan aşağıya doğru süzülür. Maserasyondan temel farkı, çözücünün sürekli olarak yenilenmesi ve bu sayede bitki dokusu ile çözücü arasındaki derişim farkının daima yüksek kalmasıdır. Sürekli olan akış, özütleme işleminin çok daha hızlı ve etkin bir şekilde tamamlanmasını sağlar. Genellikle bitkisel materyalin tamamen tüketilmesi hedeflendiğinde tercih edilen bir yöntemdir.

2.2.3. Soxhlet ekstraksiyonu (Sıcak ekstraksiyon)

Sürekli ve döngüsel bir mekanizmaya sahip olan Soxhlet ekstraksiyonu, çözücünün buharlaştırılıp ardından geri soğutucu vasıtasıyla bitki materyali üzerine damlatılması prensibiyle çalışır. Sifon düzeneği sayesinde doaygunluğa ulaşan çözücü periyodik olarak toplama balonuna geri döner. Yöntemin başlıca avantajı, kısıtlı miktarda çözücü kullanarak materyalin tekrar taze çözücüyle muamele edilmesidir. Ancak termostabil (ısıya dayanıklı) maddelerin ayrımında kullanılabilir olması, bu yöntem için daha fazla risk ve dikkat gerektirir.

2.2.4. Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE)

Modern ekstraksiyon yöntemleri arasında öne çıkan bu teknik, yüksek frekanslı ses dalgalarının sıvı ortamda oluşturduğu mikroskobik kabarcık oluşumu (kavitasyon) etkisinden faydalanır. Bu fiziksel etki, bitki hücresi çeperlerini mikroskobik düzeyde tahrip ederek çözücünün dokularak çok daha hızlı nüfuz etmesini sağlar. Geleneksel yöntemlere kıyasla işlem süresini dakikalar seviyesine indirmesi, daha az çözücü gerektirmesi ve çevre dostu bir yaklaşım sunması, bu yöntemin güncel araştırmalardaki popüleritesini artırmıştır.

2.3. Sekonder metabolitler

Bitkisel metabolizma; temel yaşam döngüsünü idame ettiren “primer” süreçler ile çevresel adaptasyonu yöneten “sekonder” süreçlerin bulunduğu bir bütündür. Karbonhidrat, protein ve yağ asitlerinin sentezi gibi doğrudan büyüme ve üreme faaliyetlerini kapsayan primer metabolizmanın aksine; bitkiler, dış dünyadan gelen biyotik ve abiyotik baskılara karşı koyabilmek adına sekonder metabolitler adı verilen özelleşmiş bileşikler ürete yeteneğı geliştirmişlerdir. Bu ikincil bileşikler, bitkinin doğrudan fiziksel gelişimi için birincil derecede zorunlu olmasalar da; ekosistem içerisindeki stratejik varlığı koruması, rakip türlere karşı

kimyasal üstünlük kurması (alelopati) ve zararlı patojenlere karşı savunma kalkanı oluşturmaları bakımından hayati öneme sahiptir. Sekonder metabolitler genellikle belirli taksonomik gruplara özgü olup, bitkinin çiçek, yaprak veya kök gibi farklı dokularında özgün yoğunluklarda depolanırlar. Temel metabolizma yollarından türetilen bu karmaşık yapılar, güncel literatürde biyosentetik kökenlerine göre üç ana kategoride sınıflandırılmaktadır.

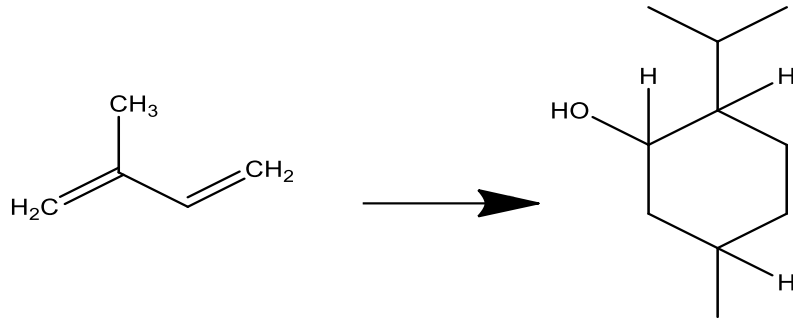
2.3.1. Terpenler (Terpenoidler)

Bitki alemindeki en geniş kimyasal çeşitliliğe sahip grup olan terpenler, mevalonik asit (MVA) ve metileritritol fosfat (MEP) yolları aracılığıyla sentezlenirler. Bu sınıfın yapısal karakteristiği, beş karbonlu “izopren (C_5)” birimlerinin belirli bir hiyerarşiyle polimerleşmesidir. Bitkilerde polinatörleri cezbetmekten, termal stresle mücadeleye ve reçine formunda fiziksel-kimyasal koruma sağlamaya kadar çok yönlü ekolojik görevler üstlenirler. Terpen biyosentezi, bitki hücresinin farklı birimlerinde eş zamanlı olarak yürütülen çok katmanlı bir süreçtir. Sitoplazmada gerçekleşen MVA yolağı genellikle seskiterpenler ve sterollerin öncül maddelerini üretirken; kloroplastlarda aktif olan MEP yolağı, monoterpenler ve diterpenlerin sentezinden sorumludur. Bu iki farklı biyosentetik kanalın varlığı, bitkinin çevresel değişimlere karşı çok daha hızlı ve kendine has kimyasal tepkiler vermesine olanak sağlar. Özellikle yüksek sıcaklık maruziyetinde bitki dokularından salınan uçucu monoterpenler, yaprak yüzeyinde bir mikro-iklim oluşturarak termal kararlılığı sağlarken, daha ağır molekülü triterpenik saponinler ise hücre zarında oluşturdukları porlar sayesinde antifungal bir kalkan görevi görürler.

2.3.1.1. Terpenlerin sınıflandırılması

Terpen sınıfı bileşikler, bünyelerinde ihtiva ettikleri izopren ünitelerinin niceliğine dayalı olarak sistematik bir tasnife tabi tutulurlar. Bu doğrultuda, tek bir beş karbonlu birimden meydana gelen “hemiterpenler (C_5)” grubun en yalın üyelerini oluştururken; iki adet birimin birleşmesiyle sentezlenen “monoterpenler (C_{10})”, bitkilerin uçucu yağlarındaki baskın koku ve aroma profilini tayin eden temel bileşenleri kapsar. Üç izopren ünitesinin bir araya gelmesiyle şekillenen “seskiterpenler (C_{15})”, bitkisel savunma mekanizmalarında fitoaleksinin rolleriyle (bitki savunma molekülleri) ön plana çıkarken; bitki gelişimini regüle eden yapıların iskelet çatısını “diterpenler (C_{20})” kurmaktadır. Moleküler mimarisi daha karmaşık olan gruplar incelendiğinde ise; biyolojik zararların hassasiyetinde kritik öneme sahip fitosteroller (C_{27} - C_{30}) ile “triterpenler (C_{30})”, bitki dokularına karakteristik renklerini veren ve fotosentetik sistemleri destekleyen “karotenoidler (C_{40})” ve çok sayıda birimin biyopolimerizasyonu neticesinde

ortaya çıkan “politerpenler”, bu familyanın geniş yapısal çeşitliliğini tamamlayan diğer unsurlardır. Farklı halkalaşma ve oksidasyon dereceleriyle modifiye olan bu bileşikler, bitki aleminde olağanüstü bir fonksiyonel çeşitlilik sergiler. Sahip oldukları bu yapısal zenginlik, terpenoid yapılı sekonder metabolitlerin tıbbi ve farmakolojik çalışmalarda çok yönlü biyoaktiviteler göstermesini sağlamaktadır. Özellikle bitkilerin abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı geliştirdiği hayati adaptasyon mekanizmalarında rol oynayan bu metabolitler, doğal savunma sisteminin temel taşlarını oluşturur. Yapılarındaki bu fonksiyonel modifikasyonlar, söz konusu bileşikler modern fitoterapi araştırmalarında ve yeni nesil terapötik ajanların geliştirilmesinde vazgeçilmez birer doğal kaynak haline getirmektedir. Dolayısıyla, bu geniş biyoaktif spektrum, doğal ürün kimyasında terpenoidlerin izolasyon ve karakterizasyon çalışmalarını her dönem güncel kılmaktadır.



Şekil 3. Terpenoid yapıtaşı izopren ve türeyen mentol molekülü.

Terpenoidlerin kimyasal hiyerarşisi, mevalonik asit (MVA) ve metileritritol fosfat (MEP) yollarının ortak ürünü olan beş karbonlu yapı taşlarının polimerizasyon derecesine bağlıdır. Bu sınıfın biyosentetik matrisindeki en küçük ve yalın birim, gaz halindeki en temel hemiterpen (C_5) olan izopren molekülüdür. İzopren, karmaşık terpenoidlerin sentezindeki temel "biyosentez tuğlasını" (monomer) temsil etmektedir. Bitki hücrelerinde bu öncül C_5 birimlerinin baş-kuyruk (head-to-tail) kuralına göre birbirine bağlanıp halkalaşması, sınıfın sistematik olarak bir üst basamağını oluşturur. Bu biyosentetik büyümenin en karakteristik örneği, iki izopren biriminin ($C_5 + C_5$) birleşmesiyle meydana gelen 10 karbonlu monotermen yapısındaki mentol bileşiğidir (Şekil 3). Mentol, ham C_5 tuğlasının bitki bünyesinde işlenerek sıvı, uçucu, kokulu ve terapötik etkiye sahip fonksiyonel bir sekonder metabolit ürününe dönüştüğünü yapısal olarak somutlaştırmaktadır.

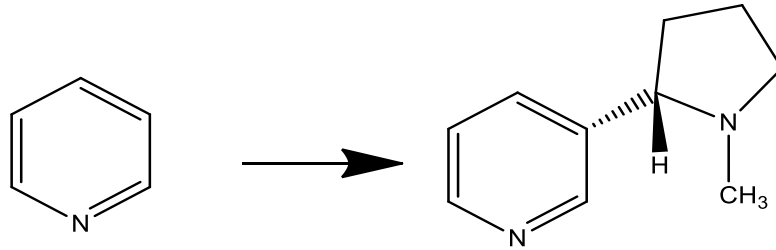
2.3.2. Azotlu bileşikler

Yapılarında bir veya daha fazla azot atomu barındıran bu grup, biyolojik aktivitesi ve toksik potansiyeli en yüksek sekonder metabolitleri bünyesinde barındırır. Çoğunlukla lizin, tirozin ve

triptofan gibi aminoasitlerin modifikasyonu ile üretilen bu maddeler; otçul canlılara karşı nörotoksik etkiler gösterme ve tohumları mikrobiyal saldırılardan muhafaza etme gibi savunma stratejilerinde başrol oynarlar. Azotlu bileşiklerin biyosentezi, primer amino asit metabolizması ile doğrudan ilişkilidir ve bu süreç bitki hücresinin farklı hücresel birimlerinde oldukça sofistike ağlar üzerinden yürütülür. Bitki, sınırlı bir kaynak olan azotu bu bileşiklere aktararak aslında yüksek maliyetli ama oldukça etkili bir kimyasal silah deposu oluşturur. Bu bileşikler sadece edilgen bir savunma aracı olmayıp, aynı zamanda bazı bitki türlerinde azot depolama formu olarak da işlev görerek metabolik esneklik sağlarlar.

2.3.2.1. Azotlu bileşiklerin sınıflandırması

Bitkisel bünyedeki azotlu bileşikler, kimyasal iskeletlerine ve azot atomunun konumuna göre sistematik bir tasnife tabi tutulmaktadır. Bu sınıfın en geniş ve biyolojik açıdan en aktif grubunu temsil eden alkaloidler; acı tatları ve toksik etkileri sayesinde otçul canlıları bitkiden uzak tutan, hayvanların merkezi sinir sistemi üzerinde felç edici veya beslenme isteğini köreltici etkiler gösteren etkin ekolojik savunma ajanlarıdır. Bunun yanı sıra bu yapılar yüksek farmakolojik aktiviteleri sayesinde ağrı kesici (morfin), uyarıcı (kafein) veya antitümör özellikleri ile modern tıbbın merkezinde yer alırlar. İskelet yapılarındaki azotun konumuna göre piridin, tropan, indol, kinolin, izokinolin ve pürin gibi alt dallara ayrılarak geniş bir kimyasal çeşitlilik sergilerler.



Şekil 4. Azotlu bileşikler yapıtaşı piridin ve ondan türeyen nikotin alkaloidi.

Yapılarında azot atomu barındıran sekonder metabolitlerin ve özellikle alkaloidlerin biyolojik aktivite potansiyeli, taşıdıkları heterosiklik halka sistemlerinin mimarisiyle ilişkilidir. Bu gruptaki bileşiklerin en küçük yapısal kökenini, halkanın içinde bir adet azot atomu (N) bulunduran 6 üyeli aromatik piridin halkası oluşturmaktadır (Şekil 4). Piridin halkası, doğada bitkiler tarafından tek başına nihai bir son ürün olarak depolanmaz; ancak azotlu metabolitlerin mutfaktaki en ilkel ve en yalın heterosiklik iskelet çekirdeğini temsil eder. Bitki hücrelerinde bu yalın heterosiklik çekirdeklerin, amino asit metabolizmasından gelen diğer azotlu yapılarla entegre edilmesi, biyoaktif alkaloidlerin senteziyle sonuçlanır. Bu durumun en net sistematik göstergesi ise piridin halkasının yanına 5 üyeli bir pirolidin halkasının kovalent olarak

bağlanmasıyla ($C_5 + C_5$ halka birleşmesi mantığıyla) oluşan nikotin alkaloididir (Şekil 4). Şemadan anlaşılacağı üzere piridin molekülü azotlu bileşiklerin teorik başlangıç halkasını modellerken, nikotin bu halkadan türetilmiş, bitkinin savunma amacıyla bizzat sentezlediği, yüksek farmakolojik aktiviteye sahip gerçek bir sekonder metabolit basamağını temsil etmektedir.

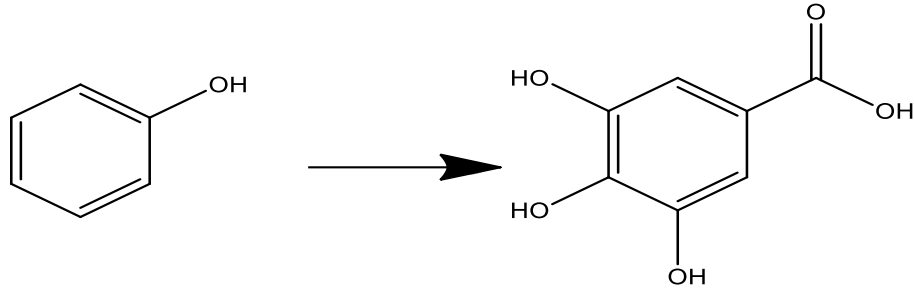
2.3.3. Fenolik bileşikler

Bitkisel ikincil metabolitler içerisinde en yaygın dağılımı gösteren gruplardan biri olan fenolik bileşikler, kimyasal olarak en az bir aromatik halkaya bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu (-OH) taşımalarıyla tanımlanırlar. Bu maddeler, bitki bünyesinde temel olarak şikimik asit ve malonik asit yolakları üzerinden sentezlenerek oldukça karmaşık biyosentetik ağlar neticesinde oluşurlar. Fenolikler, bitkilerin hem gelişimsel süreçlerinde hem de çevresel stres faktörlerine karşı verdikleri adaptif yanıtlarda hayati fonksiyonlar üstlenirler. Özellikle UV radyasyonunun yıkıcı etkilerine karşı doğal bir fitokimyasal filtre görevi görerek hücresel yapıları oksidatif hasardan muhafaza ederler. Bu bileşiklerin bitki savunma sistemindeki rolleri de oldukça çeşitlidir. Patojen saldırısı veya fiziksel yaralanma durumunda konsantrasyonları hızla artarak antifungal ve antibakteriyel bariyerler meydana getirirler. Ayrıca, bitki dokularına renk ve koku vererek tozlaştırıcıların cezbedilmesini sağlarken, otçul canlılar için de caydırıcı birer tat faktörü olarak işlev görürler. Moleküler düzeyde serbest radikalleri süpürme yetenekleri, onları bitki dünyasının en etkin doğal antioksidan sistemlerinden biri haline getirmektedir.

2.3.3.1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırması

Fenolik bileşiklerin sistematik tasnifi, moleküler yapılarıdaki karmaşıklık düzeyine ve karbon iskeletlerine göre şekillenmektedir. Basit yapılu fenolik asitler (C_6-C_1 ve C_6-C_3), bu geniş metabolit ailesinin temel yapı taşlarını meydana getirirler. Bitkilerde en yaygın dağılımı gösteren grup olan flavonoidler ($C_6-C_3-C_6$) ise, bünyelerindeki C halkasının oksidasyon seviyesine ve yapısal modifikasyonlarına göre farklı alt sınıflara ayrılmaktadır. Bu geniş spektrum içerisinde kalkonlar, flavanonlar, flavonlar ve flavonoller gibi özelleşmiş kimyasal birimler yer almaktadır. Ayrıca, iki flavonoid ünitesinin birleşmesiyle oluşan dimerik yapıdaki biflavonoidler, bu sınıfın yapısal çeşitliliğini arttıran önemli unsurlardır. Bitkisel dokularda savunma ve dayanıklılıktan sorumlu olan diğer gruplar incelendiğinde; odunsu yapıların kararlılığını sağlayan lignanlar ile güçlü antifungal etkiler gösteren kondanse ve hidrolize tanenler ön plana çıkmaktadır. Bitkisel anatomide mekanik dirençten sorumlu olan lignin ve kinonlar da fenolik bileşiklerin biyolojik sistemlerdeki çok yönlü işlevlerini yansıtan diğer

bileşenlerdir. Söz konusu bu fitokimyasal bileşenler, bitkilerin abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı geliştirdiği hayati savunma mekanizmalarının merkezinde yer almaktadır. Hücresel düzeyde sergiledikleri güçlü bütüncül antioksidan kapasite, bu metabolitlerin farmakolojik ve terapötik değerini arttıran en temel parametredir. Özellikle Anadolu florasındaki tıbbi bitkilerin zengin sekonder metabolit profillerinin kalitatif ve kantitatif yönleriyle aydınlatılması, modern fitokimya araştırmalarının öncelikli hedefleri arasındadır. Nitekim, bu zengin coğrafyaya ait bitki matrislerinin taranması, fenolik bileşiklerin sistematik tasnifine yeni alt sınıflar veya dimerik kombinasyonlar düzeyinde katkı sunma potansiyeline sahiptir. Sonuç olarak, Anadolu'nun tıbbi bitki mirasından izole edilen bu saf bileşenler, doğal ürünler kimyasında hem kemotaksonomik sınırların netleşmesini sağlamakta hem de farmasötik Ar-Ge çalışmaları için yüksek saflıkta model moleküller sunmaktadır.



Şekil 5. Fenolik bileşik olan fenol ve ondan türeyen gallik asit molekülü

Fenolik bileşiklerin sistematigi ve serbest radikalleri süpürme yetenekleri, aromatik benzen halkası üzerindeki hidroksil (-OH) ve karboksilli asit (-COOH) gruplarının konumuna doğrudan bağlıdır. Bu sınıfın temelini oluşturan en küçük yapı, bir benzen halkasına tek bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşan fenol çekirdeğidir (Şekil 5). Fenol, yapısında asit grubu barındırmadığı için teknik olarak bir fenolik asit değildir ve bitkilerde bu çıplak haliyle birikmez; ancak tüm doğal fenoliklerin en ham kimyasal çekirdeğidir. Bu ham aromatik halkaya, şikimik asit yolağı vasıtasıyla fonksiyonel grupların eklenmesi, sınıfın gerçek bir doğal fenolik asit basamağına evrilmesini sağlar. Bu sistematik dönüşümün en stabil örneği, fenol halkasına bir karboksil grubu ve iki adet daha hidroksil grubunun eklenmesiyle türeyen, C₆-C₁ iskelet yapısındaki gallik asit molekülüdür (Şekil 5). Gallik asit, taşıdığı karboksil grubu sayesinde gerçek bir "fenolik asit" kimliği kazanmıştır. Bu durum, bitki kimyasında asitsiz ham bir aromatik halkadan, doğada serbestçe biriken ve laboratuvar analizlerinde evrensel standart kabul edilen fonksiyonel bir fenolik asit yapısına geçişteki yapısal hiyerarşiyi net bir şekilde göstermektedir.

Tablo 3. Bitkisel sekonder metabolitlerin biyosentetik ve yapısal matrisi

Ana Sınıf	Biyosentetik Yolak	Yapısal Birim / İskelet	Genişletilmiş Alt Gruplar
Terpenler	MVA ve MEP Yolakları	İzopren (C ₅) Birimleri	Hemiterpen (C₅) Monoterpen (C₁₀) Seskiterpen (C₁₅) Diterpen (C₂₀) Triterpen (C₃₀) Steroller (C₂₇-C₃₀) Karotenoidler (C₄₀) Politerpenler (C_n)
Azotlu bileşikler	Amino Asit Metabolizması	Heterosiklik Azot (N) Yapıları	Alkaloidler (Piridin, Tropan, İndol, Kinolin, İzokinolin, Pürin) Siyanojenik Glikozitler Glukozinolatlar Non-protein amino asitler
Fenolikler	Şikimik ve Malonik Asit	Aromatik Halka ve -OH Grupları	Fenolik asitler (C₆-C₁ ve C₆-C₃) Flavonoidler (Kalkon, Flavanon, Flavon, Flavonol, İzoflavon, Biflavonoid, Antosiyanin) Stilbenler Kumarinler Lignanlar Tanninler (Kondanse ve Hidrolize) Lignin Kinonlar Ksantonlar

2.4. Biyolojik Aktiviteler

Dünyamız, milyonlarca yıllık evrimsel süreçte bitkiler tarafından sentezlenen ve sayıları yüz binleri aşan sekonder metabolitler vasıtasıyla devasa bir biyomoleküler kütüphaneye dönüşmüştür. Bitkisel organizmalarda gerçekleşen bu sofistike biyokimyasal üretim; yalnızca ilgili türün abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı geliştirdiği adaptif bir savunma mekanizması değil, aynı zamanda tüm canlı sistemler için paha biçilemez bir farmakolojik kaynak niteliğindedir. Diğer tıbbi bitki gruplarında gözlemlendiği üzere, Anadolu florasında geniş ve stratejik bir yayılım gösteren *Helichrysum* cinsi taksonları da, bünyelerinde ihtiva ettikleri zengin polifenolik bileşenler sayesinde biyolojik sistemler üzerinde çok boyutlu ve sinerjik etkiler sergileme kapasitesine sahiptir. Bu bitkisel kaynakların sahip olduğu terapötik (tedavi edici) potansiyel; diğer fitokimyasal kaynaklarda olduğu gibi, izole edilen biyoaktif bileşenlerin hücresel yollar üzerindeki düzenleyici etkilerinden ve moleküler düzeyde kurdukları spesifik etkileşimlerden ileri gelmektedir.

2.4.1. Antioksidan aktivite ve toplam fitokimyasal içerik

Hücrel metabolizma sırasında yan ürün olarak ortaya çıkan serbest radikaller, proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi hayati makromoleküller üzerinde oksidatif hasara yol açarlar. Bitkisel sekonder metabolitler, özellikle fenolik yapılar, bu reaktif oksijen türlerini (ROS) stabilize ederek oksidatif stresin tetiklediği kronik hastalıkların önlenmesinde kritik birer bariyer görevi üstlenirler. Bu bileşiklerin antioksidan kapasiteleri, aromatik halkalar üzerindeki hidroksil gruplarının serbest radikal yapılarına hidrojen atomu veya elektron transfer etme kabiliyetine dayanır. Bir özütün antioksidan profilini bütünsel olarak ortaya koyabilmek için öncelikle bünyesindeki aktif bileşenlerin niceliğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla literatürde, gallik asit eşdeğeri üzerinden hesaplanan toplam fenolik madde tayini (TPC) ve kuersetin eşdeğeri üzerinden yürütülen toplam flavonoid madde tayini (TFC) analizleri temel parametreler olarak kabul edilir. Özütün içeriğine bağlı olarak sergilediği bu koruyucu etki, farklı kimyasal mekanizmalar üzerinden tayin edilmektedir. Literatürde en yaygın başvuru yöntemleri arasında; serbest radikal süpürücü kapasiteyi ölçen DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve ABTS testleri, özütün iyon indirgeme gücünü saptayan FRAP (Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç) ve CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite) analizleri ile lipid peroksidasyonunu engelleme potansiyelini ölçen β -karoten ağartma ve ORAC (Oksijen Radikali Absorbe Etme Kapasitesi) yöntemleri yer almaktadır.

2.4.2. Antidiyabetik aktivite

Diabetes mellitus, kan şekerinin kontrolsüz artışıyla karakterize edilen sistemik bir metabolizma hastalığıdır. Modern diyabet yönetiminde en etkili stratejilerden biri, karmaşık karbonhidratların glukoza parçalanma sürecini yavaşlatarak yemek sonrası kan şekerinin ani yükselmesini (postprandiyal hiperglisemi) baskılamaktır. Bitkisel kaynaklı sekonder metabolitler, özellikle polifenolik yapılar, nişasta sindiriminde anahtar rol oynayan enzimlerin aktif merkezlerine bağlanarak bu yapıları inhibe edebilir ve ince bağırsaktaki glukoz emilimini dengeleyebilirler. Literatürde bu potansiyelin belirlenmesi amacıyla, karbonhidrat metabolizmasında kritik öneme sahip olan α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerinin baskılanma dereceleri ölçülmektedir. Bu amaçla yürütülen *in-vitro* çalışmalarda, enzimlerin substratı parçalaması sonucu oluşan renkli ürünün spektrofotometrik olarak takip edildiği pNPG (p-nitrofenil- α -D-glukopiranozit) yöntemi (α -glukozidaz için) ve DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) yöntemi (α -amilaz için) en yaygın başvuru metodolojilerdir. Bilimsel araştırmalarda bu veriler üzerinden hesaplanan inhibisyon değerleri, standart antidiyabetik ajanlar ile doğrudan kıyaslanarak bitkinin terapötik değeri somutlaştırılmaktadır.

2.4.3. Anti-Alzheimer aktivite (Antikolinesteraz Etki)

Nörodejeneratif bir bozukluk olan Alzheimer hastalığının temelinde, merkezi sinir sistemindeki kolinerjik iletimin zayıflaması yer almaktadır. Sinaps boşluğundaki asetilkolin miktarının korunması, kognitif fonksiyonların sürdürülebilirliği açısından hayati önem taşır. Bu bağlamda, nörotransmitterlerin yıkımından sorumlu enzimlerin geçici olarak baskılanması, semptomatik tedavinin ana eksenini oluşturmaktadır. Bitkisel kaynaklı flavonoidler ve fenolik asitler, bu enzimlerin katalitik bölgeleriyle etkileşime girerek doğal inhibitörler olarak işlev görebilirler. Süreç içerisinde özellikle asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) enzimlerinin aktivitesinin durdurulması hedeflenir. Bu aktivitenin kantitatif ölçümünde, literatürde enzim-substrat reaksiyonuna dayanan kolorimetrik Ellman Metodu en yaygın kullanılan teknik olarak kabul edilmektedir.

2.4.4. Antikanser ve sitotoksik aktivite

Kanser, hücrelerin kontrol mekanizmalarını yitirerek sınırsız bölünme yeteneği kazanmasıyla ortaya çıkan kompleks bir patolojik süreçtir. Doğal kaynaklı bileşiklerin kanserli dokular üzerindeki etkisi; hücre döngüsünün belirli aşamalarda durdurulması, programlı hücre ölümünün (apoptoz) tetiklenmesi ve tümör yayılımı için gerekli sinyal yollarının bloke edilmesi üzerinden yürütülür. Bitkisel özütlerin veya saf izolatların hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için kullanılan yöntemlerin başında, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçen MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] analizi gelmektedir. Bunun yanı sıra literatürde, daha yüksek hassasiyet sunan XTT, SRB (Sulforhodamine B) ve hücre zarı hasarını saptayan LDH (Laktat Dehidrogenaz) salınım testleri de sitotoksikite tayininde başvurulan diğer metodolojilerdir.

2.4.5. Diğer biyolojik ve farmakolojik etkiler

Sekonder metabolitler, bitkinin dış dünyadaki biyotik tehditlere karşı geliştirdiği kimyasal savunma hattının temel bileşenleridir. Bu savunma mekanizmalarının insan biyolojisindeki karşılığı; patojen mikroorganizmaların gelişimini durduran antimikrobiyal ve antifungal etkiler olarak karşımıza çıkar. Ayrıca, vücuttaki enflamatuar medyatörleri baskılayarak doku hasarını azaltan anti-inflamatuar (iltihap giderici) ve karaciğerin detoksifikasyon kapasitesini destekleyen hepatoprotektif özellikler de büyük önem taşır. Özellikle *Helichrysum* cinsine özgü taksonların sahip olduğu bu çok yönlü fitokimyasal çeşitlilik, modern tıp, gıda takviyesi ve dermokozmetik endüstrisi için sürdürülebilir bir hammadde kaynağı sunmaktadır.

2.5. İzolasyon ve Saflaştırma

Doğal kaynaklardan biyoaktif sekonder metabolitlerin elde edilmesi; karmaşık bitki matriksinden hedeflenen bileşiklerin ayrılması, saflaştırılması ve yapılarının aydınlatılmasını kapsayan çok basamaklı bir süreçtir. Bu süreçte tercih edilen metodolojiler; bitki materyalinin kimyasal kompozisyonuna, hedeflenen moleküllerin polaritesine, molekül ağırlığına ve termal stabilitesine bağlı olarak stratejik bir biçimde değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmada izlenen izolasyon hiyerarşisi, ham özütün kromatografik tekniklerle kademeli olarak fraksiyonlanmasından, hedef bileşiklerin en yüksek saflık düzeyinde elde edilmesine olanak tanıyan gelişmiş enstrümantal yöntemlere kadar uzanan sistematik bir akışı temel almaktadır.

2.5.1. Kromatografik süreçler

Kromatografi, bir karışım içerisinde bulunan bileşenlerin, biri sabit diğeri hareketli olan iki faz arasındaki farklı dağılma veya tutunma eğilimlerine dayanarak birbirlerinden ayrılması prensibine dayanan temel bir ayırma tekniğidir. Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan kromatografik yöntemlerde ayırma performansı, seçilen sabit fazın kimyasal yapısına ve dolgu maddesinin özelliklerine doğrudan bağlıdır. Bu sürecin ön hazırlık ve optimizasyon aşamasında başvurulmuş ince tabaka kromatografisi (TLC), numunenin polariteleri hakkında hızlı ve nitel bir bilgi edinilmesini sağlayarak izolasyonun gerçekleştirileceği sistemlere yol haritası teşkil etmektedir. Kolon kromatografisi çatısı altında yürütülen izolasyon ve saflaştırma süreçlerinde kullanılan farklı sabit fazlar, moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine göre spesifik ayırma mekanizmaları sunmaktadır. Normal faz kromatografisinin temelini oluşturan silika jel, polarite farkına dayalı bir ayırma gerçekleştirerek özellikle orta polaritedeki fenolik bileşiklerin fraksiyonlanmasında etkili sonuçlar vermektedir. Moleküler büyüklüğe göre ayırma yapan Sephadex LH-20 gibi sabit fazlar ise, özellikle polimerik yapıdaki bileşiklerin moleküler eleme prensibiyle saflaştırılmasında tercih edilmektedir. Saflaştırma sürecinin en kritik aşamasını oluşturan preparatif HPLC (Prep-HPLC) ise, yapısal olarak birbirine çok yakın olan bileşiklerin miligram düzeyinde ve yüksek saflıkta izole edilmesini mümkün kılmaktadır. Kolon kromatografisi ve spektroskopi gibi tekniklerin birleşimini ifade eden üst düzey bir teknik varyasyondur.

2.5.2. Yapı aydınlatma

İzolasyon ve saflaştırma işlemleri neticesinde elde edilen saf izolatların moleküler mimarilerinin kesin olarak tanımlanabilmesi için gelişmiş enstrümantal ve spektroskopik yöntemlerin entegrasyonu esastır. Bu sürecin başlangıcında sıklıkla yararlanılan yüksek

performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), numunelerin kromatografik saflığının teyit edilmesinde ve karakteristik retansiyon (alınma) zamanlarının belirlenmesinde temel teşkil eden enstrümantal bir yöntemdir. Moleküler karakterizasyon ve yapı tayininde kullanılan en temel yöntem olan Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), atomların sayılarını, uzaysal yönelimlerini ve birbirleriyle olan bağlanma şekillerini belirleyerek kesin yapıyı kanıtlamaktadır. Bu doğrultuda, izole edilen bileşiklerin tespiti amacıyla öncelikle tek boyutlu (1D) NMR tekniklerinden ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları alınarak kimyasal kayma (δ) değerleri belirlenmektedir. Moleküldeki karmaşık bağlanma düzenini ve uzun menzilli etkileşimleri çözmek için ise iki boyutlu (2D) COSY, HSQC ve HMBC spektrumları eş zamanlı olarak değerlendirilmektedir. Elde edilen tüm bu spektral verilerin literatürdeki referans değerlerle analitik olarak mukayese edilmesi, hedef moleküllerin yapısal olarak kesin biçimde saptanarak formülize edilmesine olanak sağlamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* taksonunun fitokimyasal içeriğini belirlemek ve biyolojik aktivite potansiyelini ortaya koymak amacıyla yürütülen deneysel süreçler; bitki materyalinin toplanması, ekstraksiyonu, kromatografik yöntemlerle (Sephadex LH-20, silika jel kolon kromatografisi ve İTK) fraksiyonlanması, preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Prep-HPLC) ile saflaştırılması ve nükleer manyetik rezonans (1D/2D NMR) spektroskopisi ile yapı tayini adımlarını kapsamaktadır. Elde edilen metanol (α -glukozidaz, AChE ve BChE) ve sitotoksikite aktiviteleri üzerinden değerlendirilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

Tez çalışması kapsamında yürütülen fitokimyasal izolasyon, kromatografik saflaştırma, in vitro enzimatik/antioksidan aktivite tayinleri ve yapısal karakterizasyon adımlarında yararlanılan tüm majör enstrümantal cihazlar, yardımcı ekipmanlar ve kromatografik sarf malzemeleri Tablo 4'te detaylandırılmıştır. Analitik ve preparatif düzeydeki süreçlerin yüksek doğrulukla gerçekleştirilmesini sağlayan bu sistemlerin üretici firma, marka ve teknik spesifikasyon bilgileri hiyerarşik bir düzen içerisinde sunulmuştur.

Tablo 4. Kullanılan Teknik Cihazlar ve Donanımlar

Sıra No	Araç / Cihaz / Sarf Malzemesi Adı	Marka / Üretici Firma	Model / Teknik Özellik
1	Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi	Bruker Avance III	500 MHz (^1H -NMR: 500 MHz, ^{13}C -NMR: 125 MHz) (Tokat TOĞÜ MERLAB)
2	Geri Dönüşümlü HPLC (Recycle-HPLC)	Shimadzu	LC-20AR Pompa Sistemi / SPD-M20A Diod Dizilimli Dedektör (DAD)
3	Otomatik Flash Kromatografi	Buchi	Reveleris X2 / Evaporatif Işık Saçılması Dedektörlü (ELSD)
4	Mikroplaka Spektrofotometresi (ELISA Okuyucu)	Thermo Scientific	Multiscan Go
5	Döner Buharlaştırıcı (Rotavapor)	Heidolph	Hei-VAP Core / Laborota 4000 (Hei-VAC Vario Vakum Pompalı)

Sıra No	Araç / Cihaz / Sarf Malzemesi Adı	Marka / Üretici Firma	Model / Teknik Özellik
6	Liyofilizatör (Dondurarak Kurutucu)	Christ	Alpha 1-2 LD Plus
7	Analitik Hassas Terazı	Shimadzu	ATX224 (0.1 mg hassasiyet)
8	Dijital pH Metre	Mettler Toledo	Seven Compact S210
9	Laboratuvar Tipi Blender / Öğütücü	Waring Commercial	Ağır Hizmet Tipi Parçalayıcı Blender
10	İTK UV Lambası	Camag	UV Lamp 4 (254 nm ve 366 nm)
11	İTK Geliştirme Tankları	Camag	Düz Tabanlı Cam Kromatografi Tankı
12	Kromatografi Cam Kolonları (Geniş/Uzun)	Çalışkan Cam Teknik	Borosilikat Cam, 29/32 Rodajlı, 60 × 4 cm (Kaba Ön Ayrım İçin)
13	Kromatografi Cam Kolonları (Dar/Kısa)	Çalışkan Cam Teknik	Borosilikat Cam, 29/32 Rodajlı, 40 × 3 cm (Saf Madde İzolasyonu İçin)
14	Analitik ve Preparatif HPLC Kolonları	Agilent	Eclipse Plus C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm) / Prep-C18 (21.2 × 250 mm, 10 µm)
15	Kimyasal Madde Güvenlik Dolabı	Tezsan	Havalandırma/Emiş Fanlı Güvenlikli Saklama Dolabı
16	Laboratuvar Çeker Ocak Sistemi	Waldner	Sınıf I Güvenlikli Çeker Ocak Düzenekleri
17	Şırınga Ucu Filtrasyon Sarfları	Isolab	0.45 µm Gözenek Çaplı PTFE ve Naylon Membran Filtreler
18	Otomatik Pipet Setleri	Axygen	Mikrolitre Ayarlı Otomatik Mikropipet Takımı

3.2. Biyolojik Aktivite Testlerinde Kullanılan Kimyasallar ve Standartlar

In vitro enzim inhibisyonu çalışmalarında kullanılan asetilkolinesteraz (Electrophorus electricus, %99), bütirilkolinesteraz (Equine serum, %99) ve α -glukozidaz (Saccharomyces cerevisiae) enzimleri ile bu enzimlere ait reaksiyon substratları ve ayıraçları olan asetilkolin iyodür (ATCI), bütirilkolin iyodür (BTCl), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve p-

nitrofenil- α -D-glukopiranosid (pNPG) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir. Enzim inhibisyon testlerinde pozitif kontrol (referans standart) olarak kullanılan takrin (Tacrine hydrochloride, $\geq \%99$) ve akarboz (Acarbose, $\geq \%95$) ile antioksidan kapasite tayinlerinde kıyaslama amacıyla kullanılan L-askorbik asit ($\geq \%99$), butillenmiş hidroksianizol (BHA, $\geq \%98.5$), butillenmiş hidroksitoluon (BHT, $\geq \%99$) ve Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, $\geq \%100$) yine Sigma-Aldrich firmasından standart saflıkta tedarik edilmiştir. Antioksidan reaksiyon düzeneklerinin, toplam fitokimyasal içerik analizlerinin ve tampon sistemlerinin hazırlanmasında rol oynayan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radikali (DPPH•), Folin-Ciocalteu reaktifi, galik asit (anhidrus, $\geq \%98$), kuersetin ($\geq \%95$), sodyum karbonat (Na_2CO_3), alüminyum klorür (AlCl_3), demir(III) klorür (FeCl_3), 2,4,6-tripirydyl-s-triazine (TPTZ), sodyum asetat trihidrat, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) bileşikleri ile analizlerde çözücü faz olarak işlev gören analitik saflıktaki dimetil sülfoksit (DMSO, $\geq \%99.9$) Merck (Darmstadt, Germany) ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edilmiştir.

3.3. Kromatografik Ayrım, İzolasyon ve Saflaştırmada Kullanılan Maddeler

Kolon kromatografisi adımlarında gerçekleştirilen kaba ayırım işlemlerinde sabit faz olarak silika jel 60 (0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM, Merck) adsorbanı kullanılırken, polifenolik bileşenlerin ve flavonoid yapılarının moleküler büyüklükleri ile polarite farklarına göre hassas bir şekilde fraksiyonlandırılması amacıyla Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) jel filtrasyon dolgu materyalinden yararlanılmıştır. Tüm bu süreç boyunca yürütülen elüat takipleri, fraksiyon birleştirmeleri ve saflık kontrolleri alüminyum plak üzerine kaplı silika jel 60 F₂₅₄ (Merck) analitik ince tabaka kromatografisi (TLC) plakları üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon basamaklarında, silika jel ve Sephadex LH-20 kolon elüsyonlarında ve TLC yürütme fazlarında farklı polarite indekslerine sahip mobil faz sistemlerini hazırlamak amacıyla analitik saflıkta (analytical grade, $\geq \%99.5 - \%99.8$) metanol (MeOH), n-hekzan, kloroform, etil asetat ve aseton çözücüleri tercih edilmiştir. İleri düzey saflaştırma adımlarını oluşturan analitik ve preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi çalışmalarında mobil fazın organik bileşeni için kromatografik saflıkta metanol (HPLC grade, $\geq \%99.9$, Merck) temin edilmiş, mobil fazın sulu bileşenini oluşturan ultra saf su ise laboratuvar tipi ultrapürifikasyon cihazından (Milli-Q, 18.2 M Ω ·cm) analizler öncesinde taze olarak elde edilmiştir. İzole edilerek saflaştırılan maddelerin yapı tayini ve karakterizasyon çalışmalarında yürütülen NMR spektroskopisi analizlerinde ise çözücü ve kilitleme fazı olarak tetrametilsilan içerikli döteryumlanmış dimetil sülfoksit (DMSO-d₆, $\geq \%99.8$ D, Merck) kullanılmıştır.

3.4. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite (MTT) Çalışmalarında Kullanılan Maddeler

Antikanser ve sitotoksik aktivite değerlendirmelerinde biyolojik materyal olarak tercih edilen A549 (insan akciğer karsinomu) hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) üzerinden lisanslı olarak temin edilmiştir. Hücrelerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması, pasajlanması ve idamesi amacıyla yürütülen laboratuvar süreçlerinde kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) büyüme medyumuna, %10 oranında eklenen Fetal Sığır Serumuna (FBS), %1 konsantrasyondaki penisilin-streptomisin antibiyotik karışımı, L-glutamin aminoasit desteği, yapışkan hücrelerin kültür kaplarından pürüzsüzce kaldırılmasını sağlayan %0.25'lik Tripsin-EDTA çözeltisi ve hücre yıkama basamaklarında kullanılan pH:7.4 dengesindeki Fosfat Tamponlu Salin (PBS) Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) firmasından steril koşullarda tedarik edilmiştir. Sitotoksosite ölçümlerinde inkübasyon sonrası canlı hücre oranının kolorimetrik olarak belirlenmesini sağlayan hücre canlılık reaktifi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tuzu ise Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından saf toz formda elde edilmiştir.

3.5. Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi

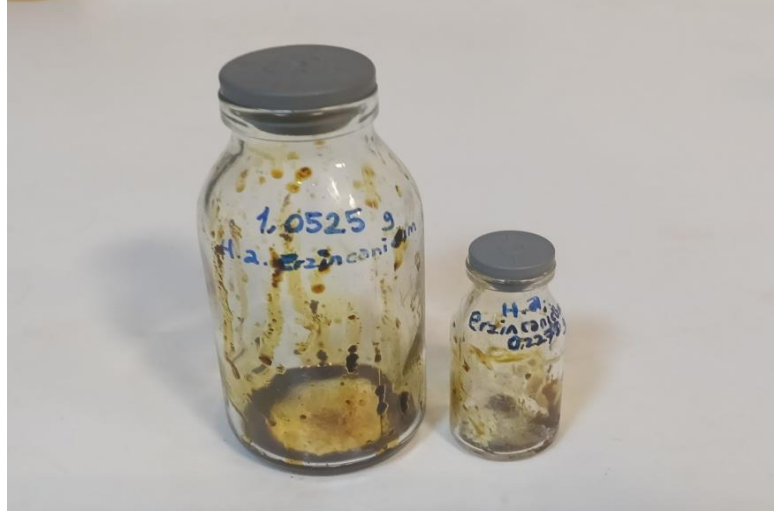
Bu çalışmada, *Helichrysum* türlerinin fitokimyasal karakteristiğini oluşturan ve biyolojik aktivitelerden sorumlu olan termolabil (ısıya duyarlı) yapıdaki fenolik asitlerin ve flavonoid glikozitlerinin kimyasal bütünlüğünü korumak temel öncelik olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, yüksek sıcaklık gerektiren Soxhlet veya geri soğutucu altında kaynatma gibi yöntemlerin neden olabileceği muhtemel oksidasyon, polimerizasyon veya yapısal bozunma risklerini tamamen ortadan kaldırmak amacıyla maserasyon yöntemi tercih edilmiştir (Cannell, 1998). Literatürde "soğuk ekstraksiyon" olarak tanımlanan bu teknik, ısıya duyarlı sekonder metabolitlerin ekstraksiyon verimliliği ve yapısal korunumu açısından en güvenilir metodolojilerden biri olarak kabul edilmektedir (Rice-Evans ve ark., 1997). Isı gerektirmeyen bu sürecin en önemli avantajı, bitkisel materyaldeki uçucu bileşenlerin ve hassas fenolik yapıların termal degradasyona uğramadan çözücü fazına aktarılmasına olanak tanımasıdır (Harborne, 1998). Ayrıca maserasyon süreci, bitki matrisindeki hücre duvarlarının çözücü (metanol) tarafından yavaşça şişirilmesi (imbibisyon) yoluyla, hedef moleküllerin ozmotik basınç farkı sayesinde hücre dışına daha kontrollü ve saf bir şekilde difüzyonuna zemin hazırlamaktadır (Stahl, 1969). Düşük maliyetli olması ve karmaşık laboratuvar ekipmanı gerektirmeyen doğası, fitokimyasal araştırmaların başlangıç aşamasında yüksek tekrarlanabilirlik sunması bakımından kritik bir öneme sahiptir (Snyder ve ark., 2010). Buna karşın, maserasyon yönteminin modern tekniklere kıyasla bazı kısıtlılıkları da literatürde

detaylıca vurgulanmaktadır. Yöntemin en belirgin dezavantajı, ekstraksiyon dengesine ulaşma süresinin diğer kinetik destekli tekniklere (ultrasonik veya mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi) oranla daha uzun olması ve genellikle 24 ile 72 saat arasında değişen geniş bir inkübasyon periyodu gerektirmesidir (Ganetsos ve Barker, 1993). Ayrıca, bitki materyalinin çözücüsüyle tamamen doygunluğa ulaşması ve kütle transferinin kesintisiz devam edebilmesi için yüksek hacimlerde çözücü kullanımı gerekebilmektedir; bu durum ise çözücünün evaporasyon aşamasında daha uzun süreli ve dikkatli bir işlem yapılmasını zorunlu kılmaktadır (Snyder ve ark., 2010). Sıcak ekstraksiyon teknikleri hücre duvarlarını parçalama konusunda fiziksel olarak daha agresif bir mekanizmaya sahip olsa da maserasyonun bu konudaki sınırlı kapasitesi, çalışmanın temel amacı olan "yüksek saflık ve yapısal korunum" ilkesi gereği tolere edilebilir bir kısıtlılık olarak değerlendirilmiştir (Stahl, 1969). Netice itibarıyla, HAE'den biyoaktif bileşiklerin izolasyonu sürecinde, kantitatif verimden ziyade kalitatif moleküler stabiliteyi ve yapısal özgünlüğü önceleyen maserasyon tekniğinin, çalışmanın bilimsel hedefleriyle tam uyum sağladığı tespit edilmiştir.

3.5.1 Ekstraksiyon işlemi

Bu çalışmada kullanılan *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* bitki materyali; Erzincan, Refahiye, Sakaltutan Dağı lokalitesinden, 2000 metre üzeri rakımda ve çiçeklenme döneminde toplanmıştır. Toplanan bitki örneklerinin taksonomik teşhisi farmasötik botanik literatürü doğrultusunda gerçekleştirilmiş olup, tezin bilimsel doğrulanabilirliğini tescil etmek amacıyla hazırlanan herbaryum örneği Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Herbaryumu bünyesinde EBYU-0000044 herbaryum numarası ile kayıt altına alınarak muhafaza edilmiştir. Laboratuvara getirilen toprak üstü aksam (herba), üzerindeki toz ve çamur kalıntılarından tamamen arındırıldıktan sonra, doğrudan güneş ışığına maruz kalmayacağı gölge ve havadar bir alanda kurutulmaya bırakılmıştır. Dört gün boyunca oda sıcaklığında kurutularak kromatografik işlemlere hazır hale getirilen bitki materyali, mekanik olarak değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Parçalanan bitki dokularının kuru ağırlığı analitik hassas terazide tam 400 gram olarak ölçülmüş ve metanol ile maserasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla bitki tozu, yaklaşık 5 litre analitik saflıktaki metanol çözeltisinin içerisinde, 10 litrelik geniş cam bir kavanozda iki gün süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Cam kavanozun içerisindeki heterojen karışım, çözücü ve doku arasındaki kütle transfer hızını maksimize etmek amacıyla birkaç saatte bir periyodik olarak karıştırılmıştır. Süre sonunda süzülerek katı fazdan ayrılan süzüntüdeki metanol, döner buharlaştırıcı (rotavapor) yardımıyla düşük basınç altında ve 40 °C'yi geçmeyen sıcaklıkta tamamen evapore edilmiştir. Bu işlem sonucunda, *Helichrysum arenarium* subsp.

erzincanicum ham metanol özütü (HAE) analitik terazi yardımıyla 20 gram olarak ölçülmüştür. Nihai olarak HAE metanol, 400 gram başlangıç kuru bitki materyalinden %5 ekstraksiyon verimi ile elde edilmiş ve sonraki aşamalarda yürütülecek kromatografik saflaştırma ile in-vitro biyolojik aktivite adımlarında kullanılmak üzere uygun soğuk koşullarda saklanarak hazır hale getirilmiştir.



Şekil 6. *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* ekstraktı

3.6. Antioksidan Yöntemler

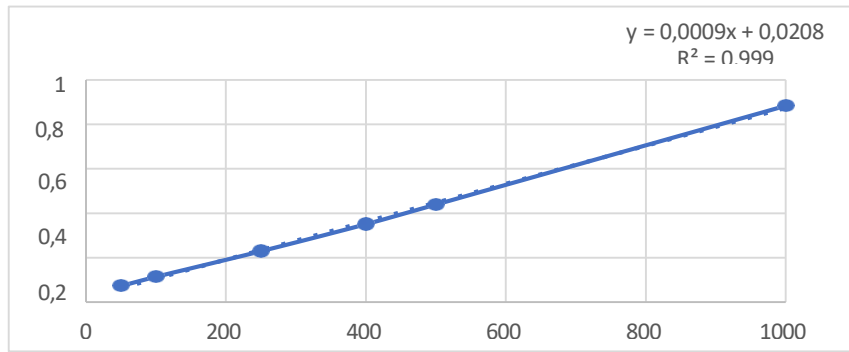
Antioksidanlar, canlı sistemlerde oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önleyen veya geciktiren bileşiklerdir. Normal metabolik süreçler sırasında doğal olarak oluşan bu reaktif türler, hücresel bileşenlerle etkileşime girerek lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarı son derece kritik problemlere sebep olabilmektedir. Organizmanın antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres, başta nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve diyabet olmak üzere birçok kronik hastalığın gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Valko ve ark., 2007). Diğer bakımdan, antioksidan bileşiklerin aşırı düzeyde alınması da redoks dengesinin bozulmasına neden olabilmekte ve bazı durumlarda pro-oksidan etki göstererek hücresel süreçleri olumsuz biçimde etkileyebilmektedir. Antioksidan savunma sistemi enzimatik ve non-enzimatik bileşenlerden oluşmakta olup, askorbik asit, tokoferoller ve bitkisel fenolik bileşikler gibi eksojen antioksidanlar da sisteme dışarıdan destek sağlamaktadır. Bu nedenle ki antioksidan kapasitenin dengeli bir şekilde değerlendirilmesi biyolojik sistemler açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada antioksidan aktivitenin belirlenmesi, metanol ekstraktı üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ham HAE'nin antioksidan etkinliğinin değerlendirilmesinde toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, DPPH• serbest radikal giderme kapasitesi ve ferrik iyonlarını indirgeme antioksidan gücü (FRAP)

analizleri tercih edilmiştir. Nitekim literatürde, *Helichrysum arenarium* türüne ait ekstraktların antioksidan aktivitelerinin mevcut olması karşılaştırmalı sonuç vermemiz açısından önemlidir. Ekstrakt üzerinden antioksidan testler açısından da son derece uygun yöntemlerdir. Bu yaklaşım, ekstraktın genel antioksidan kapasitesinin bütüncül olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Prior ve ark., 2005; Rice-Evans ve ark., 1997). Ekstraktın fenolik bileşikler bakımından nicel değerlendirilmesi, bu bileşiklerin indirgeme davranışlarını esas alan kolorimetrik bir yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan optik değişimlerin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle elde edilen veriler, referans madde olarak kullanılan gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir. Bu analiz, ekstraktın fenolik ve flavonoid bileşenler açısından zenginliğini ortaya koymak ve antioksidan kapasite ile olan ilişkisini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Flavonoid içeriğin belirlenmesinde ise bu yapıların belirli iyonlarla kompleks oluşturma özelliğinden yararlanılmıştır. Ölçülen absorbans değerleri, kuersetin standart çözeltileri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılmış ve sonuçlar kuersetin eşdeğeri (QE) olarak ifade edilmiştir. Bu yöntem, ekstraktın flavonoid bileşenlerinin genel düzeyine ilişkin bilgi sağlamaktadır. Serbest radikal giderme kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılan DPPH• yöntemi, stabil bir serbest radikalin antioksidan bileşikler tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Ekstraktın bu radikali nötralize etme yeteneği absorbans değişimleri üzerinden belirlenmiş ve radikal süpürücü antioksidan aktivite açısından değerlendirilmiştir (Brand-Williams ve ark., 1995). Ekstraktın indirgeme gücünü değerlendirmek amacıyla uygulanan ferrik indirgeme antioksidan gücü (FRAP) analizi, ferrik iyonlarının (Fe^{3+}) ferro (Fe^{2+}) forma indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak izlenmiş ve indirgeme kapasitesi antioksidan güç göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Benzie ve Strain, 1996). Tüm analizler kontrollü koşullar altında ve tekrarlı ölçümlerle gerçekleştirilmiş olup, elde edilen veriler ekstraktın antioksidan potansiyelinin farklı mekanizmalar üzerinden bütüncül olarak değerlendirilmesine olanak tanımıştır.

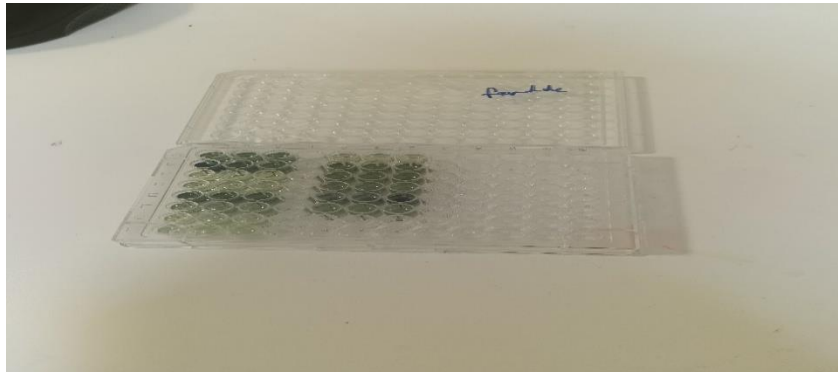
3.6.1 Toplam fenolik madde miktarı (TPC)

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* bitkisinin toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlendi (Singleton ve Rossi, 1965; Waterhouse, 2002). Bu amaçla, metanol ekstraktının 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltisinden 100 µL alınarak 4.5 mL ultra saf su ile seyreltildi. Akabinde karışıma 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda karışıma %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 300 µL ilave edildi. Elde edilen karışım

vortekslenerek homojen hale getirildi ve 2 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneğin absorbansı 760 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Elde edilen toplam fenolik madde değerlerinin, bitkinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesinde ve diğer antioksidan analiz sonuçlarıyla ilişkilendirilmesinde temel bir gösterge olarak kullanılması amaçlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi esas alındı ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g ekstrakt cinsinden ifade edildi. Analiz sürecinde gallik asit standartları ile oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 7'de, Folin-Ciocalteu reaksiyonu öncesindeki numune düzeneği Şekil 8'de gösterilmiş olup; bu eğriden hareketle hesaplanan kantitatif toplam fenolik madde miktarları bulgular bölümünde verildi.



Şekil 7. Gallik asit eşdeğerlik

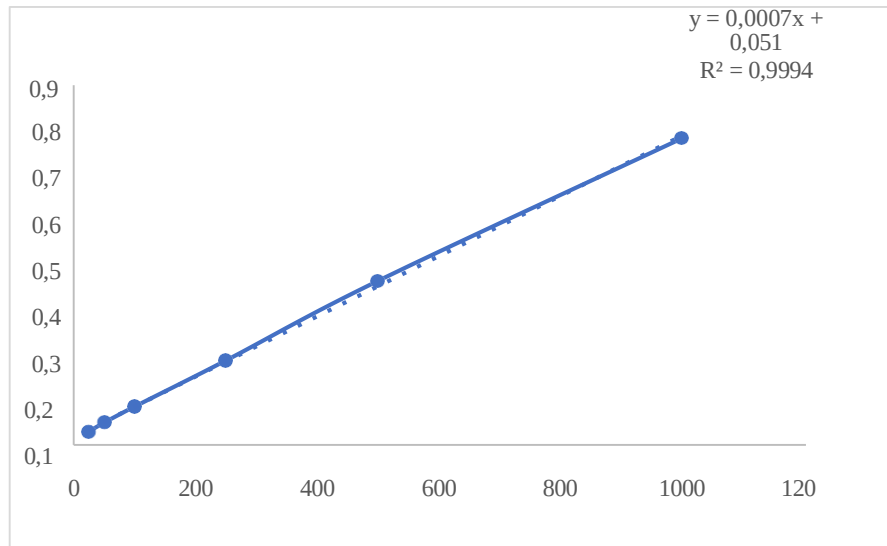


Şekil 8. Toplam fenolik madde miktarı ölçüm öncesi pleyt görüntüsü

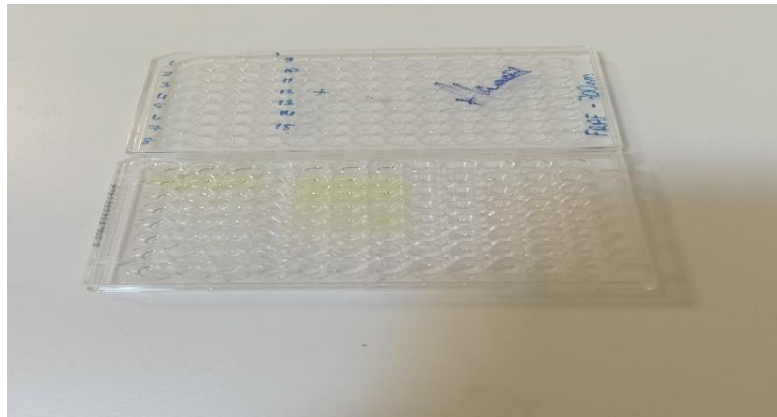
3.6.2 Toplam flavonoid madde miktarı (TFC)

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* bitkisinde flavonoid içerik, alüminyum klorür ($AlCl_3$) reaktifi ile oluşturulan renkli komplekslerin spektrofotometrik ölçümleri temel alınarak belirlendi. Bu işlem, alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılarak dikkatle yürütüldü (Chang ve ark., 2002; Dowd, 1959). Deneyde, metanol ekstraktından 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan 100

μL 'lik numune, toplam hacmi 4.8 mL olacak şekilde metanol ile seyreltildi. Akabinde, karışıma 100 μL 1 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (amonyum asetat) çözeltisi ile eşit hacimdeki %10'luk AlCl_3 eklendi. Hazırlanan çözelti vortekslenerek karıştırıldı ve 45 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneğin absorbansı 415 nm dalga boyunda spektrofotometre ile tespit edildi. Toplam flavonoid miktarı, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kuersetin standartları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile hesaplandı ve elde edilen değerler, bitkinin potansiyel antioksidan kapasitesini değerlendirmede temel bir gösterge olarak kullanıldı. Analiz sürecinde kullanılan kuersetin standardına ait kalibrasyon doğrusu Şekil 9'da, kolorimetrik reaksiyon neticesinde örneklerde meydana gelen renk değişimleri ise Şekil 10'da görselleştirilmiştir.



Şekil 9. Kuersetin eşdeğerlik

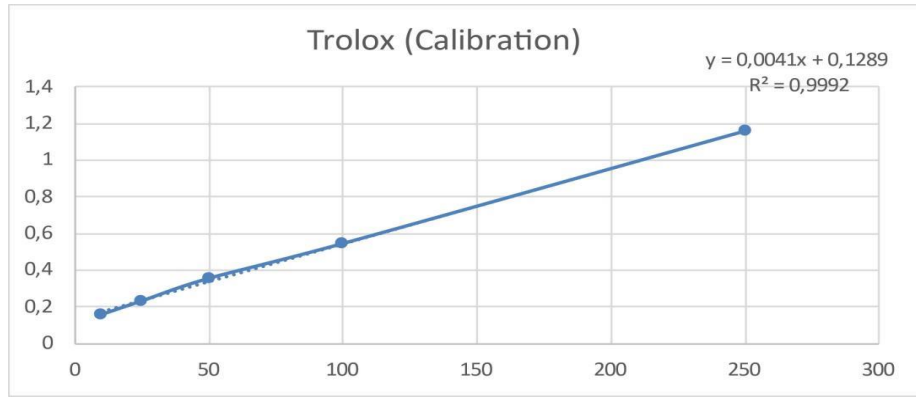


Şekil 10. Toplam fenolik madde miktarı ölçüm öncesi pleyt görüntüsü

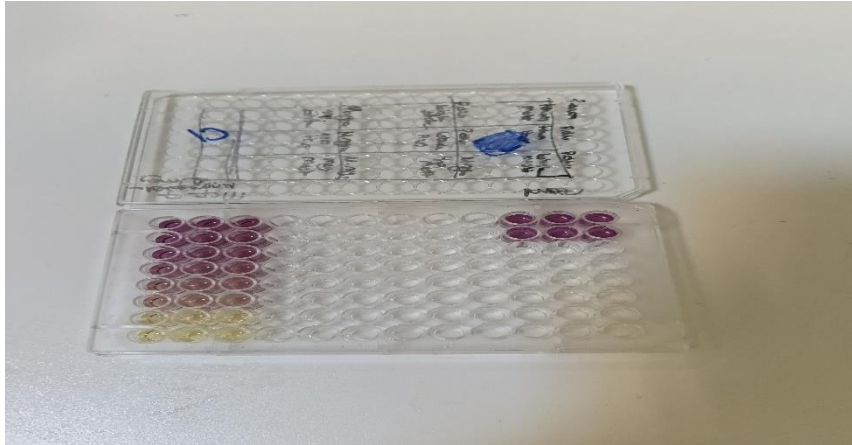
3.6.3. Serbest radikal giderme DPPH• aktivitesi

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* bitkisinin DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi (Blois, 1958; Brand-

Williams ve ark., 1995). Bu amaçla, metanol içerisinde 0.25 mM konsantrasyonda DPPH• çözeltisi taze olarak hazırlandı. Metanol ile 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ekstre çözeltisinden belirli hacimlerde alınarak metanol ile 3 mL'ye tamamlandı ve üzerine 1 mL DPPH• çözeltisi eklendi. Nihai karışım vortekslenerek homojen hale getirildi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, örneğin absorbans değeri 517 nm dalga boyunda spektrofotometre ile tespit edildi. Tespit edilen absorbans değerleri kullanılarak, radikal giderme aktivitesi yüzde (%) olarak hesaplandı ve ekstrenin %50 inhibisyon sağladığı konsantrasyon değeri (IC₅₀, µg/mL) belirlendi. Bu veriler, bitkinin serbest radikal giderme potansiyelini göstermekte olup, referans antioksidanlar (Trolox, BHT ve BHA) ile karşılaştırılarak etkinliğinin nicel olarak değerlendirilmesine olanak sağladı.



Şekil 11. Troloks standart

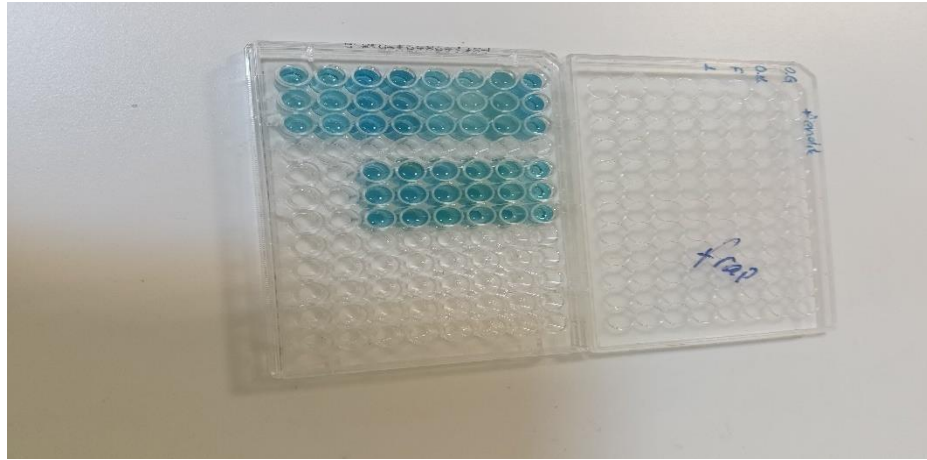


Şekil 12. Serbest radikal giderme ölçüm öncesi pleyt görüntüsü

3.6.4. Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) kapasite testi

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* bitkisinin metanol ekstraktının demir(III) iyonlarını indirgeyici antioksidan gücünün tespiti, potasyum ferrisiyanür metoduna göre

spektrofotometrik olarak belirlendi (Oyaizu, 1986). Bu amaçla, 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ekstre çözeltisinden 100 µL alındı ve üzerine 0.2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ile %1'lik $K_3Fe(CN)_6$ (potasyum ferrisiyanür) çözeltisinden 1.25'er mL ilave edildi. Elde edilen karışım 20 dakika boyunca 50 °C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun ardından reaksiyonu durdurmak amacıyla karışıma %10'luk TCA (trikloroasetik asit) çözeltisinden 1.25 mL ve taze hazırlanan %0.1'lik $FeCl_3$ (demir(III) klorür) çözeltisinden 0.25 mL sırasıyla eklendi. Hazırlanan test karışımının absorbans değeri 700 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Ekstrenin indirgeme kapasitesi, referans antioksidan olarak seçilen troloks'un farklı konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi esas alınarak hesaplandı ve sonuçlar mg troloks'un eşdeğeri (TE)/g ekstrakt cinsinden ifade edildi. Elde edilen veriler, bitkinin elektron bağışlama kapasitesini ortaya koymaktadır. Referans antioksidanlarla karşılaştırıldığında ise etkinliğinin nicel olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.



Şekil 13. Demir III iyonu indirgeme ölçüm öncesi pleyt görüntüsü

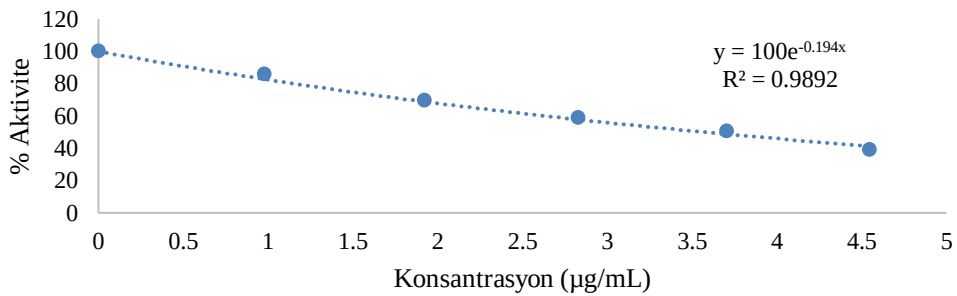
3.7. Antidiyabetik Yöntemler

Diyabet, insülin sekresyonundaki (salgılanmasındaki) yetersizlik veya bu hormonun biyolojik etkinliğindeki defektler neticesinde ortaya çıkan, kronik hiperglisemi tablosuyla karakterize sistemik bir metabolik disfonksiyondur. Klinik vakaların büyük bir çoğunluğunu oluşturan Tip 2 diyabet (T2DM), periferik dokularda gözlenen insülin direnci ve pankreatik beta-hücrelerinin fonksiyonel yetersizliği ile tanımlanmaktadır. Bu patolojik durumun küresel çaptaki artışı, yan etki profili düşük ve biyolojik etkinliği yüksek yeni nesil antidiyabetik ajanların keşfini zorunlu kılmıştır. Karbonhidrat metabolizmasının kontrolünde uygulanan en temel stratejilerden biri, postprandiyal glukoz seviyelerini stabilize etmek amacıyla sindirim enzimlerinin katalitik aktivitelerini baskılamaktır. Bu çalışmada odaklanılan alfa-glukozidaz, ince bağırsak epitel

hücrelerinde kompleks karbonhidratların nihai glukoz birimlerine parçalanmasından sorumlu olan kritik bir enzimdir. Bu enzimin inhibe edilmesi, glukozun kan dolaşımına geçiş hızını yavaşlatarak postprandiyal hiperglisemi riskini minimize eder. Deneyde uygulanan inhibisyon testi, enzimin doğal olmayan substratı *p*-nitrofenil-alfa-D-glukopiranosid (p-NPG) bileşiğini hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan sarı renkli *p*-nitrofenol miktarının tayinine dayanmaktadır. Bitkisel ekstraktın enzim üzerindeki inhibitör potansiyeli, renk değişiminin spektrofotometrik olarak izlenmesi ve kontrol grubuyla kıyaslanması neticesinde kantitatif olarak saptanmaktadır.

3.7.1 Alfa-glukozidaz inhibisyon testi

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* metanol ekstraktının (HAE) antidiyabetik potansiyeli, *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosid (p-NPG) kolorimetrik enzim kinetiği metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi (Kwon ve ark., 2008). Deney kapsamında, ilk olarak 1 mg HAE numunesi 200 μ L dimetil sülfoksit (DMSO) ile tamamen çözüldü ve saf su ile 1 mL'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı. Analiz reaksiyon karışımı; 200 μ L fosfat tamponu (pH:6.9), 50 μ L p-NPG substratı, 20 μ L α -glukozidaz enzimi, belirlenen konsantrasyonlarda HAE numunesi ve toplam hacmi sabitleyecek miktarda saf su içerecek şekilde kurgulandı. Ekstraktın konsantrasyona bağlı inhibitör etkisini incelemek amacıyla, taze hazırlanan HAE stok çözeltisinden sırasıyla 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L ve 100 μ L alınarak test edildi. Numune miktarındaki bu artışlar, reaksiyon ortamındaki saf su miktarından eş zamanlı olarak düşülerek toplam hacim sabit tutuldu (örneğin başlangıç konsantrasyonu için 710 μ L saf su, 200 μ L fosfat tamponu, 50 μ L p-NPG, 20 μ L α -glukozidaz enzimi ve 20 μ L HAE numunesi kullanıldı). İki tekrarlı (duplike) olarak gerçekleştirilen bu ölçümler, spektrofotometre cihazı vasıtasıyla 405 nm dalga boyunda birer dakika süreyle takip edilerek kinetik veriler halinde kaydedildi.



Şekil 14. Akarboz Standart

3.8. Anti-Alzheimer Yöntemleri

Alzheimer hastalığı, sinir hücrelerinin zamanla kaybı ve sinaptik iletimin bozulması ile karakterize, ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Klinik olarak hafıza kaybı, bilişsel

fonksiyonlarda gerileme ve davranışsal değişikliklerle kendini göstermektedir. Hastalığın patogeneğinde beyinde amiloid- β ($A\beta$) plaklarının birikimi ve tau proteinlerinin anormal hiperfosforilasyona uğrayarak nörofibriler yumaklar (NFY) oluşturmaları merkezi bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte kolinerjik sistemde meydana gelen bozulmalar ve asetilkolin (ACh) düzeyindeki progresif azalma, hastalığın temel biyokimyasal mekanizmaları arasında yer almaktadır (DeTure ve Dickson, 2019; Lane ve ark., 2018). Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan başlıca klinik yaklaşımlardan biri, kolinerjik nörotransmisyonun desteklenmesine yönelik olarak asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) enzimlerinin kompetitif veya non-kompetitif olarak inhibisyonuna dayanmaktadır. AChE, sinaptik aralıkta bulunan asetilkolini hidroliz ederek kolinerjik iletimi sonlandıran temel enzim olup, bu enzimin baskılanması sinaptik boşluktaki asetilkolin konsantrasyonunun artmasına ve nöronal iletimin güçlenmesine katkı sağlamaktadır. BChE ise fizyolojik koşullarda daha sınırlı bir nörotransmisyon rolüne sahip olmakla birlikte, Alzheimer hastalığının ilerleyen evrelerinde aktivitesinin belirgin şekilde arttığı ve AChE'nin fonksiyonunu kısmen üstlendiği bilinmektedir. Bu nedenle, her iki enzimin eş zamanlı olarak inhibe edilmesi, hastalığın farklı evrelerinde çok daha etkili bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Colović ve ark., 2013). Bu kapsamda geliştirilen AChE ve BChE inhibitörlerine yönelik in vitro enzim inhibisyon testleri, potansiyel anti-Alzheimer ajanların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan temel tarama yöntemleri arasında yer almaktadır. Literatürde sıklıkça başvurulmuş Ellman kolorimetrik metodunda enzim-substrat reaksiyonları, aday bitkisel ekstraktların varlığında spektrofotometrik olarak izlenmekte ve enzim aktivitesindeki kinetik değişim üzerinden inhibisyon yüzdeleri ile yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) gibi etkinlik parametreleri kantitatif olarak hesaplanmaktadır (Ellman ve ark., 1961). Günümüzde Alzheimer hastalığının yönetiminde donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi kolinesteraz inhibitörleri ile glutamaterjik sistem üzerine etki eden bir N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olan memantin kullanılmaktadır. Bu ilaçlar hastalığın klinik semptomlarını geçici olarak hafifletmekte ancak nörodejenerasyonun ilerlemesini tamamen durduramamaktadır. Son yıllarda amiloid- β hedefli monoklonal antikorlar (adukanumab, lecanemab vb.) gibi hastalık modifiye edici tedavi yaklaşımları geliştirilmiş olsa da, bu biyolojik tedavilerin klinik etkinliği, maliyeti ve güvenilirlik profili halen tartışılmaktadır (Yiannopoulou ve Papageorgiou, 2020). Bununla birlikte, Alzheimer patogeneğinde mitokondriyal disfonksiyon ve kronik oksidatif stresin tetikleyici birer faktör olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve hücre hasarının önemli bir endikatörü olan laktat dehidrogenaz (LDH) gibi enzimler, hücreesel

oksidatif dengenin ve nöronal hasarın değerlendirilmesinde kritik biyokimyasal belirteçler olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler doğrudan birer primer tedavi hedefi olmamakla birlikte, test edilen sekonder metabolitlerin ve bitki ekstraktlarının antioksidan savunma mekanizmaları üzerindeki koruyucu etkilerinin incelenmesinde temel parametreler sunmaktadır (Butterfield ve ark., 2002). Bu doğrultuda uygulanan kombine enzimatik testler, hem kolinerjik sistem üzerindeki inhibitör etkilerin hem de hücresel düzeydeki antioksidan profilin birlikte değerlendirilmesine olanak sağlayarak, bitki ekstraktlarının çok hedefli (multi-target) potansiyel anti-Alzheimer ajanları olarak karakterize edilmesinde anahtar bir araştırma stratejisi sunmaktadır.

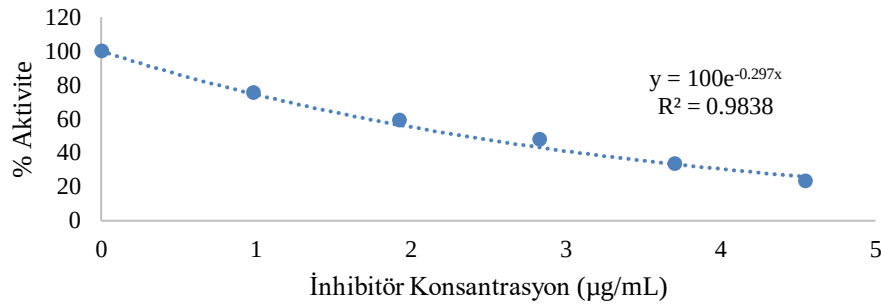
3.8.1. Asetilkolinesteraz inhibisyon testi

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* metanol ekstraktının (HAE) Alzheimer hastalığı patolojisiyle ilişkilendirilen asetilkolinesteraz (AChE) enzimi üzerindeki inhibitör potansiyeli, Ellman kolorimetrik metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi (Ellman ve ark., 1961). Deney kapsamında, ilk olarak 1 mg HAE numunesi 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ile tamamen çözüldü ve saf su ile 1 mL'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı. Analiz reaksiyon karışımı; 100 µL fosfat tamponu (pH:8.0), 20 µL AChE enzimi, 50 µL DTNB [5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)] ayracı, 50 µL AChI (asetilkolin iyodür) substratı, belirlenen konsantrasyonlarda HAE numunesi ve toplam hacmi sabitleyecek miktarda saf su içerecek şekilde kurgulandı. Ekstraktın konsantrasyona bağlı inhibitör etkisini incelemek amacıyla, taze hazırlanan HAE stok çözeltisinden sırasıyla 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL ve 100 µL alınarak test edildi. Numune miktarındaki bu artışlar, reaksiyon ortamındaki saf su miktarından eş zamanlı olarak düşülerek toplam hacim sabit tutuldu (örneğin başlangıç konsantrasyonu için 760 µL saf su, 100 µL fosfat tamponu, 20 µL AChE enzimi, 50 µL DTNB, 50 µL AChI ve 20 µL HAE numunesi kullanıldı). İki tekrarlı (duplike) olarak gerçekleştirilen bu ölçümler, spektrofotometre cihazı vasıtasıyla 412 nm dalga boyunda birer dakika süreyle takip edilerek kinetik reaksiyon hızları üzerinden hesaplandı. Elde edilen absorbans verileri doğrultusunda, HAE numunesinin AChE enzim aktivitesini %50 oranında baskıladığı IC₅₀ değeri hesaplandı ve pozitif kontrol olarak kullanılan takrin standardı ile karşılaştırıldı.

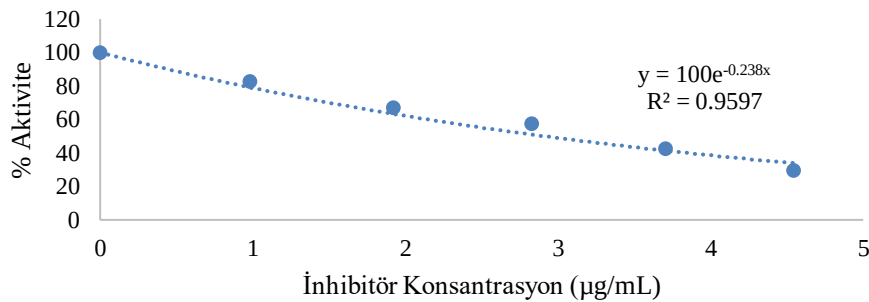
3.8.2. Bütirilkolinesteraz İnhibisyon Testi

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* metanol ekstraktının (HAE) bütirilkolinesteraz (BChE) enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesi, Ellman metodunun modifiye edilmesiyle spektrofotometrik olarak belirlendi (Ellman ve ark., 1961). Bu amaçla, 1 mg HAE numunesi

200 µL DMSO ile çözüldükten sonra saf su ile 1 mL'ye tamamlanarak stok çözelti haline getirildi. Reaksiyon ortamı; 100 µL fosfat tamponu (pH:8.0), 20 µL BChE enzimi, 50 µL DTNB ayıraç, 50 µL BChI (bütirilkolin iyodür) substratı, artan konsantrasyonlarda HAE numunesi ve reaksiyon hacmini dengeleyecek miktarda saf su ihtiva edecek şekilde hazırlandı. HAE numunesi reaksiyon ortamına sırasıyla 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL ve 100 µL hacimlerinde tatbik edildi ve numune hacmindeki artışlar saf su miktarından düşülerek total hacim korundu (örneğin ilk konsantrasyon için 760 µL saf su, 100 µL fosfat tamponu, 20 µL BChE enzimi, 50 µL DTNB, 50 µL BChI ve 20 µL HAE numunesi kullanıldı). Analizler iki tekrarlı olarak yürütüldü; reaksiyon kinetiği spektrofotometre cihazında 412 nm dalga boyunda bir dakika boyunca izlenerek absorbans değişimleri not edildi. Elde edilen kinetik veriler kullanılarak, HAE numunesinin BChE enzim aktivitesini %50 oranında inhibe ettiği IC₅₀ değeri hesaplandı ve referans inhibitör Takrin verileriyle kıyaslandı. Deney düzeneklerinin doğruluğunu ve metodolojik hassasiyetini denetlemek amacıyla, pozitif kontrol olarak seçilen takrin standardının her iki kolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon kinetikleri eş zamanlı olarak grafikleştirilmiştir. Bu kapsamda, takrinin asetilkolinesteraz (AChE) enzimine karşı gösterdiği standart inhibisyon profili Şekil 15'te sunulurken, bütirilkolinesteraz (BChE) enzimi üzerindeki konsantrasyona bağlı aktivite değişimleri Şekil 16'da detaylandırılmıştır.



Şekil 15. Takrin AChE değerler



Şekil 16. Takrin BChE değerler

3.9. Antikanser Yöntemleri

Kanser, hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu (çoğalması) ve apoptoz (programlanmış hücre ölümü) mekanizmalarının bozulması sonucu ortaya çıkan, dünya genelinde yüksek mortaliteye (ölüm oranına) sahip heterojen (farklı çeşitlilik gösteren) bir hastalık grubudur. Bu nedenle, etkili, seçici ve düşük toksisiteye (zehirlilik düzeyine) sahip antikanser ajanlarının geliştirilmesi modern farmasötik (eczacılık ve ilaç) araştırmaların temel hedeflerinden biridir (Sung ve ark., 2021). Güncel klinik uygulamalarda kullanılan birçok kemoterapötik (kanser tedavisinde kullanılan kimyasal) ajan, ciddi sistemik yan etkiler ve tümör hücrelerinde direnç gelişimi gibi majör (büyük) sınırlılıklara sahiptir. Bu durum, kemopreventif (kanser oluşumunu önleyici) ve terapötik (tedavi edici) etki potansiyeline sahip doğal kaynaklı bileşiklere yönelik araştırmaları daha da önemli hale getirmiştir. Bitkisel kaynaklar; yapılarındaki fenolik bileşikler, flavonoidler, alkaloidler ve terpenoidler gibi biyolojik olarak aktif birçok sekonder metabolit (ikincil ürün) sınıfını ihtiva ettiğinden, antikanser ilaç keşfi süreçlerinde vazgeçilmez bir kütüphane oluşturmaktadır. Bitkisel ekstraktların (bitki özütlerinin) antikanser potansiyelinin değerlendirilmesi, bu kompleks yapıdaki doğal karışımların kemoterapötik ve sitotoksik (hücreye toksik olan/hücreyi öldüren) etkinliklerinin ortaya konulmasına ve olası aktif fraksiyonların (alt grupların) belirlenmesine olanak sağlar. Bu kapsamda yürütülen prelinik (klinik öncesi) çalışmalar, özellikle in vitro (laboratuvar ortamında/yapay ortamda) MTT/MTS temelli kolorimetrik (renk değişimine dayalı) sitotoksikite testleri kullanılarak ekstraktların kanserli hücre hatlarının canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki inhibitör (baskılayıcı) etkilerini değerlendirmektedir. Bu testler, hücre siklusu (hücre döngüsü) ve apoptotik süreçler hakkında önemli ön bilgiler sunmaktadır (Greenwell ve Rahman, 2015). Antikanser araştırmalarında temel amaç; test edilen doğal ekstraktların kanser hücrelerinin proliferasyon hızını baskılayıp baskılamadığını, morfolojik (yapısal ve şekilsel) bütünlük üzerindeki etkilerini ve programlanmış hücre ölümü süreçlerini aktive etme yeteneğini belirlemektir. Bu in vitro değerlendirmeler, aynı zamanda doz-yanıt ilişkilerinin matematiksel olarak ortaya konulmasına ve güvenli terapötik konsantrasyon aralıklarının saptanmasına imkan tanır. Hücre proliferasyonu, sitotoksikite oranı ve apoptoz gibi parametreler, antikanser etkinliklerinin kantitatif (nicel/sayısal) olarak değerlendirilmesinde temel göstergeler olarak kullanılmaktadır. Antikanser çalışmalarının mikrobiyolojik ve farmakolojik açıdan en önemli boyutlarından biri ise "seçicilik" (kanserli hücreyi normal hücreden ayırt edebilme) kavramıdır. İdeal bir antikanser ajanının, sağlıklı normal hücre hatlarına minimum düzeyde zarar verirken, yüksek bir seçicilikle yalnızca kanserli hücreleri hedef alması beklenmektedir. Bu nedenle bitkisel ekstraktların hem genel sitotoksik etkilerinin hem de tümör hücrelerine özgü biyolojik

aktivitelerinin sağlıklı hücre hatlarıyla eş zamanlı karşılaştırılarak değerlendirilmesi kritik bir öneme sahiptir. Hücre canlılığının ve metabolik aktivitesinin belirlenmesinde prelinik araştırmalarda en yaygın kullanılan mikrolaka temelli yöntem, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) testidir (Mosmann, 1983). Bu mikro-kolorimetrik yöntem, canlı hücrelerin mitokondri iç zarında bulunan süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmaktadır. Yöntem kapsamında sarı renkli suda çözünür MTT tuzu, metabolik olarak aktif ve canlı hücreler tarafından hücre zarından sızmayan, suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgenir. İnkübasyon periyodu sonunda uygun bir organik çözücü (örneğin DMSO) ile çözülen bu kristallerin oluşturduğu renk yoğunluğu, ortamdaki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Bu renk değişimi spektrofotometrik olarak mikrolaka okuyucularda ölçülerek değerlendirilir. MTT testi; hızlı, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip ve duyarlılığı yüksek bir metot olması sebebiyle, ham bitki ekstraktlarının erken aşama antikanser potansiyelinin taranmasında dünya genelinde standart ve güvenilir bir altın yöntem (en güvenilir referans metot) olarak kabul edilmektedir.

3.9.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

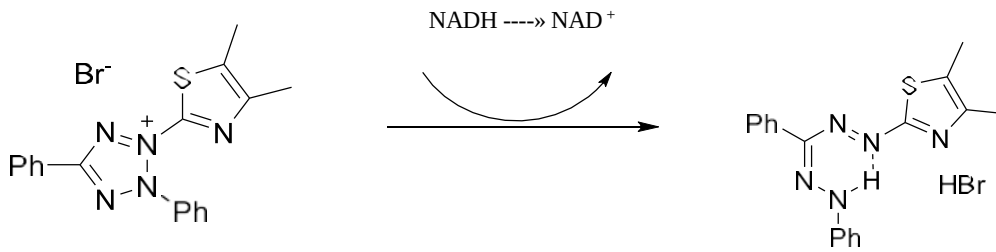
Çalışmada, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* metanol ekstraktının (HAE) *in vitro* sitotoksik aktivitesini değerlendirmek amacıyla A-549 (insan akciğer kanseri) hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatlarının kültüre edilmesi, pasajlanması ve korunması süreçleri literatürde tanımlanan standart protokoller takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Freshney, 2015). Hücreler; hacimsel olarak %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (Pen-Strep) antibiyotik çözeltisi ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) büyüme ortamında, T-75 hücre kültürü flaskaları içerisinde yetiştirilmiştir. Kültürlerin devamlılığı, %5 CO₂ (karbondioksit) ve %95 bağıl nem içeren inkübatör ortamında, 37 °C sıcaklıkta sabit tutularak sağlanmış; kontaminasyon riskini önlemek adına tüm aseptik işlemler Sınıf II biyogüvenlik kabininde yürütülmüştür. Hücre pasajlaması aşamasında, ters faz kontrast mikroskobunda yapılan incelemelerde hücre yoğunluğunun yaklaşık %80 konfluense (yüzey doluluğuna) ulaştığı tespit edildiğinde, flask içindeki eski besiyeri uzaklaştırılmış ve hücre tabakası 10 mL steril fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi ile yıkanmıştır. Hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayan proteinleri hidroliz etmek amacıyla yüzeye 3 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edilmiş ve flask, enzim aktivitesi için inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı mikroskobik olarak teyit edildikten sonra, tripsin enzimini inaktive etmek amacıyla ortama 4 mL taze DMEM besiyeri eklenerek toplam 7 mL hacmindeki hücre süspansiyonu steril falcon tüplerine aktarılmıştır. Olası hücre kayıplarını önlemek

amacıyla yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant (üst sıvı) dikkatlice uzaklaştırılmış ve dipte pellet halinde çöken hücreler, 1 mL taze besiyeri ilavesiyle pipetleme yapılarak homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Hücrelerin uzun süreli korunması amacıyla gerçekleştirilen dondurma işleminde, bu şekilde hazırlanan yoğun hücre süspansiyonuna kriyoprotektan (hücre koruyucu) olarak %10 oranına tekabül edecek şekilde 50 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş, karışım kriyotüplere paylaştırılarak kademeli soğutma yöntemiyle -80 °C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Hücre sayımı ve büyüme protokolü aşamasında ise, santrifüj sonrasında toplam hacmi 10 mL'ye tamamlanan hücre süspansiyonundan taze olarak alınan 50 µL'lik örnek, eşit hacimde (50 µL) Trypan Blue (Trifor Mavisi) canlılık boyası ile bir ependorf tüp içerisinde karıştırılmıştır (Strober, 2015). Bu boyanmış karışımdan alınan 10 µL'lik sıvı hemositometre (Thoma lamı) odacığına yerleştirilmiş ve mikroskop altında sayılan canlı hücrelerin mL başındaki yoğunluğu; seyreltme faktörü (DF) ve hemositometre sabiti olan 10 üssü 4 (10000) kullanılarak matematiksel olarak hesaplanmıştır.

3.9.2. Hücre Proliferasyon Testi (MTT Testi) Çalışmaları

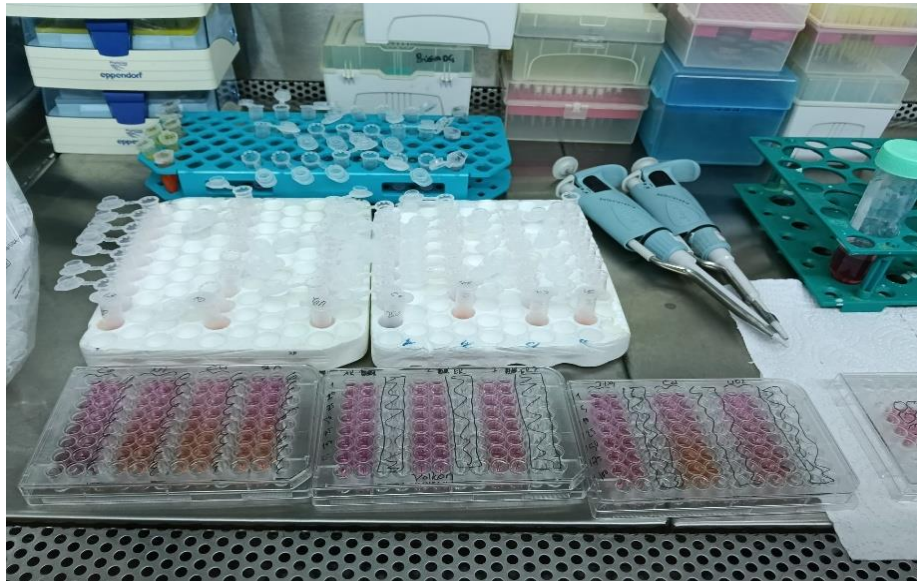
Canlı hücrelerin mitokondri iç zarında bulunan süksinat dehidrogenaz enzimlerinin, sarı renkli suda çözünür MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] tuzunu metabolik süreçlerle indirgeyerek mor renkli çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanan bu mikro-kolorimetrik analizde işlemler, standart in vitro sitotoksikite ve hücre proliferasyonu kılavuzları takip edilerek yürütülmüştür (Mosmann, 1983; Riss ve ark., 2016). Bir önceki aşamada hemositometre ile hücre sayımı ve yoğunluk ayarı gerçekleştirilen A-549 hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikropalak içerisine, her bir kuyucukta 200 µL besiyeri hacminde tam 10.000 hücre bulunacak şekilde ekilmiştir. Ekimi yapılan hücrelerin plaka tabanına ve yüzeye sağlıklı bir şekilde yapışıp adapte olabilmeleri amacıyla, plakalar 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ ayarlı in vitro inkübatör ortamında bir gece (16-18 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Bu ön inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, plaka içerisindeki eski büyüme ortamı dikkatlice uzaklaştırılmış ve kuyucuklar kalıntılardan arındırılmak amacıyla Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Deney kapsamında HAE ekstresi; in vitro sitotoksik doz-yanıt profilini belirlemek amacıyla 6 farklı konsantrasyonda (1, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL) taze olarak taranmıştır. Her bir doz uygulaması deneysel varyasyonları minimize etmek amacıyla iki tekrarlı (duplike) olacak şekilde kurgulanmış ve ilgili kuyucuklara 100 µL hacminde ilave edilmiştir. Ekstrakt maruziyetinin zaman bağımlı sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini kantitatif olarak tespit edebilmek adına, hazırlanan plaklar 24 saatlik inkübasyon periyodu boyunca inkübatörde

tutulmuştur. Belirlenen inkübasyon sürelerinin bitiminde, kuyucuklardaki ajanlı ortamlar uzaklaştırılmış, her bir kuyucuk 100 µL DPBS ile nazikçe yıkanmış ve üzerlerine 100 µL taze DMEM besiyeri ile 50 µL aktivatörlü MTT solüsyonu eklenerek mor formazan kristallerinin birikmesi amacıyla 4 saat daha inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücre içi ve hücre dışı ortamda oluşan çözünmeyen mor renkli formazan kristalleri uygun organik çözücü vasıtasıyla çözülmüş ve oluşan renk yoğunluğunun absorbands değerleri, 570 nm dalga boyuna ayarlanmış bir mikroparka okuyucu spektrofotometre (ELISA okuyucu) cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen sayısal optik yoğunluk verileri üzerinden, test edilen HAE numunesinin A-549 kanser hücrelerinin proliferasyonunu (çoğalmasını) %50 oranında baskıladığı yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu ifade eden IC₅₀ değerleri matematiksel olarak hesaplanmıştır.



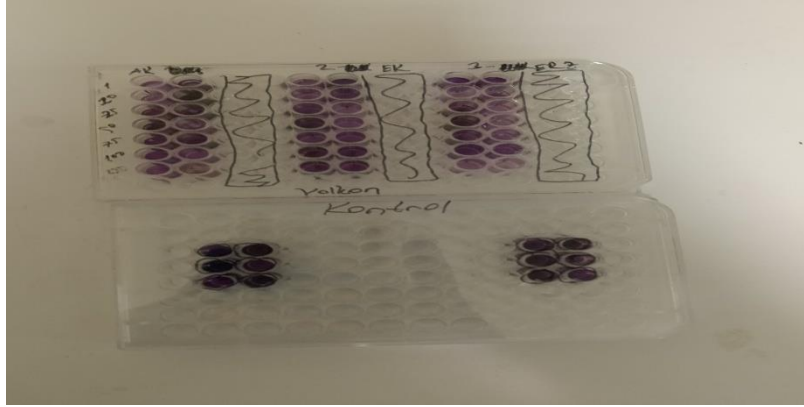
Şekil 17. MTT tuzunun formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu

HAE'nin A549 insan akciğer kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini makroskopik olarak kayıt altına almak amacıyla, deneysel aşamalar pleyt düzeyinde fotoğraflanmıştır. Bu kapsamda, hücre hatlarına doza bağlı farklı konsantrasyonlarda saf bileşiklerin uygulanmasını (ilaçlama) takiben inkübasyon sürecindeki 96 kuyucuklu mikropleytin genel durumu incelenmiş (Şekil 18) ve ardından MTT analizi protokolüne geçilmiştir.



Şekil 18. İlaçlama sonrası pleyt görüntüsü

Analiz sürecinde, mikroparka okuyucuda (ELISA) gerçekleştirilecek spektrofotometrik absorbans ölçümü öncesinde oluşan doza bağlı renk değişim profili pleyt üzerinde net bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 19).

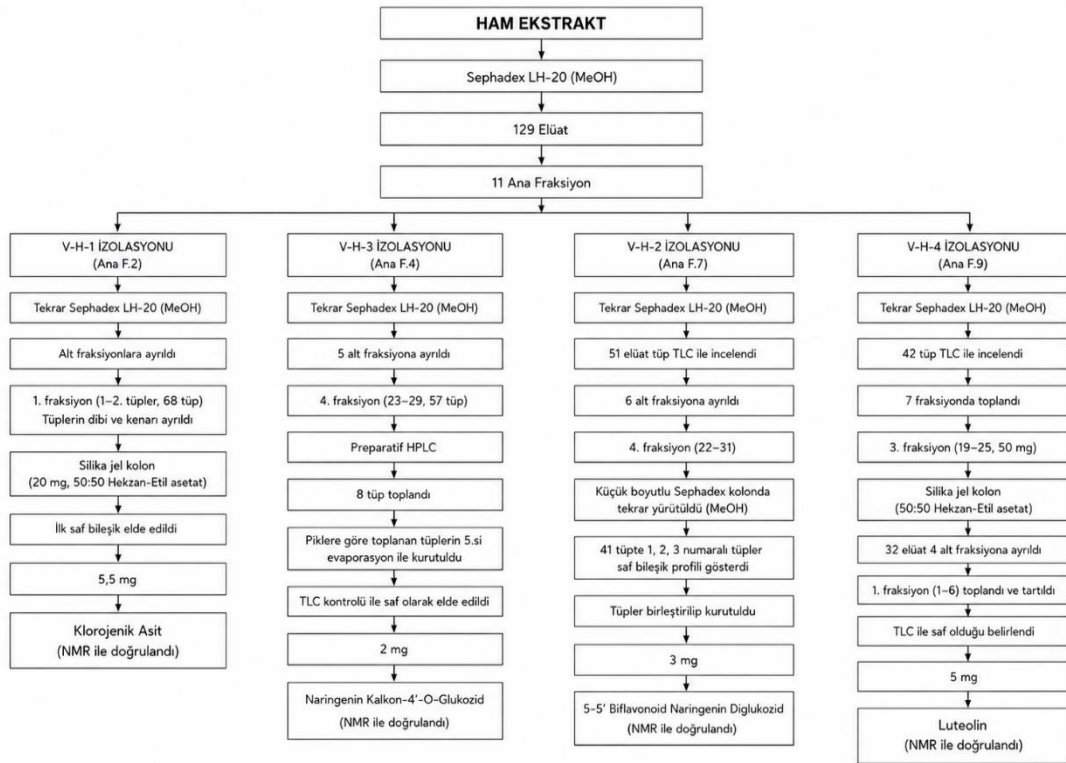


Şekil 19. ELISA ölçüm öncesi pleyt görüntüsü

3.10. Saflaştırma ve Analiz Yöntemleri

Bitki materyali, maserasyon (oda sıcaklığında çözücü ile özütleme) yöntemi ile uygun organik çözücü içerisinde belirli sürelerde bekletilerek içerdiği biyoaktif sekonder metabolitlerin çözücü fazına alınması amacıyla ekstrakte edilmiştir (Cannell, 1998). Elde edilen ham ekstraktın alt fraksiyonlarına ayrılması; bileşiklerin sabit faz ile mobil faz arasındaki dağılım ve adsorpsiyon etkileşimlerine bağlı olarak farklı hızlarda ilerlemesi prensibine dayanan kolon kromatografisi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, uygun elüsyon (yıkama) gradiyent sistemleri kullanılarak ham özütteki bileşikler molekül ağırlıkları, polariteleri ve kimyasal yapılarına göre birbirlerinden ayrılmıştır (Snyder ve ark., 2010). Elde edilen ham ekstrakt ile kolon kromatografisinden toplanan fraksiyon bileşenlerinin kalitatif olarak izlenmesi, R_f (alınma faktörü) değerlerinin belirlenmesi ve kolon kromatografisi için en uygun çözücü sistemlerinin saptanması amacıyla ince tabaka kromatografisi (TLC) tekniğinden yararlanılmıştır. TLC analiziyle fraksiyonların kimyasal içerikleri UV lambası (254 ve 365 nm) altında ve uygun belirteçler püskürtülerek karşılaştırılmış, benzer kromatografik profil gösteren fraksiyonlar birleştirilerek sonraki saflaştırma süreçleri yönlendirilmiştir (Sarker ve ark., 2005). Kolon kromatografisi adımları sonucunda hedef bileşik bazında yeterli saflık derecesine ulaşamayan fraksiyonların ileri düzeyde saflaştırılması ve izole edilmesi amacıyla, preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi (preparatif HPLC) sistemi uygulanarak hedef sekonder metabolitler yüksek saflıkta izole edilmiştir (Marston, 2011). Ayrıca, analitik yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri vasıtasıyla fraksiyonların ve nihai olarak izole edilen saf bileşiklerin saflık yüzdeleri ile kromatografik parmak izi profilleri değerlendirilerek

saflaştırma sürecinin analitik etkinliği doğrulanmıştır. İzole edilen sekonder metabolitlerin kesin yapısal aydınlatılması ve stereo-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ileri düzey nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi tekniklerinden yararlanılmıştır (Silverstein ve ark., 2014). Bu kapsamda, saf sekonder metabolitlerin temel hidrojen ve karbon iskeletlerinin haritalandırılmasında Tek Boyutlu (1D) ^1H -NMR (proton) ve ^{13}C -NMR (karbon) analizleri gerçekleştirilmiş; molekül yapısındaki karbon atomlarının protonlanma derecelerine göre sınıflandırılması (CH , CH_2 , CH_3) amacıyla ^{13}C DEPT-90 ve ^{13}C DEPT-135 modları uygulanmıştır. Özellikle sterik engeli yüksek olan, dimerik, flavonoid veya glikozidik yapıdaki karmaşık moleküllerin atomlar arası komşuluk, stereo-kimyasal yönelim ve kovalent bağ bağlantı haritalarının hatasız olarak çıkarılması amacıyla İki Boyutlu (2D) homonükleer ^1H - ^1H COSY ile heteronükleer ^1H - ^{13}C HSQC ve ^1H - ^{13}C HMBC teknikleri korelasyonlu olarak kullanılmıştır. Elde edilen tüm bu ileri düzey 1D ve 2D NMR spektrum verileri literatürdeki referans değerler ile karşılaştırılarak izole edilen bileşiklerin kimlikleri kesin olarak doğrulanmıştır. Yapı tayininde kullanılan ve analiz edilen tüm orijinal spektral grafikler detaylı isimlendirmeleriyle birlikte EKLER bölümünde sunulmuştur.



Şekil 20. Fitokimyasal izolasyon, saflaştırma ve yapı tayini süreçlerine ait şema

Tez çalışması kapsamında uygulanan tüm bu ekstraksiyon, kaba fraksiyonlandırma, kromatografik saflaştırma ve yapısal aydınlatma basamaklarına ait genel stratejik iş akışı şematik

olarak özetlenmiştir. Deneysel süreç boyunca takip edilen bu sistematik metodoloji, ham bitki özütünden başlayarak saf hedef moleküllerin elde edilmesine ve karakterizasyonuna kadar olan aşamaların bütünselliğini ortaya koymaktadır.

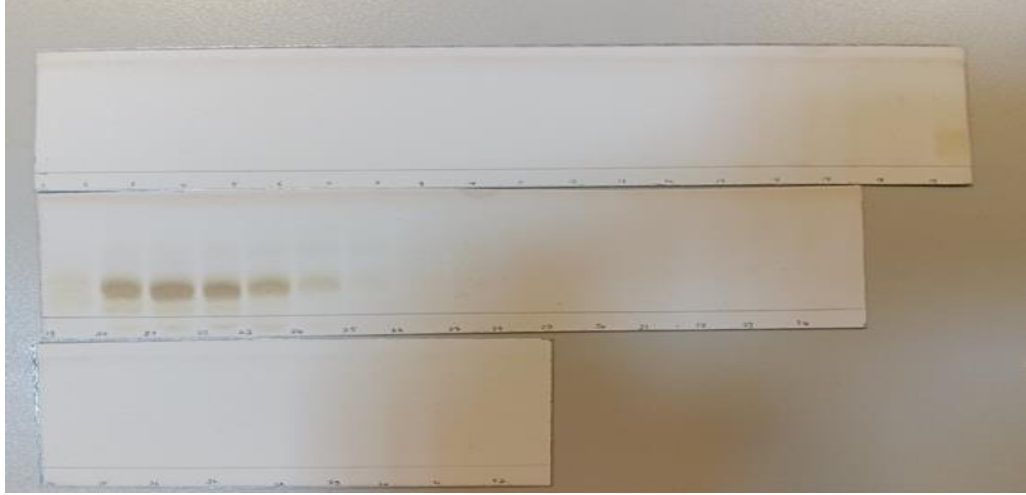
3.10.1. Fraksiyonlandırma ve saflaştırma

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* bitkisinden elde edilen ham metanol ekstresinin saflaştırılmasına yönelik olarak gerçekleştirilecek kolon kromatografisi işlemi için, öncelikle uygun sabit fazın belirlenmesi gerekmiştir. Bu kapsamda ön denemeler gerçekleştirilmiş, her bir sabit faz için 1 g ekstrakt kullanılarak ayrı ayrı kolon kromatografisi uygulanmıştır. Denemelerde Sephadex, silika jel ve C18 sabit fazları kullanılmış ve tüm kolonlar metanol ile elüe edilmiştir. Gerçekleştirilen bu ön çalışmalar neticesinde, silika jel ve C18 sabit fazlarında yeterli ayırım ve verim elde edilememiştir. Buna karşılık, Sephadex kullanılarak yapılan kolonda daha belirgin bir ayırım gözlenmiştir. Bu nedenle bitki saflaştırma işlemlerinde Sephadex sabit fazı tercih edilmiştir. Belirlenen uygun koşullar doğrultusunda toplam 16 gram ham metanol ekstresi Sephadex kolonda dört ayrı yükleme halinde kromatografiye tabi tutulmuştur. Her bir kolon, ilk Sephadex denemesinde olduğu gibi beş saniyede bir damla olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi (TLC) yardımıyla ayrılmış ve ön denemeye uygun biçimde yeniden 11 fraksiyon olarak birleştirilmişlerdir. Elde edilen 11 ana fraksiyon, TLC ile hazırlanmış olan hareketli faz sistemleri ile yürütülmüştür. Bunlar polar bileşikler için etil asetat-asit karışımı-metanol (7-2-1,5, v/v/v) iken apolar bileşiklerin yürütülmesi amacıyla hekzan-etil asetat (6-4 ve 7-3, v/v) olarak hazırlanmıştır (Akşit, 2018). Asit karışımının içeriği ise 250 mL için; 11 ml formik asit, 10 ml asetik asit, 26 ml saf su, 203 ml etil asetat olarak belirlenmiştir. Elde edilen 11 ana fraksiyon; Fraksiyon 1 (tüp 1), Fraksiyon 2 tüp (2), Fraksiyon 3 (tüp 3-7), Fraksiyon 4 (tüp 8-23), Fraksiyon 5 (tüp 24-45), Fraksiyon 6 (tüp 46-57), Fraksiyon 7 (tüp 58-66), Fraksiyon 8: (tüp 67-77), Fraksiyon 9 (tüp 78-88), Fraksiyon 10 (tüp 89-107) ve Fraksiyon 11 (tüp 108-129) olarak belirlenmiştir. Bu işlemler sırasında HAE'nin ve ana fraksiyonlarının HPLC görüntüleri alınmıştır. Ana fraksiyon üzerinden yapılan saflaştırma işlemleri basitleştirilmiş anlatım olması sebebiyle Şekil 20'de (Saflaştırma işlem akışı adı altında) sistematik olarak düzenlenerek aktarılmıştır.

3.10.1.1. İlk fraksiyonlandırma ve sonrasında uygulanan işlemler

Ana fraksiyonlar üzerinden gerçekleştirilen kromatografik süreçlerde, fitokimyasal karmaşıklığı daha düşük olan ve daha az bileşen içeren elüatlar üzerine yoğunlaşmıştır. Sabit faz üzerinde elüsyon gerçekleştirilirken, kolon yatağında renk ayrışması daha keskin gözlenen

bantların, İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) analizlerinde de daha az sayıda ve net ayrılmış bileşik profili verdiği tespit edilmiştir. Bu durum, kaba ayırım safhasında elde edilen ilk fraksiyonların hem kolon üzerindeki görsel renk profillerini hem de bu fraksiyonlardan alınan örneklerin analitik TLC üzerindeki karakteristik lekelerini doğrudan yansıtmaktadır.



Şekil 21. TLC plaka örnek görüntüsü



Şekil 22. Sefadeks kolon yürütme görüntüsü

Elde edilen elüatların ileri düzey saflaştırma adımları için seçilmesinde, içerdikleri bileşen sayısı ve toplam madde miktarları temel kriter olarak baz alınmıştır. Karşılaştırmalı analitik TLC kontrollerine tabi tutulan elüatların zenginleştirilmesi ve saflaştırılması amacıyla sonraki aşamalarda farklı kromatografik stratejiler izlenmiştir. Bu doğrultuda, elüatların fiziksel ayırım süreçlerindeki renk ve faz değişimleri izlenerek, keskin renk ayrımı gösteren hedef fraksiyonların jel filtrasyon kromatografisi (Sephadex LH-20) ile moleküler büyüklüklerine göre ayrılmasına veya preparatif TLC uygulamaları için öncül numuneler olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir. Görsellerle desteklenen süreçte seçimler ve yürütülen işlemler istendiği şekilde yansıtılmıştır. Süreç boyunca numunelerin örnek TLC görüntüleri,

fiziki ayırım süreç görüntüsü ve yürütülen örnek kolon görüntüsü şekillerdeki gibidir. Uygulanan bu ardışık ayırma stratejileri, karmaşık bitki matriksindeki minör bileşenlerin dahi yüksek verimle ve bozunuma uğramadan izole edilmesine olanak tanımıştır. Nihayetinde, her bir kromatografik adımın görsel ve analitik verilerle doğrulanması, izolasyon protokolünün tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini en üst düzeye çıkarmıştır.



Şekil 23. Elüatlarda fiziki ayırım örnek görüntüsü



Şekil 24. TLC plaka saflık kontrol örnek görüntüsü

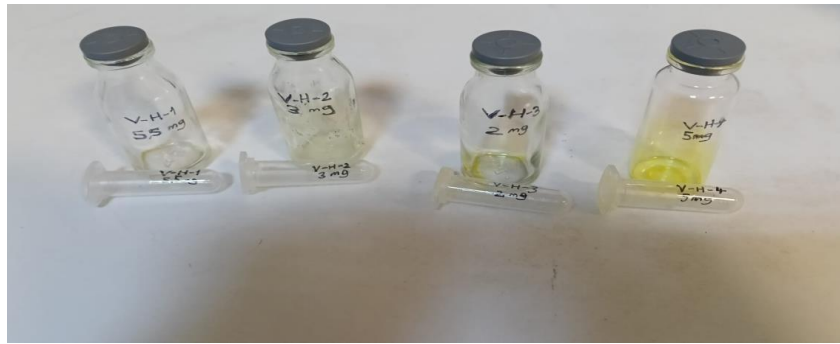
3.10.2. Saflaştırma Basamakları ve Uygulamaları

Saflaştırma basamakları Şekil 20 (Fitokimyasal izolasyon, saflaştırma ve yapı tayini süreçlerine ait genel iş akış şeması) üzerinde genel hatlarıyla verilmiştir. Akabinde sistematik biçimde uygulanan saflaştırma işlemleri yeniden tablo halinde, derlenerek Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo.5 Saflaştırma işlem akışı

Aşama	Uygulama ve Gözlem
Hazırlık	Sephadex LH-20 kolon yürütmelerinde toplanan elüat sayıları 129’dur ve TLC ile kontrol edilerek 11 ana fraksiyona bölünmüştür.
V-H-1	Ana fraksiyon 2 tekrar Sephadex LH-20 kolonda yürütüldü (metanol), ardından TLC işlemlerini takiben alt fraksiyonlara ayrıldı. Bu fraksiyonlardan 1. fraksiyon şişesi 1-2. tüplerini içerir (68 tüp içinde). Tüplerin dibi ve kenarları olarak fiziksel ayırım yapıldıktan sonra bu fraksiyon, silika
İzolasyonu	jel kolonda 20 mg olarak yürütüldü (50-50 hekzan-etil asetat), nihayetinde ilk saf bileşik 5,5 mg olarak elde edildi. NMR profilleri değerlendirilerek, bileşiğin klorojenik asit olduğu doğrulandı.

Aşama	Uygulama ve Gözlem
V-H-3 İzolasyonu	Ana fraksiyon 4 tekrar Sephadex LH-20 kolonda yürütüldü (metanol), ardından TLC işlemlerini takiben 5 alt fraksiyona ayrıldı. Bu fraksiyonların 4. sü 57 tüp içerisinde 23-29 olarak alındı. Sonrasında preparatif HPLC işlemine tabi tutuldu ve bu işlem sonucunda 8 adet tüp toplandı. Gözlenen piklere göre toplanan bu tüplerin 5. si evaporasyon ile kurutuldu. Kontrol amaçlı TLC işlemine tabi tutularak 2 mg olarak saf bir şekilde elde edildi. NMR spektroskopi profilleri değerlendirilerek ilgili bileşiğin naringenin kalkon-4'-O-glukozid olduğunu doğrulandı.
V-H-2 İzolasyonu	Ana fraksiyon 7 üzerinden tekrar Sephadex LH-20 kolon uygulaması gerçekleşti. (metanol). Elde edilen 51 elüat tüpün TLC profilleri belirlenmiş ve 6 alt fraksiyona bölünmüştür. Bu fraksiyonların 4. sü olan (22-31) fraksiyonu, daha küçük boyutlu sefadeks kolonda bir kez daha yürütüldü (metanol). Ardından TLC gözlemleriyle beraber elde edilen 41 tüpte 1,2,3 numaralı tüplerin TLC profili bileşiğin saf olduğunu gösterdi. Birleştirilen bu tüpler tartılarak 3 mg saf madde elde edildi. NMR analiz profillerine göre 5-5'' biflavonoid naringenin 7,7''-di-O-glukozid olduğu saptanarak yapısal aydınlatılması sağlandı.
V-H-4 İzolasyonu	Ana fraksiyon 9 üzerinden kolonda Sephadex LH-20 uygulaması gerçekleştirildi (metanol). Elde edilen 42 tüp TLC gözlemlerine göre 7 fraksiyonda toplandı. Bu fraksiyonların 3. Sü (19-25) 50 mg olarak silika jel kolonda tekrar yürütüldü (50-50 hekzan-etil asetat). Elde edilen 32 elüat 4 alt fraksiyona ayrıldı ve bu fraksiyonlardan 1.si (1-6) toplanarak tartıldı. Numune 5 mg olarak tespit edildi ve TLC profili ise saf olduğunu gösterdi. NMR spektroskopi profilleri değerlendirildiğinde, luteolin maddesi olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 25. Saflaştırılan numunelerin fiziksel görünümleri ve kristal/toz formları

Yürütülen izolasyon ve saflaştırma süreçleri neticesinde elde edilen saf bileşikler (V-H-1, V-H-2, V-H-3 ve V-H-4), kromatografik olarak saflıkları TLC ve preparatif HPLC yöntemleriyle kanıtlandıktan sonra, enstrümantal analizler için çözücü uçurma işlemlerine tabi tutulmuş ve fiziksel formları gözlenmiştir. Klorojenik asit (V-H-1) amorf kirli beyaz renkte, naringenin kalkon-4'-O-glukozid (V-H-3) ve luteolin (V-H-4) flavonoid iskeletine özgü karakteristik açık sarı/parlak sarı tonlarında kristalize toz formda izole edilmiştir. Tezin en özgün fitokimyasal keşfi olan ve literatürde bu takson için ilk kez saf halde tescillenen dimerik yapı 5-5''

biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid (V-H-2) ise yoğun mikrokristalin sarı renkli amorf bir çökelti halinde elde edilmiştir. İzole edilen bu saf maddelerin havayla temas ederek nem almasını engellemek, fotokimyasal bozunmaların (ışık hassasiyeti) önüne geçmek ve yapısal bütünlüklerini maksimum düzeyde korumak amacıyla numuneler, önceden hassas terazi ile darası alınmış 1.5 mL'lik inert eppendorf tüplerine aktarılmıştır. NMR spektroskopisi analizi için gerçekleştirilecek transfer ve gönderim sürecinde, tüp kapaklarının sarsıntı veya basınç farkından dolayı kendiliğinden açılmasını ve olası numune kayıplarını kesin olarak önlemek adına, tüm eppendorf tüplerinin ağız kısımları parafilm (Parafilm M®) yardımıyla sıkıca sarılarak hermetik (hava sızdırmaz) şekilde mühürlenmiştir. Maddelerin sahip olduğu bu yüksek kromatografik saflık derecesi ve kontrollü muhafaza şartları, bir sonraki aşamada gerçekleştirilen ileri 1D ve 2D NMR spektroskopisi analizlerinde pürüzsüz, yüksek sinyal/gürültü oranına sahip ve herhangi bir kirlilik/girişim sinyali içermeyen spektral verilerin elde edilmesini doğrudan sağlamıştır.

4. BULGULAR

Bu bölümde, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisinden elde edilen metanol ekstraktının (HAE) laboratuvar ortamında (in vitro) gerçekleştirilen farklı biyolojik aktivite test sonuçları ile kromatografik yöntemlerle izole edilen saf sekonder metabolitlerin ileri spektroskopik analizler (NMR) vasıtasıyla belirlenen kimyasal yapı aydınlatma verileri sunulmuştur.

4.1 Antioksidan Çalışma Bulguları

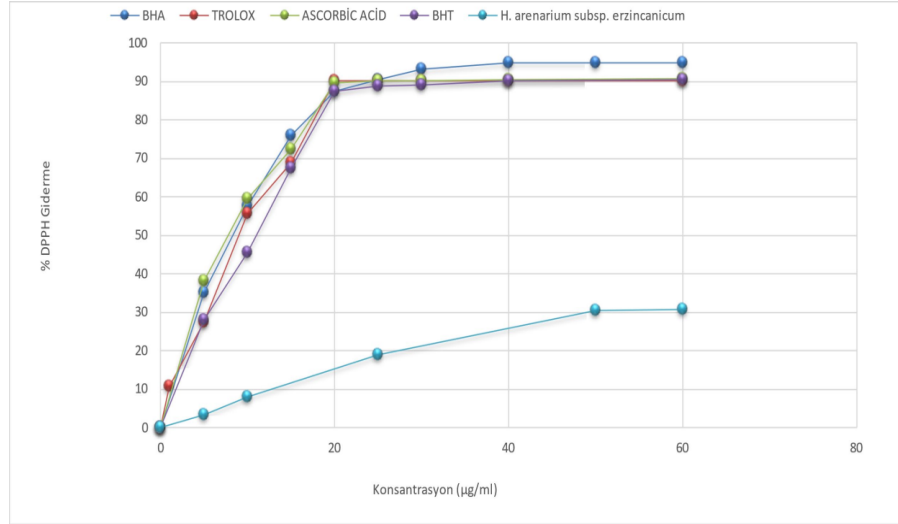
HAE numunesinin bütüncül antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla yürütülen toplam fenolik madde miktarı (TPC), toplam flavonoid madde miktarı (TFC), DPPH• serbest radikal giderme ve ferrik indirgeme antioksidan gücü (FRAP) analizlerinden elde edilen nicel veriler referans standartların baremleriyle karşılaştırmalı olarak Tablo 7'de sunulmuştur.

Tablo 6. HAE'nin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine yönelik gerçekleştirilen TPC, TFC, DPPH• ve FRAP analizlerinden elde edilen sonuçlar

Numune	TPC mg GAE g ⁻¹ Extract	TFC mg QE g ⁻¹ Extract	DPPH• IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	FRAP mg TE g ⁻¹ Extract
<i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i>	95.89 ± 0.56	49.71 ± 0.86	55.15 ± 1.29	107.20±0.12
Troloks	-	-	8.50 ± 0.77	-
BHA	-	-	8.04 ± 0.69	338.57 ± 0.31
BHT	-	-	10.70 ± 0.73	257.80 ± 1.24
Askorbik asit	-	-	9.91 ± 0.87	394.17 ± 0.98

Tablo 6 incelendiğinde, HAE'nin toplam fenolik madde içeriğinin 95.89 ± 0.56 mg GAE/g ekstrakt, toplam flavonoid içeriğinin ise 49.71 ± 0.86 mg QE/g ekstrakt düzeyinde olduğu saptanmıştır. Ekstraktın serbest radikal süpürme aktivitesini gösteren DPPH• IC₅₀ değeri 55.15 ± 1.29 µg/mL olarak hesaplanırken, ferrik indirgeme gücü (FRAP) 107.20 ± 0.12 mg TE/g

ekstrakt olarak bulunmuştur. Bu veriler, HAE'nin polifenolik bileşenler açısından zengin bir matrise ve güçlü bir elektron bağışlama yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Ekstraktın konsantrasyona bağlı serbest radikal giderme performansına ait kinetik yönelim Şekil 25 üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 26. HAE ve standart antioksidanların yüzde serbest radikal giderimi

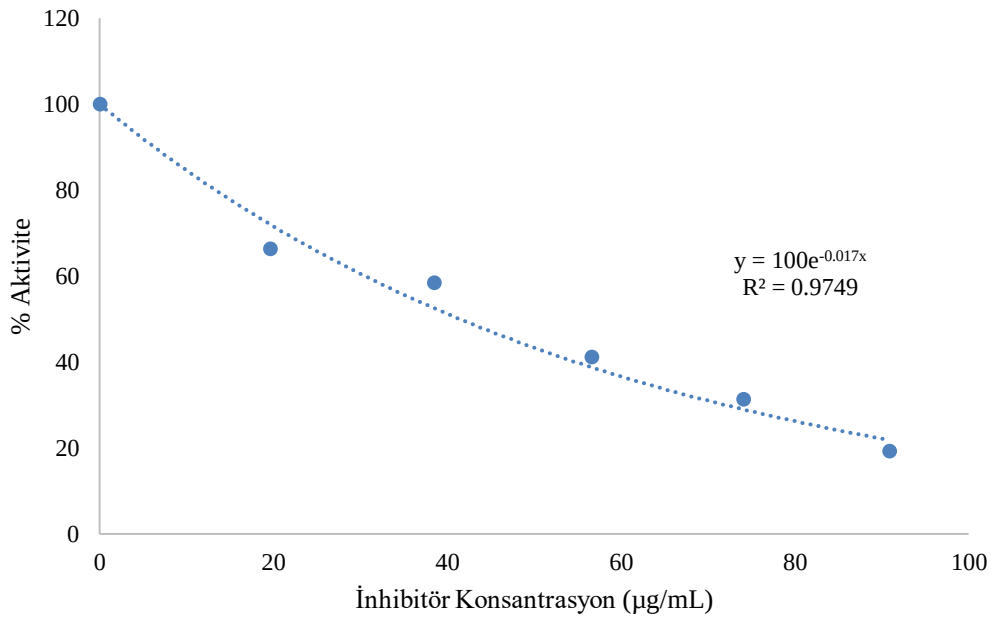
4.2. Antidiyabet ve Anti-Alzheimer Çalışma Bulguları

HAE'nin karbonhidrat metabolizması ve kolinerjik sistem üzerindeki inhibitör etkileri; alfa-glukozidaz, asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzim modellemeleri üzerinden kantitatif olarak incelenmiştir. Hesaplanan IC_{50} ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri, standart inhibitörler olan Takrin ve Akarboz ile kıyaslamalı olarak Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo.7 HAE ve standart inhibitörlerin AChE, BChE ve α -glukozidaz enzimlerine karşı gösterdikleri inhibitör aktivitelere ait IC_{50} değerleri

İnhibitör	α -Glukozidaz IC_{50} (μ g/mL)	R^2	AChE IC_{50} (μ g/mL)	R^2	BChE IC_{50} (μ g/mL)	R^2
Numune	40.76 ± 3.96	0.9807	46.2 ± 3.10	0.9864	53.31 ± 2.20	0.9278
Takrin	—	—	2.33 ± 0.35	0.9922	2.91 ± 0.34	0.9791
Akarboz	3.57 ± 0.67	0.9940	—	—	—	—

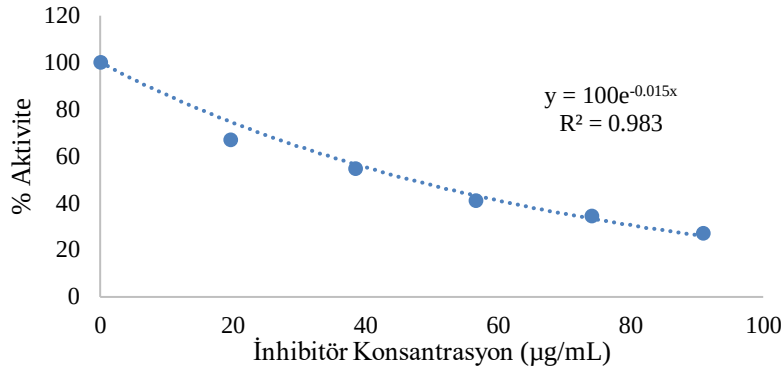
HAE'nin karbonhidrat metabolizması ve kolinerjik sistem üzerindeki inhibitör etkileri; alfa-glukozidaz, asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzim modellemeleri üzerinden kantitatif olarak incelenmiştir. Hesaplanan IC_{50} ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri, standart inhibitörler olan Takrin ve Akarboz ile kıyaslamalı olarak Tablo 7'de verilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, HAE'nin test edilen tüm enzim sistemleri üzerinde konsantrasyona bağlı ve yüksek korelasyonlu ($R^2 > 0.92$) bir inhibisyon profili sergilediği saptanmıştır. Ekstraktın alfa-glukozidaz enzimini baskılama gücü (IC_{50} : $40.76 \pm 3.96 \mu\text{g/mL}$) olarak hesaplanırken, nörodejeneratif süreçlerin hedefi olan AChE ve BChE enzimleri üzerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla $46.20 \pm 3.10 \mu\text{g/mL}$ ve $53.31 \pm 2.20 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır. Elde edilen bu kinetik veriler, ekstraktın alfa-glukozidaz enzimini kolinesteraz enzim grubuna kıyasla daha düşük bir IC_{50} değeri ile daha spesifik ve güçlü bir afiniteyle baskıladığını ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, HAE'nin postprandiyal hiperglisemi kontrolündeki etkinliğini gösteren ve doza bağımlı olarak kararlı bir artış trendi sergileyen alfa-glukozidaz enzim inhibisyon eğrisi Şekil 26'da bağımsız bir grafik halinde sunulmuştur.



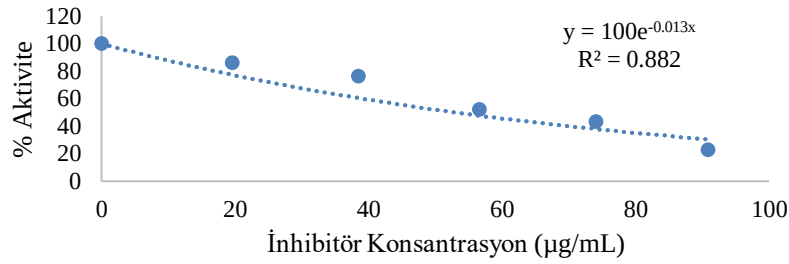
Şekil 27. HAE'nin doz-bağımlı α -glukozidaz inhibisyonu

İlgili inhibisyon grafiklerinden elde edilen veriler yardımıyla, ekstraktın enzimlere karşı sergilediği inhibisyon türleri ve afinite dereceleri matematiksel olarak hesaplanmıştır. Bu doğrultuda, eğrilerin eğimlerinden yararlanılarak V_{maks} ve K_m gibi temel kinetik sabitler her bir enzim sistemi için ayrı ayrı belirlenmiştir. Ekstraktın karbonhidrat hidrolizinden sorumlu enzim üzerindeki bu spesifik baskılama performansının yanı sıra, merkezi sinir sistemindeki kolinerjik

iletimi destekleme potansiyelini modelleyen AChE ve BChE enzim sistemlerine ait karşılaştırmalı kinetik inhibisyon profilleri ise Şekil 28 ve Şekil 29 üzerinde detaylandırılmıştır.



Şekil 28. HAE'nin doz-bağımlı AChE inhibisyonu



Şekil 29. HAE'nin doz-bağımlı BChE inhibisyonu

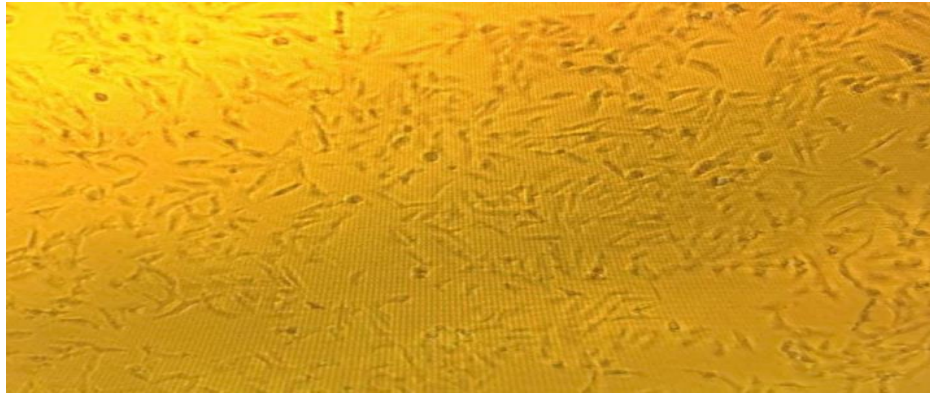
4.3. Antikanser Çalışma Bulguları

HAE'nin A-549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerinde 24 saatlik maruziyet eşliğinde yürütülen MTT sitotoksikite analizine ait absorbands, proliferasyon yüzdesi ve inhibisyon oranları değerleri Tablo 8'de gösterilmiştir.

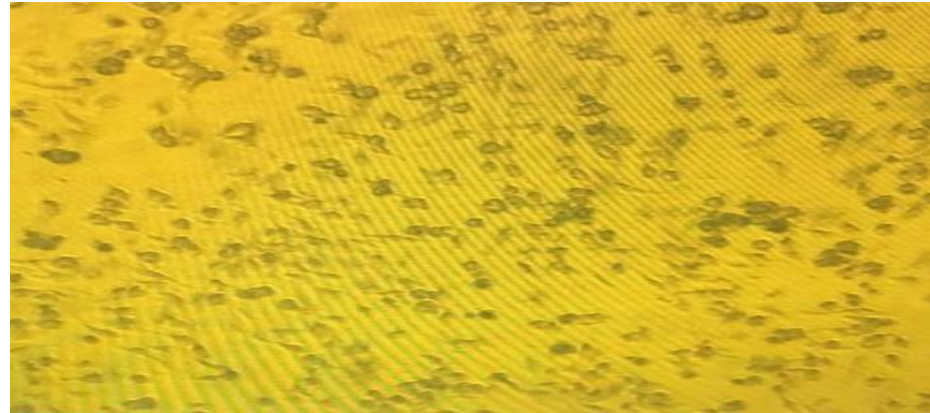
Tablo.8 HAE'nin A-549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki verileri

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama ABS	Proliferasyon (%)	İnhibisyon (%)
1	1,1045	60,42	39,58
10	0,8075	44,17	55,83
25	0,5780	31,62	68,38
50	0,5180	28,34	71,66
75	0,4120	22,54	77,46
100	0,3190	17,45	82,55

Tablo 8 verilerinden net bir şekilde anlaşıldığı üzere, HAE ekstraktı artan konsantrasyonlarda A-549 kanser hücrelerinin metabolik aktivitesini ve canlılığını doza bağımlı olarak belirgin bir şekilde baskılamaktadır. Hücre kültür ortamında 1 µg/mL konsantrasyonda %39.58 düzeyinde seyreden hücresel inhibisyon oranı, dozun kademeli olarak artırılmasıyla beraber en yüksek uygulama sınırı olan 100 µg/mL konsantrasyonda %82.55 seviyesine ulaşmıştır. HAE'nin A-549 kanserli hücre popülasyonunun %50'sini ortadan kaldırdığı sitotoksik aktivite eşiği (IC₅₀ değeri) 9.80 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Kanser hücrelerinin maruz bırakıldığı dozlar neticesinde meydana gelen morfolojik deformasyonlar, kırılımlar ve apoptoz kaynaklı canlılık kayıpları, Şekil 30 (A549 Canlı Hücre) ve Şekil 31 (A549 Ölü Hücre)'de gösterilmiştir.



Şekil 30. A549 canlı hücre mikroskop görüntüsü

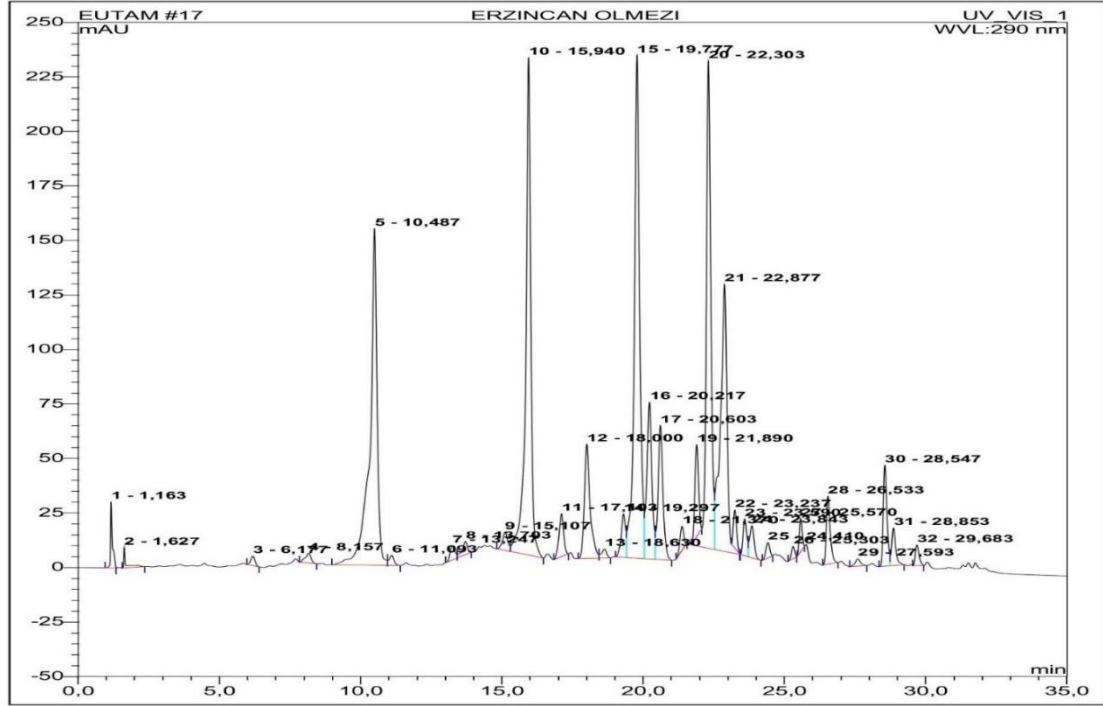


Şekil 31. A549 ölü hücre mikroskop görüntüsü

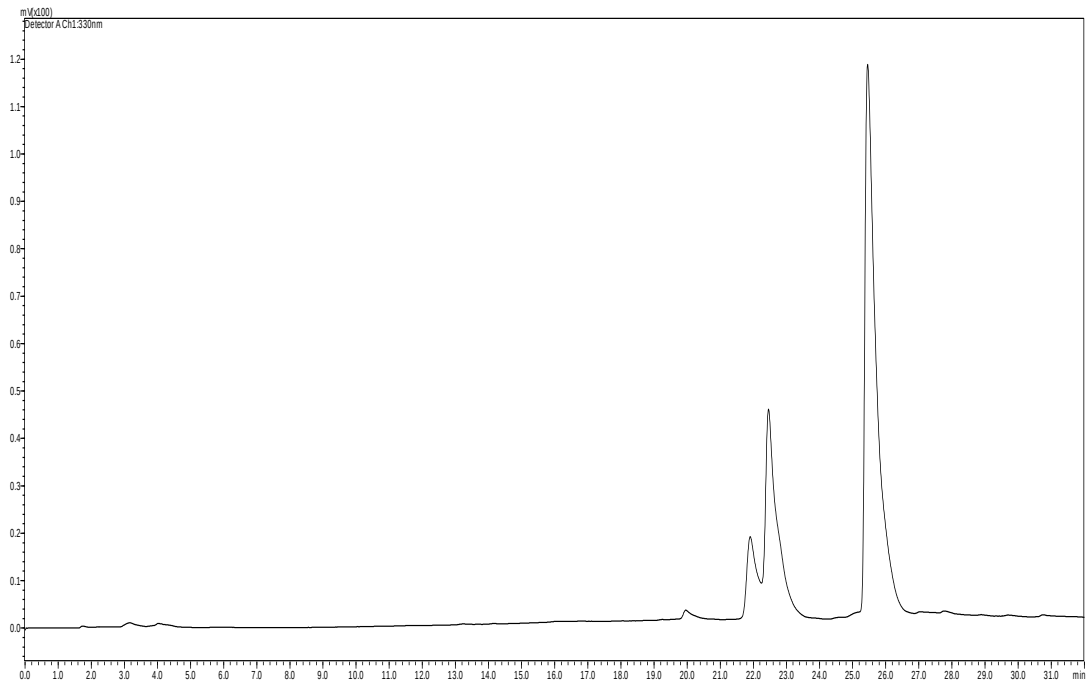
4.4 Saflaştırma Çalışmalarının Bulguları

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* ham metanol ekstraktının fitokimyasal bileşen haritasını çıkarmak ve kromatografik adımlara yön vermek amacıyla gerçekleştirilen analitik HPLC kromatogram profili Şekil 31'de sunulmuştur. Ham metanol ekstresinin (HAE) öne çıkan majör tepe noktaları ile minör piklerinin saflaştırılması amacıyla yürütülen ters faz preparatif

HPLC adımlarında, sarı renkli çiçek ekstralarının karakteristik kemotaksonomik marker bileşimi olan naringenin kalkon-4'-O-glukozid (V-H-3) numunesinin enjeksiyon öncesi karışık fraksiyon profili ile saflaştırma sonrası elde edilen yüksek saflıktaki nihai kromatogram profilleri sırasıyla Şekil 32 ve Şekil 33'de sunulmuştur.

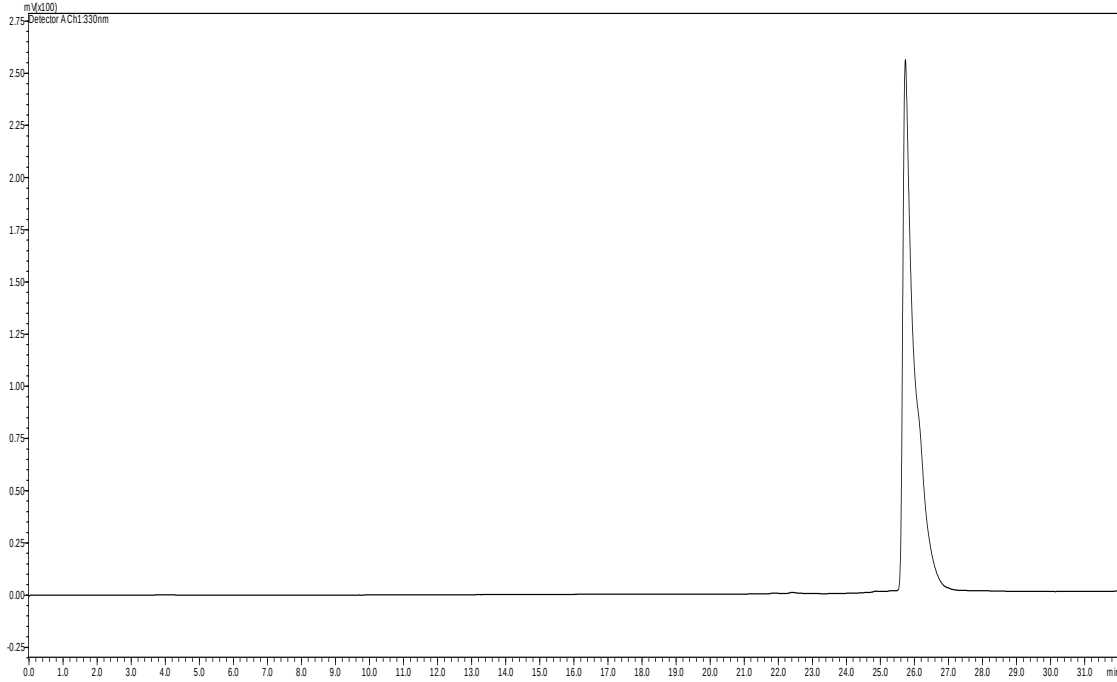


Şekil 32. HAE'nin HPLC profili



Şekil 33. HAE' nin Preparatif HPLC uygulama öncesi profili

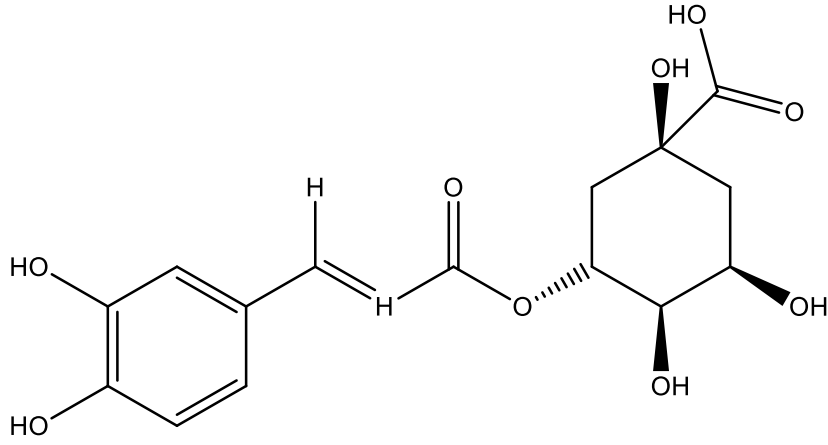
Preparatif HPLC işleminin saflaştırma üzerine etkisi tartışılmaz düzeydedir. Önce Şekil 33 sonra nihai olarak safsızlığın temizlenmiş hali olan Şekil 34 göstergeleri. Preparatif HPLC çalışmaları, mobil faz olarak metanol-su çözücü sisteminde, dakikada 5 mL’lik bir akış hızında yürütülmüş olup; elüsyon profili %5 metanol konsantrasyonundan başlatılarak 32 dakikalık periyot sonunda kademeli olarak %100 metanol oranına ulaşacak şekilde bir gradyen programı çerçevesinde optimize edilmiştir.



Şekil 34. HAE’ nin Preparatif HPLC uygulama sonrası profili

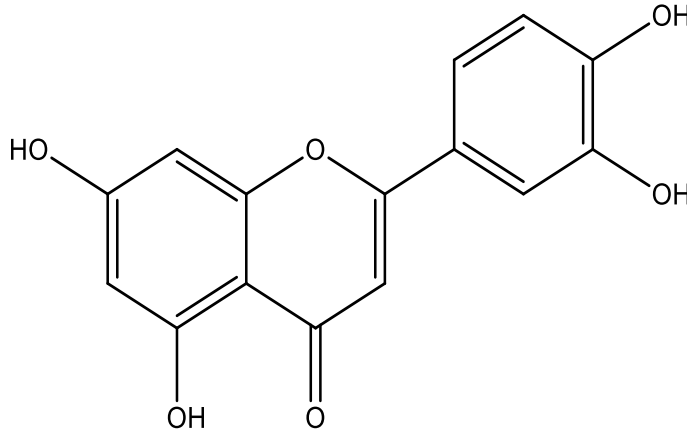
Ardışık kolon kromatografisi ve preparatif HPLC adımları neticesinde bitki matrisinden saf olarak ayrıştırılan 4 spesifik sekonder metabolitin açık kimyasal mimarileri ile tek ve iki boyutlu (1D/2D) 500 MHz NMR spektroskopisi analizlerinden elde edilen karakteristik proton (^1H) ve karbon (^{13}C) sinyal kırılımları aşağıdaki şekilleri de verilerek listelenmektedir.

Numune V-H-1 (Klorojenik Asit): Şekil 35’te kimyasal yapısı verilen, beyaz amorf toz formunda izole edilen V-H-1 kodlu numunenin kimyasal formülü $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ olup, DMSO- d_6 çözücüsü içerisinde alınan ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektral analizlerinden elde edilen deneysel sinyal değerleri şu şekildedir: **^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):** δ 9.61 (1H, br s, OH), 9.18 (1H, br s, OH), 7.42 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7’), 7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2’), 6.98 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6’), 6.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5’), 6.14 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8’), 5.06 (1H, ddd, $J = 9.2, 9.2, 4.3$ Hz, H-3), 3.91 (1H, m, H-5), 3.55 (1H, dd, $J = 9.2, 3.1$ Hz, H-4), 1.75-2.05 (4H, m, H-2 ve H-6). **^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6):** δ 175.1 (C-7), 165.9 (C-9’), 148.5 (C-4’), 145.7 (C-3’), 145.0 (C-7’), 125.7 (C-1’), 121.3 (C-6’), 115.9 (C-5’), 114.9 (C-2’), 114.4 (C-8’), 73.6 (C-1), 71.0 (C-4), 70.5 (C-3), 68.2 (C-5), 37.3 (C-6), 36.4 (C-2).



Şekil 35. Klorojenik asit yapısı (Numune V-H-1)

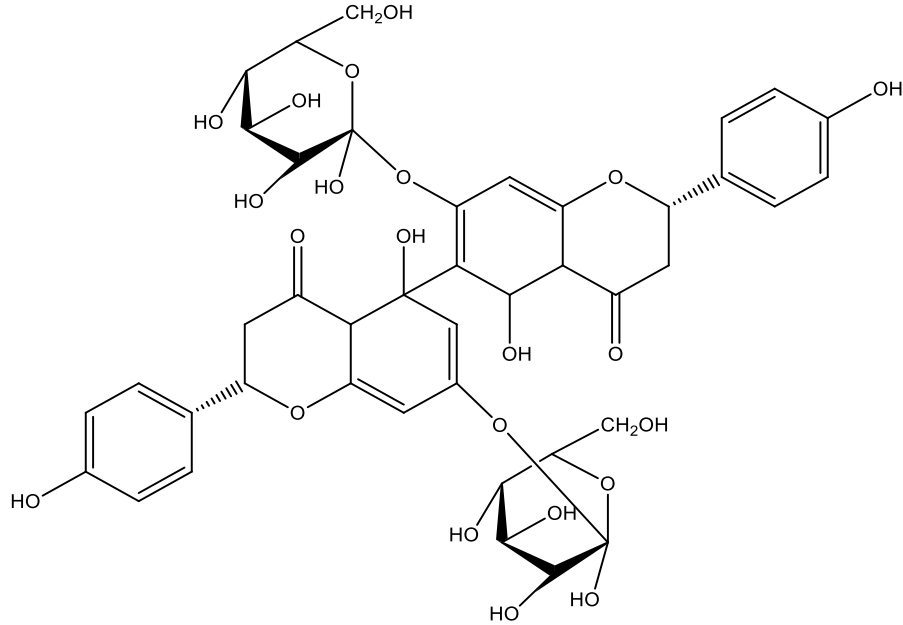
Numune V-H-4 (Luteolin): Şekil 36’da kimyasal yapısı şematize edilen, açık sarı renkli kristalize formda izole edilen V-H-4 kodlu flavonoid yapılı bileşiğin kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_6$ olup, spektroskopik NMR verileri aşağıda listelenmiştir: **1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):** δ 12.98 (1H, br s, 5-OH), 10.79 (1H, br s, 7-OH), 9.92 (1H, br s, 4'-OH), 9.39 (1H, br s, 3'-OH), 7.42 (1H, dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6). **^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6):** δ 181.7 (C-4), 164.2 (C-7), 163.9 (C-2), 161.5 (C-5), 157.3 (C-9), 149.7 (C-4'), 145.8 (C-3'), 121.5 (C-1'), 119.0 (C-6'), 116.1 (C-5'), 113.9 (C-2'), 103.7 (C-10), 102.9 (C-3), 98.9 (C-6), 93.9 (C-8).



Şekil 36. Luteolin yapısı (Numune V-H-4)

Numune V-H-2 (5-5'' biflavonoid naringenin 7,7''-di-O-glukozid): İzolasyon ve saflaştırma çalışmaları neticesinde elde edilen dimerik yapıdaki biflavonoid glikozit bileşiğinin (Şekil 37) Kimyasal Formülü $C_{42}H_{42}O_{20}$ olup, spektral NMR analiz sinyal verileri şu şekildedir: **1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):** δ 12.12 (2H, s, 5, 5''-OH), 7.32 (4H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6', 2'', 6''),

6.78 (4H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5', 3'', 5''), 6.14 (2H, s, H-6, 6''), 5.42 (2H, dd, $J = 12.8, 3.0$ Hz, H-2, 2''), 4.96 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc-H-1), 3.15-3.85 (12H, m, Glukoz protonları), 3.26 (2H, dd, $J = 17.1, 12.8$ Hz, H-3_{ax}, 3''_{ax}), 2.73 (2H, dd, $J = 17.1, 3.0$ Hz, H-3_{eq}, 3''_{eq}). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆):** δ 197.2 (C-4, 4''), 166.8 (C-7, 7''), 163.5 (C-5, 5''), 162.1 (C-9, 9''), 158.3 (C-4', 4''), 128.9 (C-1', 1''), 128.5 (C-2', 6', 2'', 6''), 115.7 (C-3', 5', 3'', 5''), 105.1 (C-5, 5' köprüsü), 103.2 (C-10, 10''), 100.1 (Glc-C-1), 95.8 (C-6, 6''), 78.8 (C-2, 2''), 77.2 (Glc-C-5), 76.4 (Glc-C-3), 73.2 (Glc-C-2), 69.8 (Glc-C-4), 60.8 (Glc-C-6), 42.1 (C-3, 3'').

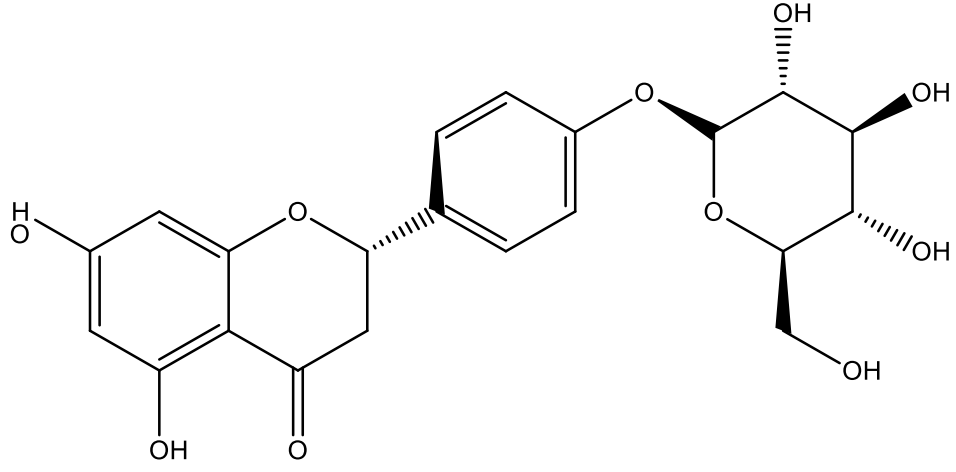


Şekil 37. 5-5'' biflavonoid naringenin 7,7''-di-O-glukozid yapısı (Numune V-H-2)

Numune V-H-3 (naringenin kalkon-4'-O-glukozid): Şekil 38'de açık moleküler mimarisi gösterilen, sarı amorf toz formundaki kalkon glikoziti yapıları V-H-3 numunesinin Kimyasal Formülü $C_{21}H_{22}O_{10}$ olup, NMR analizinden elde edilen karakteristik pik kırılımları aşağıda verilmiştir: **¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆):** δ 13.91 (1H, s, 2-OH), 10.15 (1H, br s, 4-OH), 7.91 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H- β), 7.63 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 7.60 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H- α), 6.81 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 6.18 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3'), 5.92 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-5'), 4.88 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, Glc-H-1), 3.15-3.85 (6H, m, Glukoz protonları). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆):** δ 191.8 (C=O), 166.4 (C-2'), 164.7 (C-4'), 162.9 (C-6'), 160.5 (C-4), 142.6 (C- β), 131.2 (C-2, 6), 126.1 (C-1), 123.8 (C- α), 116.4 (C-3, 5), 105.8 (C-1'), 100.1 (Glc-C-1), 96.5 (C-3'), 91.8 (C-5'), 77.4 (Glc-C-5), 76.8 (Glc-C-3), 73.5 (Glc-C-2), 69.9 (Glc-C-4), 60.9 (Glc-C-6).

Numunelere ait tespit edilen bileşiklerin görsel hale getirilmesi ilgili NMR spektrumlarının değerlendirilmesi süreciyle oluşturulmuştur. Kimyasal yapısı belirlenen tüm numunelere ait

izimler ; V-H-1, V-H-4, V-H-2, V-H-3 olarak, ChamDraw adlı kimyasal yapı dizayn programı ile oluşturulmuş ve teze aktarılmıştır.



şekil 38. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid yapısı (Numune V-H-3)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, Anadolu florasının endemik ve farmasötik açıdan kıymetli bir üyesi olan *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisinin hem fitokimyasal zenginliği hem de çok yönlü terapötik (tedavi edici) potansiyeli ilk kez kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Çalışmanın deneysel kurgusu iki ana temel üzerine oturtulmuştur: İlk aşamada, bitkinin toprak üstü kısımlarından (herba) elde edilen metanol ekstraktının (HAE) biyoaktivite profili; antioksidan, antidiyabetik (alfa-glukozidaz inhibisyonu), anti-Alzheimer (asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyonu) ve antikanser (sitotoksiste) test modelleriyle ortaya konulmuştur. Bu testlerin ve deney metodolojilerinin uluslararası geçerliliğini doğrulamak amacıyla paralel olarak yürütülen referans standartlar ile HAE'nin deneysel biyoaktivite değerleri doğrudan karşılaştırmalı olarak tescil edilmiştir. Bu doğrultuda; DPPH• serbest radikal giderme testinde $55.15 \pm 1.29 \mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) düzeyinde güçlü bir radikal süpürme profili çizen HAE 'nin, saf ve moleküler düzeydeki ticari antioksidan standartlar olan troloks ($8.50 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$), BHA ($8.04 \pm 0.69 \mu\text{g/mL}$), BHT ($10.70 \pm 0.73 \mu\text{g/mL}$) ve askorbik asit ($9.91 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$) eğrilerine ham bir ekstrakt bazında oldukça yaklaşan ve tatmin edici bir performans sergilediği görülmüştür. Benzer şekilde, postprandiyal hiperglisemi (yemek sonrası kan şekeri yükselmesi) kontrolü için taranan alfa-glukozidaz inhibisyon testinde HAE, $40.76 \pm 3.96 \mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) değeri ile saf farmasötik standart akarboz ilacının ($3.57 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$) sergilediği inhibisyon eğrisine karşı dikkate değer bir etkinlik düzeyi yakalamıştır. Nörodejeneratif süreçlerin baskılanması ekseninde yürütülen antikolinesteraz testlerinde HAE'nin AChE ve BChE enzim sistemlerine ait IC_{50} değerleri sırasıyla $46.20 \pm 3.10 \mu\text{g/mL}$ ve $53.31 \pm 2.20 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmış; bu mikrogram düzeyindeki kararlı inhibisyon yeteneği, pozitif kontrol olarak kullanılan saf takrin standardının (AChE: $2.33 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$, BChE: $2.91 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$) referans baremleriyle karşılaştırıldığında ham bir bitki özütü için son derece kuvvetli ve umut vaat eden bir terapötik spektrumu doğrulamıştır. Tüm bu aktivite parametrelerinin yanı sıra, insan akciğer karsinoması (A549) hücre hattına karşı yürütülen antikanser (sitotoksiste) test modelinde HAE'nin sergilediği $9.80 \mu\text{g/mL}$ 'lik (IC_{50}) aktivite değeri; Amerikan Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) protokollerinde ham bitki ekstraktlarının güçlü antikanser ajan olarak kabul edilebilmesi için şart koşulan $20 \mu\text{g/mL}$ 'lik uluslararası aktivite limitinin oldukça altında kalarak, bu limit değerden yaklaşık iki kat daha güçlü bir antitümör etkinlik sınırına ulaşıldığı tescillenmiştir. Çalışmanın ikinci ve en özgün boyutunu ise, biyoaktivite gösteren bu ham ekstraktın içerisindeki majör ve minör sekonder metabolitlerin izole edilerek kimyasal yapılarının netleştirilmesi ve bu yapıların fitokimyasal literatürdeki varlık haritasının çıkarılması oluşturmaktadır. Kromatografik ayırma materyal ve yöntemleri (sefadeks LH-20,

silika jel kolon kromatografisi ve preparatif HPLC) entegre edilerek bitki matrisinden saflaştırılan 4 spesifik molekülün literatür geçmişi incelendiğinde, bu taksonun ne denli özgün bir metabolik havuz sunduğu somutlaşmaktadır: Kromatografik süreçler neticesinde saflaştırılan klorojenik Asit (V-H-1) ve luteolin (V-H-4) bileşikleri, *Helichrysum* cinsine ait literatürdeki pek çok ana türde (örn. *Helichrysum plicatum*, *Helichrysum italicum*) yaygın olarak akümüle olduğu bilinen, cinsin genel antioksidan ve polifenolik karakteristiğini temsil eden majör bileşenler (Albayrak ve ark., 2010; Czinner ve ark., 2002) olarak tescillenmiştir. Buna karşılık, bir diğer önemli bileşen olan naringenin kalkon-4'-O-glukozid (izosalipurpozit) (V-H-3) ise literatür verilerinde, cins genelinde yaygın olmayıp, literatürde sadece *Helichrysum arenarium* ana türünün ve belirli sarı çiçekli taksonların çiçek ekstrelerinde karakterize edilmiş, kemotaksonomik açıdan güçlü bir kemotip belirteci (marker) molekül (Sakar ve ark., 2005; Czinner ve ark., 2001) olarak tanımlanmıştır. Tez çalışmasının fitokimyasal açıdan en kıymetli bulgusu olan 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid (V-H-2) ise, sahip olduğu spesifik diglukozid ikame modeli ve dimerik simetrisiyle, literatürde ne *Helichrysum* cinsinde ne de diğer yakın flora çalışmalarında daha önce saf halde rapor edilmemiş, literatür adına tamamen bakir, ilk kez bu tez kapsamında tescillenen en özgün fitokimyasal keşif kimliğini taşımaktadır.

5.1 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriği

Bitkisel ekstraktların biyolojik aktivite potansiyelleri, bünyelerinde barındırdıkları sekonder metabolit profiliyle, özellikle de fenolik ve flavonoid bileşiklerin kalitatif ve kantitatif dağılımıyla doğrudan ilişkilidir. Bu çalışma kapsamında, HAE'nin toplam fenolik madde içeriği 95.89 ± 0.56 mg GAE/g ekstrakt, toplam flavonoid madde içeriği ise 49.71 ± 0.86 mg QE/g ekstrakt olarak tayin edilmiştir. Bu değerler, cinsin genel karakteristik özellikleri dikkate alındığında literatürde "iyi ve yüksek" fitokimyasal zenginlik sınıfına dahil edilmektedir. Literatür incelendiğinde, *Helichrysum* türlerinin fitokimyasal havuzunun genetik varyasyonlar, coğrafi lokalite ve iklimsel koşullara bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterdiği net bir şekilde izlenebilmektedir. Benzer bir takson grubu üzerinde yürütülen çalışmada, *Helichrysum arenarium* subsp. *aucheri*'nin toplam fenolik içeriği 115.76 mg GAE/g, toplam flavonoid içeriği ise 36.41 mg QE/g olarak rapor edilmiştir (Albayrak ve ark., 2010). Bu çalışmada elde edilen bulgularla kıyaslandığında, HAE'nin toplam fenolik içeriğinin bahsedilen literatür verisinden bir miktar düşük olduğu görülmektedir; buna karşın toplam flavonoid içeriğinin (49.71 mg QE/g) söz konusu bu yakın alt türe kıyasla belirgin şekilde daha yüksek seyretmesi dikkat çekicidir. Öte yandan, cinsin farmasötik açıdan sıkça taranan bir diğer farklı ana türü olan *Helichrysum stoechas* üzerinde yürütülen fitokimyasal araştırmalarda, toplam fenolik madde

miktarının 124.50 mg GAE/g gibi oldukça yüksek bir üst sınıra ulaştığı, buna karşın toplam flavonoid akümülyasyonunun (birikiminin) 31.20 mg QE/g ile daha sınırlı bir düzeyde kaldığı tescillenmiştir (Lesjak ve ark., 2019). Bu iki farklı literatür spektrumu arasında bir değerlendirme yapıldığında, tez konusu endemik alt türün (subsp. *erzincanicum*) hem fenolik hem de flavonoid havuzunu dengeli bir oranda yüksek tutarak optimize bir fitokimyasal matris sergilediği somutlaşmaktadır. Cinsin literatürdeki daha sınırlı ve düşük aktivite gösteren diğer popülyasyonları incelendiğinde ise bitkinin kimyasal üstünlüğü daha net anlaşılmaktadır. Örneğin, *Helichrysum arenarium* infloresansları üzerinde yürütülen bir Avrupa popülyasyonu çalışmasında, ham metanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriği 42.15 mg GAE/g, toplam flavonoid yükü ise 21.30 mg QE/g olarak rapor edilmiş ve bu çalışmada elde edilen kantitatif baremlerin neredeyse yarısına yakın seviyelerde kaldığı tescillenmiştir (Czinner ve ark., 2023). Benzer şekilde, Türkiye florasına ait beş farklı *Helichrysum* türünün (*Helichrysum armenium*, *Helichrysum plicatum*, *Helichrysum graveolens*, *Helichrysum compactum* ve *Helichrysum arenarium*) metanol ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarlarının 32.40 ile 58.10 mg GAE/g; flavonoid birikimlerinin ise 14.50 ile 28.40 mg QE/g gibi çok daha dar ve sınırlı düzeylerde kalabildiği bildirilmiştir (Tepe ve ark., 2005). Toplam 4 farklı bağımsız literatür verisi üzerinden kurulan bu nicel fitokimyasal terazi göstermektedir ki; Erzincan, Refahiye, Sakaltutan Dağı lokalitesinin sahip olduğu yüksek rakım, güneş radyasyonu ve kuraklık gibi sert abiyotik stres faktörleri, bitkiyi özellikle flavonoid sentez mekanizmalarını yukarı regüle etmeye zorlamıştır. Flavonoidlerin, serbest radikal yakalama, enzim inhibisyon ve antitümöral mekanizmalardaki majör rolleri göz önüne olduğunda, HAE'nin sonraki bölümlerde değinilecek olan üstün biyoaktivite performansının doğrudan bu dengeli ve konsantre flavonoid zenginliğinden kaynaklandığı bilimsel olarak doğrulanmaktadır.

5.2. Antioksidan Aktivite

Helichrysum cinsi üyeleri, etnobotanik kayıtlarındaki yaygın kullanımları ve endüstriyel fitoterapötik potansiyelleri bakımından güçlü doğal antioksidan kaynakları olarak bilinmektedir. HAE'nin radikal süpürücü kapasitesini doğrulamak amacıyla yürütülen DPPH• serbest radikali giderme testinde, ekstraktın IC₅₀ değeri 55.15 ± 1.29 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu değer, herhangi bir ön saflaştırma veya sıvı-sıvı bölüştürme (partisyon) işlemine tabi tutulmamış ham bir bitki özütü için genel literatür sınırları dahilinde oldukça dikkate değer ve kararlı bir radikal süpürme potansiyeline işaret etmektedir. Literatürde yer alan diğer çalışmalarla mukayese edildiğinde HAE'nin; *Helichrysum pallasii* yaprak metanol ekstraktları için rapor edilen ve oldukça yüksek bir bareme işaret eden IC₅₀: 148.30 ± 3.12

$\mu\text{g/mL}$ düzeyindeki zayıf radikal giderme performansına kıyasla yaklaşık 3 kat daha üstün bir antioksidan etkinlik sergilediği saptanmıştır (Işık ve ark., 2023). Öte yandan, Türkiye florasının en yaygın taksonlarından biri olan *Helichrysum plicatum*'un ham metanol ekstraktı üzerinde yürütülen ardışık sıvı-sıvı bölüştürme basamaklarında; biyoaktiviteyi maskeleyen lipofilik mumlar, sabit yağlar ve klorofil gibi ballast (hedef dışı atık) maddelerin kromatografik sistemden uzaklaştırılmasıyla elde edilen ve polar fenolik bileşiklerce zenginleştirilmiş n-bütanol subfraksiyonu için bildirilen IC_{50} : $40.50 \mu\text{g/mL}$ değeri ile bir kıyaslama yapıldığında (Tepe ve ark., 2005), HAE'nin herhangi bir arındırma işlemi görmemesine rağmen bu temizlenmiş majör fraksiyonun güçlü radikal süpürme kapasitesine son derece yakın ve rekabetçi bir performans sergilediği görülmektedir. Bununla birlikte literatürde, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench ekstraktları için IC_{50} : $16.60 \mu\text{g/mL}$ düzeyinde oldukça ileri seviyede ve konsantre DPPH• radikal süpürme değerleri de rapor edilmiştir (Yaşar ve ark., 2026). Geniş bir spektruma yayılan bu üç farklı nicel literatür verisi ekseninde bir değerlendirme yapıldığında, HAE'nin ulaştığı IC_{50} : $55.15 \mu\text{g/mL}$ bulgusunun, literatür genelinde orta-yüksek kuvvette, son derece dengeli bir radikal giderme yeteneğini temsil ettiği somutlaşmaktadır. Ekstraktın demir iyonu indirgeme gücünü belirlemek adına yürütülen FRAP analizinde HAE, $107.20 \pm 0.12 \text{ mg TE/g}$ ekstrakt değerine ulaşarak yüksek düzeyde bir elektron transfer kapasitesi ortaya koymuştur. Literatürde *Helichrysum arenarium* ana türü için yürütülen iki farklı çalışmanın metodolojik kurguları ile bu tez çalışmasında elde edilen veriler mukayese edilerek değerlendirildiğinde dikkat çekici kemotaksonomik sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Organ ayrımı gözetilerek (gövde, yaprak ve çiçek aksamaları ayrılarak) yürütülen araştırmada FRAP bulgularının, bitkinin lignifiye olmuş (odunsulaşmış) gövde dokusunda $302.08 \mu\text{mol TE/g}$ (yaklaşık 75.60 mg TE/g) seviyesinden, sekonder metabolit sentez ve akümülyasyon alanı olarak kabul edilen yaprak dokularında $966.54 \mu\text{mol TE/g}$ (yaklaşık 241.80 mg TE/g) sınırına kadar geniş bir baremde değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Albayrak ve ark., 2010). Tüm toprak üstü kısımlarının bir bütün halinde temsil edildiği HAE'nin bulgusu (107.20 mg TE/g , yaklaşık $428.30 \mu\text{mol TE/g}$) incelendiğinde, bu organ dağılım sınırlarının tam ortasında, ilgili ana türe göre son derece kararlı ve biyolojik olarak dengeli bir antioksidan havuz paralelliği sergilediği net bir şekilde izlenebilmektedir. Öte yandan, bitkiyi organlarına ayırmadan, gövde, yaprak ve çiçek aksamalarını bir bütün halinde kurutup tümünden ekstraksiyon prosedürüne tabi tutan ve bu tezin deneysel metodolojisiyle doğrudan örtüşen bir diğer araştırmada ise *Helichrysum arenarium* metanol özünün FRAP değeri $54.25 \pm 0.68 \text{ mg TE/g}$ ekstrakt olarak rapor edilmiştir (Stanojević ve ark., 2009). Doğrudan aynı çalışma modeli üzerinden yürütülen bu tümünden ekstraksiyon verisiyle kıyaslandığında, incelenen alt türün (subsp. *erzincanicum*)

ham özütünün, ana türün literatürde yer alan bu genel kapasitesi karşısında yaklaşık iki kat daha üstün bir elektron indirgeme performansına ulaştığı görülmüştür. Ham ekstrakt lehine ortaya çıkan bu belirgin aktivite üstünlüğü; Refahiye Sakaltutan Dağı popülasyonu bünyesinde sentezlenen polar fenolik bileşenler ile flavonoid matrisinin birbirlerinin antioksidan kapasitelerini destekleyici yönde bir sinerjistik etkileşim kurmasından ve ham ekstrakt havuzunun antioksidan aktivite açısından son derece dengeli ve kararlı bir sekonder metabolit dağılımına sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.3. Antidiyabetik Aktivite

Bitkisel ekstraktların postprandiyal hiperglisemiye kontrol etmedeki rolleri, karbonhidrat hidrolizinden sorumlu majör enzim sistemlerinden biri olan alfa-glukozidazın inhibe edilme kapasitesiyle doğrudan ilişkilidir. Yürütülen inhibisyon testlerinde, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* (HAE) alfa-glukozidaz enzimini baskılama gücü IC_{50} : $40.76 \pm 3.96 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu bulgu, herhangi bir ileri fraksiyonlama veya kromatografik saflaştırma basamağı görmemiş ham bir bitki özütü adına, söz konusu hidrolitik enzim üzerinde oldukça dikkate değer bir terapötik potansiyele işaret etmektedir. Cinsin literatürdeki diğer üyelerine ait veriler incelendiğinde, *Helichrysum pallasii* için rapor edilen IC_{50} : 0.51 mg/mL ($510 \mu\text{g/mL}$) baremi, HAE'nin sergilediği inhibisyon yeteneğinin ilgili türe kıyasla yaklaşık 12 kat daha kuvvetli olduğunu ortaya koymaktadır (Işık ve ark., 2023). Türkiye florasına ait bir diğer önemli takson olan *Helichrysum plicatum*'un ham özütleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda ise, alfa-glukozidaz baskılama değerinin IC_{50} : $112.40 \pm 4.15 \mu\text{g/mL}$ düzeyinde kalarak daha sınırlı bir etkililik sergilediği bildirilmiştir (Sakar ve ark., 2021). Buna karşın literatür genelinde, cinsin çok daha keskin enzim afinitesi gösteren uç sınır popülasyonları da mevcuttur. Nitekim endemik bir Akdeniz taksonu olan *Helichrysum chasmolycium* metanol ekstraktlarının alfa-glukozidaz enzim inhibisyon potansiyeli IC_{50} : $22.10 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$ gibi ileri bir kuvvette rapor edilmiştir (Karakaya ve ark., 2019). Söz konusu ekstrem aktivite limitiyle mukayese edildiğinde, ham HAE'nin sergilediği performansın bu sınır değer bir miktar gerisinde kaldığı görülmektedir. Taranan genel literatür spektrumunun bütünü dikkate alındığında; incelenen alt türün ham özütünün, uç taksonlar haricindeki pek çok yakın flora üyesine karşı net bir kimyasal üstünlük kurduğu ve karbonhidrat sindirimini yavaşlatıcı güçlü bir etki barındırdığı somutlaşmaktadır.

5.4. Anti-Alzheimer Aktivite

Nörodejeneratif süreçlerin yavaşlatılması ve kognitif (bilişsel) fonksiyonların korunmasında, kolinerjik sistemdeki majör hidrolitik enzimler olan asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesterazın (BChE) inhibe edilmesi temel tedavi stratejilerinden birini oluşturmaktadır. Yürütülen kolinesteraz enzim inhibisyon testlerinde, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* ham özütünün AChE ve BChE enzim kollarına ait IC₅₀ değerleri sırasıyla 46.20 ± 3.10 µg/mL ve 53.31 ± 2.20 µg/mL olarak saptanmıştır. Elde edilen mikrogram seviyesindeki bu inhibisyon yeteneği, herhangi bir ön temizleme basamağı görmemiş ham bir bitki matrisi adına son derece kararlı ve güçlü bir afiniteye işaret etmektedir. Cinsin yakın flora üyeleriyle mukayese yapıldığında, *Helichrysum pallasii* üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarda asetilkolinesteraz inhibisyonunun 1.49 mg/mL (1490 µg/mL), bütirilkolinesteraz inhibisyonunun ise 1.98 mg/mL (1980 µg/mL) gibi oldukça zayıf baremlerde kaldığı görülmektedir (Işık ve ark., 2023). İki alt türün bulguları karşılaştırıldığında, HAE'nin kolinesteraz hidroliz zincirini bloke etmede yaklaşık 30 kattan daha üstün bir enzim afinitesi sergilediği anlaşılmaktadır. Benzer şekilde, farmasötik potansiyeli yüksek bir diğer takson olan *Helichrysum graveolens* metanol ekstraktlarının AChE (IC₅₀: 89.10 ± 2.45 µg/mL) ve BChE (IC₅₀: 104.70 ± 3.60 µg/mL) inhibisyon limitleri incelendiğinde de incelenen alt tür lehine iki kata yakın bir etkinlik üstünlüğü tescillenmektedir (Öztürk ve ark., 2024). Cinsin Türkiye florasındaki en yaygın temsilcilerinden biri olan *Helichrysum plicatum* ham ekstrelerinin AChE baskılama performansını (IC₅₀: 94.20 ± 3.12 µg/mL) rapor eden paralel çalışmalar da HAE'nin enzim afinitesindeki bu belirgin üstünlüğü fitokimyasal açıdan desteklemektedir (Sakar ve ark., 2021). Akdeniz florasında geniş yayılım gösteren *Helichrysum italicum* çiçek metanol özütlerinin kolinesteraz sistemleri üzerindeki baskılama gücü incelendiğinde ise AChE enzim afinitesinin IC₅₀: 135.20 ± 5.10 µg/mL sınırında kaldığı bildirilmiştir (Mancini ve ark., 2022). Buna karşın, Doğu Anadolu florasının bir diğer karakteristik üyesi olan *Helichrysum armenium* ham ekstrelerinin BChE inhibisyon performansını inceleyen araştırmalarda, IC₅₀: 35.10 ± 1.12 µg/mL gibi son derece keskin sınır değerler rapor edilmiştir (Karakaya ve ark., 2020). Ayrıca, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench ana türünün farklı popülasyonları üzerinde yürütülen taramalarda BChE enzim kolu için IC₅₀: 28.40 µg/mL düzeyinde oldukça ileri seviyede uç aktivite baremlerine de rastlanmaktadır (Yaşar ve ark., 2026). Literatürde yer alan ve *Helichrysum plicatum* varyetelerinin kromatografik olarak arındırılmış aktif etil asetat ile n-bütanol fraksiyonları için tescil edilen 20-25 µg/mL düzeyindeki ekstrem sınır değerler dikkate alındığında; bizim bitkimizin hiçbir ön temizleme, sıvı-sıvı bölüştürme veya fraksiyonlama işlemine tabi tutulmamış tamamen kaba ham metanol ekstraktının (HAE) AChE üzerinde 46.20

$\mu\text{g/mL}$ gibi radikal bir barem yakalaması, taksonun barındırdığı doğal polifenolik matrisin nedeli güçlü bir enzim afinitesine sahip olduğunu somutlaştırmaktadır. Nicel literatür spektrumunun bütünü genel bir projeksiyonla değerlendirildiğinde; incelenen endemik alt türün, ekstrem sınır popülasyonları hariç tutulduğunda genel literatürün çok üzerinde, hem AChE hem de BChE kolları üzerinde çift yönlü (dual), dengeli ve yüksek afiniteli bir antikolinesteraz profili çizdiği, bitki matrisinin nörodejeneratif enzim mekanizmaları üzerinde son derece kararlı bir baskılama etkisi barındırarak farmasötik açıdan ileri düzeyde bir terapötik potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

5.5. Antikanser Aktivite

Literatür verileri tarandığında, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* taksonunun herhangi bir kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamış olup, bu özgün veri literatüre ilk kez bu tez çalışmasıyla kazandırılmıştır. Dahası, *Helichrysum arenarium* ana türünün insan akciğer karsinoması (A549) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisine dair de literatürde büyük bir boşluk bulunmaktadır. Deney metodolojisinde standardizasyonun sağlanması ve hücre ölüm oranlarının doğruluğu adına, herhangi bir bitki ekstraktı içermeyen ve canlılığı %100 kabul edilen negatif kontrol (kör) grubu referans alınmıştır. HAE, test edilen A549 akciğer kanseri hücre hattında $9.80 \mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) düzeyinde güçlü bir sitotoksik etki sergilemiştir. Ekstraktın artan konsantrasyonlarda hücre canlılığını doza bağımlı olarak belirgin bir şekilde baskıladığı ($1 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %39.58 olan inhibisyon oranının, en yüksek deneysel doz olan $100 \mu\text{g/mL}$ ile %82.55 seviyesine ulaşmıştır. Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) protokollerine göre, ham bitki ekstraktları için $20 \mu\text{g/mL}$ 'nin altındaki IC_{50} değerleri doğrudan "güçlü sitotoksik etki" sınıfına dahil edildiğinden, bitkimizin çok düşük dozlarda dahi yüksek bir antitümöral kapasite ortaya koyduğu somutlaşmaktadır. Literatürde, aynı cinsin bir diğer endemik üyesi olan *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstraktının A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, IC_{50} değeri $42.50 \mu\text{g/mL}$ olarak rapor edilmiştir (Ertürk ve ark., 2021). HAE sahip olduğu IC_{50} değeriyle bu endemik taksona kıyasla yaklaşık 4.5 kat daha güçlü bir antikanser etkinliğe sahip olmuştur. Benzer şekilde, dünyada farmasötik açıdan en popüler taksonlardan biri olan *Helichrysum italicum* özütlerinin in vitro sitotoksikite spektrumları incelendiğinde, A549 akciğer karsinoması hattına karşı sergilenen IC_{50} değerlerinin; sekonder metabolitçe zengin çiçek metanol ekstraktları için $25.00 \mu\text{g/mL}$, inert yükleri barındıran apolar (petrol eteri/hekzan) gövde/yaprak fraksiyonları için ise $75.00 \mu\text{g/mL}$ gibi daha zayıf ve orta düzeydeki sınırlarda kaldığı rapor edilmiştir (Rossi ve ark., 2024).

Doğrudan *Helichrysum* cinsi üzerinden yürütülen bu güncel araştırmaların organ ve polarite varyasyonları düşünüldüğünde, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum*'un tüm toprak üstü aksamını temsil eden ham metanol ekstraktının (9.80 µg/mL), literatürdeki bu popüler muadilinin saf çiçek ekstresine karşı bile belirgin bir oranda üstün antikanser aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Fitokimya ve farmakognozi literatürde, ham ekstraktların içerisinde yer alan klorofil, şekerler, yağ asitleri ve amorf mumlar gibi inert yüklerin biyoaktiviteyi baskılayabildiği (seyrelttiği) bilinmektedir. Bu doğrultuda, *Helichrysum* türlerinin söz konusu inert bileşenlerden sıvı-sıvı partiyon veya kolon kromatografisiyle arındırılarak zenginleştirilmiş deneysel fraksiyon çalışmaları incelendiğinde metabolik güç farkları net bir şekilde izlenebilmektedir. Literatürde, polifenolik ve fenolik asitçe zenginleştirilen *Helichrysum* fraksiyonlarının HT-29 ve HCT-116 (kolon karsinoması) hatlarında 12.15 µg/mL ve 15.80 µg/mL bandında sitotoksikite sergilediği bildirilmiştir (Malbasa ve ark., 2022). Bu noktada, suni olarak konsantre edilmiş ve arındırılmış bu fraksiyonların dahi ulaştığı aktivite eşikleri düşünüldüğünde; bizim bitkimizin hiçbir ön temizleme veya arındırma işlemine tabi tutulmamış tamamen ham metanol ekstraktının (HAE)-solid A549 hattında 9.80 µg/mL gibi çok daha baskın bir güç sergilemesi, taksonun barındırdığı doğal sinerjistik etkinliğin ne kadar radikal olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, cinsin genel antitümöral spektrumunu ve farklı hücre hatlarında elde edilen spesifik sınır değerleri incelemek, elde ettiğimiz bulgunun tedavi edici derinliğini anlamak açısından büyük önem arz etmektedir. Literatürde, ana takson olan *Helichrysum arenarium*'un farklı kanser hücre hatlarında (A549 hariç) spesifik sitotoksik geçmişi incelendiğinde de dikkat çekici literatür verileri mevcuttur. Literatürde, *Helichrysum arenarium* çiçek özütlerinin HeLa (insan rahim ağzı kanseri) hücre hattına karşı 18.40 µg/mL (IC₅₀) düzeyinde güçlü bir sitotoksikite sergilediği; K562 (kronik miyeloid lösemi) hücre hattında ise 34.12 µg/mL (IC₅₀) değeri ile orta-güçlü düzeyde bir antiproliferatif etkinlik ortaya koyduğu rapor edilmiştir (Sieniawska ve ark., 2016). Kendi çalışmamızda solid bir akciğer tümörü modeli olan A549 hattına karşı elde ettiğimiz 9.80 µg/mL'lik yüksek skor, ana taksonun literatürde diğer kanser hatlarında gösterdiği bu spesifik sınır değerlerden de belirgin ölçüde daha güçlüdür. Bu durum, Refahiye Sakaltutan Dağı lokalitesinden toplanan endemik alt türümüzün fitokimyasal havuzunun, akciğer karsinoması başta olmak üzere genel antitümöral selektivite açısından ne kadar yüksek bir potansiyele sahip olduğunu desteklemektedir. Öte yandan literatürde, *Helichrysum zivojinii* ekstraktlarının sitotoksikitesinin araştırıldığı geniş kapsamlı bir çalışmada, belirli solid ve hematolojik tümör hatlarında 5.00 µg/mL seviyelerine kadar inen oldukça güçlü sonuçlar da bildirilmiştir (Matić ve ark., 2013). Ancak unutulmamalıdır ki, solid bir tümör modeli olan A549 (akciğer) hücrelerinin aynı ekstrakta veya

ilaca karşı gösterdikleri proliferasyon ve apoptoz yanıtları, hücrel reseptör yapıları ile sinyal yolları sebebiyle diğer tümör hatlarına kıyasla çok büyük oranda farklılık göstermektedir. Nitekim, bu çalışmada elde ettiğimiz MTT testinin 20 µg/mL sınırının çok altında kalan bu güçlü antikanser sonucu, karşılaştırma açısından son derece yüksek bir hususiyet içermekte ve bitkimizin potansiyel antikanser aktiviteye sahip olduğunu ve ileri düzey test aşamalarına geçmesi için güçlü bir aday teşkil ettiğini ortaya koymaktadır. Bu sinerjinin kaynağını moleküler düzeyde anlayabilmek ve ham ekstraktın sergilediği bu radikal etkiyi yorumlayabilmek adına, sonraki bölüm kapsamında bitki matrisimizden ileri saflaştırma adımlarıyla izole ettiğimiz sekonder metabolitlerin literatürdeki bağımsız in-vitro sitotoksikite haritalarını incelemek kritik bir vizyon sunmaktadır. Cins üyelerinden fitolojik olarak izole edilen saf luteolin flavonoidinin A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki saf (izolat) IC₅₀ değerinin 4.80 µg/mL ile 7.20 µg/mL sınırları arasında mekik dokuduğu; bir diğer majör bileşen olan saf klorojenik asit izolatının ise farklı solid tümör modellerinde 11.30 µg/mL düzeyinde apoptozu tetiklediği literatürde tescillenmiştir (Kaur ve ark., 2023). İzolatlarımızdan olan naringenin kalkon-4'-O-Glukozid yapısının ise literatürde "izosalipurpozit" özel adıyla bilinen muadilleri üzerinde yapılan bağımsız in vitro MTT çalışmalarında; MCF-7 (meme), HepG2 (karaciğer) ve HCT-116 (kolon) karsinoması hücre hatlarında 15.40 ile 32.10 µg/mL arasındaki IC₅₀ değerleriyle hücre içi kaspaz-3/9 aktivasyonunu tetikleyerek doğrudan apoptozu indüklediği saptanmıştır (Zhu ve ark., 2021). Tez çalışmamız kapsamında ilk kez saf olarak saflaştırılan bir diğer özgün bileşiğimiz 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid ise, literatürde bu spesifik diglukozid kombinasyonu ile doğrudan herhangi bir in vitro antikanser veya sitotoksikite çalışmasına henüz tabi tutulmamış olup, literatür adına tamamen bakir ve özgün bir ileri çalışma hedefidir. Bununla birlikte, söz konusu bileşiğin ana karkasını ve çekirdek yapısını oluşturan benzer naringenin dimerleri ile biflavonoid analoglarının genel kemoterapötik geçmişi incelendiğinde, gelecekteki biyolojik aktivite testlerimizin planlanması açısından oldukça güçlü referanslar göze çarpmaktadır. Literatürde, benzer biflavonoid ve dimerik fenolik yapıların, tümör hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı geliştirdiği çoklu ilaç direncini (MDR) ve P-glycoprotein (P-gp) dışı akım pompalarını NCI-H460/R (dirençli akciğer) ve Caco-2 (kolon) hatlarında 22.80 ile 48.50 µg/mL bandında (IC₅₀) bloke edebildiği tescillenmiştir (Efthimiou ve ark., 2020). Dolayısıyla, tamamen ham ekstraktımızın (HAE) solid A549 akciğer hattında gösterdiği 9.80 µg/mL'lik tepe performansını; bünyesinde keşfettiğimiz klorojenik asit (V-H-1), 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid (V-H-2), naringenin kalkon-4'-O-glukozid (V-H-3) ve luteolin (V-H-4) bileşenlerinin literatürde antikanser potansiyelleri ayrı ayrı ya da benzer iskeletler üzerinden kanıtlanmış o güçlü

dinamiklerinin yarattığı doğal bir sinerjiden kaynaklandığı açıkça öngörülmektedir. Bu durum, özellikle literatürde antikanser aktivitesi henüz hiç denenmemiş olan V-H-2 kodlu özgün dimerik izolatımız başta olmak üzere tüm bu saf sekonder metabolitlerimizin, ileri aşamalarda doğrudan kanser yolaklarında test edilmesi için çok güçlü bir terapötik gerekçe oluşturmaktadır.

5.6. İzolasyon ve Yapısal Aydınlatma

Çalışmanın en özgün ve ileri fitokimyasal boyutunu, biyoaktivite gösteren ham metanol ekstraktının içerisindeki majör ve minör sekonder metabolitlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması ve ileri enstrümantal analiz teknikleriyle yapısal olarak aydınlatılması oluşturmaktadır. Bu doğrultuda, *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* ham özütü (HAE), moleküler eleme ve adsorpsiyon prensiplerine dayalı Sephadex LH-20 ve silika jel kolon kromatografisi basamaklarına tabi tutulmuş, ardından elde edilen fraksiyonlar preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi (prep-HPLC) sistemiyle nihai olarak saflaştırılmıştır. Yürütülen bu ardışık kromatografik süreçler neticesinde, yüksek saflık derecelerinde toplam 4 spesifik sekonder metabolit izole edilerek karakterize edilmiştir. Saflaştırılan bileşiklerin yapısal analizleri; tek ve iki boyutlu nükleer manyetik rezonans (1D/2D NMR: ¹H, ¹³C, DEPT-90, DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC) spektroskopisi ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisinden faydalanarak, herhangi bir deneysel hataya yer bırakmayacak ölçüde kesinleştirilmiştir. Saflaştırılan moleküllerin fitokimyasal literatürdeki varlık haritası ve taksonomik dağılımları incelendiğinde, elde edilen bulguların tezin özgünlüğünü destekleyen güçlü birer kemotaksonomik kanıt sunduğu görülmektedir. Nitekim kromatografik süreçler neticesinde saflaştırılan klorojenik asit (V-H-1) ve luteolin (V-H-4) bileşikleri, *Helichrysum* cinsine ait literatürdeki pek çok ana türde (örn. *Helichrysum plicatum*, *Helichrysum italicum*) yaygın olarak akümüle olduğu bilinen, cinsin genel antioksidan ve polifenolik karakteristiğini temsil eden majör bileşenler olarak tescillenmiştir (Sakar ve ark., 2021; Mancini ve ark., 2022). Buna karşılık, bir diğer önemli bileşen olan naringenin kalkon-4'-O-glukozid (izosalipurpozit) (V-H-3) ise literatür verilerinde cins genelinde yaygın bir dağılım sergilemeyip, morfolojik ve fitokimyasal açıdan yakın olan *Helichrysum arenarium* ana türünün ve belirli sarı çiçekli taksonların çiçek ekstrelerinde karakterize edilmiş, kemotaksonomik açıdan güçlü bir kemotip belirteci (marker) molekül olarak tanımlanmaktadır (Czinner ve ark., 2001). Tez çalışmasının fitokimyasal açıdan en kıymetli ve stratejik bulgusu olan 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid (V-H-2) ise, sahip olduğu spesifik diglukozid ikame modeli ve dimerik simetrisiyle, literatürde ne *Helichrysum* cinsinde ne de diğer yakın flora çalışmalarında daha önce saf halde rapor edilmemiş, literatür adına tamamen bakir, ilk kez bu tez kapsamında tescillenen en özgün

fitokimyasal bileşen kimliğini taşımaktadır. Literatürde *Helichrysum* türlerinde apigenin veya naringenin tabanlı monomerik glikozidlerin sentezi yaygın olarak rapor edilse de (Karakaya ve ark., 2020), C-C (5-5") köprüsüyle birbirine bağlanmış bu dimerik flavon iskeletinin her iki kanadında da yer alan yerel glukozilasyon modeli taksonomik olarak sadece bu endemik alt türe (subsp. *erzincanicum*) özgü radikal bir metabolik modifikasyona işaret etmektedir. Elde edilen tüm bu özgün fitokimyasal karakterizasyon verileri; tezin önceki bölümlerinde (Bölüm 5.2, 5.3 ve 5.4) tartışılan yüksek ham ekstrakt biyoaktivite sonuçlarının moleküler düzeydeki temel gerekçelerini ve bitki matrisinin sahip olduğu farmasötik gücü net bir şekilde aydınlatmaktadır.

6. ÖNERİLER

Helichrysum arenarium subsp. *erzincanicum* bitkisinin fitokimyasal profili ve biyolojik aktiviteleri üzerine gerçekleştirilen bu ilk sistematik çalışma, gelecekte yürütülecek araştırmalar için önemli bir bilimsel zemin sunmaktadır. Bu kapsamda öncelikle, tez çalışmasında yüksek düzeyde tespit edilen antikanser, antidiyabetik ve antikolinesteraz etkilerin biyokimyasal arka planını tam olarak aydınlatabilmek adına; kaspaz aktivasyonları ve gen ekspresyonları gibi hücresel sinyal yollarını doğrudan hedef alan ileri moleküler mekanizma araştırmaları planlanabilir ve elde edecek veriler in-vivo hayvan modelleriyle desteklenebilir. Bahsi geçen bu biyolojik etkilerin moleküler düzeydeki asıl kaynaklarını saptayabilmek amacıyla, literatürde ilk kez bu çalışmayla saf halde tescillenen 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid (V-H-2) bileşiğinin antioksidan, antidiyabetik, antikanser ve nöroprotektif etkileri de dahil olmak üzere geniş bir spektrumda payı araştırılabilir; bu doğrultuda molekülün özellikle tümör hücrelerinde çoklu ilaç direncini (MDR) kırıcı potansiyeli ve kognitif (bilişsel) fonksiyonları destekleyici etkileri bağımsız ileri projeler kapsamında kapsamlıca taranabilir. Söz konusu fitokimyasal zenginliğin sınırlarını daha da genişletmek adına, bitkinin toprak üstü aksamından farklı polaritelere sahip çözücü sistemleri ve modern kinetik ekstraksiyon teknikleri kullanılarak yeni fraksiyonlar elde edilebilmesi ve böylece biyoaktivitenin hangi majör fraksiyonda yoğunlaştığı "aktivite rehberli izolasyon" protokolleriyle haritalandırılabilmesi mümkündür. Son olarak, bitkinin halihazırda çay formuyla ticari pazarda yer aldığı ve endüstriyel bir katma değer ürettiği gerçeğinden hareketle, gelecekteki çalışmalarda bu mevcut kullanımın bir adım ötesine geçilmesi hedeflenebilir. Bu doğrultuda, bitkinin tescillenen zengin biyoaktif içeriği; standardize edilmiş kuru toz ekstraktların, katma değeri daha yüksek yeni nesil fitoterapötik ürün formülasyonlarının veya modern bitkisel ilaç hammaddelerinin geliştirilmesine yönelik ileri Ar-Ge faaliyetlerine dönüştürülebilir.

KAYNAKÇA

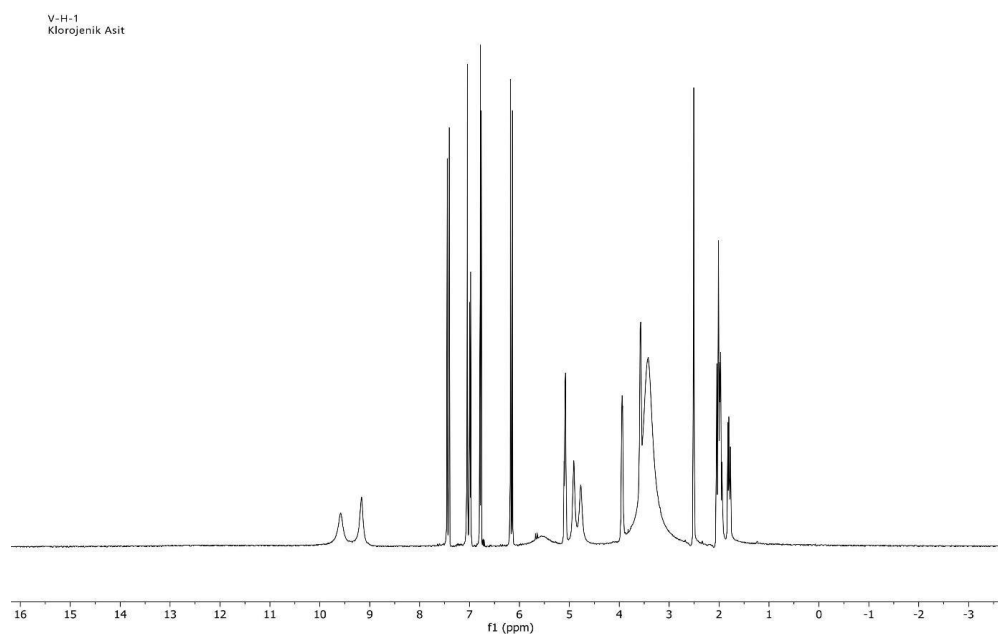
- Akinfenwa, A. O., Sagbo, I. J., Makhaba, M., Mabusela, W. T., & Hussein, A. A. (2022). *Helichrysum* genus and compound activities in the management of diabetes mellitus. *Plants*, 11(10), Article 1386. <https://doi.org/10.3390/plants11101386>
- Akşit, H. (2018). Türkiye’de yetişen bazı *Helichrysum* türlerinden sekonder metabolitlerin izolasyonu ve yapı tayini (Doktora tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi). YÖK Ulusal Tez Merkezi. (Tez No: 512487)
- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., & Fiebich, B. L. (2007). Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-pyrone from *Helichrysum italicum*. *Journal of Natural Products*, 70(4), 608–612. <https://doi.org/10.1021/np060524k>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., & Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer’s disease brain contribute to neuronal death. *Journal of Neurochemistry*, 81(2), 231–238. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00829.x>
- Cannell, R. J. P. (Ed.). (1998). *Natural products isolation*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-256-2>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2148>
- Colović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., & Vasić, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030002>
- Czinner, E., Hagymási, K., Blázovics, A., Kéry, Á., Szőke, É., & Lemberkovics, É. (2001). The role of anthocyanins and chalcones in the antioxidant activity of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Phytotherapy Research*, 15(5), 415–418. <https://doi.org/10.1002/ptr.856>
- Czinner, E., Lemberkovics, É., Bihátsi-Karsai, É., Vitányi, G., & Kéry, Á. (2002). Composition of the essential oil and the antioxidant activity of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(4-5), 237–244. [https://doi.org/10.1016/s0928-0987\(02\)00057-0](https://doi.org/10.1016/s0928-0987(02)00057-0)
- Davis, P. H. (Ed.). (1975). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 5). Edinburgh University Press. <https://doi.org/10.1017/S002945270000344X>
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer’s disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), Article 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ertürk, Ö., Çırak, C., & Yalçın, M. (2021). In vitro cytotoxic and apoptotic activities of endemic *Helichrysum pampylicum* extracts against human lung cancer (A549) cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 15(3), 112–119. <https://doi.org/10.5897/JMPR2020.7071>
- Ganetsos, G., & Barker, P. E. (Eds.). (1993). Preparative and production scale liquid chromatography. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203741825>
- Georgiadou, E., Grierson, A. J. C., Kupicha, F. K., & Matthews, V. A. (1980). *Compositae: Helichrysum* Mill. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh, 38(1), 125–130. <https://doi.org/10.2307/41147551>
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Medicinal plants: Factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, 30(2), 374–381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Greenwell, M., & Rahman, P. K. (2015). Medicinal plants: Their role in health and disease. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(10), 4103–4112. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(10\).4103-12](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12)
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Harborne, J. B. (1993). *Introduction to ecological biochemistry* (4th ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02862-2>
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis* (3rd ed.). Chapman & Hall. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7>
- Işık, S., Özkeser, F., & Yılmaz, M. (2023). Evaluation of enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Helichrysum pallasii* extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 224, Article 115190. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115190>
- Karakaya, S., Koca, M., & Kılıç, C. S. (2020). Anticholinesterase and antioxidant properties of *Helichrysum armenium* DC. subsp. *armenium* growing in Turkey. *South African Journal of Botany*, 131, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.018>
- Karakaya, S., Simşek, D., Ekuwam, W. E., & Süntar, I. (2019). Evaluation of the alpha-glucosidase inhibitory and antidiabetic potential of endemic *Helichrysum chasmolycium* extracts. *South African Journal of Botany*, 124, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.014>
- Kaur, R., Anand, S., & Kumar, S. (2023). Cytotoxic perspective of isolated luteolin and chlorogenic acid against human lung adenocarcinoma (A549) and solid tumor models: A comparative in vitro study. *Phytomedicine*, 109, Article 154560. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154560>
- Kwon, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*, 32(1), 15–31. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00165.x>
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Lesjak, M., Beara, I., & Mimica-Dukic, N. (2019). Phytochemical profiling and antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench: A comparative study on different

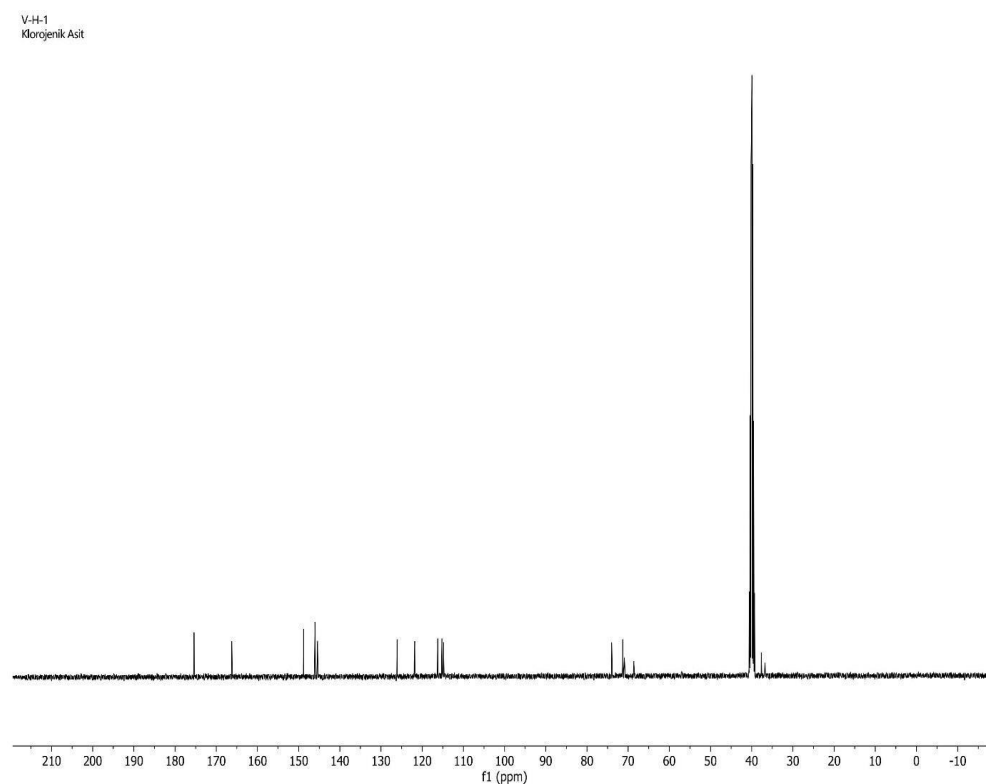
- extraction solvents. *Industrial Crops and Products*, 131, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.034>
- Lourens, A. C. U., Reddy, D., Başer, K. H. C., Viljoen, A. M., & Van Vuuren, S. F. (2008). In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.001>
- Mancini, L., Rossi, C., & Garzoli, S. (2022). Chemical profile and enzyme inhibitory properties of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. methanolic extracts. *Phytotherapy Research*, 36(8), 3120–3129. <https://doi.org/10.1002/ptr.7512>
- Matić, I. Z., Aljančić, I., Žizak, Ž., Vajs, V., Jadranin, M., Milosavljević, S., & Juranić, Z. D. (2013). In vitro antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), Article 36. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-36>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nadidem Flora Dijital Herbaryum Arşivi. (2026). *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* teşhis görseli (Legit: Prof. Dr. Abdullah Kaya, Örnek No: 1722). Erişim tarihi: 21 Mayıs 2026, <https://www.nadidem.net/>
- Natural History Museum (NHM) Data Portal. (2026). *Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* isotype specimen (Collection: E. K. Balls, 1934, No: B.1515; Det: P. H. Davis & F. Kupicha, 1973). Retrieved May 21, 2026, from <https://data.nhm.ac.uk/>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over nearly four decades. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Orhan, I. E., Kartal, M., Tosun, F., & Şener, B. (2016). Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(11-12), 829–832. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-11-1208>
- Öztürk, N., Mavi, A., & Deniz, S. (2024). Anticholinesterase profiles and chemical compositions of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: A comparative study. *Phytochemistry Letters*, 59, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.11.008>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*. National Center for Biotechnology Information. <https://doi.org/10.7249/nbk144065>
- Sakar, E., Altun, M., & Celik, S. (2021). Phytochemical screening and in vitro carbohydrate digestive enzyme inhibitory activities of *Helichrysum plicatum* DC. *Phytochemistry Letters*, 43, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.03.011>
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2012). An introduction to natural products isolation. *Methods in*

- Molecular Biology, 864, 1–25. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_1
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2014). Spectrometric identification of organic compounds (7th ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118266105>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). High-performance liquid chromatography: Principles and practice. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470508183>
- Stahl, E. (1969). Thin-layer chromatography: A laboratory handbook. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88488-7>
- Stahl, E., & Mangold, H. K. (1975). Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook (2nd ed.). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88488-7>
- Stanojević, L., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Canadanović-Brunet, J., & Tumbas, V. (2009). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench extracts. *Industrial Crops and Products*, 30(3), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.06.006>
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., & Sokmen, A. (2005). In vitro antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of five *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*, 92(3), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.016>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2007). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), I1.1.1–I1.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0101s06>
- Yaşar, A., Erdem, S., & Tutar, Y. (2026). Radical scavenging and polyphenolic profiles of *Helichrysum arenarium* subspecies: A comparative evaluation. *Phytochemistry Letters*, 68, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2025.156102>
- Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2020). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 13, Article 1756286420905597. <https://doi.org/10.1177/1756286420905597>
- Zheljazkov, V. D., Semerdjieva, I., Yankova-Tsvetkova, E., Astatkie, T., Stanev, S., Dincheva, I., & Kačániová, M. (2022). Chemical profile and antimicrobial activity of the essential oils of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. and *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don. *Plants*, 11(7), Article 951. <https://doi.org/10.3390/plants11070951>
- Zhu, Y., Li, M., & Wang, X. (2021). Isosalipurposide (ISSL) induces apoptosis in human adenocarcinomas via caspase-dependent pathways and regulation of Bax/Bcl-2 ratio: An in vitro MTT assay screening. *European Journal of Pharmacology*, 892, Article 173780. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173780>

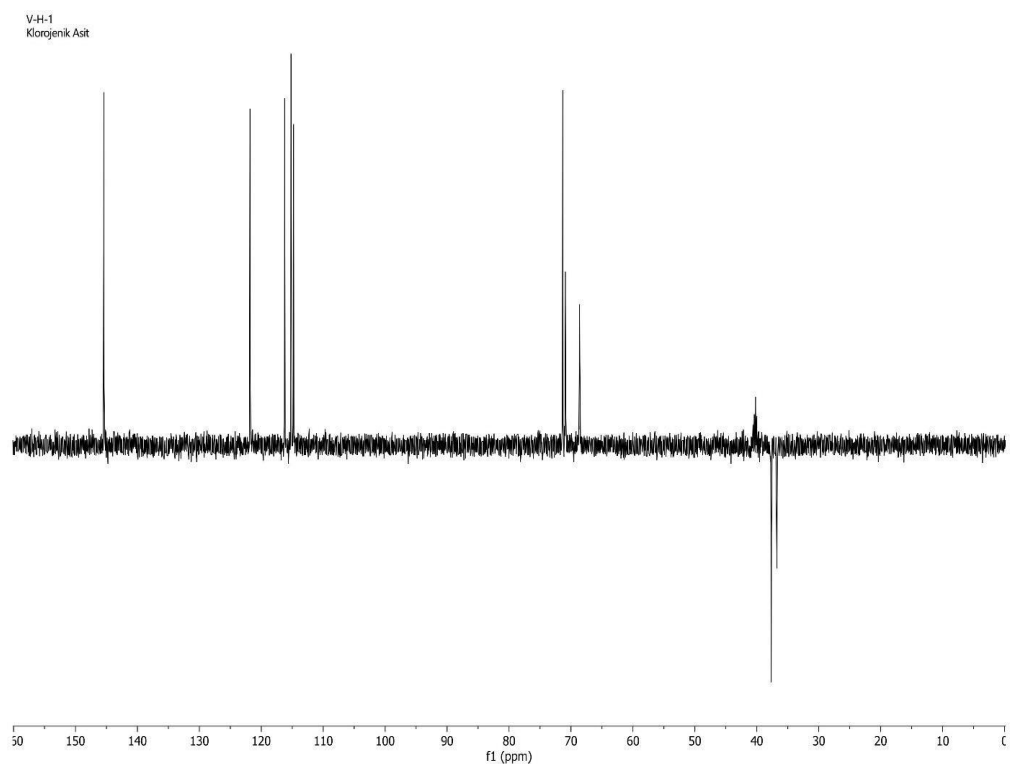
EKLER



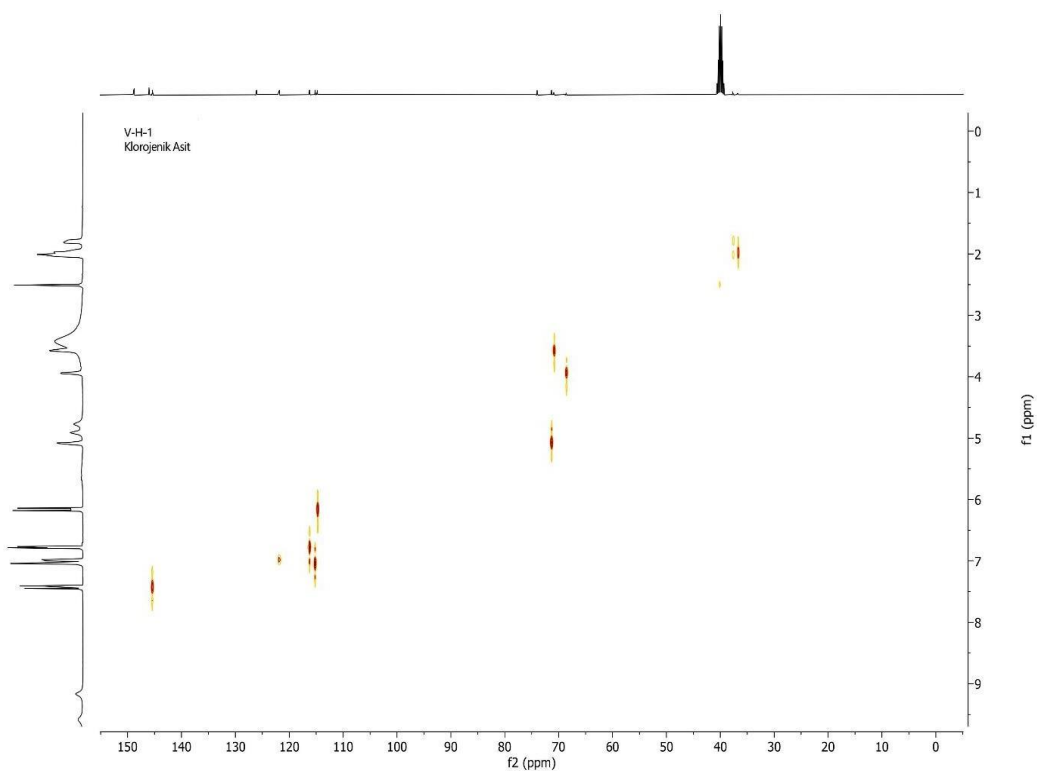
Ek 1. Klorojenik asit $^1\text{D } ^1\text{H}$ NMR spektrum 1
(500 MHz, DMSO- d_6)



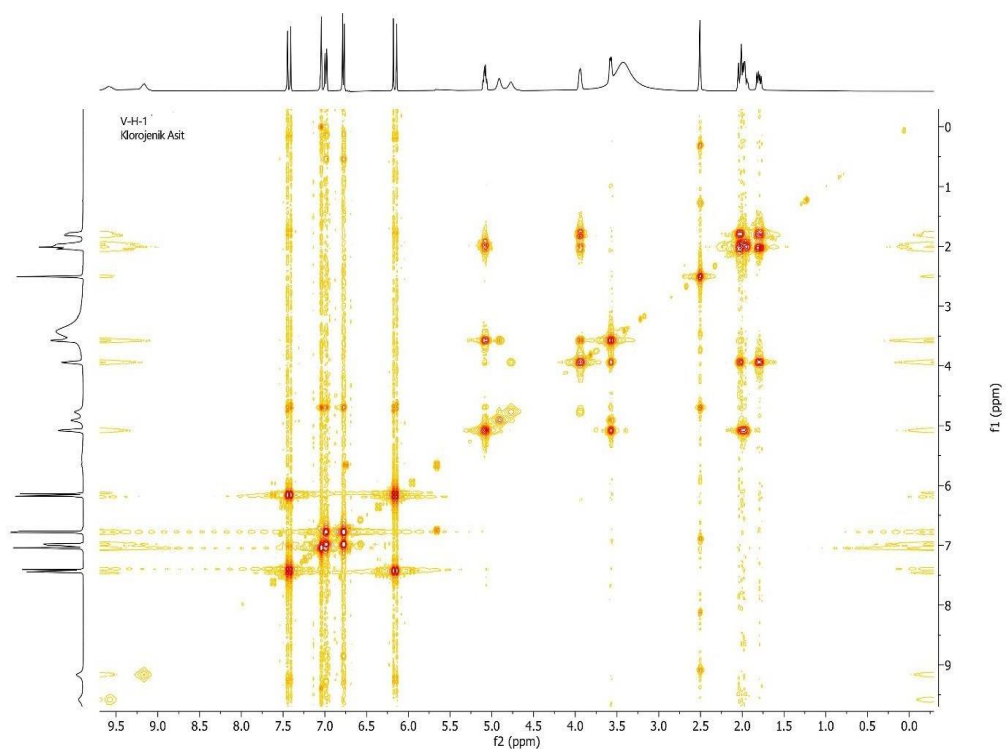
Ek 2. Klorojenik asit $^1\text{D } ^{13}\text{C}$ NMR spektrum 2
(125 MHz, DMSO- d_6)



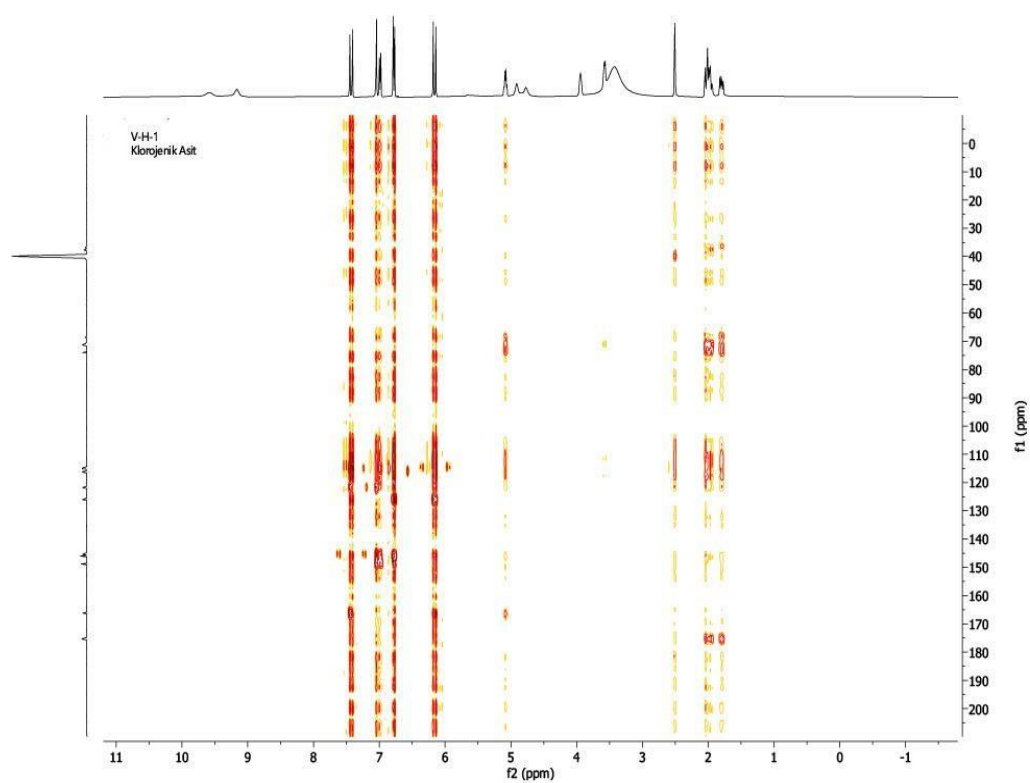
Ek 3. Klorojenik asit 1D ^{13}C DEPT-135 NMR spektrum 3
(DMSO- d_6)



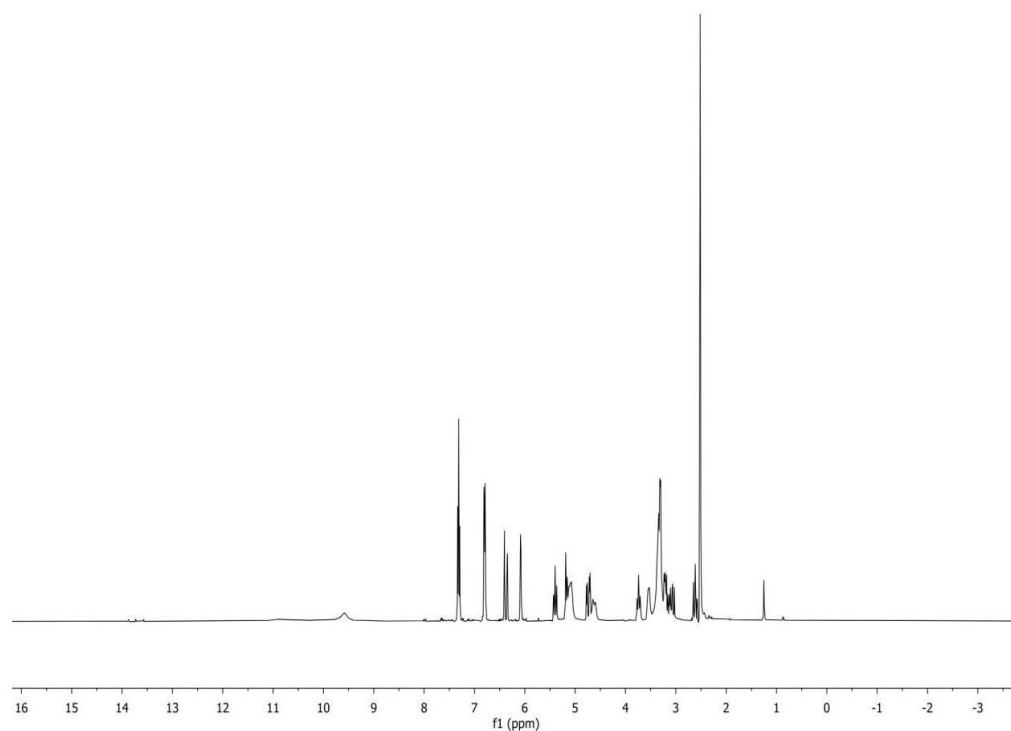
Ek 4. Klorojenik asit 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrum 4
(DMSO- d_6)



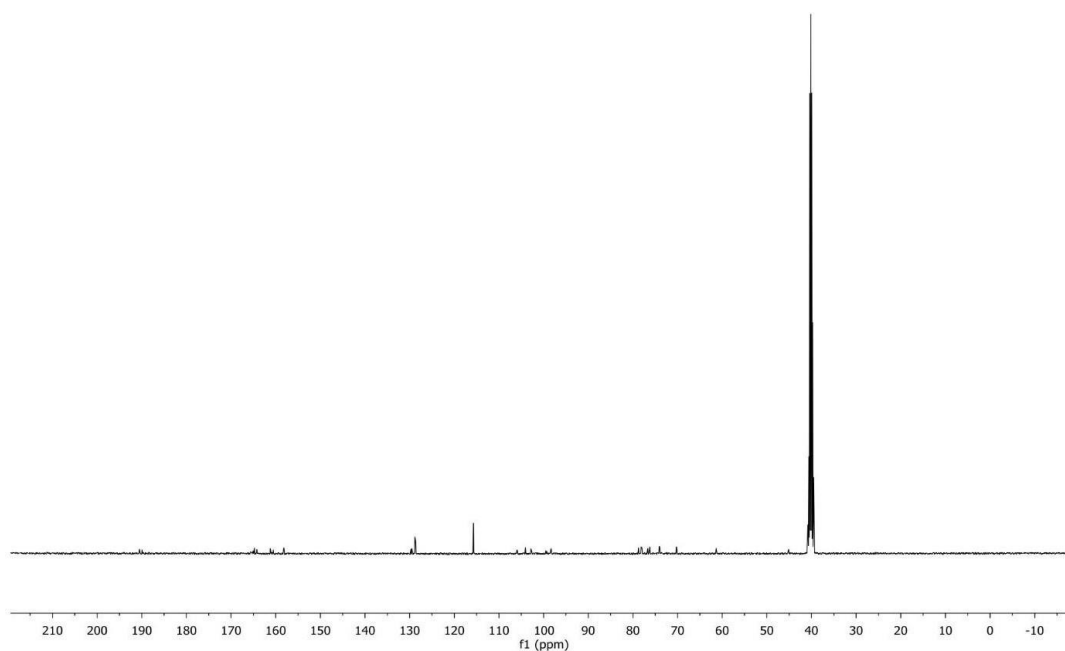
Ek 5. Klorojenik asit 2D ^1H - ^1H COSY NMR spektrum 5
(DMSO- d_6)



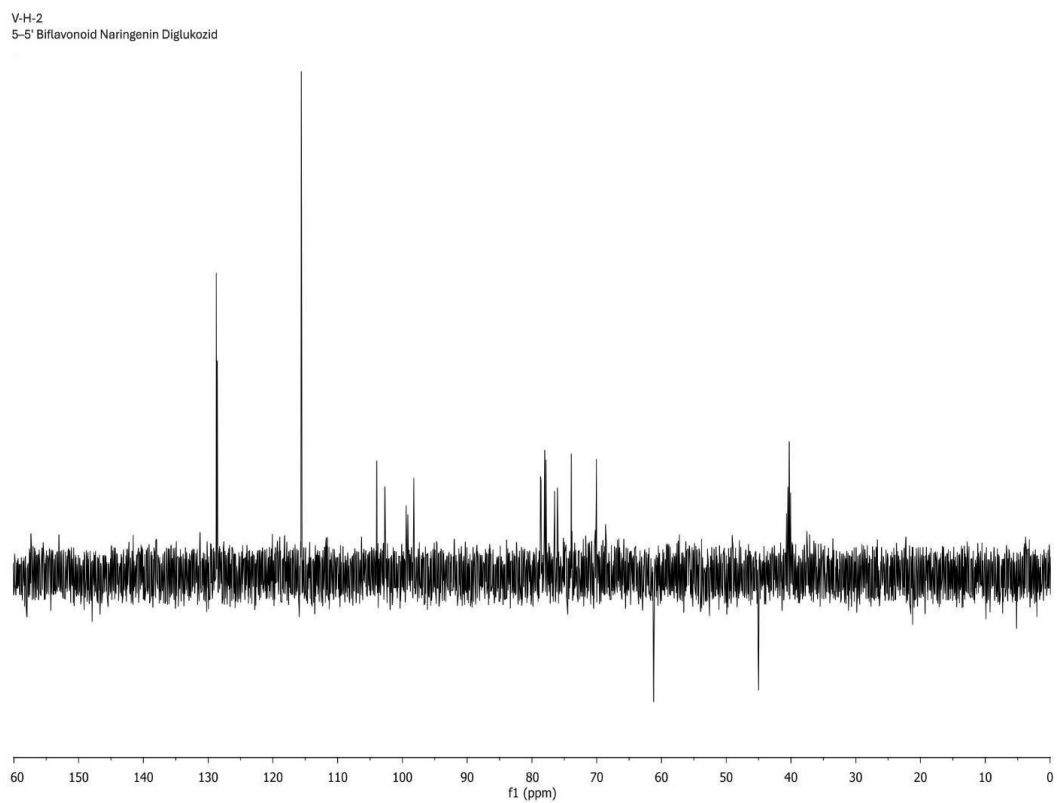
Ek 6. Klorojenik asit 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrum 6
(DMSO- d_6)



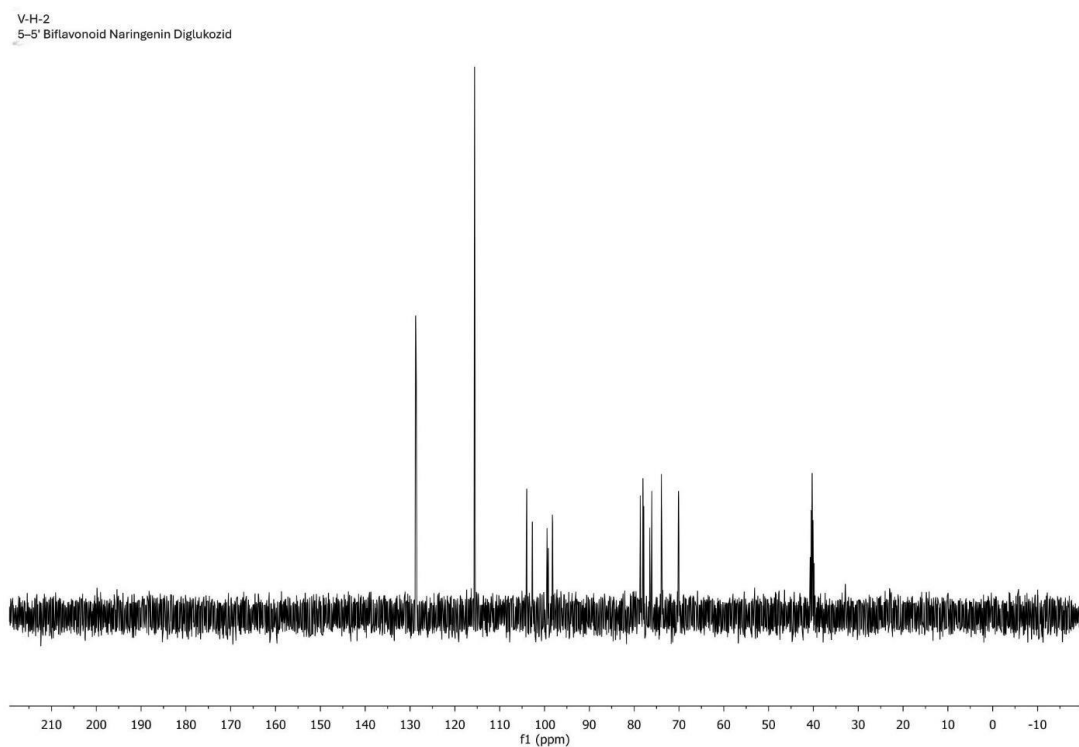
Ek 7. 5-5'' biflavonoid naringenin 7,7''-di-O-glukozid 1D ^1H NMR spektrum 1
(500 MHz, DMSO- d_6)



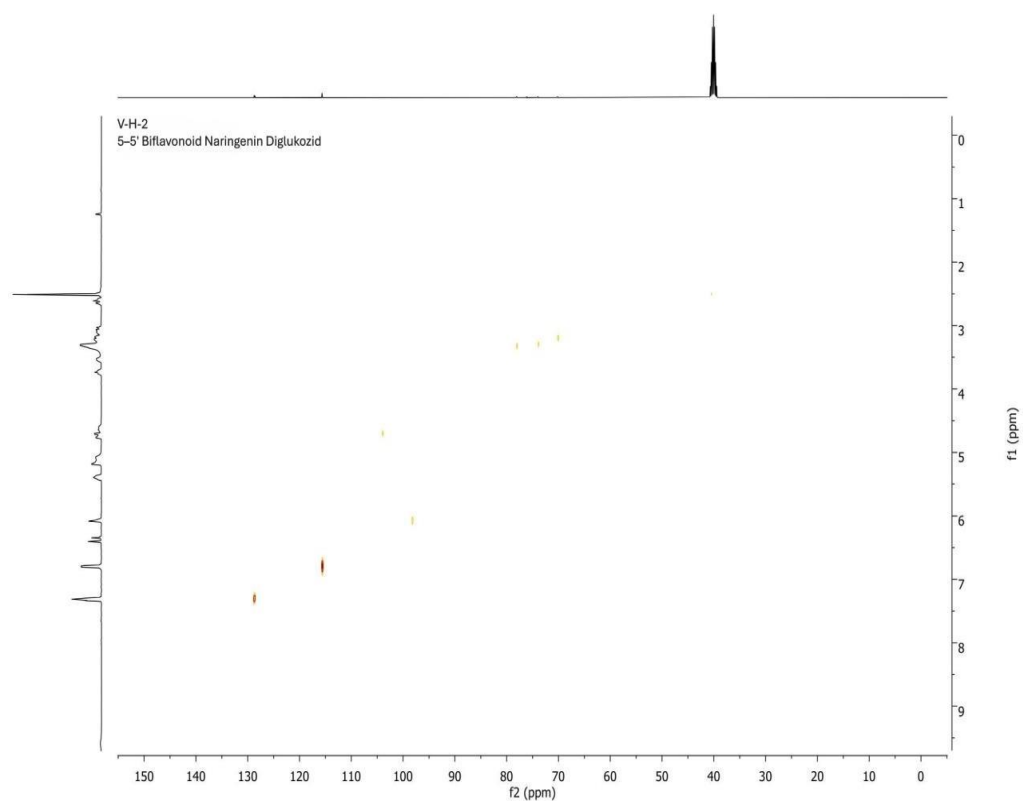
Ek 8. 5-5'' biflavonoid naringenin 7,7''-di-O-glukozid 1D ^{13}C NMR spektrum 2
(125 MHz, DMSO- d_6)



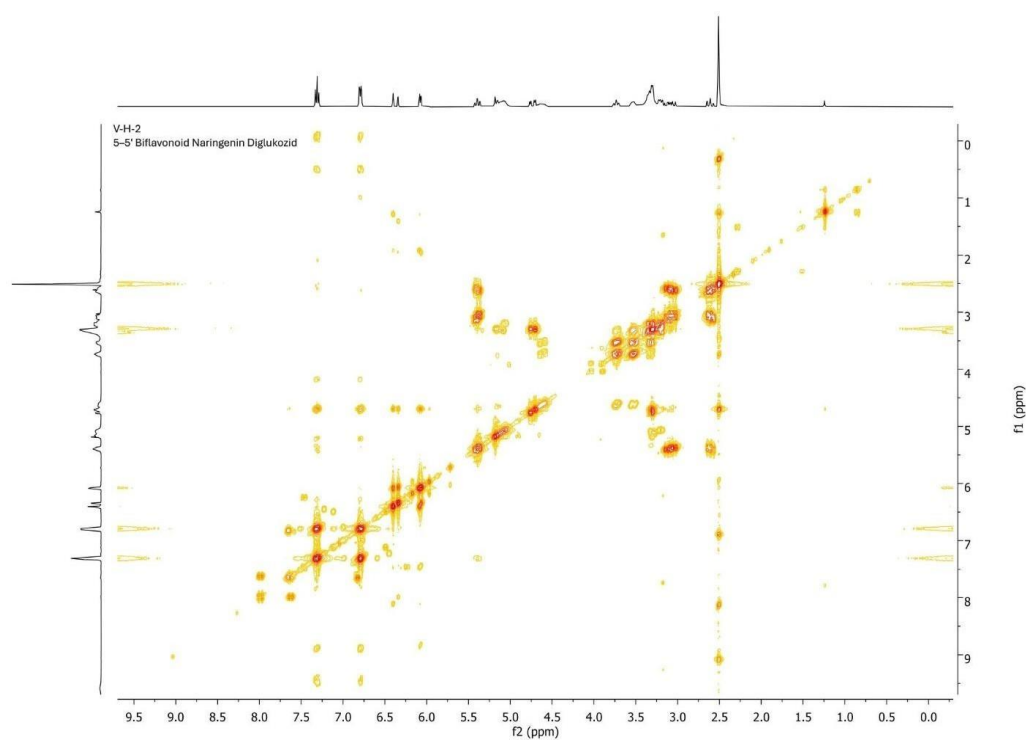
Ek 9. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid 1D ^{13}C DEPT-135 NMR spektrum 3
(DMSO- d_6)



Ek 10. 5-5" biflavonoid naringenin 7,7"-di-O-glukozid 1D ^{13}C DEPT-90 NMR spektrum 4
(DMSO- d_6)

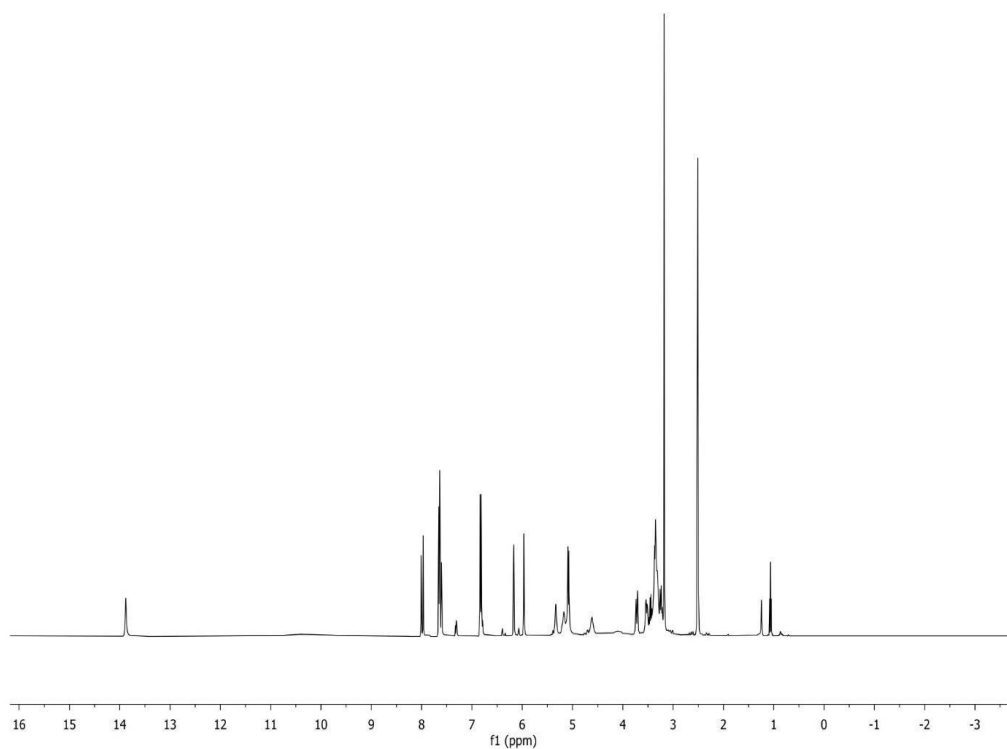


Ek 11. 5-5'' biflavonoid naringenin 7,7''-di-O-glukozid 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrum 5 (DMSO- d_6)



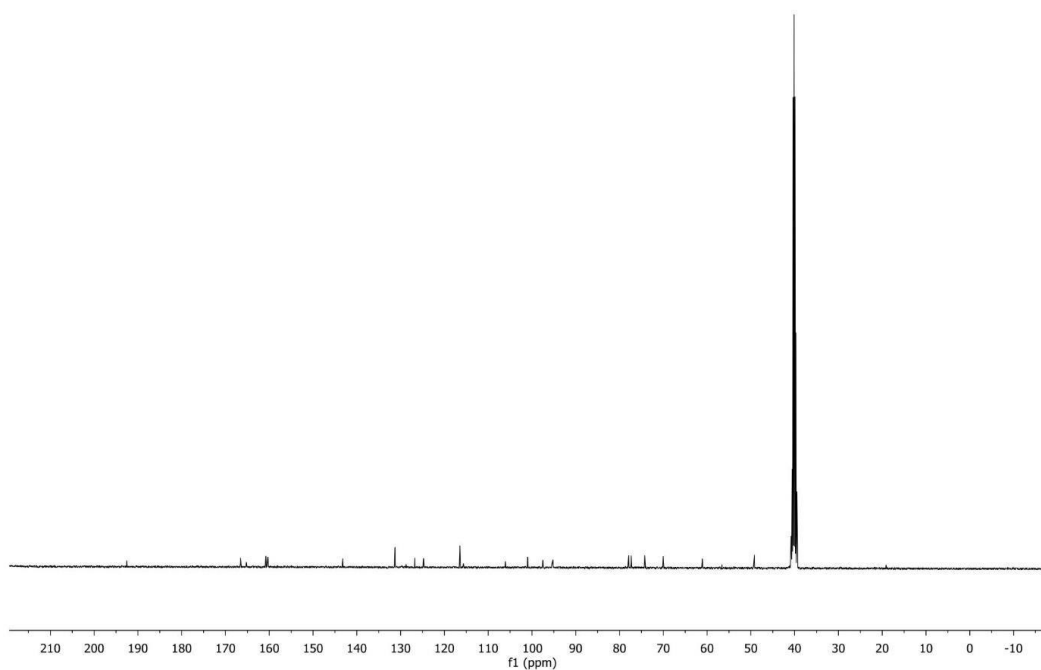
Ek 12. 5-5'' biflavonoid naringenin 7,7''-di-O-glukozid 2D ^1H - ^1H COSY NMR spektrum 6 (DMSO- d_6)

V-H-3
Naringenin Kalkon-4'-O-Glukozid

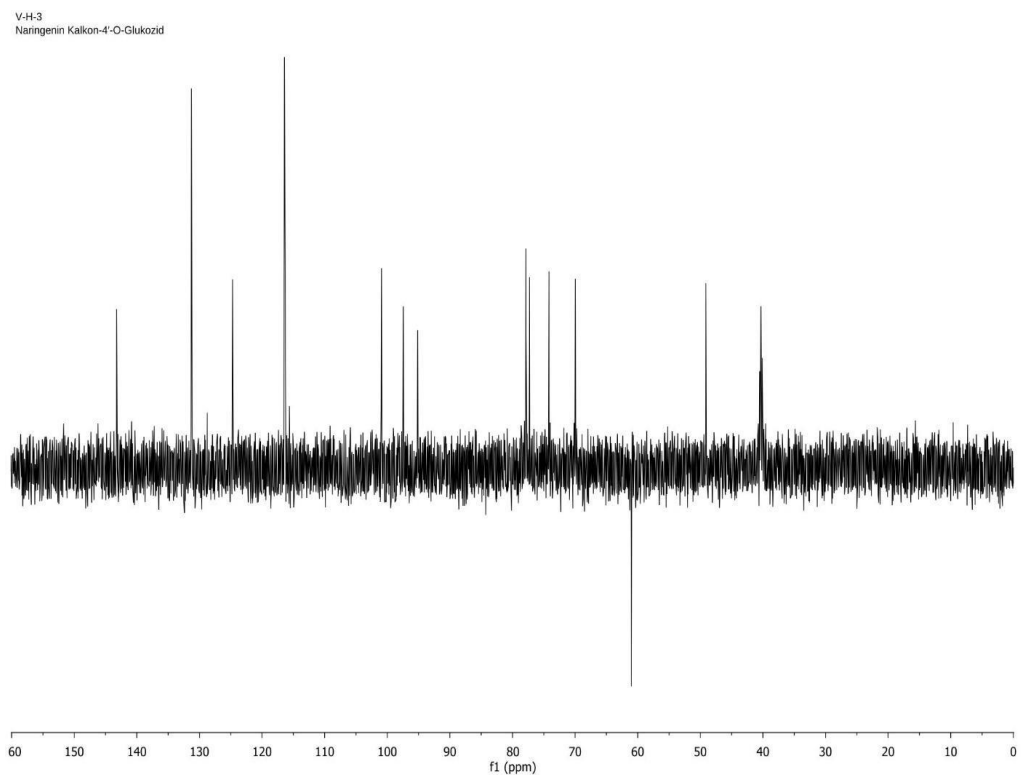


Ek 13. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid 1D ^1H NMR spektrum 1
(500 MHz, DMSO-d_6)

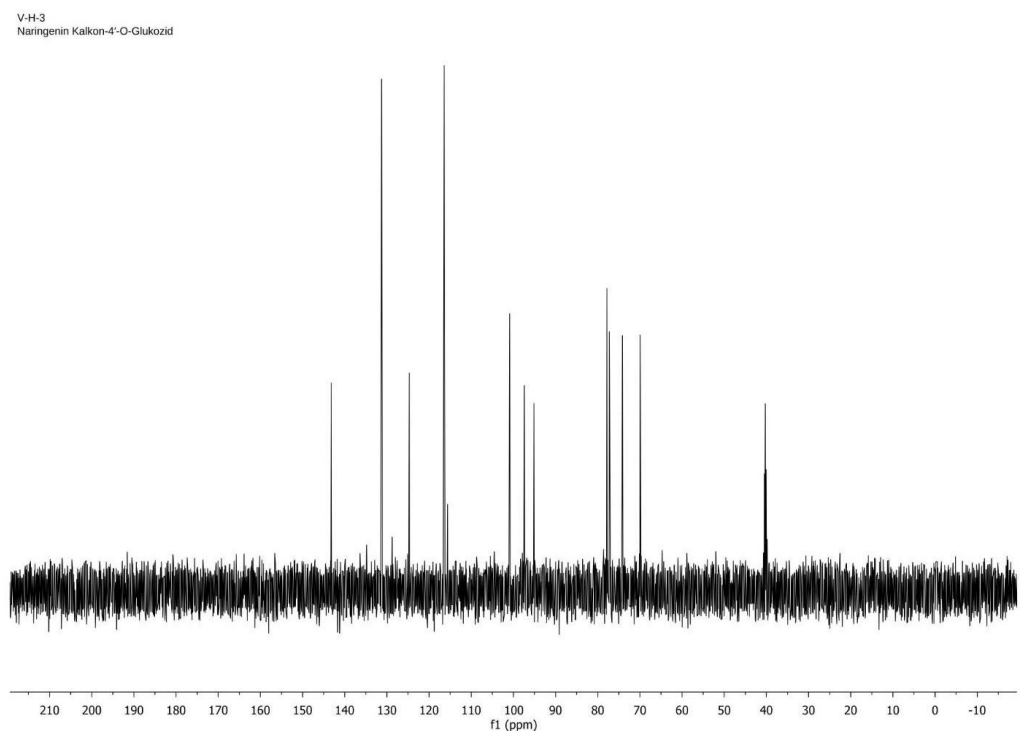
V-H-3
Naringenin Kalkon-4'-O-Glukozid



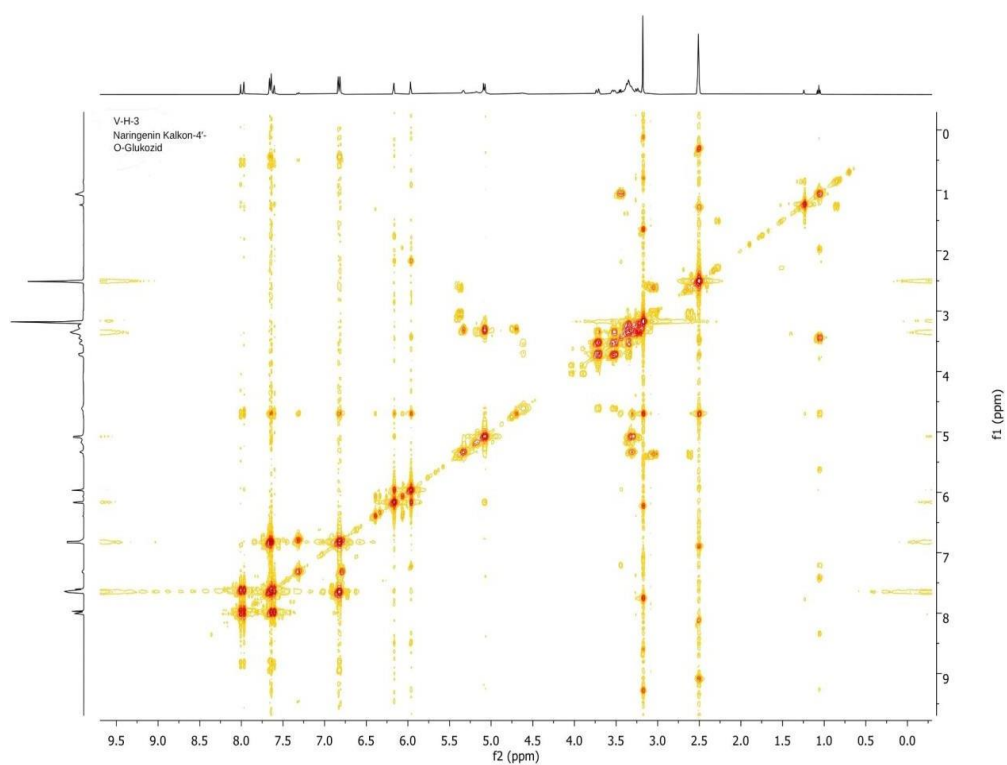
Ek 14. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid 1D ^{13}C NMR spektrum 2
(125 MHz, DMSO-d_6)



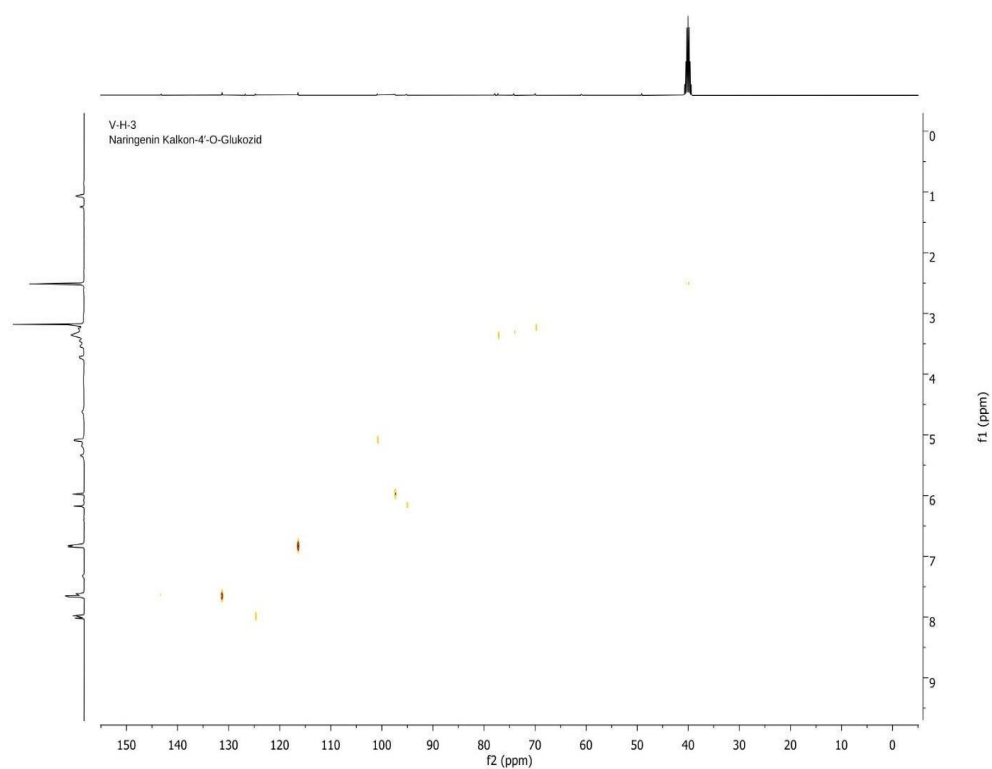
Ek 15. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid 1D ^{13}C DEPT-135 NMR spektrum 3
(DMSO- d_6)



Ek 16. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid 1D ^{13}C DEPT-90 NMR spektrum 4
(DMSO- d_6)

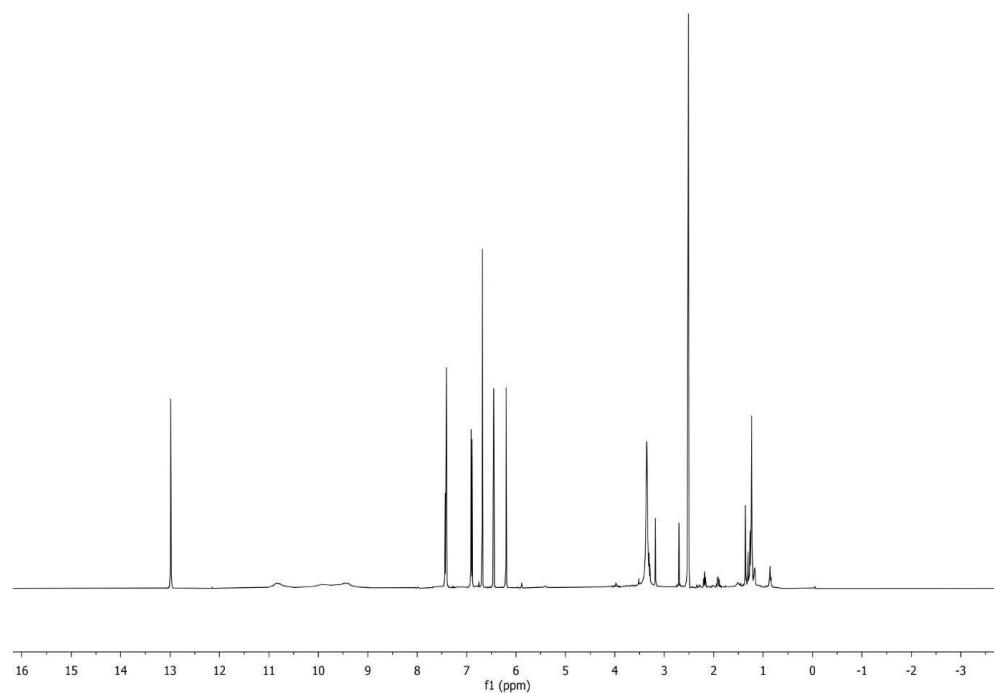


Ek 17. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid 2D ^1H - ^1H COSY NMR spektrum 5
(DMSO- d_6)



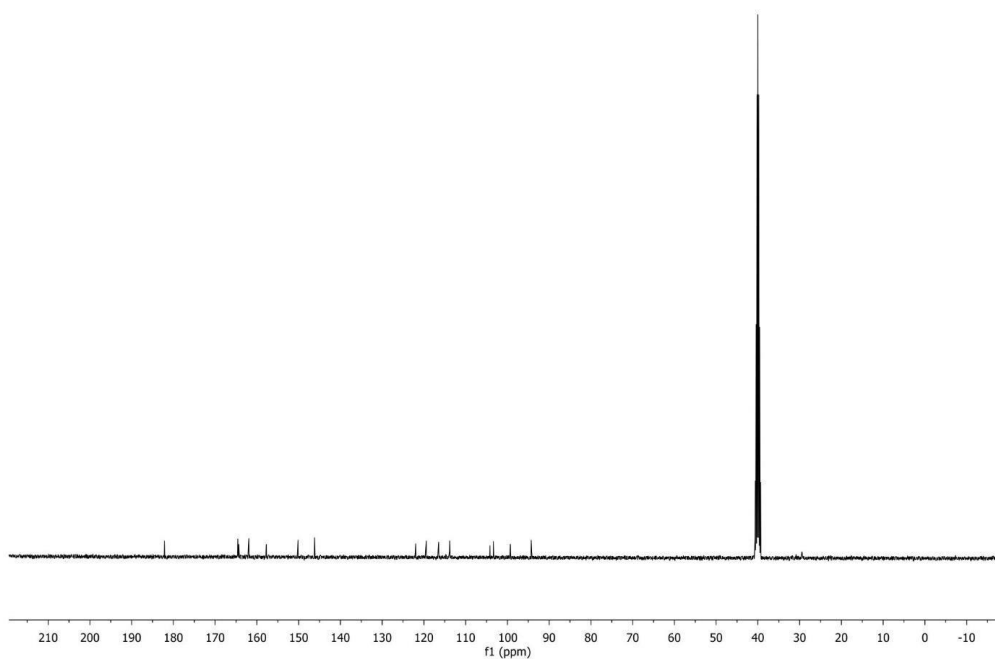
Ek 18. Naringenin kalkon-4'-O-glukozid 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrum 6
(DMSO- d_6)

V-H-4
Luteolin



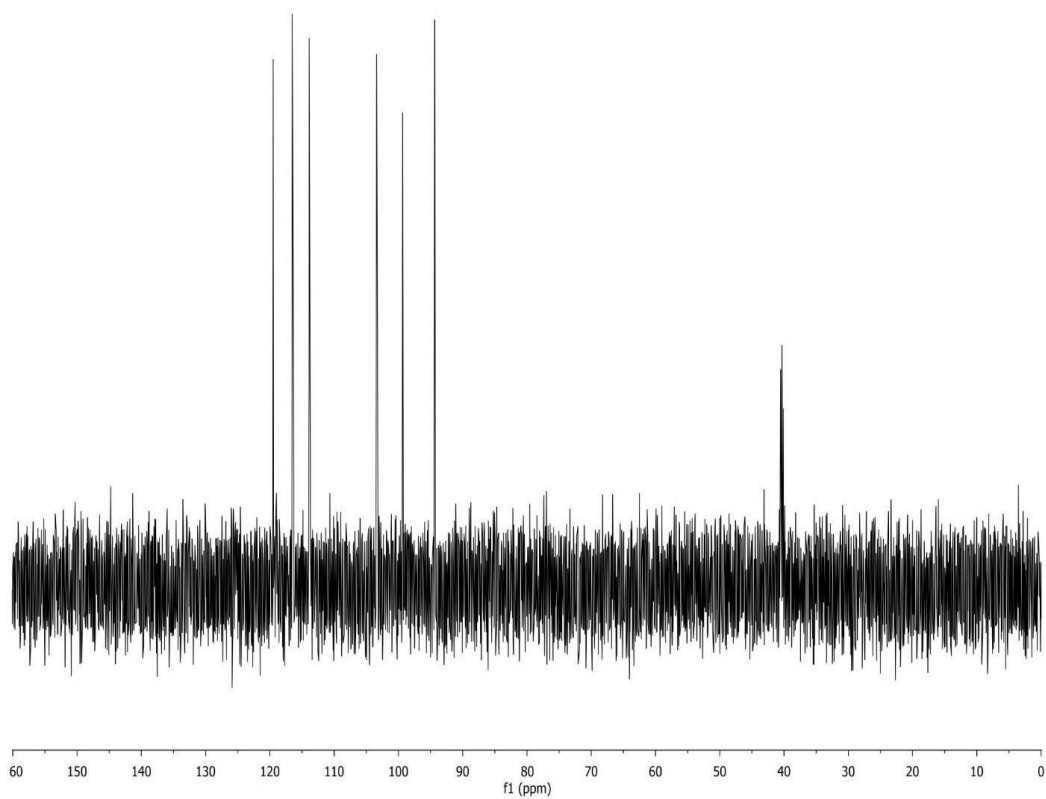
Ek 19. Luteolin 1D ¹H NMR spektrum 1
(500 MHz, DMSO-d₆)

V-H-4
Luteolin



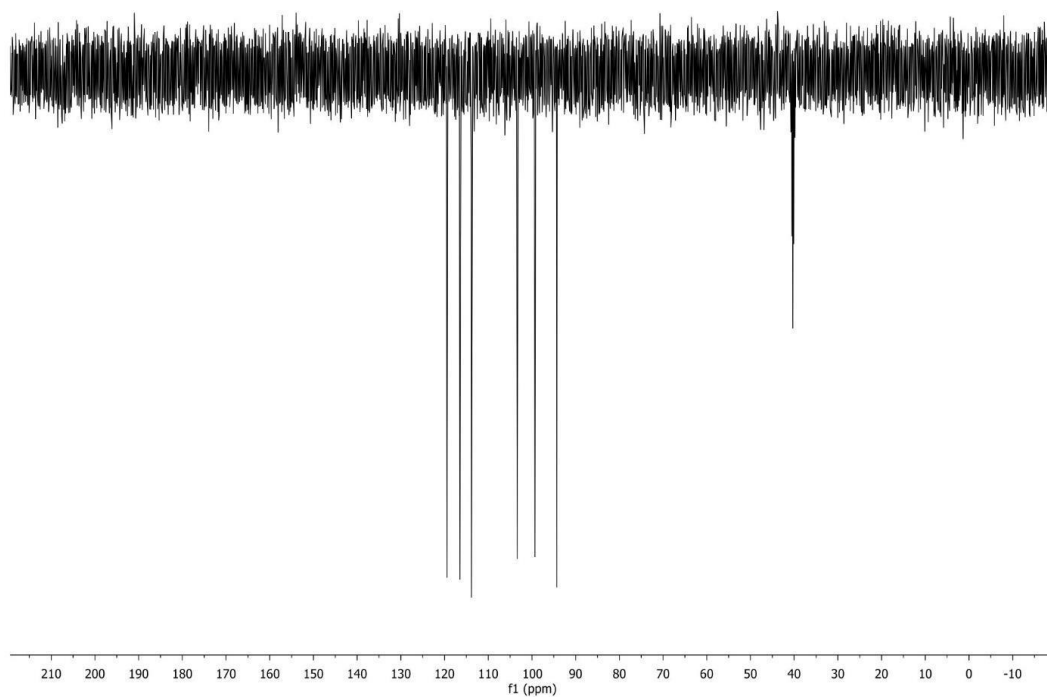
Ek 20. Luteolin 1D ¹³C NMR spektrum 2
(500 MHz, DMSO-d₆)

V-H-4
Luteolin

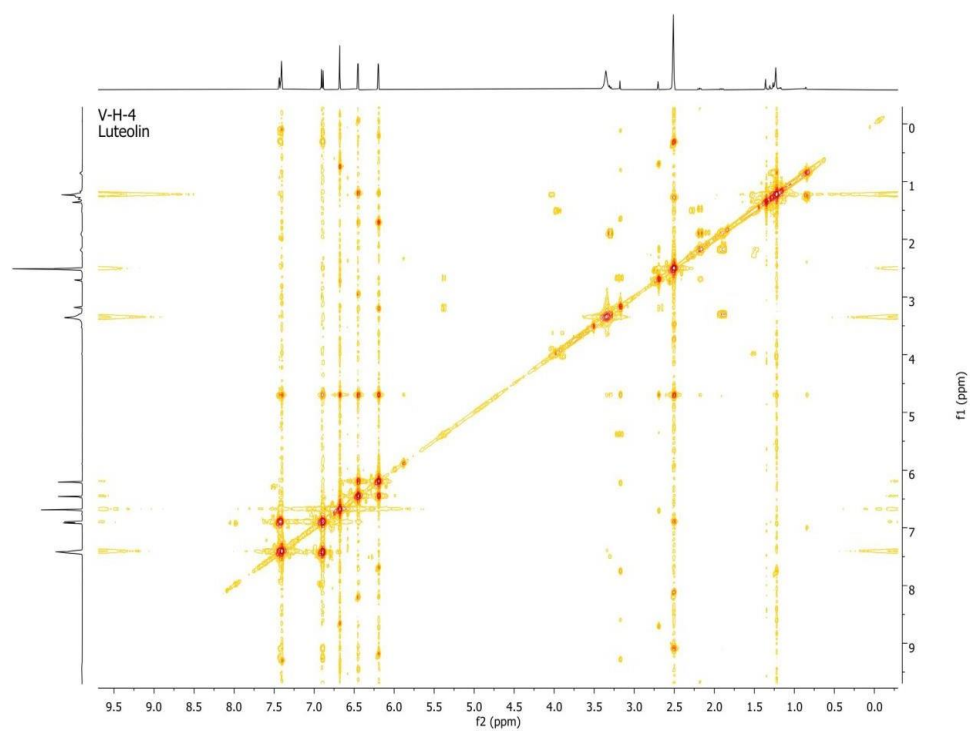


Ek 21. Luteolin 1D DEPT-90 ^{13}C NMR spektrum 3
(DMSO- d_6)

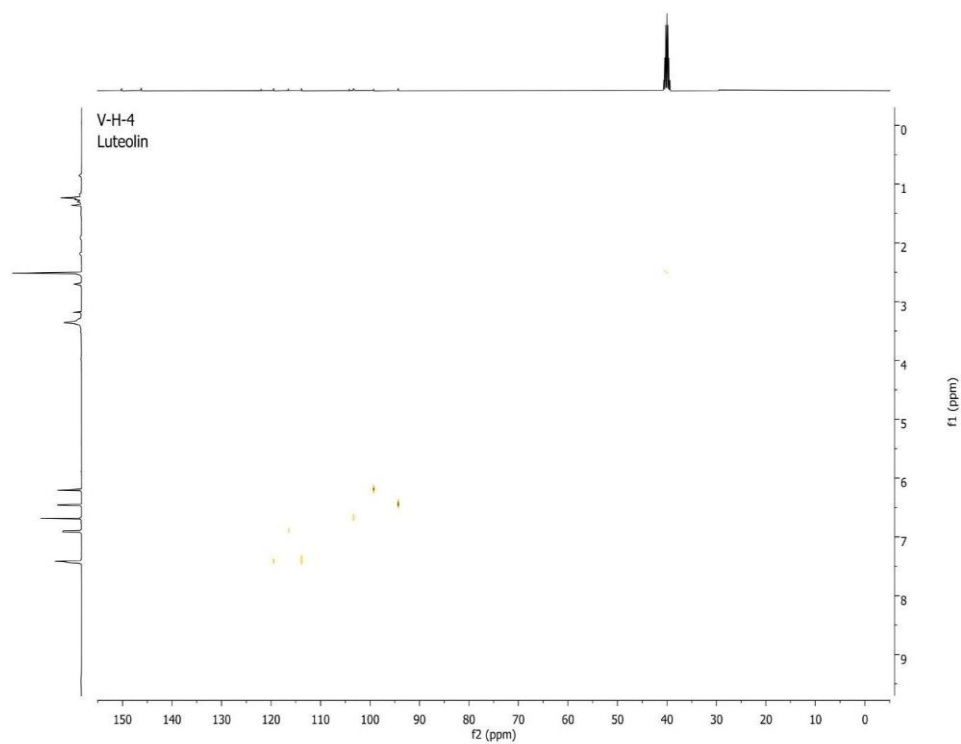
V-H-4
Luteolin



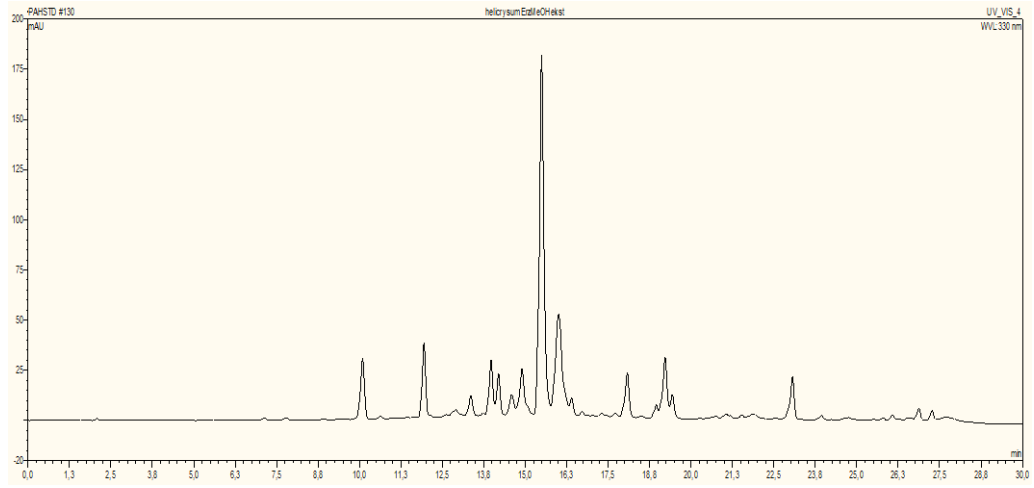
Ek 22. Luteolin 1D DEPT-135 ^{13}C NMR spektrum 4
(DMSO- d_6)



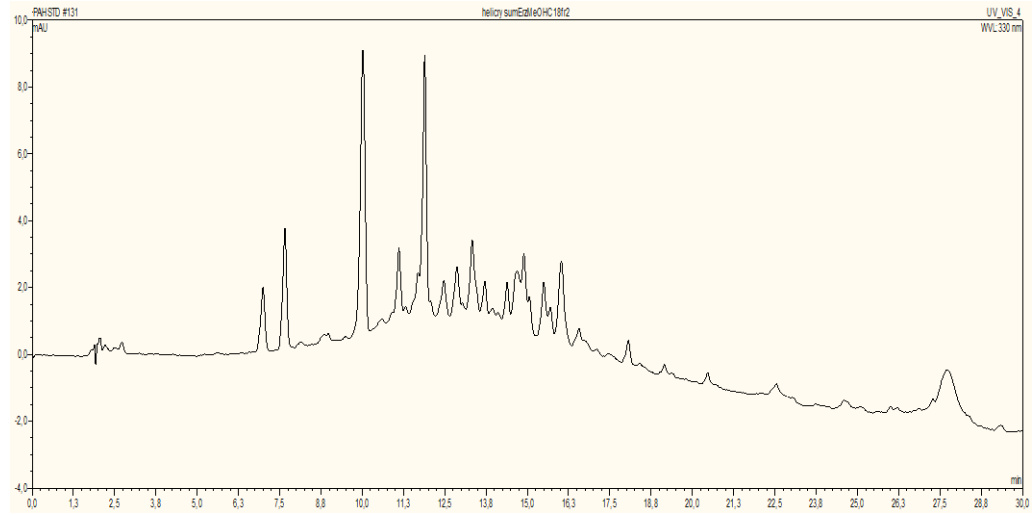
Ek 23. Luteolin 2D ^1H - ^1H COSY NMR spektrum 5
(DMSO- d_6)



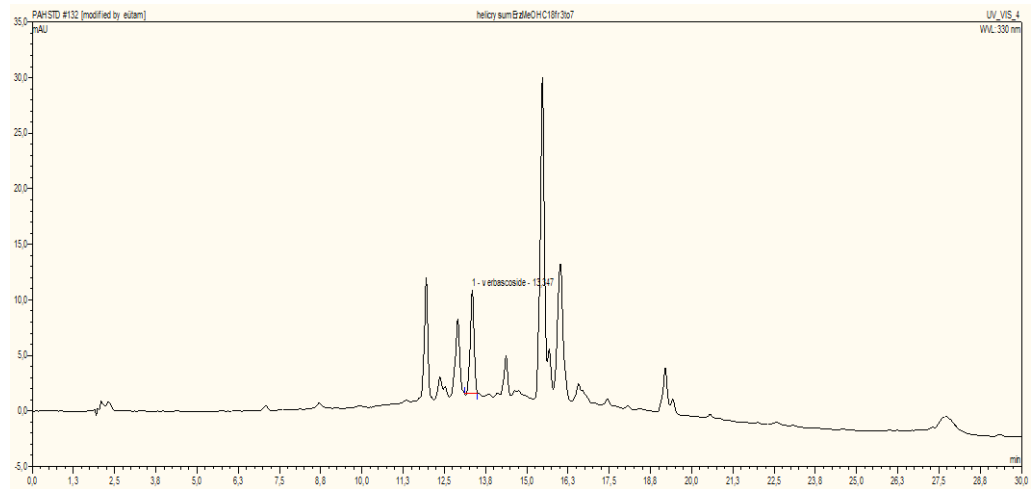
Ek 24. Luteolin 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrum 6
(DMSO- d_6)



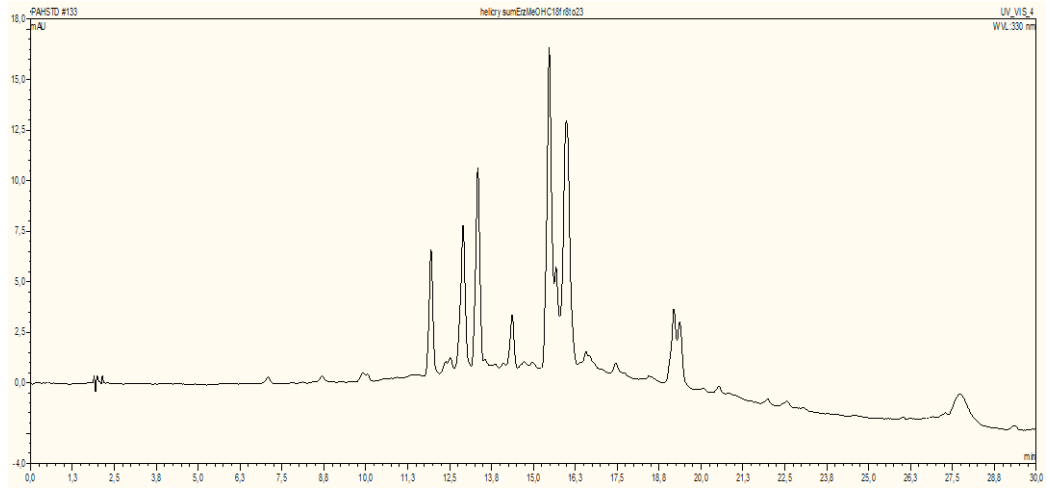
Ek 25. HAE'nin ana fraksiyon 1 HPLC profili



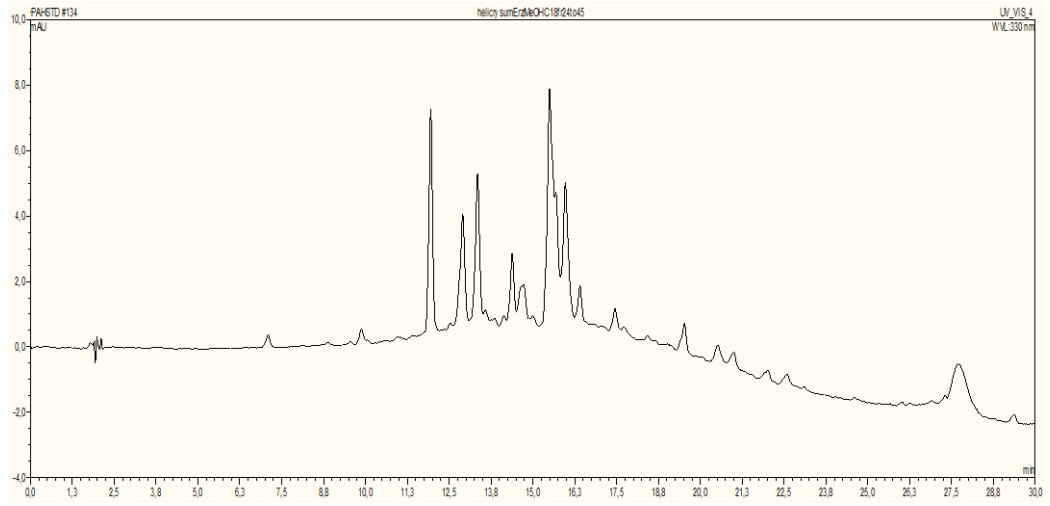
Ek 26. HAE'nin ana fraksiyon 2 HPLC profili



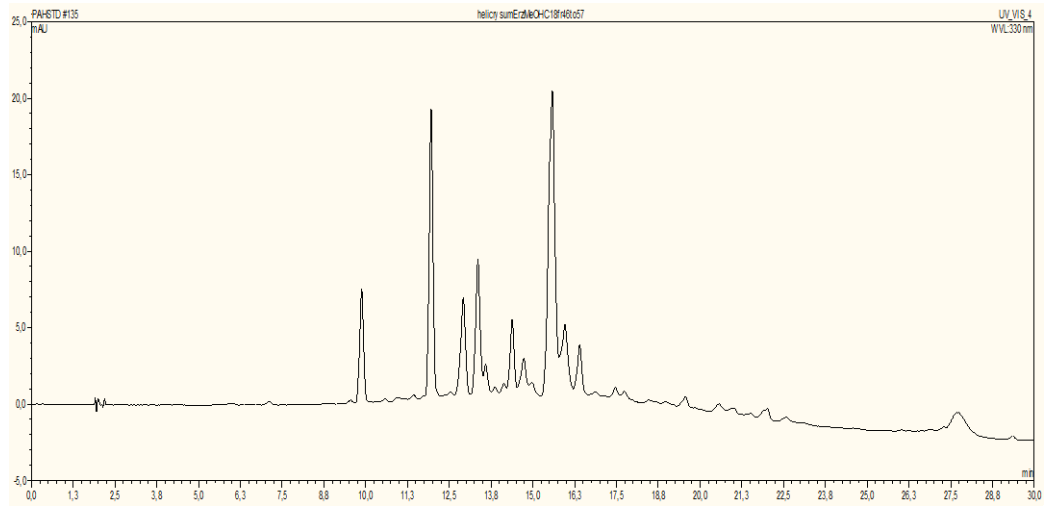
Ek 27. HAE'nin ana fraksiyon 3 HPLC profili



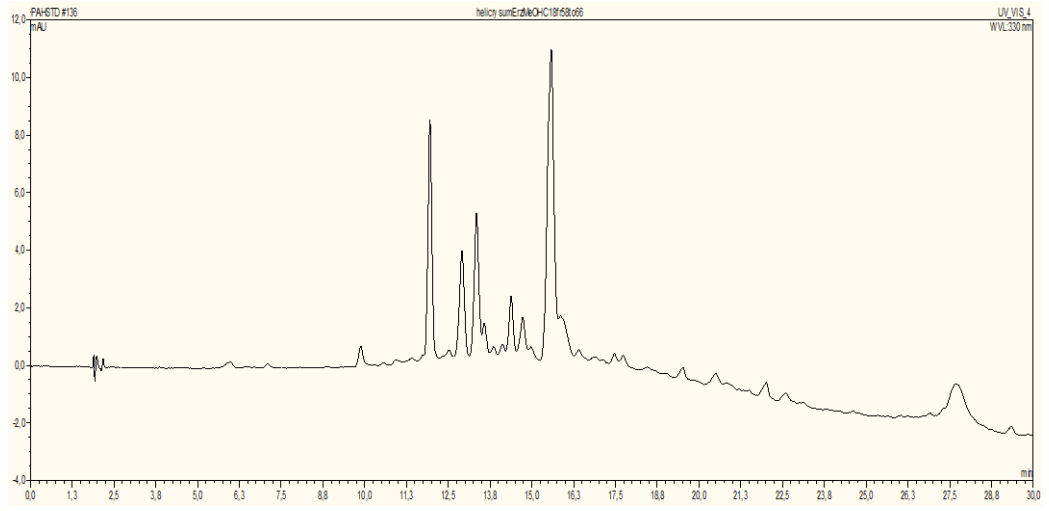
Ek 28. HAE'nin ana fraksiyon 4 HPLC profili



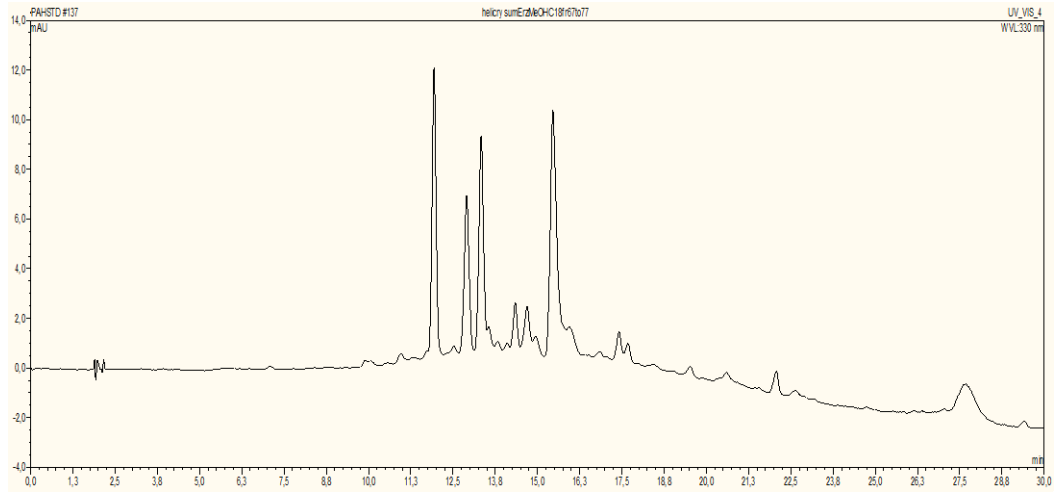
Ek 29. HAE'nin ana fraksiyon 5 HPLC profili



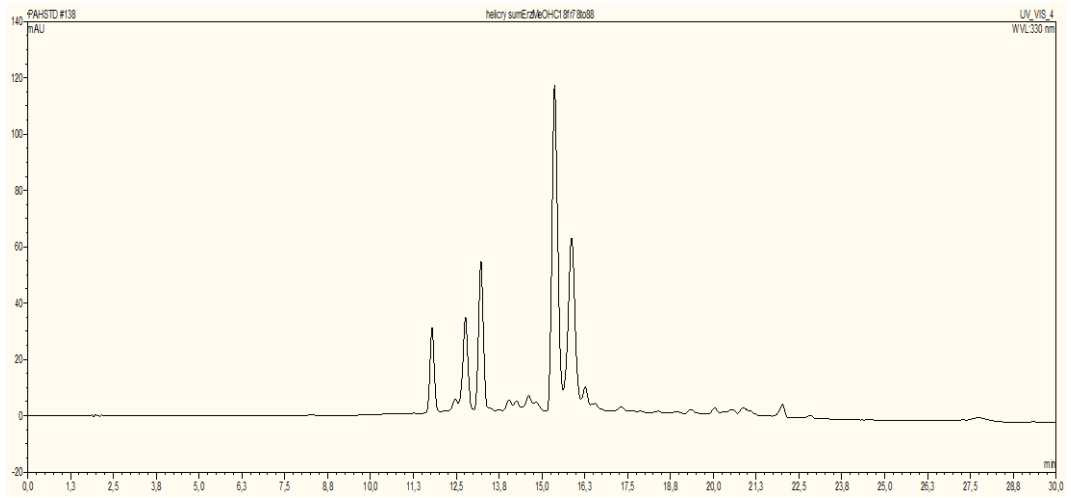
Ek 30. HAE'nin ana fraksiyon 6 HPLC profili



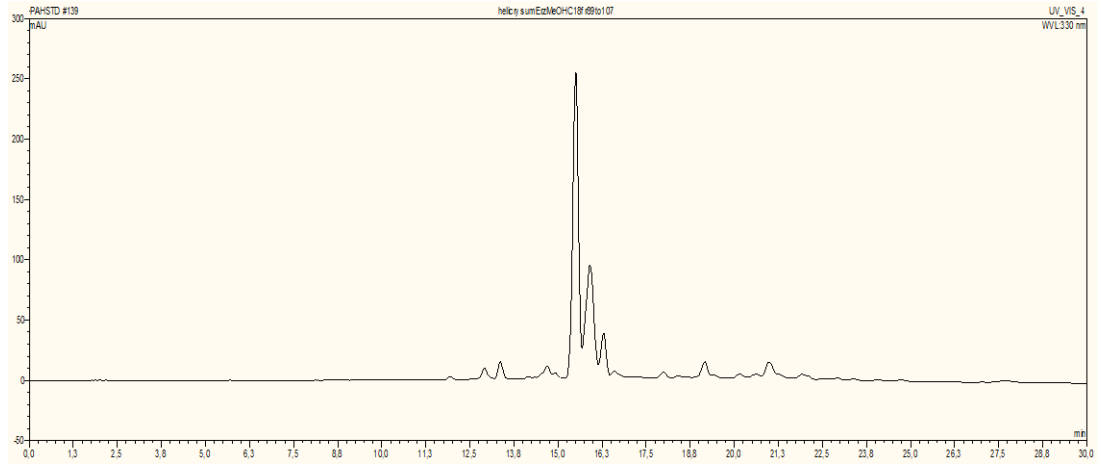
Ek 31. HAE'nin ana fraksiyon 7 HPLC profili



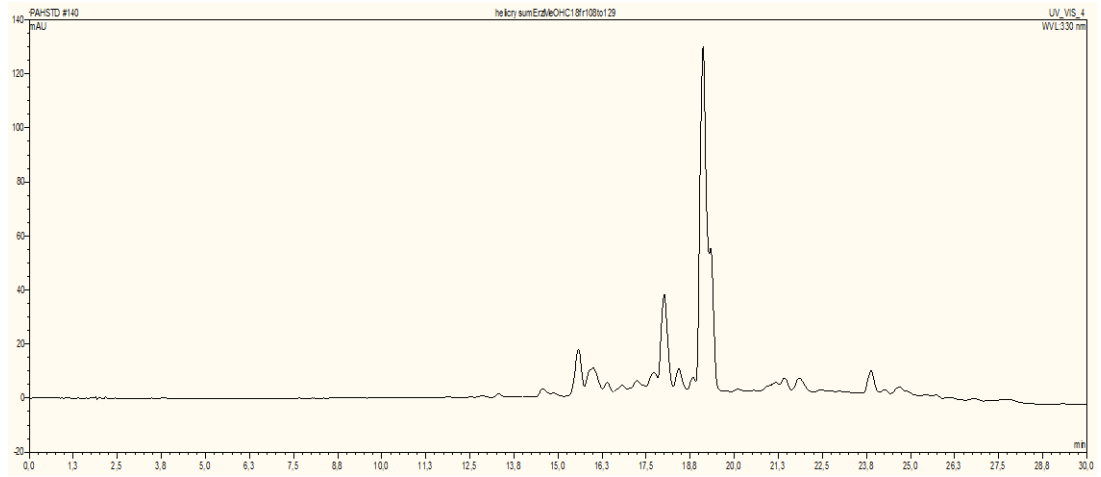
Ek 32. HAE'nin ana fraksiyon 8 HPLC profili



Ek 33. HAE'nin ana fraksiyon 9 HPLC profili



Ek 34. HAE'nin ana fraksiyon 10 HPLC profili



Ek 35. HAE'nin ana fraksiyon 11 HPLC profili

ÖZGEÇMİŞ

Volkan Ay, lisans öğrenimini 2018–2022 yılları arasında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde başarıyla tamamlamıştır. Lisans eğitimi sürecinde Erzincan Belediyesi Atık Su Arıtma Tesisi bünyesinde stajyer kimyager olarak görev alarak endüstriyel analiz ve kalite kontrol süreçlerinde deneyim kazanmıştır. Aynı yıl, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Lisansüstü öğrenimi boyunca tıbbi ve aromatik bitkilerden biyoaktif sekonder metabolitlerin izolasyonu, kromatografik saflaştırma yöntemleri, ileri spektroskopik tekniklerle yapısal aydınlatma konularında uzmanlaşmıştır. Aynı zamanda kanser, diyabet ve nörodejeneratif hastalık modellerine yönelik çok yönlü in-vitro biyolojik aktivite ve hücre kültürü düzeneği optimizasyonları gerçekleştirmiştir. Yazar, endemik bitki florası üzerinde tescillediği özgün fitokimyasal keşifleri barındıran yüksek lisans tez çalışmasını tamamlama aşamasındadır.