



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.) BİTKİSİNİN
KİMYASAL İÇERİK, ANTİOKSİDAN
AKTİVİTE VE ASETİLKOLİNESTERAZ
ENZİM İNHİBİSYONU ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

Yeliz ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Kasım-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.) BİTKİSİNİN
KİMYASAL İÇERİK, ANTIOKSİDAN
AKTİVİTE VE ASETİLKOLİNESTERAZ
ENZİM İNHİBİSYONU ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

Yeliz ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Kasım-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL ve ONAYI

Yeliz ŞAHİN tarafından hazırlanan “Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kimyasal içerik, antioksidan aktivite ve asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu özelliklerinin belirlenmesi” adlı tez çalışması 11/10/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Abdülmelik ARAS
İğdır Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü

.....

Danışman

Prof. Dr. Ercan BURSAL
Muş Alparslan Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü

.....

Üye

Dr.Öğr.Üyesi Serap KIZILKAYA
Muş Alparslan Üniversitesi,
Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Gıda İşleme Bölümü

.....

Yukarıdaki sonuç;
Enstitü Yönetim Kurulu/...../2023 Tarih ve/..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Selçuk SAĞIR

FBE Müdürü

Bu tez çalışması Muş Alparslan Üniversitesi, BAP birimi tarafından BAP-22-SBF-4902-01 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Yeliz ŞAHİN

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.) BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİK, ANTIOKSİDAN AKTİVİTE VE ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM İNHİBİSYONU ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Yeliz ŞAHİN

Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Bu çalışmadaki temel amaç haşhaş bitkisinin (*Papaver somniferum* L.) biyokimyasal özelliklerinin fenolik bileşik içeriklerinin tespiti, antioksidan aktivitelerinin tayini ve asetilkolinesteraz enzimi inhibisyonunun belirlenmesidir. Bu kapsamda haşhaş bitkisinin (*Papaver somniferum* L.) kök, gövde, yaprak ve kapsül kısımlarının ayrı ayrı ekstraksiyonları hazırlanarak *in vitro* biyoanalitik çalışmalar gerçekleştirildi.

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin antioksidan aktivitelerini belirlemek için ABTS radikal giderme aktivitesi, DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi, FRAP (ferrik iyonları indirgeme gücü) ve CUPRAC (kuprik iyonları indirgeme kapasitesi) *in vitro* biyoanalitik yöntemler olarak çalışıldı. Antioksidan çalışmalarda elde edilen sonuçlar BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit (C vitamini) ve α - tokoferol (E vitamini) gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı. Bu çalışmada haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin etanol ekstrelerinin ABTS radikal giderme aktiviteleri, DPPH radikal giderme aktiviteleri, kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kuvveti ve ferrik (Fe^{3+}) indirgeme kuvveti aktiviteleri orta düzeyde etki gösterdikleri tespit edildi.

Ayrıca, haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin ekstrelerinin asetilkolinesteraz (AChE) enzimine karşı inhibisyonu *in vitro* enzim aktivite yöntemi ile belirlendi. Çalışma sonuçlarına göre bitki ekstrelerinin AChE (asetilkolinesteraz) enzimini inhibisyonunun düşük seviyelerde olduğu tespit edildi. Diğer taraftan, bitkinin farklı kısımlarından elde edilen ekstrelerinin HPLC cihazı ile fenolik bileşik tayinleri gerçekleştirildi. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının hepsinde de kantitatif olarak tespit edilen en fazla miktarda bulunan majör organik bileşik absisik asit olduğu HPLC analizleri sonucunda belirlenmiştir. Bunun yanında en fazla bulunan ikinci bileşik kapsül kısmı hariç üç kısımda da mirisetin, kapsül kısmında ise kaemferol olarak tespit edilmiştir.

In silico enzim inhibisyonunun tespiti için AutoDock Vina bilgisayar programı kullanılarak AChE enzimi ile bitkinin majör bileşikleri olan absisik asit, mirisetin ve kaemferol bileşikleri arasındaki moleküler etkileşimler bulunmuştur. Absisik asit, mirisetin ve kaemferol için sırasıyla bağlanma enerjisi olarak -7.9 kcal/mol, -9.2 kcal/mol ve -9.3 kcal/mol belirlenirken karşılaştırmak için kullanılan AChE enziminin standart inhibitörü olarak bilinen takrin bileşiğinin bağlanma enerjisi -8.7 kcal/mol bulunmuştur.

Bu çalışma ile haşhaş bitkisinin kök, gövde, yaprak ve kapsül kısımlarının antioksidan aktiviteleri, fenolik bileşiklerinin HPLC ile tespiti ve AChE enzimini inhibe etme potansiyeli *in vitro* ve *in silico* biyoanalitik çalışmalar ile belirlenmiştir.

2023, 55 Sayfa

Anahtar kelimeler: AChE, antioksidan aktivite, asetilkolinesteraz, fenolik bileşik, haşhaş, HPLC, *Papaver somniferum*

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF CHEMICAL CONTENT, ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME INHIBITION PROPERTIES OF POPPY PLANT (*Papaver somniferum* L.)

Yeliz ŞAHİN

Muş Alparslan University
Naturaland Applied Science
Department of Chemistry

Advisor : Prof. Dr. Ercan BURSAL

The main purpose of this study is to determine the biochemical properties of the poppy plant (*Papaver somniferum* L.) within the scope of determination of phenolic compound contents, determination of antioxidant activities and acetylcholinesterase enzyme inhibition. In this context, *in vitro* bioanalytical studies were carried out by preparing separate extractions of the root, stem, leaf and capsule parts of the poppy plant (*Papaver somniferum* L.).

ABTS radical scavenging activity, DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity, FRAP (ferric ions reducing power), and CUPRAC (cupric ions reducing capacity) *in vitro* bioanalytical methods were evaluated to determine the antioxidant activities of the poppy plant (*Papaver somniferum* L.). In antioxidant studies, the results were compared with the standard antioxidants such as BHT (Butylated hydroxytoluene), ascorbic acid (vitamin C), and α -tocopherol (vitamin E). In this study, it was determined that ethanol extracts of poppy (*Papaver somniferum* L.) plant showed moderate effects on ABTS radical scavenging activities, DPPH radical scavenging activities, cupric (Cu^{2+}) ions reducing power and ferric (Fe^{3+}) reducing power activities.

Inhibition of the AChE (acetylcholinesterase) enzyme was discussed. According to the results of the study, the plant extracts showed low inhibition of the AChE (acetylcholinesterase) enzyme. Also, phenolic compound determinations of plant samples were carried out using HPLC. A large amount of phenolic compounds were detected in the ethanol extract of the poppy (*Papaver somniferum* L.) plant. Abscisic acid was found to be the most abundant major compound in the all parts of the plant. Also, myricetin was found to be the second major compounds in the three parts of the plant except the capsule part, whereas kaempherol was the second major compound for the capsule part.

AutoDock Vina computational programme was used to measure *in silico* molecular docking interaction of AChE enzyme with the major phenolic compounds of the poppy (*Papaver somniferum* L.) plant which are abscisic, myricetin, and kaempherol. The binding energy scores of the abscisic acid, myricetin, and kaempherol compounds with AChE were calculated -7.9 kcal/mol, -9.2 kcal/mol, and -9.3 kcal/mol, whereas -8.7 kcal/mol was measured for the standard tacrine.

In this study, the antioxidant activities of the root, stem, leaf and capsule parts of the poppy plant, the detection of phenolic compounds by HPLC and the potential to inhibit the AChE enzyme were determined by *in vitro* and *in silico* bioanalytical studies.

2023, 55 Pages

Keywords: AChE, antioxidant activity, acetylcholinesterase, phenolic compounds, HPLC, *Papaver somniferum*, poppy

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmalarım süresince bilgi birikimiyle desteklerini ve tecrübelerini eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ercan BURSAL hocama çok teşekkür ederim. Yüksek Lisans çalışmalarımın hem deneysel ve hem de yazım kısmında bana desteklerini sunan Dr. Öğrt. Üyesi Serap KIZILKAYA'ya çok teşekkür ederim. Çalışma bitkisinin teminini sağlayan Uşak Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla bitkileri Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ercüment Osman SARIHAN hocama teşekkür ederim.

Bu süre zarfında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Nevin TURAN ÖZEK, Doç. Dr. Kenan BULDURUN, Doç. Dr. Adem KORKMAZ, Dr. Öğrt. Üyesi Ahmet SAVCI ve Doç. Dr. Abdülmelik ARAS hocalarıma ayrı ayrı teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Yüksek Lisans sürecimde bana olan desteğini esirgemeyen değerli eőim Mehmet Ali ŞAHİN'e teşekkür etmek ve kızlarım Azra ve Asya'ya sevgilerimi sunmak isterim.

Yeliz ŞAHİN
MUŞ-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Haşhaş Bitkisi (<i>Papaver somniferum</i> L.).....	2
1.1 Haşhaş bitkisinin kimyasal özellikleri ve kullanım alanları	4
1.2 Antioksidanlar.....	5
1.2.1 Antioksidanların sınıflandırılması	6
1.2.1.1 Enzimatik antioksidanlar	6
1.2.1.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	8
1.2.1.2.1 Doğal antioksidanlar	8
1.2.1.2.2 Sentetik antioksidanlar.....	9
1.3 Enzimler.....	10
1.4 Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi	11
1.4.1 Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması	11
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Kullanılan bitkisel materyal	17
3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler	17
3.1.3 Yararlanılan alet ve cihazlar	18
3.1.4 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	19
3.1.4.1 DPPH metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	19
3.1.4.2 CUPRAC metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	19
3.1.4.3 ABTS metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	19
3.1.4.4 FRAP metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	20
3.1.4.5 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	21
3.2 Yöntem.....	21
3.2.1 Bitki ekstraktlarının hazırlanması	21
3.2.2 Bitki numunelerinin antioksidan aktivite tayinleri	23
3.2.2.1 DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tayini	23
3.2.2.2 CUPRAC metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini	24
3.2.2.3 FRAP yöntemine göre indirgeme kapasite tayini	24
3.2.2.4 ABTS katyon radikali giderme aktivitesi tayini.....	25
3.2.2.5 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi	25

3.2.2.6 HPLC ile fenolik bileşiklerin içerik analiz yöntemi.....	26
3.2.2.7 Moleküler doking ve <i>in silico</i> analizler.....	27
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA	28
4.1 Bitki Numunelerinin Antioksidan Aktivite Tayinleri.....	28
4.1.1 ABTS yöntemi sonuçları	29
4.1.2 DPPH yöntemi sonuçları	30
4.1.3 FRAP yöntemi sonuçları.....	32
4.1.4 CUPRAC yöntemi sonuçları.....	33
4.1.5 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi sonuçları	34
4.1.6 HPLC ile Fenolik Bileşik Tayinleri	35
4.1.7 Moleküler doking ve <i>in silico</i> çalışmalar.....	43
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

Dk	: Dakika
μg	: Mikrogram
mg	: Miligram
μl	: Mikrolitre
M	: Molar
•	: Radikal
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
%	: Yüzde değer

Kısaltmalar

ABTS	: 2,2-Azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit
BHA	: Butillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Butillenmiş Hidroksi Toluen
CAT	: Katalaz
Cu^{2+}	: Kuprik iyonu
CuCl_2	: Bakır(II) Klorür
CUPRAC	: Kuprik iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DPPH	: 1,1-Difenil-2-Pikril-Hidrazil
Fe^{3+}	: Ferrik iyonu
FeCl_2	: Demir(II) Klorür
FeCl_3	: Demir(III)Klorür
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: Potasyum Persülfat
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: Potasyum Ferrosiyanyür
Na_2HPO_4	: Disodyum Fosfat
Neokuprin	: 2,9-dimetil-1,10-fenatrolin
SOD	: Süper oksit dismutaz
TCA	: Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ülkemizde haşhaş ekiminin izin verildiği şehirler	4
Şekil 1.2. Bazı enzimatik olmayan antioksidanlar	10
Şekil 1.3. Asetilkolinesterazın asetat ve kolin oluşturan hidroliz reaksiyonu	11
Şekil 1.4. Asetilkolinesteraz enziminin (monomer) kristalografik yapısı	12
Şekil 3.1. Haşhaş bitkisi ve kısımları	17
Şekil 3. 2. Bitki numuneleri için etanol ekstresi hazırlama aşamaları.....	22
Şekil 4.1. Elde edilen bitki ekstraktları.....	28
Şekil 4.2. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının etanol ekstraktlarının farklı derişimlerinin (10-50 µg/mL) ABTS+ giderme aktivitelerinin gösterimi	30
Şekil 4.3. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının etanol ekstraktlarının farklı derişimlerinin (10-50 µg/mL) DPPH• giderme aktivitelerinin gösterimi	31
Şekil 4.4. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımları etanol ekstraktlarının farklı derişimlerinin (10-50 µg/mL) ferrik iyonlarını indirgeme kuvveti tayini.....	32
Şekil 4.5. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımları etanol ekstraktlarının farklı derişimlerinin (10-50 µg/mL) kuprik iyonlarını indirgeme kuvveti tayini	33
Şekil 4.6. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının AChE inhibisyonu	34
Şekil 4.7. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmı etanol ekstresinin HPLC kromatogramları... 36	
Şekil 4.8. Haşhaş bitkisinin yaprak kısmının etanol ekstresinin HPLC kromatogramı . 38	
Şekil 4.9. Haşhaş bitkisinin sap kısmının etanol ekstresi HPLC kromatogramları	40
Şekil 4.10. Haşhaş bitkisinin kök kısmının etanol ekstresi HPLC kromatogramı	42
Şekil 4.11. AChE ile absisik asit arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri.....	44
Şekil 4.12. AChE ile mirisetin arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri	45
Şekil 4.13. AChE ile kaemferol arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Haşhaş bitkisinin (<i>Papaver somniferum</i> L.) taksonomisi	2
Çizelge 1.2. Antioksidan maddeler.....	6
Çizelge 1.3. Antioksidanların sınıflandırılması	6
Çizelge 3.1. Bitki ekstralarının hazırlanması için kullanılan bitki ağırlıkları ve etanol miktarları.....	21
Çizelge 3.2. Bitki ekstralarının evaporatörden geçtikten sonraki net ağırlıkları	22
Çizelge 3.3. HPLC analizleri için kullanılan deneysel koşullar	27
Çizelge 4.1. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri	35
Çizelge 4.2. Haşhaş bitkisinin yaprak kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri	37
Çizelge 4.3. Haşhaş bitkisinin sap kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri	39
Çizelge 4.4. Haşhaş bitkisinin kök kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri	41
Çizelge 4.5. Haşhaş bitkisinin majör fenolik bileşikleri ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimler	43

1. GİRİŞ

Bitkiler insanlığın varoluşundan beri giyecek, gıda, barınma, yakıt, tıbbi ve kimyevi ilaçlar, aroma ve tatlandırıcı gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Fossil kayıtları üzerinde yapılan araştırmalarda bitkilerin tıbbi yönden kullanılmasında, Eski Taş devrine yani on bin yıl öncesine dayandığı tespit edilmiştir. İran ve Irak'ın kuzey sınırında bulunan mağarada insan fosili üzerinde iyileştirici etkisi olduğu değerlendirilen sekiz değişik bitki türlerinin kalıntıları bulunmuştur (Fabricant ve Farnsworth, 2001).

Tedavi amacıyla kullanılmakta olan bitki türleri, sürekli gelişmekte olan teknoloji ve buna bağlı olarak gelişen endüstriyel sanayiye paralel olarak geçmişten bu güne sürekli artmaktadır. Tarihin en eski çağlarından beri insanların bitkilerle ilgilenmeleri, daha çok faydalanmak amacı ile olmuştur. Bu durum ilk devirlerde insanların içgüdüleri ile hareket etmesinden ileri gelmiştir. İnsanlar, bitkileri kendilerine göre faydalı olup olmadıklarına göre, zararlı veya zararsız olup olmadıklarına göre ve zehirli veya zehirsiz olup olmadıklarına göre tecrübe edinip sınıflamaya çalışmışlardır. Bitkilerin tıbbi alandaki etkileri üzerine yazılmış ilk kaynaklar Çin, Hindistan, Mısır, Yunanistan ve Roma'da bulunmaktadır.

Mezopotamya uygarlıklarında antik çağlarda kullanılan bitkisel ilaç sayısı iki yüz elli iken, antik Yunan döneminde bu sayı altı yüz, Fars-Arap dönemlerinde ise yaklaşık olarak dört bin civarında olduğu tespit edilmiş olup bitkisel ilaç sayısının 19. yüzyıl başlarında ise tahmini on üç bine yükseldiği tespit edilmiştir (Baytop, 1999). 20. yüzyılın sonlarında iki yüz elli bin bitki türünün olduğu ancak bu bitkilerden, halk doktorları tarafından seksen bin tane bitki türü kullanıldığı değerlendirilmektedir. Bu verilerin çok düşük düzeyde kalmasının başlıca sebepleri şunlardır; etnobotanik bilgilerin zamanında kayıt altına alınmaması, kimyevi ilaçlar, biyolojideki gelişmelere paralel olarak tıbbi alandaki bitkilerde arzın azalması ve olumsuz çevresel faktörler sebebiyle neslin azalması hatta yok olmasıdır (Joy ve ark., 2001).

Günümüzde bitkilerin, besleyici ve ekonomik özelliklerinin yanında alternatif tıptaki kullanım alanlarına daha çok önem verilmektedir. Bünyesinde farklı kimyasal bileşenler içeren ve sağlık açısından önemli olan gıdalara bitkisel gıda denir. Bitkiler, aynı zamanda insan sağlığı açısından önemli antioksidan maddeler de barındırmaktadır (Yeloğlu, 2012).

Bu çalışmada daha önce biyokimyasal özellikleri yeterli düzeyde çalışılmamış

olan ve antioksidan kaynağı olduğu düşünülen haşhaş bitkisinin (*Papaver somniferum* L.) kapsül, yaprak, sap, kök kısımlarının ayrı ayrı karşılaştırmalı olarak farklı metotlarla antioksidan seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin antioksidan aktivitelerini belirlemek için ABTS, DPPH, FRAP ve CUPRAC *in vitro* biyoanalitik metotları kullanıldı. Antioksidan sonuçları ele alınırken standart antioksidanlar BHT, askorbik asit ve α -tokoferol ile karşılaştırıldı. Ayrıca bu bitki kısımlarının sinir sisteminde önemli fonksiyonları olan asetilkolinesteraz enzimine karşı inhibisyon etkilerini incelemek için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda enzim inhibisyonunu belirlemek için *in vitro* deneyler ve *in silico* moleküler doking çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1.1 Haşhaş Bitkisi (*Papaver somniferum* L.)

Haşhaş bitkisi gelincikgiller cinsinden olup tür ismi *Papaver somniferum* L. olarak sistematik isimlendirilmesi yapılmıştır. *Papaver* latince anlamı gelincik, *somniferum* ise rüya görmek ve uyku verici anlamlarına gelmektedir.

Genel olarak bitkinin yetiştirilmesi Kuzey Yarımküre’de Hindistan’dan Rusya’ya ve Güney Yarımküre’de ise Avustralya’dan Tazmanyaya’ya kadar geniş coğrafi alanları kapsamaktadır (Krikorian ve Ledbetter, 1975). Türkiye, İran, Azerbaycan, Ermenistan, Afganistan ve Pakistan ülkelerinde de doğal olarak yetişmektedir (Davis ve ark., 1988; Muhammad ve ark., 2021).

Çizelge 1.1. Haşhaş bitkisinin (*Papaver somniferum* L.) taksonomisi

Alem (regnum)	Plantae
Alt Alem (subregnum)	Tracheobionta
Bölüm (phylum)	Magnoliophyta
Sınıf (classis)	Magnoliopsida
Alt Sınıf	Magnoliidae
Takim (ordo)	Papaverales
Aile (familya)	Papaveraceae
Cins (genus)	<i>Papaver</i>
Tür (species)	<i>Papaver somniferum</i>

Papaveraceae familyası 28 cins ve 250 türden oluşmaktadır. Bu aileye ait bitkiler Kuzey Yarımküre’de ılıman ve subtropikal bölgelerde dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise bu aileden beş cins vardır (Seçmen ve ark., 1995; Muhammad ve ark., 2021).

Papaver somniferum (2n=22) Papaveraceae familyası üyesi olup tek yıllık otsu

bir yapıya sahip bitki türüdür (Vašek ve ark., 2019). Tek yıllık bitki türlerinin kök kısmı zayıf bir yapıya sahip iken, çift yıllık bitki türlerinin kök sistemi daha gelişmiş ve güçlü yapılara sahiptir. *Papaver* cinslerinin çiçekleri tek veya salkım şeklindedir. Bu çiçekler gösterişli ve beyaz, mor, pembe veya kırmızı renklerde olabilmektedirler. *Papaver* cinsleri 60-200 cm arasında uzayabilmektedir. *Papaver* cinslerinin kapsül çapı 5 cm ile 7 cm arasında değişkenlik gösteren türleri bulunmaktadır (Smith ve Fletcher, 1949; Davis, 1982.). Kapsüllerin içerisinde bulunan tohumlar yaklaşık 1 mm çap büyüklüğüne sahip çok sayıda tanecik olarak bulunmaktadırlar. Ülkemizde papaver türünden 10 tanesi endemik olmak üzere 36 yabancı tür bulunmakta olup 20'ye yakın alt türü ve çeşidi yer almaktadır. Bu anlamda ülkemizin *Papaver* türü bakımından zengin ve merkezi bir konumda olduğu anlaşılmaktadır (Arslan ve ark., 2011).

Papaver L. cinsi *Argemonidium*, *Carinatae*, *Glauca*, *Horrida*, *Meconella*, *Miltantha*, *Oxytona (Macrantha)*, *Papaver*, *Pilosa* ve *Rhoeadium* olmak üzere on altı başlık halinde sınıflandırılmaktadır. Ülkemizde *Horrida* ve *Meconella* cinslerine rastlanılmamaktadır. Kültür bitkisi olarak yetiştirdiğimiz *Papaver somniferum* bitki türü *Papaver* cinsi içerisinde yer almaktadır. *Papaver somniferum* türünün *P. somniferum ssp. spontaneum* ve *P. somniferum ssp. anatolicum* olmak üzere iki alt tür yer almaktadır. Alt türlerinden birincisi olan haşhaşın kapsülleri olgunlaşınca üst kısmında yer alan delikler açılmakta ve tohumlar belirgin hale geldiklerinden dolayı dökülmektedir. Bu tür haşhaşa ülkemizde “açık haşhaş” denilmektedir. İkinci alt tür olan haşhaşın kapsülleri ise belirgin hale gelince yani olgunlaşınca açılma göstermemektedir. Bu haşhaş türüne ülkemizde “kör haşhaş” denilmektedir. Ülkemizde çiftçiler tarafından yaygın olarak ikinci tür olan *P. somniferum ssp. anatolicum*'un alt türü mor çiçekli ve beyaz çiçekli varyeteleri tercih edilmektedir (Tanker, 2003).

Haşhaşın morfin ve uyuşturucu yapısı bağımlılık yaptığından dolayı tarım için izne tabi olarak yetiştirilmektedir. Türkiye’de yapılan haşhaş tarımı 3298 sayılı *Uyuşturucu Maddelerle İlgili Kanun ve Yönetmeliği* kapsamı dâhilinde, çizilmemiş halde ve denetimli bir şekilde haşhaş kapsülü üretimi şeklinde yapılmaktadır. Ülkemizde 13 il ve bu illere bağlı bazı ilçelerde kontrollü olarak yaklaşık 70,000 hektar alanda üretimi yapılmakta olan haşhaş bitkisinden aynı zamanda morfin üretimi de yapılmaktadır. Bu özelliği ile değeri hiç azalmayan en önemli tıp bitkisi niteliği taşır. Haşhaş bitkisi ülkemiz açısından stratejik öneme sahip ve dünyada lider konumunda olduğumuz önemli bitkilerden birisidir. 2019 yılı TMO verilerine göre; Türkiye dünyanın morfin ihtiyacının %25’ini karşılayabilecek düzeyde ve haşhaş üretiminde birinci sırada yer almaktadır.

Ülkemizde haşhaş ekiminin izin verildiği şehirler Şekil 1.1' de gösterilmiştir (2019 yılı Haşhaş Raporu, Toprak Mahsulleri Ofisi, 2020, www.tmo.gov.tr).



Şekil 1.1.Ülkemizde haşhaş ekiminin izin verildiği şehirler

1.1 Haşhaş bitkisinin kimyasal özellikleri ve kullanım alanları

Kültür ve tıbbi bitkiler içerisinde yer alan haşhaş, içerdiği alkaloidler yönünden ülkemizde büyük öneme sahiptir. Haşhaş bitkisi bünyesinde tebain, kodein, noskopin, papaverin ve morfin gibi tıp sektörü açısından önemli değişik grup alkaloidleri barındırmaktadır. Bunların dışında yaklaşık 30'dan fazla değişik alkaloid içeren kapsülleri, maddi değeri yüksek, yarı sentetik ilaçların hammaddelerinin üretiminde kullanılmaktadır. Aynı zamanda alkaloidler insan saçından ve derisinden alınan numunelerde bir adli olayın aydınlatılmasında da yararlanılmaktadır. Üretimi yapılan yarı sentetik ilaçların hammaddeleri; kodein fosfat, kodein baz, kodein hidroklorür, dionin, morfin hidroklorür, kodein sülfat, morfin sülfat, dihidrokodein bitartarat, dihidrokodein, tiyosiyanat şeklinde sıralayabiliriz. Ayrıca haşhaş tohumları bünyesinde kalsiyum, potasyum, çinko, demir, mangan ve bakır mineralleri ile omega-3 ve omega-6 yağ asitlerini de barındırır. Yüksek besleyici değeri olan ve yemeklerde kullanılan haşhaş yağı, çoklu doymamış yağ asitlerini bünyesinde barındırır (Hlinkova ve ark., 2012). Haşhaş tohumu meydana getirdiği yağın %82.2'sini doymamış yağ asitleri bünyesinde yer alan linoleik asit ($C_{18}H_{32}O_2$), toplam yağ asitlerinin %74.5'ini oluşturmaktadır. Palmitik asit ($C_{16}H_{32}O_2$) ise doymuş yağ asitlerinin %84'ünü oluşturmaktadır. Doymamış yağ asitlerinde fazla miktarda linoleik asit ($C_{18}H_{32}O_2$) bulunurken, doymuş yağ asitlerinde ise palmitik asit ($C_{16}H_{32}O_2$) yaygın olarak bulunmaktadır (Bozan ve Temelli, 2008).

Afyon maddesi *Papaver somniferum* türlerinin kapsülünde çok miktarda bulunmaktadır. Haşhaş kapsülünün mezokarpında yer alan süt borularından lateks adı verilen özel bir sıvı barındırmaktadır. Bu özel sıvıyı barındıran kapsül enine olarak çizilir ise borulardaki lateks dışarı çıkar akar ve dışarı çıkan sıvı hava ile teması sonucu kurur, bu kurumuş haline afyon denir. Bu kuruyan madde kahverengi ve siyah rengini alır ve ham afyonun rengini oluşturur. Afyonda çok düşük miktarda alkaloid bulunmaktadır (Baytop, 1974).

Afyon maddesinin vücuda ne kadar miktarda alındığı önemlidir. Küçük dozda alınan afyon nefes almayı hızlandırır ve ağrı kesici özelliğe sahipken; yüksek dozda alınır ise solunumu durdurur. Uykusuzluğu giderme, öksürüğü durdurma, ishali önleme ve kas spazmlarından kaynaklanan ağrıları giderme gibi farklı işlevlerde de kullanılabilir (Çapur, 2006).

1.2 Antioksidanlar

Antioksidanlar, radikal yapıda bulunan ürünler ile hızlı bir şekilde reaksiyon oluşturarak peroksidasyonun ve otooksidasyonun ilerlemesini inhibe eden, derişimi az substrat düzeyinde fosforilasyonu durdurmasına veya geciktirmesine neden olan madde ya da sistemlerdir (Aslan, 1995; Sise, 1997).

Organizmadaki yapılarda, serbest radikaller ve bu radikallerin neden olduğu reaksiyonların oluşmasını engelleyen ve dengeleyen sistemler bulunmaktadır. Canlıların metabolizmasındaki organ ve hücre sistemlerini korumak için reaktif oksijen tepkimelerine karşı kompleks halde bulunan antioksidan sistemleri mevcuttur. Söz konusu sistemler, radikalik ürünleri etkisiz hale getiren ve oluşan yapılarla etkileşim halinde bulunan, endojen ve ekzojen kaynaklı olabilen maddelerdir (Teber, 2019; Valko, 2007).

Metabolizmanın oksidan-antioksidan dengesini muhafaza eden basamaklardan en az biri üzerinden etki eden antioksidanlar farklı metabolik mekanizmalarda önemli görevlerde yer almaktadırlar. Bu kapsamda DNA, protein ve lipid gibi moleküllerde meydana gelen hasarların onarılmasında, radikalik ürünlerin temizlenmesinde, organizmada bulunan enzim tiplerinin kayıplarının oluşmamasında, serbest radikallere neden olan kimyasal reaksiyonların durdurulması veya reaksiyon hızının yavaşlatılması gibi durumlarda görev alırlar (Grutteridge, 1995; Güzel ve ark., 2013).

Antioksidanlar savunma mekanizmalarına göre önleyici, radikal süpürücü ve enzim tamircisi olmak üzere üç ana başlıkta ele alınır. Bitki bazlı antioksidanların çoğu

hidrofiliktir fakat tokoferoller, K vitamini ve karotenoidler hidrofobik yapıya sahiptirler. Suda çözünen antioksidanlara örnek ürik asit ve askorbik asittir (Haida ve Hakimian, 2019). Antioksidan maddelerin enzim yapısında olan ve olmayan antioksidanlar olarak gruplandırılması Çizelge 1.2’de gösterilmiştir (Çöllü, 2007; Kırıl 2012).

Çizelge 1.2. Antioksidan maddeler

Antioksidan enzimler	Enzim yapısında olmayan antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	A Vitamini (β -Karoten)
Katalaz	C Vitamini (Askorbik asit)
Süperoksit redüktaz	E Vitamini (α -Tokoferol)
Peroksiredoksinler	Proteinler (transferin, ferritin, albumin, bilirubin)
Peroksidazlar	Hormonlar (serotonin, melatonin)
Glutatyon redüktaz	Fenolik bileşikler (polifenoller, flavonoitler)
Glutatyon S-transferaz	Lipoik asit, ürik asit, glutatyon

1.2.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanların özelliklerine göre sınıflandırılması Çizelge 1.3’te gösterilmiştir (Bursal ve Teber, 2020).

Çizelge 1.3. Antioksidanların sınıflandırılması (Baykal,1998)

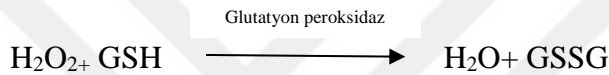
Yapılarına göre antioksidanlar	Çözünürlüklerine göre antioksidanlar	Kaynaklarına göre antioksidanlar	Yerleştikleri yere göre antioksidanlar
Enzimatik antioksidanlar	Suda çözünen antioksidanlar • C vitamini • Glikoz • Ürik asit • Glutatyon • Sistein	Organizmada bulunan(endojen) antioksidanlar • Katalaz • α tokoferol • SOD	İntrasellüler • SOD • Glutatyon peroksidaz • Katalaz
Enzimatik olmayan antioksidanlar	Lipitlerde çözünen antioksidanlar • β -karoten • α -tokoferol • Flavonoidler • Biluribin	Dışarıdan alınan(ekzojen) antioksidanlar • Adenozin • Allopurinol	Ekstrasellüler • Askorbik asit • Transferrin • Albümin

1.2.1.1 Enzimatik antioksidanlar

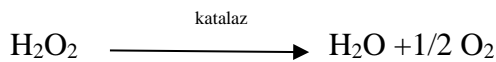
Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) bu gruptaki en yaygın antioksidanlardandır. ROS için yüksek bağlanma enerjisine sahip olduklarından dolayı oksitativ stres halinde daha etkili koruma sağlarlar (Ratnam ve ark., 2006).

Süperoksit Dismutaz Enzimi: SOD, GPx ve CAT ile beraber organizmadaki O_2^- seviyesini denetlemektedir. SOD, süperoksitin O_2^- ve hidrojenperoksit (H_2O_2) dismutasyonunu katalizler. SOD enzimi, katalize edilen reaksiyonla O_2^- radikalini yükseltgendirirken öteki O_2^- radikalini ise H_2O_2 'ye indirger. Metabolizmada metal kofaktörlerine göre üç çeşit SOD enzimi: sitozolik CuZn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve Fe-SOD yer almaktadır (Ratnam ve ark., 2006; Gill ve Tuteja 2010). Hidroksil radikallerinin ağır metali katalizli oluşmasını engellemeye olanak sağlar (Gill ve Tuteja 2010).

Glutasyon Peroksidaz Enzimi: Hidrojen peroksit ve bazı hidroperoksitlerin indirgenmesinde sorumlu bir enzimdir. İndirgeyici ajan için glutasyon kullanılır. Azalan GPx aktivitesi H_2O_2 artmasına ve ciddi hücre hasarına neden olmaktadır. GSH, hidrojen peroksit ile yükseltgenerek GSSG'ı meydana getirir (Kızılkaya, 2022).



Katalaz: SOD enzimiyle katalize edilen, ayrışma tepkimesi sonucu oluşan H_2O_2 'yi su (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştürmektedir. H_2O_2 derişiminin yüksek olduğu yapılarda katalazın enzimatik enerjisi yükseltgenmektedir. Eritrosit hücrelerinin çoğunda CAT aktivitesini gerçekleştirdiği ifade edilmektedir (Rucker, 2004).



Bir dakikada yaklaşık 6 milyon H_2O_2 molekülünü bileşenlerine ayıran bu enzim yüksek turnover oranına sahiptir (Gill ve Tuteja 2010). Ek olarak, CAT'ın peroksidatif tepkimesi yoluyla bazı zehirli maddeler üzerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir (Ratnam ve ark., 2006). Katalazlar (hidroperoksidazlar) günümüze kadar detaylı bir şekilde araştırılmış olup, monofonksiyonel katalazlar, bifonksiyonel katalazlar ve manganez içeren üç yüzden fazla tip katalaz tespit edilmiştir (Chelikani ve ark., 2004).

Fe, Cu ve Mn gibi geçiş metalleri farklı oksidasyon reaksiyonlarında prooksidan ve antioksidan olarak özellik gösterirler. Geçiş metalleri son orbitallerindeki elektronlarını radikaller oluşturmak için aktarabilir ve oksidatif strese sebep ettirebilirler. Aynı zamanda bahsettiğimiz ağır metaller organizmada biyolojik antioksidan savunma sisteminde aktif yer alırlar. Süperoksit dismutazdaki Cu, Zn ve Mn metalloenzimlerin

aktif orijinleri olarak süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e dönüştürürken, katalazdaki Fe iyonu hidrojen peroksiti suya iyonize eder.

1.2.1.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar ise doğal ve sentetik olmak üzere iki alt başlık altında ele alınmaktadır.

1.2.1.2.1 Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptirler ve vücutta sentezlenemediklerinden dolayı dışarıdan hazır bir şekilde beslenme yoluyla metabolizmaya alınmaları gerekmektedir. Bitkilerin farklı kısımlarında bulunurlar. Doğal antioksidanlar fenoller, flavonoidler, karotenoidler, vitaminler, glutatyon ve endojen metabolitlerini barındırırlar. Bitkisel yapıları antioksidanlar, peroksitleri parçalayıcı, serbest radikalleri kovucu, singlet ve triplet oksijen kuşağı, enzim inhibitörleriyle birlikte sinerjik faaliyetlerde bulunurlar (Larson, 1998). Sebze, meyve (kabuklu ve kabuksuz meyveler dâhil) ve baklagil grubunda bulunan besinlerde birçok antioksidan türü bulunur. Bunların dışında bitkilerin kısımları olan tohum, yaprak, çiçek, kök ve kabuklarda yaygın antioksidanlar görülmektedir (Pratt ve ark., 1990). Bu yüzden dolayı meyve ve sebzelerin bol miktarda tüketilmesiyle, hastalıklara, kansere ve ölüm oranında belirgin bir azalmaya neden olduğu görülmektedir (Ames ve ark., 1993).

Doğal antioksidanlar arasında α -tokoferol (E vitamini), karotenoidler, polifenoller ve askorbik asit (C vitamini) sayılabilir. Askorbik asit, bitkilerde fazla miktarda bulunur ve suda çözünen bir antioksidandır. Doğal antioksidanlar sulu ortamda aktifler, radikal süpürücü ve indirgenme olaylarında aktif rol oynar. (Hamre ve ark., 2004). C vitamininin fonksiyonlarından biri de midede *N*-nitrozo bileşiklerinin oluşmasını engeller ve kolajen oluşumunu desteklemesidir. Bu yüzden kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır (Byers ve Perry, 1992). Bazı ilaçlar alındıklarında kan-beyin engelini geçemediği için C vitamini nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde de önemlidir (Vertuani ve ark., 2004).

Yüksek derişimlerde C ve E vitaminleri prooksidanlar olarak davranabilir (Hamre ve ark., 2004). Doğada 8 çeşit E vitamini bulunur. Bunlar: α , β , γ ve δ -tokoferoller ve α , β , γ ve δ -tokotrienollerdir. İçlerinde α -tokoferol en güçlü antioksidan özelliktedir. (Rizvi ve ark., 2014). Kromanol halkasındaki -OH grubunun H atomu, stabilize ve delokalize bir ortaklanmamış elektrona sebep olan bir serbest radikale verilebilir; meydana gelen E

vitamini radikali, lipid peroksidasyonunun zincir tepkimesini sonlandırmak için kinetik olarak inerttir (Rungratanawanich ve ark., 2018). Lipid peroksit radikallerine karşı vitamin E, tepkime yeteneği özelliği ile yağda çözünen ve bağ kıran bir antioksidandır ve bu radikalın yeni bir PUFA (çoklu doymamış yağ asidi) ile reaksiyona girmesini önler.

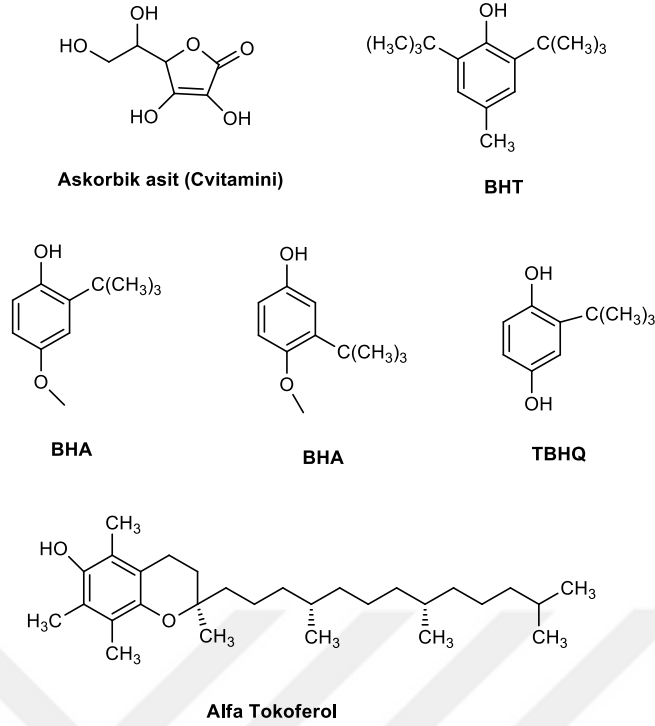
1.2.1.2.2 Sentetik antioksidanlar

Koenzim Q (CoQ) veya ubiquinon, biyolojik sistemde yer alır. Metabolizmaya, ATP üretimi senteziyle çok fazla enerji vermek için diyet ile desteklenebilir. Antioksidan savunma mekanizmalarında, beslenme ve diyet önemli bir yer tutar (Ratnam ve ark., 2006). Bilirubin, glutatyon ve ürik asit ve antioksidanları insan artıklarında küçük moleküler kütleli antioksidanlardır (Byers ve Perry, 1992).

Bütil hidroksi anisol (BHA), bütil hidroksi toluen (BHT), *tert*-bütil hidrokinon (TBHQ), *2-tert*-bütil-4-metilfenol (TBMP) gibi bazı fenolik yapıda bulunan bileşikler, gıda katkı maddesi olarak bilinen antioksidanlar, sentetik antioksidanlar olarak isimlendirilmektedir. Bu sentetik antioksidanlar, tepkime denklemleriyle gösterilir, lipit(yağ) peroksidasyonunda bulunan radikal zincir tepkimesini önlemek amacıyla hidrojen atomlarını lipit radikallerine aktarır (Teber, 2019).



BHA antioksidanı, kızarmış ürünlerde koruyucu madde olarak kullanılır ve ısıya dayanıklı bir antioksidandır. Örneğin kuru tahıllarda, karışımlarda veya tatlılarda kullanılır. Yüksek dozlarda alındığında insan sağlığını bozan tümörün oluşturmaya zemin sağlayan bir antioksidan olabileceği bildirilmiştir.



Şekil 1.2. Bazı enzimatik olmayan antioksidanlar

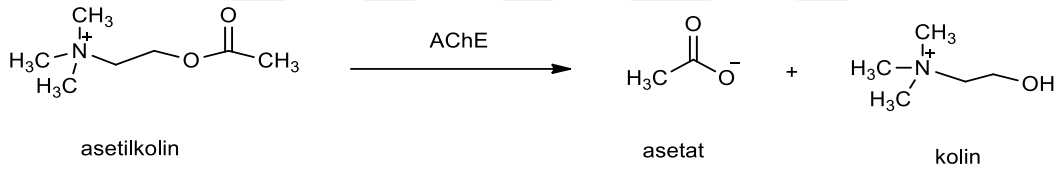
1.3 Enzimler

Enzimler, canlı hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonların hızını artıran, herhangi bir değişikliğe maruz kalmadan, yan ürün oluşumuna meydan vermeden ve yüzde yüz verim veren biyolojik katalizörlerdir (Aras ve ark., 2018). Ancak katalitik RNA moleküllerinin bir kısmı hariç tüm enzimler protein yapılıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 2000; Nelson ve Cox, 2004).

Üç boyutlu kendilerine özgü yapıları sahiptirler. Aynı tür tepkimeler enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir. Enzim katalizli reaksiyonların reaktanları substrat olarak adlandırılmaktadır. Enzimler, belirli bir substrat ya da substratlar için özgüdür. Protein yapısı olmayan kofaktör olarak adlandırılan bileşen olmadan, birçok enzim proteini katalitik olarak aktif değildir. Apoenzim, enzimlerinin aktif protein bileşenlerine, aktif enzime (kofaktör dâhil) ise holoenzim denir (Aras ve ark., 2016). Kofaktörleri diğerlerinden daha sıkı bağlayan bazı enzimler bulunur. Prostetik grup, bir kofaktör enzime zarar vermeden bileşenlerine ayrılması zor olacak şekilde sıkı bağlanmasıyla oluşur (Palmer ve Bonner, 2011). Enzim aktivitesini ve katalizleme hızını değiştiren faktörler şunlardır: Substrat derişimi, enzim derişimi, sıcaklık, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerdir. Ayrıca birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına turnover sayısı hesaplanmaktadır (Aras ve ark., 2017).

1.4 Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi

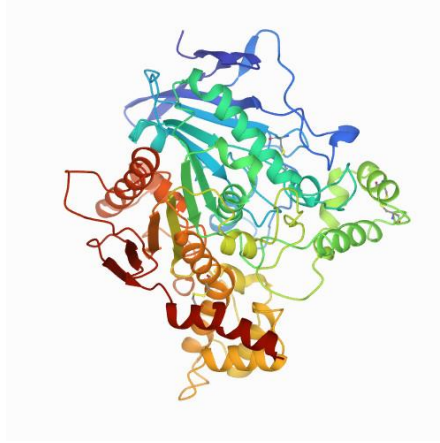
Asetilkolinesteraz enzimi (AChE; EC 3.1.1.7) vücutta merkezi ve periferel dokularda, adrenerjik ve kolinerjik dokularda, sinir ve kas dokularında, eritrositlerde ve plasental dokularda bulunan kolinesteraz enzimlerinden birisidir. Asetilkolinesteraz enzimi sağlıklı erişkin insan beyninde vücudun diğer dokularına oranla çok daha yüksek miktarda bulunan nörotransmitter bir molekül olan asetilkolini hidrolize eden bir enzimdir. Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dendritik uzantıların proksimalinde bulunur. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80' inden AChE sorumlu olduğu söylenmektedir (Hartman, 2010). Bu enzim sinaptik boşluklarda var olan asetilkolini, asetat ve koline hidrolize edip inaktive eder. İlk kez 1914 yılında Henry Hallet Dale tarafından keşfedilmiştir. Otto Lewi, 1921 yılında kurbağaların kalplerini ele aldığı deneysel çalışmalarında asetilkolinin nörotransmitter olduğu sonucuna ulaşmıştır. Yaptığı bu çalışma ile 1936 yılında Nobel Ödülünü almaya hak kazanmıştır. Böylece Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının, metabolizmasında, asetilkolinin etkili olduğu ortaya çıkmıştır (Jokanović ve Maksimović,1997) .



Şekil 1.3. Asetilkolinesterazın asetat ve kolin oluşturan hidroliz reaksiyonu

1.4.1 Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması

Karaciğerde sentezlenen kolinesteraz enzimlerinden olan AChE, 1938 yılında ilk kez elektrik balığından (*Torpedo marmoneta*) saflaştırılmıştır. Rekombinant AChE'lar, insanlar tarafından ticari araç olarak kullanılırken informal model olarak ele alınmaktadır (Pohanka, 2011). AChE enzimi, yüksek aktiviteye sahip ve saniyede yaklaşık yirmi beş bin asetilkolini (ACh) parçalamaktadır. Enzimde aktif bölge katyonik ve anyonik iki alt birimden meydana gelmektedir. Enzimdeki anyonik kısım asetilkolinde mevcut olan kuaterner amin ile bağ kurar. Anyonik bölge ile diğer artı yüklü substrat veya inhibitörler de bağ oluşturabilir. Katyonik bölgede ise substratlar on dört aromatik amino asitle etkileşim kurabilirler (Mallis ve ark., 2000).



Şekil 1.4. Asetilkolinesteraz enziminin (monomer) kristalografik yapısı

Asetilkolinesteraz enzimi sinir iletimi gerçekleşirken, sinaptik boşluğa bırakılır ve postsinaptik membrandaki ACh reseptörleri tarafından tespit edilir. Tespit edilmesine müteakip sinyal meydana gelir. Aynı şekilde postsinaptik membranda AChE, ACh'i hidrolize eder ve sinyal akışını bloke eder. Serbest kalan kolin, önceki sinaptik nöron tarafından tekrar alınır ve kolin asetiltransferazın asetil-CoA ile tepkimesiyle yeniden asetilkolin sentezlenir (Mesulam ve ark.. 2002;Nelson ve ark., 2008).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Haşhaş bitkisinin ülkemizde ve yurt dışında önemli kullanım alanları olduğundan dolayı çeşitli incelemelerde bulunmuş olup bazı literatür araştırmalarına aşağıda yer verilmiştir.

Yücel Şengün ve ark. (2020) tarafından, ülkemizde bulunan Afyonkarahisar ilinde yetişen haşhaş bitkilerinin (*Papaver somniferum*) kapsüllerini kırmak suretiyle mavi ve beyaz haşhaş tohumlarını elde etmişler ve tohumlardan yüksek miktarda yağ asitlerinin bulunduğunu ve bunların linoleik, oleik asit ve palmitik asit olduğu tespit edilmiştir. Mavi ve beyaz haşhaş tohumunun yağ örneklerinin antioksidan aktivite değerleri DPPH ve ABTS+ yöntemlerine göre ele alınmış olup mavi haşhaş tohumunun antioksidan aktivite değerleri DPPH: %40.35±0.14 ve ABTS: %41.09±0.58 değerleri arasında olduğunu, beyaz haşhaş tohumunun antioksidan aktivite değerleri DPPH: %40.86±1.25 ve ABTS: %41.95±1.46 değerleri arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, yağ örnekleri kendi içerisinde fenolik madde miktarları arasında anlamlı farklılık görüldüğü, ancak antioksidan aktiviteleri bakımından önemsenecek bir farklılığın bulunmadığı çıkarımında bulunmuşlardır. Çalışma alanı bakımından ilk defa yağ örneklerinin gıda mikrobiyolojisi bakımından önemli bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve mavi tohuma karşı duyarlı mikroorganizmaların *E. coli* ve *L. monocytogenes* olduğu, beyaz tohuma ise *B. subtilis* ve *S. aureus* dışındaki mikroorganizmalara karşı benzer düzeyde etki gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak haşhaş tohumu yağlarının doğal antioksidan ve antimikrobiyal ürünler olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu çıkarımında bulunmuşlardır.

Sharopov ve ark. (2018) yaptıkları çalışmalarında taze haşhaş (*Papaver somniferum*) olarak nitelendirdikleri bitkinin yeşil halini numune olarak kullanarak haşhaş bitkisinin alkaloid içeriğine, antioksidanlarına ve çeşitli kısımlarının sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. *P. somniferum* bitkisini çeşitli kısımlara ayırıp (yapraklar, saplar, kökler, kapsüller, çiçekler, tohumlar) alkaloid bileşimlerini ve biyolojik aktivitelerini araştırmayı amaçlamıştır. Alkaloid bakımından ele alındığında papaverin, kodein, morfin, meconin ve β -hidroksidamaskon değerlerini tespit etmişlerdir. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmında çok fazla morfin, papaverin ve kodein bulunduğunu tespit etmişlerdir. *P. somniferum* alkaloid ekstresi güçlü bir antioksidan etki gösterdiğinden dolayı DPPH, ABTS ve FRAP yöntemlerini de uygulamışlardır. DPPH radikali için 35.1 - 157.6 $\mu\text{g/mL}$ ve ABTS+ radikal süpürücü için 138.5 - 306.3 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen

IC₅₀ değerleri rapor edilmiştir. Haşaş bitkisinin iek özütü kısımları, en yüksek antioksidan özellikleri sergilemiş ve bu sırayı tohum ve kapsül (tohumsuz) kısımları takip etmiştir. En yüksek fenolik madde miktarı yaprak ve çiçeklerde, sırasıyla 2.0 g ve 1.9 g CAE/100 g FW bitki materyalinde tespit edilmiştir. Flavonoidler 0.03 g ile 0.34 g QE/100 g FW arasında değişmektedir. Yapraklar en yüksek miktarda toplam flavonoid içermektedir(0.34 g QE/100 g FW).

Gevenkiris (2006) Türk menşeli haşaş tohumlarında toplam fenolik madde miktarını 3.05 - 4.44 mg GAE (gallik asit eşdeğeri)/g olarak bildirmiştir; Ishtiaque ve ark. (2013) ticari haşaş tohumlarındaki toplam fenolik ve flavonoid içeriğini sırasıyla 193.7 ve 67.6 mg QE/g olarak bildirmiştir. Fenol hidroksil grupları nedeniyle fenolikler, antisiyanrler ve flavonoidler yüksek antioksidan aktiviteler sergilediğini ifade etmişlerdir. Ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ile karşılık gelen DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri arasındaki korelasyon, fenollerin ve flavonoidlerin antioksidan etkilerden sorumlu ana bileşenler olduğunu çıkarımında bulunmuşlardır. Ayrıca haşaş özütleri yüksek oranda antioksidatif alkaloid içermektedir ve alkaloid özütü güçlü antioksidan etki sergilediği çıkarımında bulunmuşlardır. Alkaloid ekstresi çalışılan insan tümör hücre hatlarına karşı aktif olduğunu gözlemlemişlerdir. Metanol ekstresi, çalışılan kanser hücre hatlarının çoğuna karşı belirgin bir sitotoksisite sergilediği çıkarımında bulunmuşlardır. Ayrıca, morfin tümör büyümesinin bir düzenleyicisi olarak tartişılması gerektiği sonucuna varmişlardır.

İnan ve ark. (2016) tarafından yapılan incelemede, haşaş bitkilerinin tohum ve kapsül verimi açısından yerel çeşidin yanı sıra TMO3, Afyon95 ve Ofis3 eşitleri ele alınmıştır ve bu çeşitlerin morfin değerlerinin yüksek olduğundan dolayı kış için haşaş ekimlerine uygun olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda deneyler sonucunda üzerinde çalıştığı haşaş eşitlerinin Denizli ilinde ekiminin yapılabileceği belirtmiştir. alışmasında kullandığı haşaş çeşitlerinde yer alan kapsüllerde morfin değerleri kullanılan genotiplere, iklim koşullarına ve kültürel süreçlere bağlı olarak değişebileceğini belirtmişlerdir.

Todorova ve ark. (2014) tarafından *Papaver rhoeas* (mısır haşaşı) ekstraktının DPPH antioksidan yönteminde en yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini keşfetmişlerdir. *Papaver rhoeas* bitkisinin antimutajenik özellikleri bulunduğunu aynı zamanda gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Abudak (2014) tarafından yapılan incelemelerde haşhaş yağı ve morfin kalitesinin değişkenlik gösteren bir çeşidin olmadığını, yağ ve morfin oranlarının ise ters orantılı değişkenlikler gösterdiğinin çıkarımında bulunmuştur.

Saeed-Abadi (2012) yaptığı çalışmada, *Papaver rhoeas* ekstraktının fareler üzerinde gerçekleştirdiği deneyde akut fazını, opioidergik glutamaterjik ve nitirir mekanizmalarını inhibe edebileceğini keşfetmiştir.

Hasplova ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, *Papaver rhoeas* çiçeğinin ekstraktı incelendiğinde DPPH radikal giderme yönteminde %85 temizleyici özellik gösterdiğini bulmuştur. Ayrıca insan lenfoblastoid hücre hattında bulunan TK6 hücrelerinde güçlü sitotoksik ve genotoksik etkileri olduğunu ifade etmişler. Etkili doz alımında yarar ve zarar arasındaki dengesinin iyi hesaplanması konusunda da uyarılarda bulunmuşlardır.

Kadioğlu (2011) tarafından yaptığı çalışmasında, elle ekim gerçekleştirildiğinde tohumlarda renk karışımında, çimlenirken ve olgunluğa erişirken çeşitlilik olduğunu vurgulamıştır. Farklı renklerde ekilen tohumların aynı tarlada değişik zamanlarda olgunlaştığını gözlemlemiştir. Ekimde makinalı ve tek renkten oluşan tohumlar kullanıldığında çimlenme ve olgunlaşmayı arttırdığı; aynı zamanda makineli tarımın kullanılmasıyla işçilik tasarrufuna ve maliyetlerin düşürülmesine neden olduğu çıkarımında bulunmuştur. Çiftçiler için verimi arttırmak için haşhaş tohumu alanında uzmanlaşmış modern bir yağhanenin kurulması gerektiği tavsiyelerinde bulunmuştur.

Özcan ve Atalay (2006) çalışmasında Afyonkarahisar koşullarında haşhaş çeşitlerinin tohum ağırlığı 0.29-0.42 g, nem %3.39-4.76, ham protein %11.94-13.58, ham kül %4.92-6.25, ham lif %22.63-30.08, HCl-çözünmeyen kül %0.72-1.68, ham enerji 6367-6740 kcal/g ve ham yağ içeriği %32.43-45.52 arasında değişkenlik gösterdiğini ve temel yağ asitleri olarak stearik, palmitik, oleik, linoleik ve linolenik yağ asitlerinin yer aldığını vurgulamışlardır.

İşler ve ark. (2005) çalışmalarında haşhaş ekimleri gerçekleştirilen arazilerde kapsül verimleri üzerine çalışmışlardır. Ülkemizde yıllık ortalama hasat oranları dikkate alındığında dekara tahmini 50-60 kg kapsül üretildiği tespit etmişlerdir. Ancak modern tarım teknikleri uygulandığında ve sulama yöntemleri ile desteklendiğinde bir dekar alandan 150 kg civarında kapsül elde edilebileceği sonucuna varmışlardır.

Pourmotabbed ve ark. (2004) yaptıkları fareler üzerindeki çalışmada, *Papaver rhoease* ekstraktında morfine bağlı olarak farelerde yoksunluk sendromunu iyileştirebileceği çıkarımında bulunmuşlardır.

Sarihan (2004) yaptığı çalışmada haşhaş bitkisinin verimi ve bazı özelliklerine göre gibberellik asidin farklı doz ve uygulama zamanlarını etkisini ele almıştır. Yaptığı incelemelerde şu verileri elde etmiştir: Morfin oranları % 0.388-0.963 değerleri arasında değişkenlik gösterdiğini vurgulamıştır. Dekara kapsül verimi; 54.250-150.525 kg/da arasında, dekara tohum verimi ise 52.200-164.450 kg/da arasında olduğunu belirtmiştir.

Kaya ve Lockwood (1999) tarafından taç yaprak renkleri farklı, beş farklı *Papaver somniferum* tohumlarından doku kültürleri alınarak alkaloid sentezi üzerine çalışmışlardır. Sonuç olarak dragendorff belirtecinden yararlanarak alkaloidlerin mevcut olduğunu leke testi ile keşfetmişlerdir.

Atakişi (1991) tarafından haşhaş hasadı gerçekleştirme metotlarını ele almıştır. Haşhaş hasat edildiğinde ürünlerin temiz bezle ya da temiz zeminde ezilerek tohumların toplandını ardından kalan tohumların dış kısmında bulunan kabuk kısımlarının halk arasındaki tabir olan kalbur ile elenerek temizlenebileceğini ifade etmiştir. Bu işlemler karşılıklı döner valsli harman makinalarında da kapsülleri kıran ve tohumları ayıran aletlerle de gerçekleştiğini belirtmiştir.

Garnock ve Scholes (1990) tarafından Yeni Zellanda'da yetiştirilen *Papaver somniferum* subsp. *setigerum* ve subsp. *somniferum* bitkileri türlerinin alkaloidlerini incelemiştir. Yaptıkları çalışmada HPLC ile analiz metodundan yararlanarak bütün bitki türünde kodein, morfin, narkotin ve tebain olduğunu bulmuşlardır. Ancak *Papaver somniferum* subsp. *setigerum* türünde kodein oranı daha fazla olduğunu, subsp. *somniferum* türünde ise az bir miktar bulunduğunu değerlendirmişlerdir. Kendiliğinden yetişen subsp. *setigerum*' da ise alkaloid miktarının fazla olduğunu diğerlerinde ise daha az olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan bitkisel materyal

Çalışma için kullanılan haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisi Uşak Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden Prof. Dr. Ercüment Osman SARIHAN tarafından temin edilmiş ve sistematik kimliklendirilmesi yapılmıştır.



Şekil 3.1. Haşhaş bitkisi ve kısımları

3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin antioksidan madde etkilerini belirlemek için gerçekleştirilen bu yüksek lisans tez çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ile araç-gereçlerin tedariki Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar-Yayımlar ve Projeler Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından BAP- 22-SBF-4902-01 nolu projeye desteklenmiştir. Çalışmada antioksidan aktivite tayini için 2,2-azino-bis-3-etilbenzo-tiyozin-6-sülfonik asit (ABTS) katyon radikal giderme aktivitesi, 1,1-difenil-2-

pikril-hidrazil (DPPH) serbest radikal giderme aktivitesi, Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi (FRAP) ve kuprik iyonları indirgeme kapasitesi (CUPRAC) metotları yapılmıştır. Ayrıca asetilkolin esteraz enzimi üzerine bu bitkinin ekstraları incelenmiştir. Bu çalışmalarda BHT (butillenmiş hidroksi toluen), askorbik asit, α -tokoferol, neokuprin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline), tris-HCl, asetilkolin esteraz enzimi, asetilkolin iyodür (ACHI), DTNB kimyasalları kullanılmıştır. Çözelti hazırlarken $CuCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$, $FeCl_3$, TCA (triklor asetik asit), potasyum persülfat, tris-HCl, potasyum fosfat kimyasal maddeler ile etanol ve saf su çözücülerini de kullanılmıştır. Bu kullanılan maddeler Sigma Aldrich ve Merck firmalarından satın alınmıştır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile de fenolik bileşik analizleri gerçekleştirilmiştir. Standart olarak kullanılan fenolik bileşikler ve kimyasallar Merkezi laboratuvar bünyesinde önceden temin edilmiş ve HPLC cihazı kütüphanesine kaydedilmiştir.

3.1.3 Yararlanılan alet ve cihazlar

- Araştırma için numunelerimiz Scaltec SBA 41 marka analitik hassas terazi ile tartılmıştır.
- Enzimin muhafazası için ve hazırlamış olduğumuz numuneler Arçelik marka buzdolabında muhafaza edilmiştir.
- Hazırlanan bitki ekstralarından numunelerin pipetlenmesinde tekli otomatik mikropipetler: Brand (0-100 μ L, 100-1000 μ L) Eppendorf Research® plus(100-1000 μ L) ve çoklu otomatik mikropipetler: Brand Transferpette® S 8 Çok Kanallı Dijital Pipet(20-200 μ L) markalı mikropipetler kullanılmıştır.
- Hazırlamış olduğumuz ekstralardan aldığımız numunelerin çözücülerini uzaklaştırmak için Heidolph Hei VAP Advantage Rotary 94200, Bioblock Scientific marka ve model evaporatör kullanılmıştır.
- HPLC cihazı: Agilent Technologies 1260 Infinity II markadan fenolik bileşik analizi yapılmıştır.
- İnkübatör: Elektro-Mag (0-300 °C) marka cihaz kullanılmıştır.
- Bitki materyalinin kısımlarını parçalamak için laboratuvar blenderı olarak Conair™ Waring™ Laboratory Blenders: Two Speeds, Commercial marka kullanılmıştır.
- Hazırlamış olduğumuz bitki ekstraları için liyofilizatör olarak Heidolph Scientific marka kullanılmıştır.

- Hazırlamış olduğumuz çözeltiler için magnetik karıştırıcı Glassco Heat&Stir, Heidolph MR Hei-Tec Stuart Scientific marka kullanılmıştır.
- Hazırlamış olduğumuz tampon çözeltilerde pH'ını belirlemek için pH metre olarak Thermo Scientific ELITEPH Pocket Type pH Meter (Elite) (1.0 - 15.0 pH) marka kullanılmıştır.
- Hazırlamış olduğumuz numunelerin analizi için spektrofotometre olarak çoklu numune için Thermo Scientific, Multiskan Go ve tekli numune için Shimadzu, UV-1800 markalarından spektrofotometreler kullanılmıştır.
- Spektrofotometre küveti olarak Quartz küvetler kullanılmıştır.
- Enzim çalışmasında karıştırmak için vorteks olarak Four E's Scientific Vortex Mixer marka kullanılmıştır.
- Distile su cihazı olarak Liston A 1210 (Rusya) markadan yararlanılmıştır.

3.1.4 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.4.1 DPPH metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. DPPH çözeltisi (1 mM) hazırlamak için, bir erlen veya behere 39 mg DPPH üzerine 100 mL etanol eklendi, etrafı ve ağız kısmı alüminyum folyo ile kapatılarak 12 saat magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu şekilde DPPH serbest radikali çözeltisi elde edildi.

3.1.4.2 CUPRAC metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. CuCl_2 çözeltisi (0.01 M) elde etmek için, 170.45 mg CuCl_2 tartılıp bir erlene aktarılarak 100 ml saf suda çözüldü.
2. Neokuprin (7.5 mM) çözeltisi elde etmek için; 156 mg neokuprin katı maddesi tartılıp bir erlende 100 ml etanol eklenerek çözüldü.
3. Asetat tampon çözeltisi (1 M) elde etmek için; 27.2 g KH_2PO_4 katı maddesi tartılıp bir erlene alınarak 200 mL destile su ilave edilerek çözüldü. HCl kullanılarak pH metre ile çözeltinin pH:6.0' ya ayarlandı.

3.1.4.3 ABTS metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tampon çözeltisi (0.1 M, pH:6.6) elde etmek için, 13.6 g KH_2PO_4 kimyasal maddesi tartılıp bir beher içerisine aktarılıp üzerine 100 mL saf su ilave edilerek pH metre ile pH:6.6 ya ayarlandı.

2. Potasyum persülfat çözeltisi (2.45 mM) elde etmek için; 66.25 mg $K_2O_8S_2$ (potasyum persülfat) 0.1 M fosfat tamponunda (pH= 7.40) tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.
3. ABTS çözeltisi (2 mM) elde etmek için; 110 mg ABTS katı maddesi hassas terazide tartıldıktan sonra erlene aktarılıp üzerine 100 mL destile saf su eklendi, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözelti hazırlandı.
4. Potasyum persülfat çözeltisi ve ABTS çözeltisinden 100'er mL alınarak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Oluşan çözelti hiç ışık almayacak şekilde alüminyum folyo kapatıldıktan sonra 6 saat oda sıcaklığında bekletildi.

3.1.4.4 FRAP metodu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (0.2 M) elde etmek için; 13.6 g KH_2PO_4 katı maddesi hassas terazide tartıldıktan sonra erlene aktarılıp üzerine 500 mL destile saf su ilave edildi. Erlen üzerine etiketlendirme yapıldı. Çözünme homojen olması için erlen manyetik karıştırıcıya konur ve içerisine magnetik karıştırıcı mıknatısı ilave edilerek oda şartlarında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. HCl çözeltisinden yararlanılarak pH'sı 6.4'e ayarlandı.
2. $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi (%1) elde etmek için; 2.5 g katı $K_3Fe(CN)_6$ maddesi hassas terazide tartılarak erlen içerisine konularak 250 mL destile saf su ilave edildi. Erlen üzerine etiketlendirme yapıldı. Çözünme homojen olması için erlen manyetik karıştırıcıya konur ve içerisine magnetik karıştırıcı mıknatısı ilave edilerek oda şartlarında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
3. TCA çözeltisi (%10) elde etmek için; 20 g TCA katı maddesi hassas terazide tartıldıktan sonra erlen içerisine 200 mL destile saf su ilave edildi. Erlen üzerine etiketlendirme yapıldı. Çözünme homojen olması için erlen manyetik karıştırıcıya konur ve içerisine magnetik karıştırıcı mıknatısı ilave edilerek oda şartlarında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
4. $FeCl_3$ çözeltisi (% 0.1) elde etmek için; 166 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ katı maddesi hassas terazide tartıldıktan sonra 100 mL destile saf suda ilave edilir. Erlen üzerine etiketlendirme yapıldı. Çözünme homojen olması için erlen manyetik karıştırıcıya konur ve içerisine magnetik karıştırıcı mıknatısı ilave edilerek oda şartlarında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

3.1.4.5 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0) elde etmek için; hassas terazide 12.1 g Tris tartıldıktan sonra 80 mL destile su ilave edilerek çözüldü. 0.1 M HCl çözeltisinden yararlanılarak pH:8.0 olarak ayarlandı ve son hacim saf su ile 100 mL ye tamamlandı.
2. Asetilkolin İyodat çözeltisi (10 mM) elde etmek için; hassas terazide 0.136 g Asetilkolin iyodat 50 mL destile saf suda çözüldü.
3. DTNB (Ellman's Reagent) (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi (10 mM) elde edilmesi için; hassas terazide 0.01 g DTNB ve 0.5 g sodyum nitrat, 50 mL destile saf suda çözüldü.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitki ekstralarının hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisi güneş ışınlarına direkt maruz bırakılmadan, oda şartlarında kök, sap, yaprak ve kapsül şeklinde dört kısım halinde ayrı ayrı kurutulmuştur. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kısımları laboratuvar blender parçalayıcısı ile parçalanarak toz haline getirilmiştir. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin etanol ekstresi **Çizelge 3.1.** de verilen miktarlarda gr/mL olarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Bitki ekstralarının hazırlanması için kullanılan bitki ağırlıkları ve etanol miktarları

Haşhaş Bitkisinin Kısımları	Miktarı (gr)	Etanol miktarı(mL)
Kök	15.05	150.5
Sap	10.35	103.5
Yaprak	11.48	114.8
Kapsül	15.00	150

Yukarıdaki çizelgede haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kısımları toz haline geldikten sonra analitik hassas terazide tartılarak beherlere eklenmişlerdir. Beherlere belirtilen miktarda etanol (1/10: w/v) eklenerek manyetik karıştırıcı ile ayrı ayrı karıştırılmış ve 30 dk. bekletilmiştir. Karışımlar daha sonra balon jöjeye süzgeç kâğıdı yardımıyla süzölmüş ve süzöntüleri bir evaporatörde 82°C'de etanol uzaklaştırılmıştır. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kalıntılarında olan kök kısmına 24.7 mL etanol, sap kısmına 33 mL etanol, yaprak kısmına 12.3 mL etanol ve

kapsül kısmına ise 15 mL etanol eklenerek konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde bitki ekstresi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Bitki ekstralarının evaporatörden geçtikten sonraki net ağırlıkları

Haşhaş bitkisinin kısımları	Balon joje boş ağırlık(g)	Evaporatörden geçtikten sonraki balon jolenin ağırlığı (g)	Net ağırlık(g)	Net ağırlık (mg)
Kök	125.297	125.544	0.247	247
Sap	180.932	181.262	0.330	330
Yaprak	143.686	143.809	0.123	123
Kapsül	157.008	157.167	0.159	159



Şekil 3. 2. Bitki numuneleri için etanol ekstresi hazırlama aşamaları

3.2.2 Bitki numunelerinin antioksidan aktivite tayinleri

Antioksidan tayin yöntemlerinde kullanılması için konsantrasyonları 10 mg/mL olacak bitki ekstraktları hazırlandı. Hazırlanmış olduğumuz ekstraktlar standart olarak kullanılan BHT, askorbik asit ve α -tokoferol ile antioksidan aktiviteleri kıyas edildi.

3.2.2.1 DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tayini

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikalinden yararlanılarak, doğal veya sentetik maddelerin radikal süpürücü (giderici) aktivitelerini ölçmede kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir. Blois yönteminin (Blois, 1958) geliştirilmiş versiyonunda DPPH serbest radikal temizleme aktivitesinde yararlanılmıştır (Bursal ve ark., 2021). DPPH radikali, 517 nm'de absorbe edebilen ve antioksidan bileşiklerle reaksiyona girerek radikal olmayan DPPH-H haline gelebilen, organik yapıya sahip mor bir maddedir. DPPH-H 517 nm'de absorbans üretmediğinden, absorbanstaki azalmaya göre serbest radikal temizleme aktivitesi ve antioksidan aktivite hesaplanmaktadır. Bu metodun esasında DPPH radikalinin potansiyel antioksidan özelliklere sahip maddelerin veya bitki ekstraktlarının reaksiyona girmesine izin verilir. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan sarı renk, DPPH radikallerini sarı difenil pikril hidrazine indirgeyen antioksidanlardan kaynaklanmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda 517 nm'de absorbans değerindeki azalma reaksiyondan kalan DPPH (radikal) solüsyonu miktarını vermektedir ve bu değer serbest radikal süpürme aktivitesi olarak adlandırılmaktadır (Bursal ve ark., 2021).

Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül olmak üzere 4 kısımdan elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite tayin bu yöntemin güncellenmiş haline göre yapıldı. Öncelikli olarak bu yöntemde 39 mg DPPH maddesi 100 mL etanolde çözülerek ve 12 saat magnetik karıştırıcıda karıştırılarak 2 mM DPPH serbest radikal çözeltisi oluşturuldu. DPPH serbest radikal çözeltisinden 300 μ L DPPH çözeltisi otomatik pipetler aracılığı ile alınarak deney tüplerine konuldu. Daha sonra 1700 μ L de etanol pipetlenerek DPPH serbest radikali kontrol çözeltisi hazırlandı. 517 nm'deki absorbans 1.50 ± 0.25 olacak şekilde etanol ile ayarlama yapıldı. Stok yani numunelerden oluşturduğumuz ekstraktların ve standart olarak kullanılan antioksidanların (BHT, askorbik asit ve α -tokoferol) farklı konsantrasyonlarda (10-50 μ g/mL) numuneleri deney tüplerine ilave edilerek toplam hacimleri 2 mL olacak şekilde etanol eklenerek numune çözeltileri hazırlandı. Etanolik DPPH çözeltisinden 1 mL alınarak her bir numuneye eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 517 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elde edilen absorbans sonuçları kullanılarak yüzde

DPPH serbest radikali giderme aktivitesi ve IC₅₀ değerleri hesaplanarak grafiğe donusturuldu. Absorbansta oluşan duşuş giderilmiş olan DPPH radikali miktarını göstermektedir.

3.2.2.2 CUPRAC metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini

Haşaşa bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kisimlerinin etanol ekstraktlarının kuprik iyonu (Cu⁺²) indirgeme kapasitesi tayini Apak ve arkadaşları (2006) taraflarından geliştirildiği kuprak yöntemine değişik bir versiyonuna göre gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan deney tüplerine otomatik pipetleme kullanılarak 0.01 M' lık CuCl₂ ozeltisinden 0.25 mL aktarıldı. Daha sonra etanolde ozunen 7.5 mM' lık neokuprin ve 1 M'lık amonyum asetat tamponundan 0.25 mL eklendi. Deney tüpleri çalkalandıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10-50 µg/mL) bitki ekstraktları veya standartları ilave edildi. En son hacimler destile saf suyla 1 mL'ye tamamlandı. Yarım saat sonra bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbanları sistematik olarak olulup kayıt edildi. Tepkimenin artan absorbanı kuprik iyonlarının indirme kapasitesini ifade etmektedir.

3.2.2.3 FRAP yöntemine göre indirgeme kapasite tayini

Oyaizu (1986) metodunun geliştirilmiş bir versiyonuna göre haşaşa bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kisimlerine su ve etanol ekstreleri ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kuvveti yöntemine göre gerçekleştirildi. Stok ozeltilerinin değişik derişimlerini içeren numuneler deney tüplerine otomatik pipetleme yardımıyla eklendi ve destile saf su ile hacimler 2 mL'ye tamamlandı. Deney tüplerine 500 µL fosfat tamponundan (0.2 M; pH:6.4) ve 500 µL potasyum ferrisiyanür (%1'lik) ilave edildikten sonra etüvde 50°C' de 20 dakika inkübe edildi. Inkübasyon işlemi ardından tepkime ozeltisi deney tüplerine 500 µL %10'luk triklorasetik asit (TCA) eklendi. Oluşan ozeltiden 1.5 mL alınıp 375 mL destile edilmiş su ve 125 µL FeCl₃ (%0.1'lik) ozeltileri eklendikten sonra spektrofotometrede 700 nm'de absorban değerleri sistematik olarak olulup kayıt edildi.

Kullandığımız yöntemde, hazırlamış olduğumuz ozeltilerin renklerinin ortamda bulunan ve antioksidan özellik gösterdiği maddelerin indirgeme kabiliyetlerinin olmasından dolayı kompleks hale geldiklerinde ozeltilerin yeşil renklerinin tonları ortaya çıkması ve spektrofotometrede kaydedilen absorbanlarına uzanmaktadır.

3.2.2.4 ABTS katyon radikali giderme aktivitesi tayini

ABTS metodu yaygın olarak kullanılan radikal giderme yöntemlerinden birisidir. ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi, bitki ekstralarının ya da saf maddelerinin yapılarında bulunan katyonları gidermede kullanılan bir tahlil metodudur (Bursal, 2009).

Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının etanol ekstraktlarının ABTSradikal temizleme aktivitesi, Aras ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş oldukları çalışmaya göre belirlendi (Aras ve ark., 2017). ABTS katyon radikali 734 nm'de absorban veren renkli organik bir maddedir. Antioksidanlarla reaksiyona girdikten sonra ABTS radikalelektron transferi yoluyla radikal olmayan ABTS'ye dönüştürülür. Spektrofotometrede 734 nm'deki absorbansta azalma, antioksidan aktiviteyi gösterir.

Bu metot gerçekleştirilirken öncelikle ABTS maddesinin ABTS⁺ radikal formuna dönüşmesini sağlamaktır. Bu yüzden çalışmada 0.1 M K₂S₂O₈ (persülfat) ve 2 mM ABTS karışımları karıştırıldı. Karıştırılan çözelti karanlıkta oda sıcaklığında on iki saat magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Hazırlanan ABTS⁺ çözeltisinin kontrol numunesinin spektrofotometrede 734 nm'de absorbanı 1.00±0.20 değeri olacak şekilde ayarlandı. Edinilen sonuçların ortalaması kontrol absorbanı olarak kullanıldı. Deney tüplerine ABTS çözeltisi ile 10-50 µL arasında bitki ekstraları eklenerek deney tüpleri hazırlandı. Numuneler normal oda şartlarında, güneş ışığı almayan bir ortamda 30 dakika bekletildikten sonra absorbanları 734 nm de ölçüldü. Absorban değerlerindeki azalma miktarı ortamdaki giderilmiş ABTS⁺ radikal miktarını verir.

3.2.2.5 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi

Asetilkolinesteraz enzimi asetilkolinin hidrolizini katalizleyerek asetilkolinin tiyokolin ve asetata dönüşmesini sağlayan bir enzim olarak bilinmektedir. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan DTNB ise tiyokolin ile reaksiyonu sonucunda 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit meydana gelmektedir. 412 nm'de oluşan sarı renkli bileşiğin renk şiddeti ölçülmüştür (Ellman ve ark., 1961). Yaptığımız çalışmada 1 M Tris-HCl tampon çözeltisinden 20 µL alınarak deney tüpüne aktarılır. Üzerine 200 µL destile saf su derişimleri farklı bitki ekstralarını 10-50 µL arasında eklenip 10 mM DNTB çözeltisi ile enzim çözeltileri eklenerek hafifçe çalkalanır. İnkübasyon için etüv 30°C ayarlanır ve 5 dk. etüvde inkübe edilir. Daha sonra üzerine 10 mM'lık asetilkolin iyodür çözeltilerinden 10 µL eklenerek spektrofotometrede 421 nm'de absorban değerleri ölçülür ve kaydedilir.

3.2.2.6 HPLC ile fenolik bileşiklerin içerik analiz yöntemi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) çalışma prensibi hazırlanan çözeltilerde bulunan çözünen maddenin uygun çözelti içerisinde çözünmesi ve yüksek basınç altında yoğun bir şekilde kolon kısmından geçirilmesi temeline dayanmaktadır (Bingöl ve ark., 2018). HPLC cihazı kullanılarak, çalışma için hazırladığımız bitki ekstralarında bulunan fenolik bileşiklerin tespiti çalışmaları yapılmıştır. Bu metotta uygulanacak olan parametre standartları olarak Çözücü gradientleri, çözücü türleri, akış hızı, sıcaklık, kolon şartları ayarlanmıştır. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının etanol ekstratlarından HPLC metoduna göre numuneler cihaza yüklenmiştir. Aşağıdaki çizelgede yer alan parametreler cihazda çalışılmıştır.

HPLC cihazında bulunan mobil faz olarak Solvent A %1'lik asetik asit ve Solvent B %100 asetonitril çözücülerinden oluşmaktadır. HPLC metodu uygulanırken cihaz açılır ve bu iki çözücü sisteme takılır. İlk başta gazların pompadan çıkması sağlanır. Daha sonra sisteme A solventi ve B solventi giriş yapması sağlanarak sistemin dengelenmeye ulaşması sağlanır. Kolonların dengelenme işlemi doğru yani düz kromatogram (baseline) halini alana kadar sürmektedir.

Aynı zamanda bir yandan da kolonlara yüklemek için numune çözeltileri hazırlanır. Numune hazırlanırken %1 asetik asit ve asetonitril (9:1) içeren 10 mL çözücü karışımı hazırlandı ve bu karışım 10 mL metanol ile karıştırılarak ekstratların hazırlanmasında kullanılan çözücü hazırlandı. Haşhaş bitkisinin kapsül, yaprak sap ve kök kısımlarında 10 mg numuneler alınmıştır. Bu ekstratlar bu 1 mL ekstre çözücüsünde çözünür ve enjektörden numune alınarak filtreden süzülür yani vialde numune aktarılmış olur. Numuneler otosamlere konur ve cihaz yürütülür. HPLC cihazıyla yapılan bu analiz Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. HPLC analizleri için kullanılan deneysel koşullar

HPLC koşulları		Gradient elüsyonu		
Model	Agilent Technologies 1260 Infinity II	zaman(dk)	A(%)	B(%)
Kolon	ACE 5 C18 (250x4.6 mm id)	0	90	10
Kolon fırını	G7130A	25	60	40
Dedektör	1260 DAD WR	39	40	60
Pompa	1260 Quat Pump VL	50	10	90
Mobil faz	A: %1 Asetik asit B: Asetonitril	55	90	10
Dalga boyları	272, 280 ve 310 nm			
Otosampler	1260 Vialsampler			
Akış hızı	1 ml/min			
Kolon sıcaklığı	28 °C			
Enjeksiyon miktarı	20 ml			

3.2.2.7 Moleküler doking ve *in silico* analizler

Bilgisayar tabanlı teknoloji ile birlikte biyoinformatik yaklaşımları içerisine alan *in silico* analizler proteinler ile moleküller arası etkileşimin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Demirel, 2021) .

AChE hedef enziminin aktif bölgeleri ile bitkinin fenolik bileşiklerin arasındaki moleküler etkileşimi incelemek için Chimera ve AutoDock Vina hesaplama yazılımları kullanıldı (Bursal ve ark., 2021). AChE enziminin (insan, PDB id: 4EY7) kimyasal yapısı Protein Veri Bankası internet sitesinden (<https://www.rcsb.org/structure/4EY7>) indirilmiştir.

AChE enziminin yapısı Discovery Studio Visualizer programında optimize edildi. Optimize edilen enzim yapısı pdb formatında kaydedilerek Chimera yazılımına yüklendi. Bileşiklerin yapıları ChemAxon'un Marvin Sketch yazılımıyla çizildi. Yapılar pdb formatında kaydedildi ve Avogadro görselleştirme uygulamasında optimize edildi. Optimize edilen yapılar pdb formatında kaydedildi ve ligand olarak yüklendi. Daha sonra Chimera yazılımı başlatıldı (Shapovalov ve Dunbrack, 2011). En iyi doking moleküler etkileşim enerji değerleri ve bağlanma etkileşimleri Discovery Studio Visualizer'da analiz edildi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1 Bitki Numunelerinin Ekstrelerinin Hazırlanması

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kök, sap, yaprak ve kök kısımları laboratuvar blender yardımıyla öğütülüp toz haline geldikten sonra kök kısmından 10.05 gr, sap kısmından 10.35 gr yaprak kısmından 11.48 gr ve kapsül kısmından 15.00 gr tartılarak beherlere aktarıldı ve etiketlendirme yapılarak üzerlerine kök kısmına 100 mL etanol, sap kısmına 150 mL etanol, yaprak kısmına 110 mL etanol, kapsül kısmına ise 100 mL etanol eklenerek manyetik karıştırıcı ile 30 dk karıştırılmış ve beklenilmiştir. Karışımlar daha sonra balon jojeye süzgeç kâğıdı yardımıyla süzülüş ve süzüntüler yeşil renginin tonlarında elde edildi. Daha sonra karışımlar evaporatör yardımıyla 82°C sıcaklıkta etanollerinden uzaklaştırıldı ve balon jojelerin ağırlıkları tartıldı ve net ağırlıkları hesaplandı. Kök kısmından 0.247 g, sap kısmından 0.330 g, yaprak kısmından 0.123 g ve kapsül kısmından ise 0.159 g elde edildi. Böylece kök kısmı % 1.64 verim, sap kısmı % 3.18 verim, yaprak kısmı % 1.07 verim ve kapsül kısmı ise % 1.06 verim elde edildi. En yüksek verimi sap kısmı vermiştir. Balon jojeden bitki kalıntıları kazınarak kök kısmından 247 mg, sap kısmından 330 mg, yaprak kısmından 123 mg ve kapsül kısmından 150 mg tartılarak konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde kök kısmına 24.7 mL etanol, sap kısmına 33 mL etanol, yaprak kısmına 12.3 mL etanol ve kapsül kısmına ise 15 mL etanol eklenerek bitki ekstraları hazırlandı.



Şekil 4.1. Elde edilen bitki ekstraları

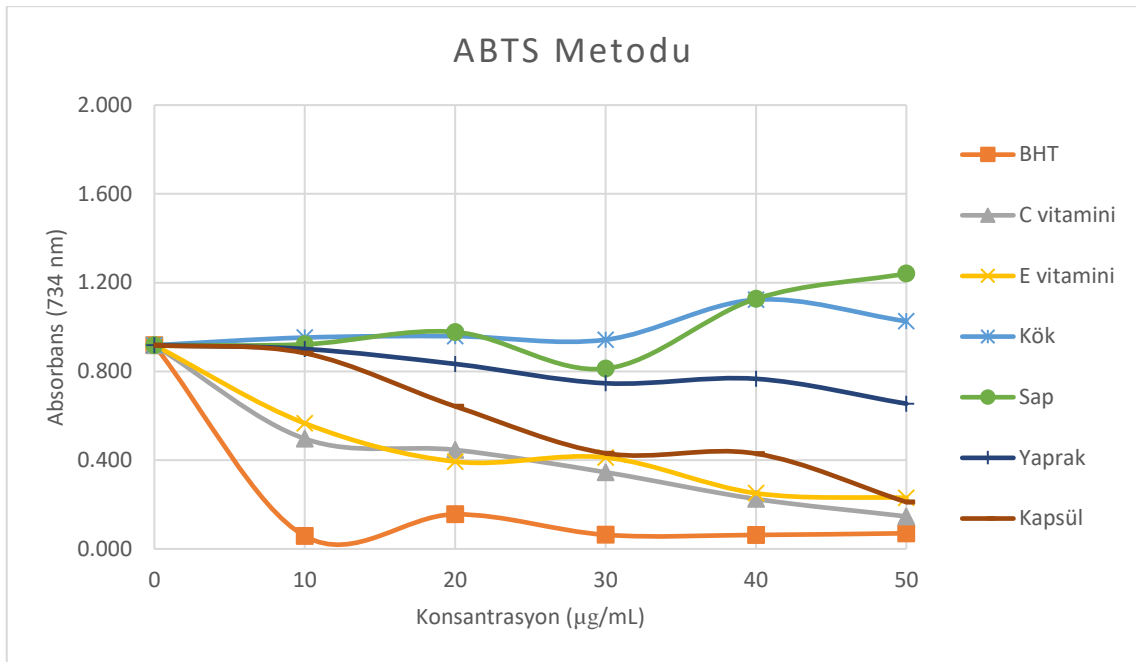
4.2. Bitki Numunelerinin Antioksidan Aktivite Tayinleri

Gıda, ilaç üretim ve tıp alanlarında kullanılmakta olan bitkilerin ve saflaştırma yöntemleri ile ortaya çıkan bitki biyoaktif bileşenlerinin biyolojik aktivitelerini belirlemek için antioksidan tayin metotları sıklıkla tercih edilip geniş kitlelerce kullanılmaktadır. Sıklıkla kullanılan tayin metotları arasında Total antioksidan aktivite metodu, FRAP, CUPRAC, Demir şelatlama kapasitesi, DPPH serbest radikali giderme yöntemi ve ABTS katyon radikali giderme yöntemi gelmektedir (Bursal, 2009). Bu çalışmamızda da hazırlamış olduğumuz ekstraktlardan antioksidan aktivite tayini belirlemek için farklı *in vitro* yöntemler kullanıldı. Bu kapsamda FRAP, CUPRAC, DPPH, ABTS yöntemleri kullanıldı ve elde edilen sonuçlar BHT, askorbik asit ve α -tokoferol gibi antioksidan aktivitesi bilinen standart antioksidanlarla stok çözeltiler hazırlanarak kıyas edildi.

4.1.1 ABTS yöntemi sonuçları

ABTS yöntemi, radikal giderme yöntemleri içerisinde en fazla tercih edilen yöntemlerden biridir. Bitki ekstresi ya da saf maddelerin radikal süpürmesi için yaygın olarak tercih edilen ve uygulanan bir analiz yöntemidir (Bursal, 2009). Absorbans değerlerindeki azalma miktarı ortamdan giderilmiş ABTS⁺ radikal miktarını vermektedir.

ABTS yönteminde ilk olarak ABTS radikalleri hazırlandı. Hazırlanan ABTS radikal çözeltisinin spektrofotometrede 734 nm'de absorbansı alınmış ve kontrol numunesinin absorbansı 1.0 ± 0.2 değeri olacak şekilde ayarlandı. Mikroplate kuyucuklarına haşhaşın kök, sap, yaprak ve kapsül ekstratlarından 10-50 μ L arasında mikropipetler yardımıyla alındı ve standart olarak kullanılacak antioksidanların (BHT, askorbik asit ve α -tokoferol) üzerine 200 μ L ABTS radikal çözeltisi ve distile su eklenerek son hacim 1000 μ L' ye tamamlandı. İnhibe edildikten sonra numunelerin absorbansları spektrofotometre de 734 nm ölçülerek absorbans değerleri kayıt edildi. Kayıt edilen absorbans verilerininin Microsoft Excel programından yararlanarak grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri μ g/mL cinsinden hesaplandı. Absorbans değişim grafiği Şekil 4.2'de verildi.



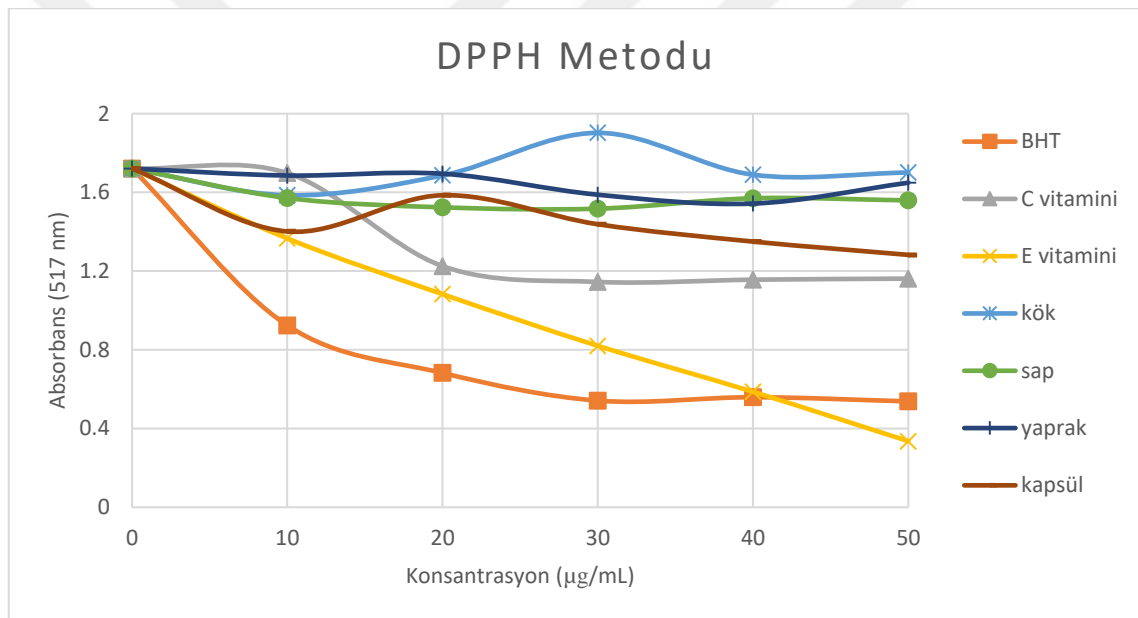
Şekil 4.2. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının etanol ekstraktlarının farklı derişimlerinin (10-50 µg/mL) ABTS+ giderme aktivitelerinin gösterimi

ABTS+ giderme aktiviteleri grafiğine göre; azalan absorbans miktarı kation radikal giderme aktivitesini ve dolayısıyla antioksidan aktivitesini verir. ABTS+ aktivitesi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHT, askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) bitki ekstraktlarına göre daha güçlü bir radikal giderme aktivitesi sergilediği görüldü. Şekil 4.2'ye göre en iyi etkiyi 50 µg/mL de BHT sergilerken, bunu sırasıyla askorbik asit (C vitamini), haşhaş kapsül, α -tokoferol (E vitamini), haşhaş yaprak, haşhaş kök ve haşhaş sap ekstraktları izledi. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmının absorbans değerlerinde ciddi bir azalma gözlenirken yaprak kısmının çok az bir miktar azalma gösterdiği, kök ve sap kısmının ise absorbans değerinde yani konsantrasyonunda artış olduğu görülmektedir. Yani haşhaş bitkisinin kapsül ekstraktında yüksek miktarlarda neredeyse standart antioksidanlar kadar ABTS+ radikali giderme aktivitesi gösterdiği ve iyi bir antioksidan özelliklerine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

4.1.2 DPPH yöntemi sonuçları

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) yöntemine göre de haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarından edinilen ekstraktların antioksidan potansiyelleri ölçüldü. Serbest radikal olarak DPPH'nin 0.1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Bunun için 39 mg DPPH 100 mL etanolde bir gün boyunca etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak manyetik karıştırıcı ile tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Bitki ekstraktlarından 10 mg/mL konsantrasyonunda çözeltiler olarak hazırlandı. Deney tüplerine ayrı ayrı

oluşturduğumuz ekstraktların farklı konsantrasyonlardaki (10-50 $\mu\text{g/mL}$) numuneleri ve standart olarak kullanılan antioksidanlar (BHT, askorbik asit, α -tokoferol) ilave edilerek herbirinin üzerine DPPH çözeltisinden 300 μL ilave edildi. Toplam hacimleri 2000 μL olabilecek şekilde etanol eklendi. 30 dakika normal şartlarda karanlıkta inkübe edildikten sonra mikrolate kuyucuklarına her bir numuneden 200 μL eklenerek UV-Vis spektrofotometrede 517 nm’de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Kontrol grubu olarak ise 1700 μL etanol çözeltisi pipetlenerek 300 μL DPPH çözeltisi kullanıldı. Kontrol absorbansının 1,500-2,000 arasında olması için etanol ile seyreltilme işlemi yapılarak DPPH radikali oranı ayarlandı. Kayıt ettiğimiz absorbans verilerini Microsoft Excel programından yararlanarak grafikler çizildi. Absorbansta oluşan düşüş serbest giderilmiş olan DPPH radikali miktarını göstermektedir.



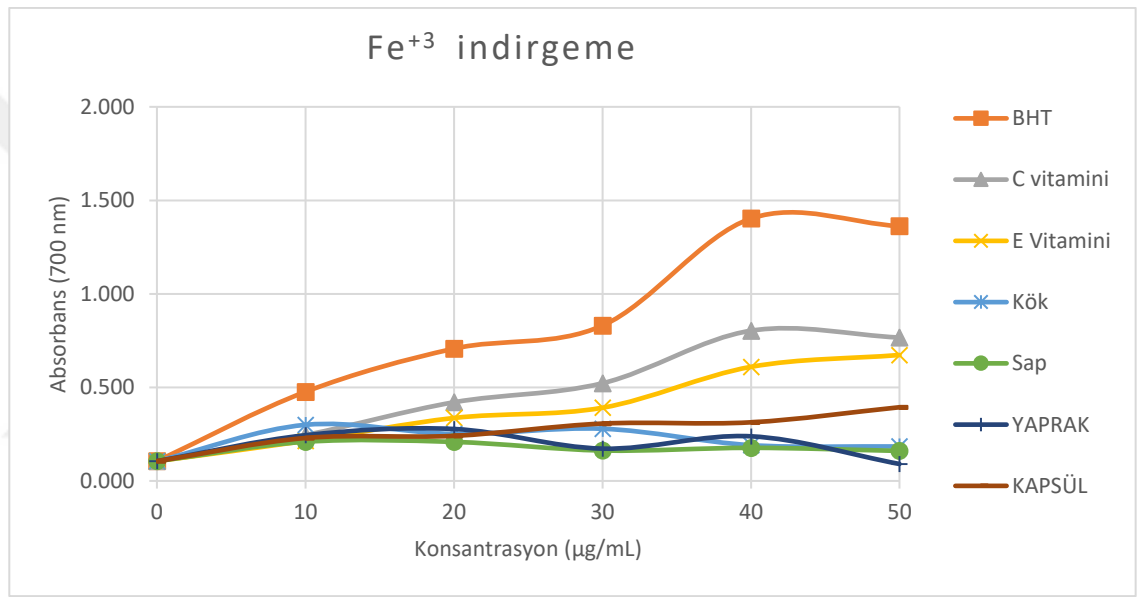
Şekil 4.3. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının etanol ekstraktlarının farklı derişimlerinin (10-50 $\mu\text{g/mL}$) DPPH• giderme aktivitelerinin gösterimi

DPPH serbest radikal giderme grafiğinde verilen sonuçlara göre standart olarak kullandığımız (E vitamini), BHT, askorbik asitin (C vitamini) ekstraktlara göre daha güçlü bir DPPH radikal giderme aktivitesi sergilediği görüldü. Şekil 4.3’e göre en iyi etkiyi 50 $\mu\text{g/mL}$ de α -tokoferol sergilerken, bunu sırasıyla BHT, askorbik asit, haşhaş kapsül, haşhaş sap, haşhaş yaprak ve haşhaş kök izledi. Bu ekstraktlar orta düzeyde DPPH serbest radikalleri ortamdaki gidermişlerdir. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmında absorbans değerlerinde azalma gözlenirken; kök, sap ve yaprak kısımlarının ise çok az bir miktar

azalma gösterdiği görülmektedir. Bu durumda haşhaş bitkisinin kapsül kısmının iyi bir antioksidan özelliklerine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

4.1.3 FRAP yöntemi sonuçları

FRAP indirgeme aktivitesi çalışmalarında 700 nm’de artan absorbans değerleri yüksek antioksidan aktivitesini vermektedir. Bu yöntemle görhazırlanan numunelerin spektrofotometrede dalga boyu 700 nm’de absorbansları ölçülerek absorbans değerleri kayıt edildi. Bu absorbans verileri Microsoft Excel programından kullanılarak grafikler çizildi.

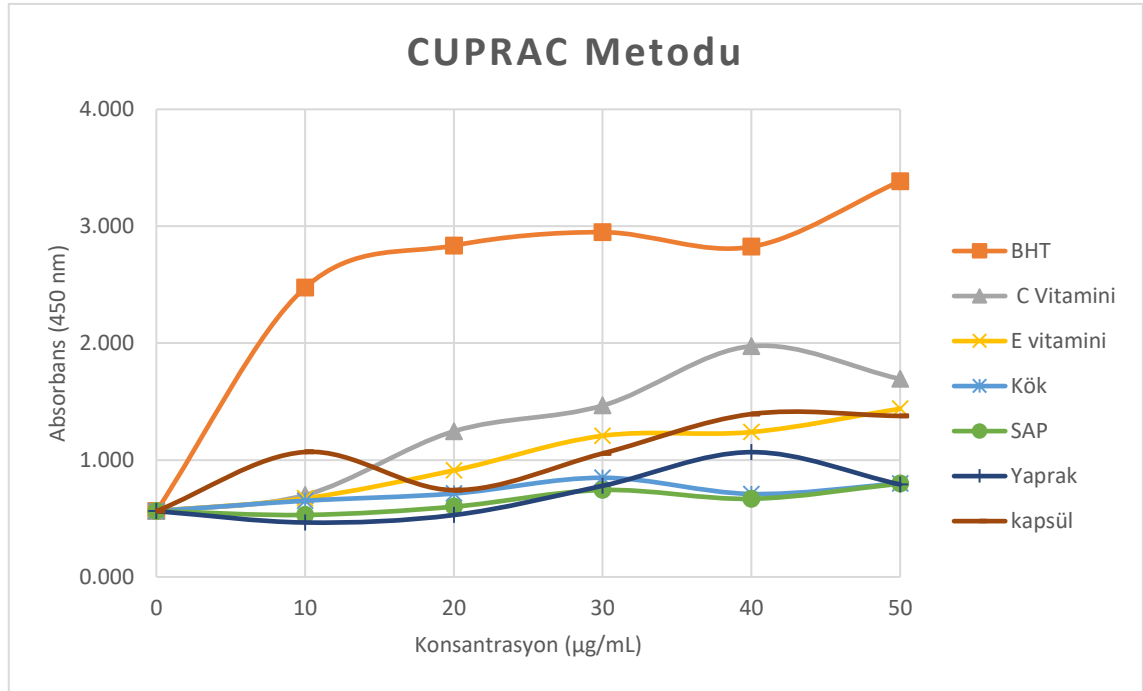


Şekil 4.4. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımları etanol ekstrelerinin farklı derişimlerinin (10-50 µg/mL) ferrik iyonlarını indirgeme kuvveti tayini

FRAP indirgeme aktivitesi grafiğine göre standartların indirme aktivitesi haşhaş bitkisinin kısımlarına göre çok daha yüksek olduğu, absorbans değerlerinin daha fazla yükselmesinden anlaşılmaktadır. Bu artma güçlü antioksidan etkisini göstermektedir. BHT etkisi en fazla bulunan antioksidan olup daha sonra sırayla askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), haşhaş kapsül, haşhaş kök, haşhaş sap ve haşhaş yaprak ekstreleri takip etmiştir. Haşhaş bitkisinin farklı kısımlarında konsantrasyon artışı çok fazla gözlenmemiştir. FRAP yöntemine göre bu ekstrelerin önemli bir oranda antioksidan özellikleri taşımadığı veya çok az bir miktar özellik taşıdığını göstermektedir.

4.1.4 CUPRAC yöntemi sonuçları

CUPRAC indirgeme aktivite çalışmalarında 450 nm’de artan absorbans değerleri güçlü antioksidan aktivitesini vermektedir. Deney tüplerine veya mikroplate kuyucuklarının her birine ayrı ayrı bitki ekstraktları ile standart maddelerin numuneleri yöntemdeki gibi eklendi. Çözeltilerin 30 dk. inkübasyon işleminden sonra UV-Vis spektrofotometrede dalga boyu 450 nm’de ölçülerek absorbans değerleri kayıt edildi. Kayıt edilen absorbans verilerini Microsoft Excel programından yararlanarak grafikler çizildi.



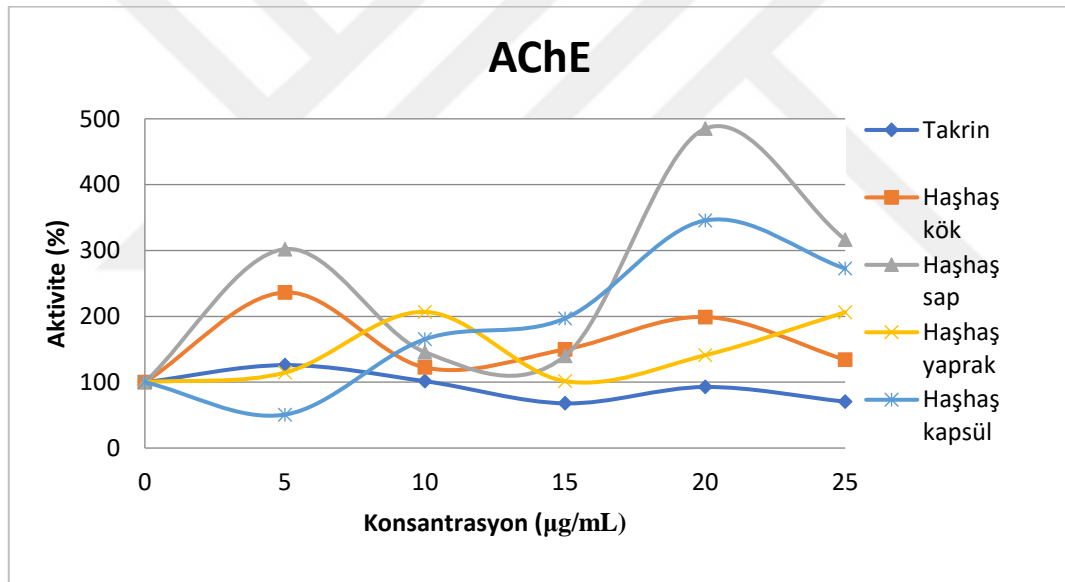
Şekil 4.5. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımları etanol ekstraktlarının farklı derişimlerinin (10-50 µg/mL) kuprik iyonlarını indirgeme kuvveti tayini

CUPRAC indirgeme aktivitesi grafiğine göre standartların indirme aktivitesi haşhaş bitkisinin kısımlarına göre daha yüksek çıkmıştır. Standartların absorbans değerleri artan konsantrasyon ile daha fazla artmıştır. Bu artma antioksidan etkisini göstermektedir. BHT etkisi en fazla olup daha sonra sırayla askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), haşhaş kapsül, haşhaş kök, haşhaş sap ve haşhaş yaprak ekstraktları takip etmiştir. Ancak haşhaş bitkisinin kapsül kısmının absorbans değeri, α -tokoferol absorbans değerine yakın olduğu görülmektedir. Haşhaş bitkisinin kısımlarında konsantrasyon artışı çok fazla gözlenmemiş olup bu da CUPRAC yöntemine uygun

antioksidan özellikleri göstermediği veya çok az bir miktar özellik taşıdığını belirtmektedir.

4.1.5 Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi sonuçları

Yapılan bu çalışmada yöntemde belirtildiği gibi mikrolate kuyucuklarının her birine reaktantlar ve bitki ekstre numuneleri eklendi. Absorbans ölçümleri her 1 dakikada kayıt edilecek şekilde 5 dakika boyunca takip edilerek spektrofotometrede dalga boyu 421 nm'de absorbans değerleri ölçülüp kaydedildi. Absorbans verilerini Microsoft Excel programından yararlanarak Aktivite %- [numune konsantrasyonu (μM)] grafiği çizildi. Elde edilen verilere göre bitki ekstraktlarının asetilkolinesteraz enzimini kaydadeğer olarak inhibe etmediği hatta bir miktar aktivite ettiğinden dolayı IC_{50} değerleri hesaplanamadı.



Şekil 4.6. Haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının AChE inhibisyonu

Bu çalışmada AChE inhibisyon yüzdeleri 5 $\mu\text{g/mL}$ - 25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları aralığında ölçülmüştür. AChE enziminin standart inhibitörü olan takrinle kıyaslandığında haşhaş bitkisinin sap kısmı 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda en yüksek inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur. Ancak, haşhaş bitkisinin diğer kısımları ise asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmediği aksine aktive ettiği bulunmuştur. Sonuçlara göre haşhaş bitkisinin kök sap, yaprak ve kapsül kısımlarının AChE aktive ettiği için inhibitör olmayıp aktivatör potansiyellerine sahip olduğu çıkmıştır. Ancak bu sonuçların farklı aktivite yöntemleri ve farklı konsantrasyonlar kullanılarak farklı deneysel koşullar ile

desteklenmesi gerekmektedir. Sonuç olarak haşhaş bitkisinin bu kurutulmuş kısımlarının AChE üzerine etkisi net olarak belirlenememiştir.

4.1.6 HPLC ile Fenolik Bileşik Tayinleri

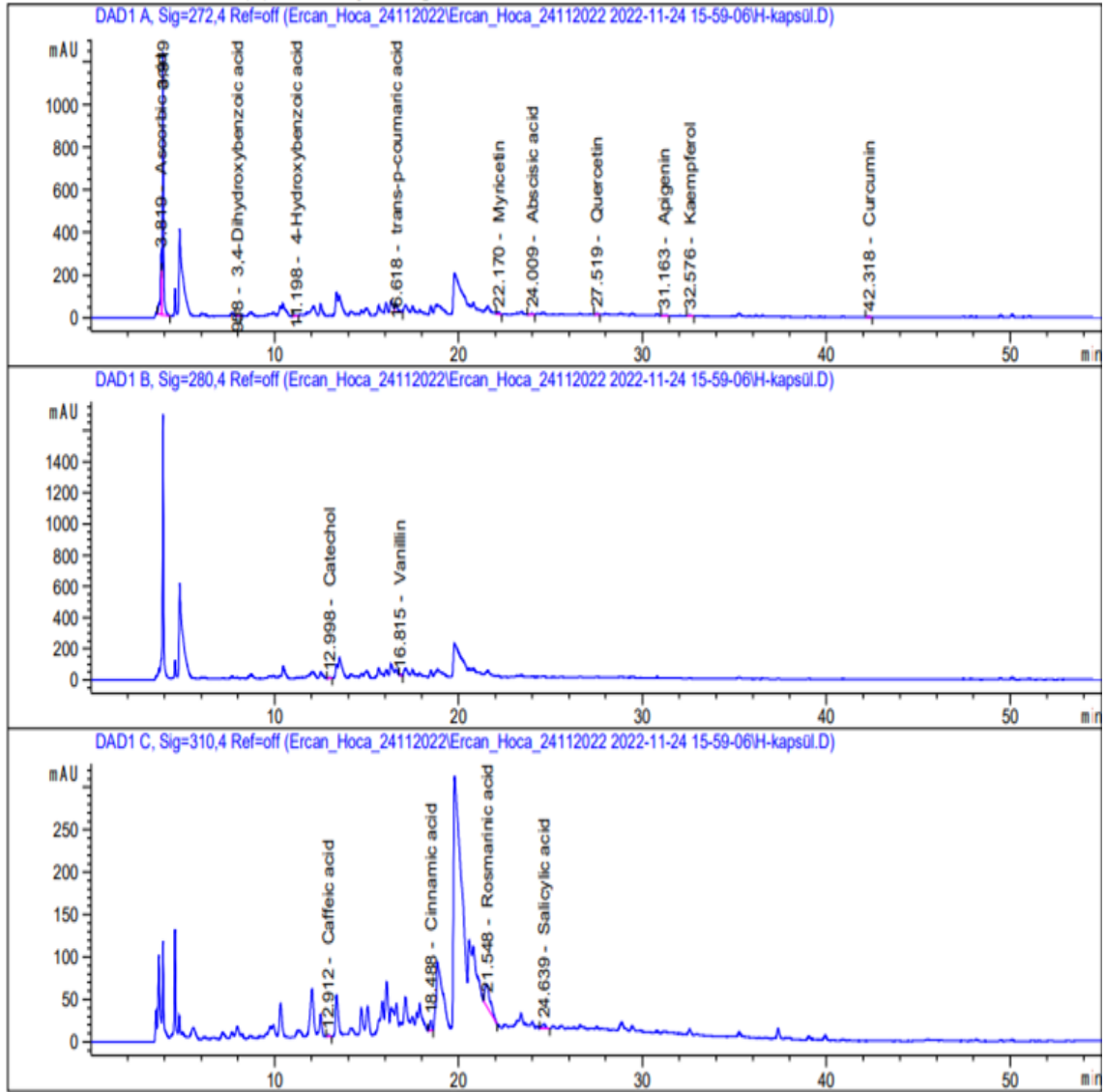
Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının etanol ekstraktlarının organik bileşik tayinleri HPLC yöntemi ile belirlendi. Bunun için on yedi (17) standart bileşik kullanılarak bitki ekstraktlarımızdaki kromatogramlar karşılaştırılmış ve içerikler kantitatif olarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının 272 nm, 280 nm ve 310 nm'deki ayrı ayrı ölçümleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kapsül kısmının etanol ekstresinin organik bileşikleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri

S.No	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area[mAU*s]	Miktar($\mu\text{g/mL}$)
1	Askorbik asit	3.82	1583	3.87 \pm 0.2
2	Gallik asit	5.41	ND	ND
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	7.95	31.6	ND
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.19	44.5	3.50 \pm 0.2
5	trans-p-kumarik asit	22.17	362.2	1.86 \pm 0.2
6	Mirisetin	22.17	82.0	5.81 \pm 0.2
7	Absisik asit	24.00	34.73	8.68\pm0.2
8	Quersetin	27.51	48.6	2.10 \pm 0.2
9	Apigenin	31.16	17.3	1.47 \pm 0.1
10	Kaemferol	32.57	24.0	6.38\pm0.2
11	Kurkumin	42.31	22.8	3.45 \pm 0.1
12	Katekol	12.99	49.6	2.89 \pm 0.2
13	Vanillin	16.81	28.3	ND
14	Kafeik asit	15.35	15.3	ND
15	Sinnamik asit	18.48	82.0	1.56 \pm 0.2
16	Rosmarinik asit	21.54	535.11	1.34 \pm 0.2
17	Salisilik asit	24.63	64.46	ND
N.D.;Tespit edilemedi.				

Elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kapsül kısmının etanol ekstresinin organik bileşiklerinin HPLC kromatogramları Şekil 4.7’de verilmiştir



Şekil 4.7. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmı etanol ekstresinin HPLC kromatogramları

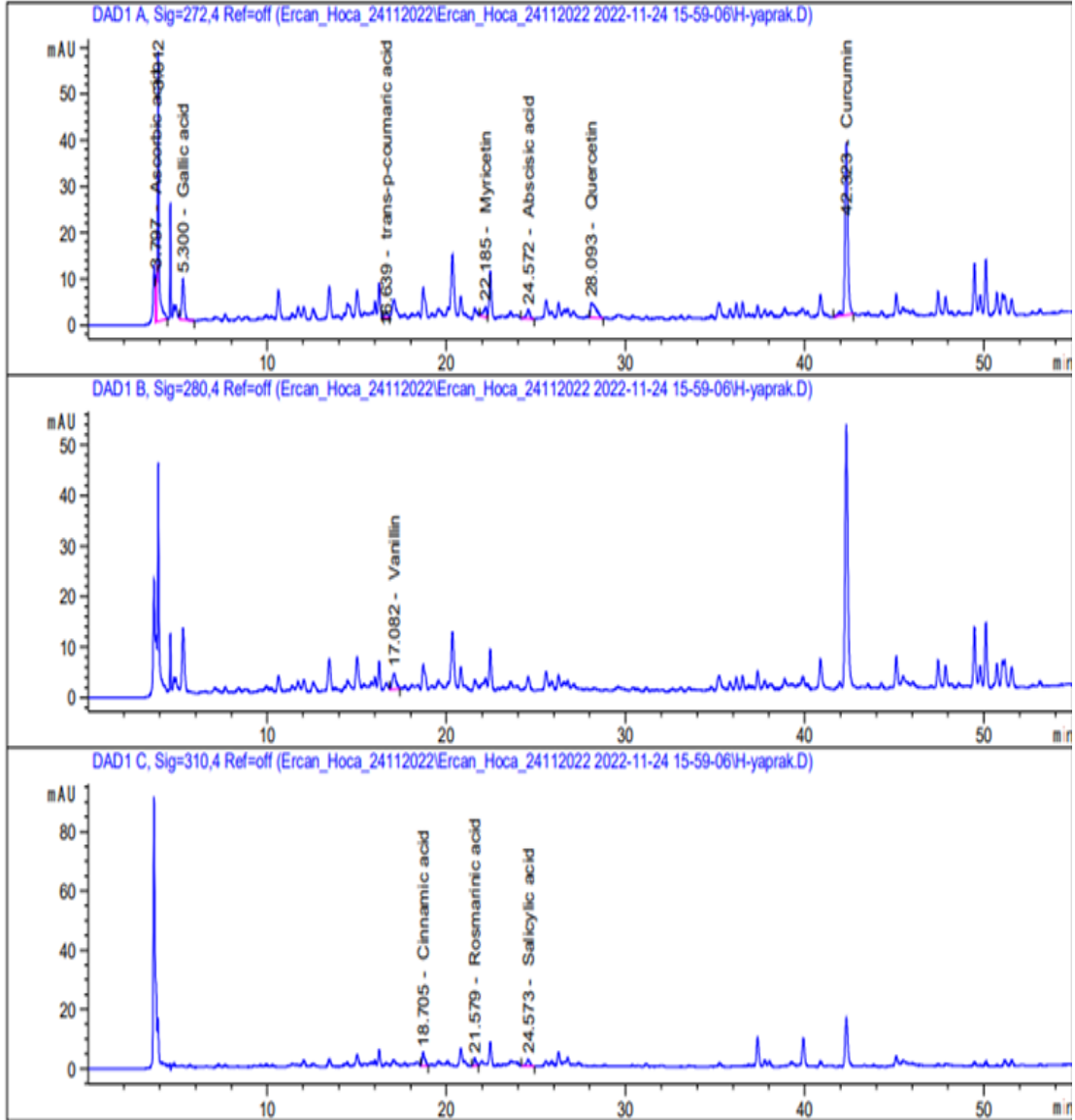
Çizelge 4.1 verileri ve Şekil 4.7’deki HPLC kromatogramlarından görüldüğü gibi haşhaş bitkisinin kapsül kısmının etanol ekstresinde kullanılmış olan toplam 17 standart bileşikten en fazla absisik asit bulunduğu belirlenmiştir. Haşhaş bitkisinin kapsül kısmının etanol ekstresinin HPLC kromatogramında ilk başta 272 nm’de askorbik asit (C vitamini) sırasıyla 3,4-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, trans-p-kumarik asit, mirisetin, absisik asit, quersetin, apigenin, kaempferol, kurkumin, 280 nm’de katekol, vanillin ve 310 nm’de ise kafeik asit, sinamik asit, rosmarinik asit, salisilik asit kromatogramları görülmektedir.

Benzer şekilde elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin yaprak kısmının etanol ekstresinin organik bileşikleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Haşhaş bitkisinin yaprak kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri

S.No	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area [mAU*s]	Miktar ($\mu\text{g/mL}$)
1	Askorbik asit	3.79	56.3	4.50 \pm 0.2
2	Gallik asit	5.30	89.1	ND
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	8.03	ND	ND
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.27	ND	ND
5	trans-p-kumarik asit	16.63	13.0	1.03 \pm 0.1
6	Mirisetin	22.18	28.1	8.76\pm0.2
7	Absisik asit	24.57	25.6	8.86\pm0.2
8	Quersetin	28.09	71.1	2.25 \pm 0.2
9	Apigenin	31.57	ND	ND
10	Kaemferol	32.59	ND	ND
11	Kurkumin	42.32	406.1	2.62 \pm 0.1
12	Katekol	13.05	ND	ND
13	Vanillin	17.02	45.8	ND
14	Kafeik asit	13.06	ND	ND
15	Sinamik asit	18.70	45.2	2.24 \pm 0.2
16	Rosmarinik asit	21.57	23.6	3.48 \pm 0.2
17	Salisilik asit	24.57	28.9	ND
N.D.;Tespit edilemedi.				

Elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin yaprak kısmının etanol ekstresinin organik bileşiklerinin HPLC kromatogramları Şekil 4.8’te verilmiştir.



Şekil 4.8. Haşhaş bitkisinin yaprak kısmının etanol ekstresinin HPLC kromatogramı

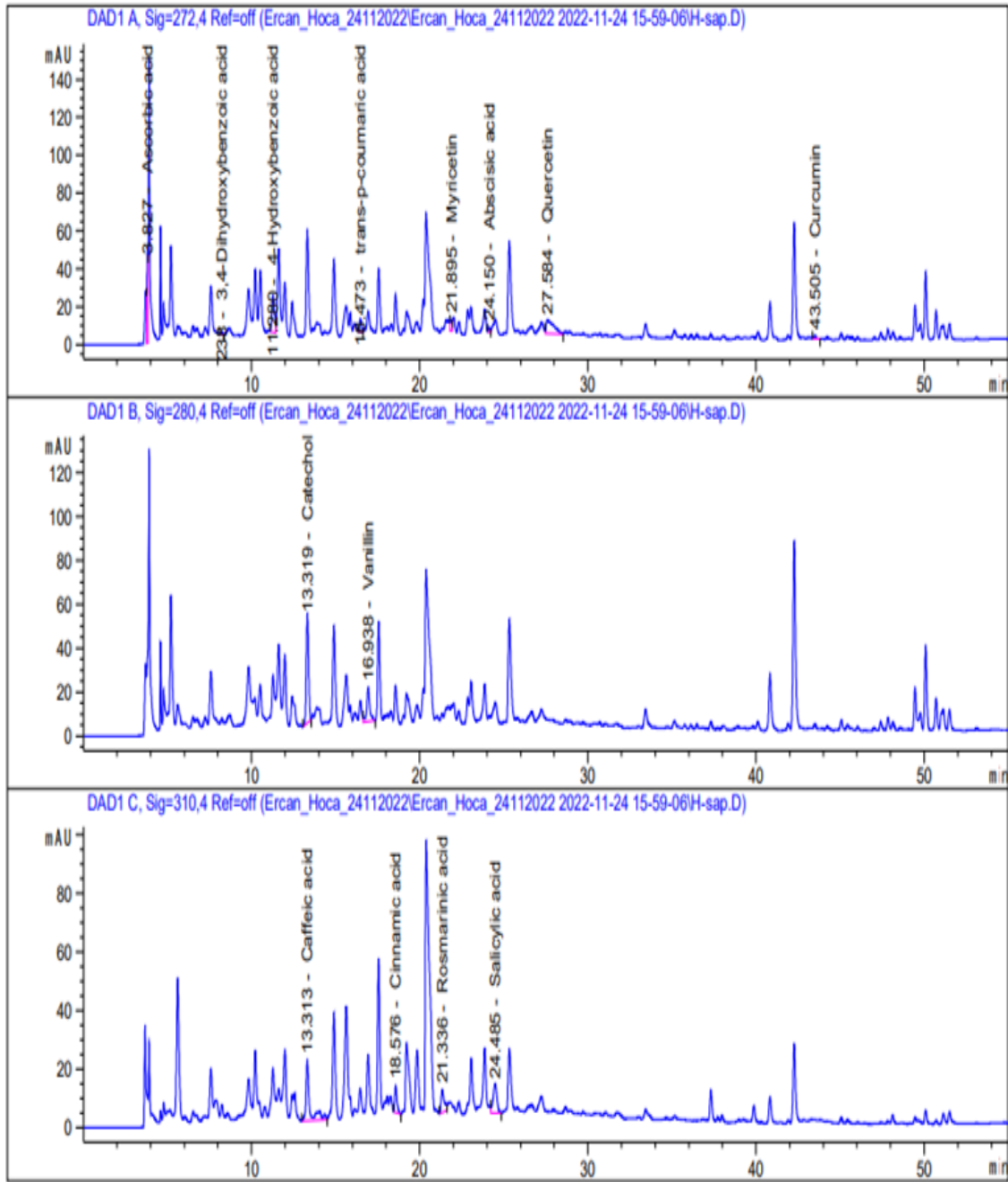
Çizelge 4.2 verileri ve Şekil 4.8'deki HPLC kromatogramlarından görüldüğü gibi haşhaş bitkisinin yaprak kısmının etanol ekstresinde kullanılmış olan toplam 17 standart bileşikten en fazla mirisetin ve absisik asitin bulunduğu belirlenmiştir. Haşhaş bitkisinin yaprak kısmının etanol ekstresinin HPLC kromatogramında ilk başta 272 nm'de askorbik asit yani C vitamini sırasıyla gallik asit, trans-p-kumarik asit, mirisetin, absisik asit, quersetin, kurkumin, 280 nm'de vanillin ve 310 nm'de ise sinamik asit, rosmarinik asit, salisilik asit pikleri görülmektedir.

Benzer şekilde elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin sap kısmının etanol ekstresinin organik bileşikleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Haşhaş bitkisinin sap kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri

S.No	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area[mAU*s]	Miktar($\mu\text{g/mL}$)
1	Askorbik asit	3.82	264.4	3.99 \pm 0.2
2	Gallik asit	5.41	ND	ND
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	8.23	8.6	ND
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.28	202.2	1.78 \pm 0.2
5	trans-p-kumarik asit	16.47	61.0	3.43 \pm 0.2
6	Mirisetin	21.89	47.9	6.90\pm0.2
7	Absisik asit	24.15	17.42	9.18\pm0.2
8	Quersetin	27.58	223.9	2.48 \pm 0.2
9	Apigenin	31.57	ND	ND
10	Kaemferol	32.59	ND	ND
11	Kurkumin	43.50	15.4	3.87 \pm 0.1
12	Katekol	13.31	481.2	3.06 \pm 0.2
13	Vanillin	16.93	198.4	ND
14	Kafeik asit	13.31	315.5	3.54 \pm 0.3
15	Sinamik asit	18.57	83.6	1.54 \pm 0.2
16	Rosmarinik asit	21.33	97.8	1.78 \pm 0.2
17	Salisilik asit	24.48	159.24	1.34 \pm 0.2
N.D.;Tespit edilemedi.				

Elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin sap kısmının etanol ekstresinin organik bileşiklerinin HPLC kromatogramları Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Haşhaş bitkisinin sap kısmının etanol ekstresi HPLC kromatogramları

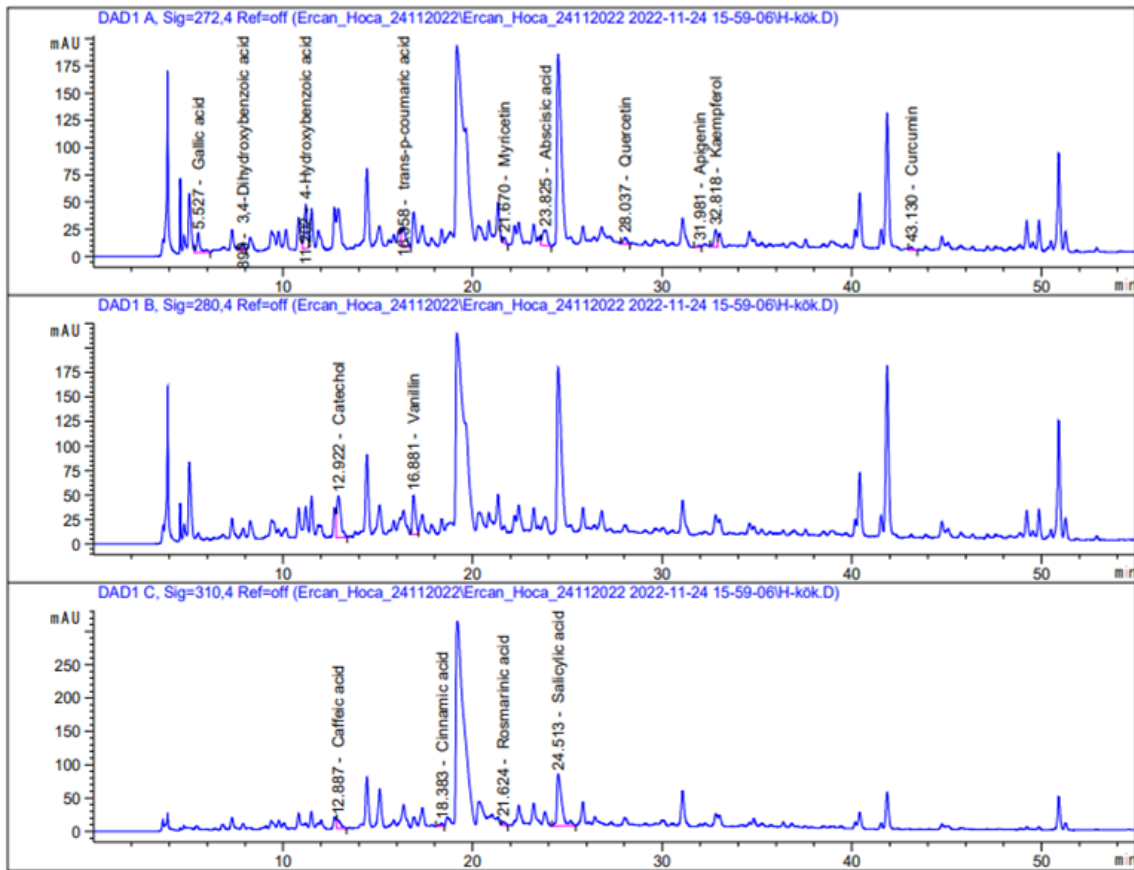
Çizelge 4.3 ve Şekil 4.9’da verilen verilere göre haşhaş bitkisinin sap kısmının etanol ekstresinde kullanılmış olan toplam 17 standart bileşikten en fazla absisik asit ve mirisetin bulunduğu belirlenmiştir. Haşhaş bitkisinin sap kısmının etanol ekstresinin HPLC kromatogramında ilk başta 272 nm’de askorbik asit yani C vitamini sırasıyla 3,4-Dihidroksibenzoik asit, 4-Hidroksibenzoik asit, trans-p-kumarik asit, mirisetin, absisik asit, quersetin, kurkumin, 280 nm’de katekol, vanillin ve 310 nm’de ise kafeik asit, sinamik asit, rosmarinik asit, salisilik asit pikleri görülmektedir.

Benzer şekilde elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kök kısmının etanol ekstresinin organik bileşikleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Haşhaş bitkisinin kök kısmı etanol ekstresinin HPLC yöntemiyle tespit edilen organik bileşikleri

S.No	Standart Bileşikler	RT(dk)	Area[mAU*s]	Miktar($\mu\text{g/mL}$)
1	Askorbik asit	3.77	ND	ND
2	Gallik asit	5.52	223.99	3.54 \pm 0.3
3	3,4-Dihidroksibenzoik asit	7.89	85.4	1.05 \pm 0.4
4	4-Hidroksibenzoik asit	11.20	405.3	1.53 \pm 0.2
5	trans-p-kumarik asit	16.35	259.28	1.98 \pm 0.2
6	Mirisetin	21.07	44.11	7.13\pm0.2
7	Absisik asit	23.82	259.07	8.25\pm0.2
8	Quersetin	28.03	75.93	2.27 \pm 0.2
9	Apigenin	31.98	16.43	1.45 \pm 0.1
10	Kaemferol	32.81	174.76	4.56 \pm 0.2
11	Kurkumin	43.13	31.97	3.20 \pm 0.1
12	Katekol	12.92	627.43	3.06 \pm 0.2
13	Vanillin	16.81	446.74	5.22 \pm 0.3
14	Kafeik asit	12.887	195.75	ND
15	Sinamik asit	18.38	40.59	2.41 \pm 0.3
16	Rosmarinik asit	21.62	56.12	2.18 \pm 0.2
17	Salisilik asit	24.51	1371.30	3.06 \pm 0.2
N.D.;Tespit edilemedi.				

Elde edilen sonuçlara göre haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kök kısmının etanol ekstresinin organik bileşiklerinin HPLC kromatogramları Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.10. Haşhaş bitkisinin kök kısmının etanol ekstresi HPLC kromatogramı

Çizelge 4.4 verileri ve Şekil 4.10'daki HPLC kromatogramlarından görüldüğü gibi haşhaş bitkisinin kök kısmının etanol ekstresinde kullanılmış olan toplam 17 standart bileşikten en fazla absisik asit ve mirisetin bulunduğu tespit edilmiştir. Haşhaş bitkisinin kök kısmının etanol ekstresinin HPLC kromatogramında ilk başta 272 nm'de gallik asit, 3,4-Dihidroksibenzoik, 4-Hidroksibenzoik asit, trans-p-kumarik asit, mirisetin, absisik asit, quersetin, apigenin, kaemferol, kurkumin, 280 nm'de katekol, vanillin ve 310 nm'de ise kafeik asit, sinnamik asit, rosmarinik asit, salisilik asit pikleri görülmektedir.

Sonuç olarak HPLC verilerine göre bitkinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının hepsinde de tespit edilen en fazla miktarda bulunan organik bileşik absisik asit olmuştur. Bunun yanında en fazla bulunan ikinci bileşik kapsül kısmı hariç üç kısımda da mirisetin, kapsül kısmında ise kaemferol olarak tespit edilmiştir. Fenolik bileşik içerik tespiti ile biyolojik aktivite birbiri arasında ilişkilidir. Bu bağlamda bitkinin farklı kısımlarının fenolik bileşik içerik analizi birbirleri ile uyumlu olduğu ve antioksidan aktivitesi sonuçları ile de korelasyonel bir ilişkisi olduğu tespit edilmiştir.

4.1.7 Moleküler doking ve *in silico* çalışmalar

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin içerik analizleri HPLC ile belirlenmiş olup bitkinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının hepsinde de kantitatif olarak tespit edilen en fazla miktarda bulunan organik bileşik absisik asit olmuştur. Bunun yanında en fazla bulunan ikinci bileşik kapsülde kaemferol diğer üç kısımda da mirisetin olarak tespit edilmiştir.

Bu bağlamda *in silico* enzim inhibisyonunun tespiti için AutoDock Vina bilgisayar programı kullanılarak AChE enzimi ile absisik asit, mirisetin ve kaemferol bileşikleri arasındaki moleküler etkileşimler bulunmuştur.

Moleküler doking çalışmaları sonuçlarına göre analiz edilen organik bileşiklerin bağlanma enerji seviyeleri belirlenmiştir. Moleküler bağlanma enerji seviyeleri AChE enzimini standart inhibitörü olan takrin molekülü ile karşılaştırılmıştır. Bitki ekstralarında en fazla miktarda bulunan fenolik bileşikler olan absisik asit, mirisetin ve kaemferol bileşiklerinin moleküler doking enerji seviyeleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Haşhaş bitkisinin majör fenolik bileşikleri ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimler

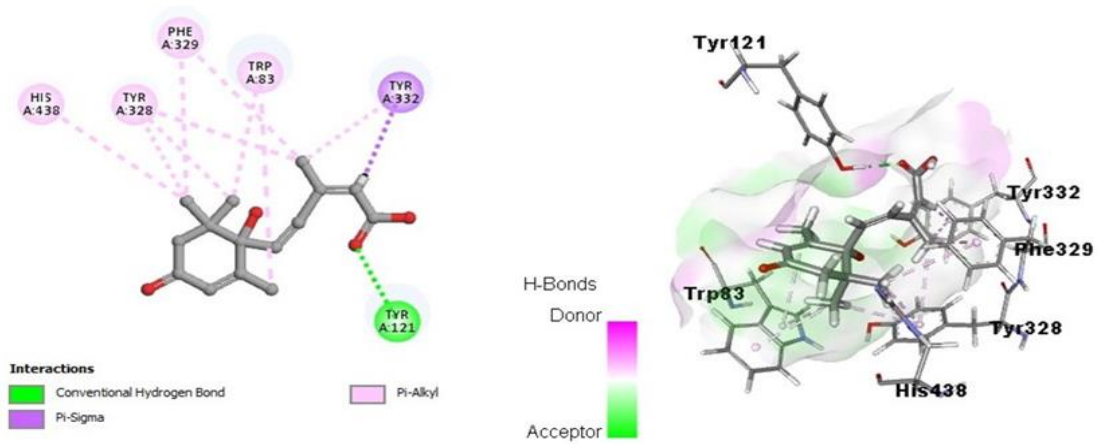
Bileşik adı	Affinite (Enerji)	Etkileşim bağ türü	Etkileşim Rezidüsü
Absisik asit	-7.9 kcal/mol	Konvansiyonel Hidrojen Bağı	TYR A:121
		Pi-Alkil	TRP A:83; TYR A:328; PHE A:329; HIS A:438
		Pi-Sigma	TYR A:332
Mirisetin	-9.2 kcal/mol	Konvansiyonel Hidrojen Bağı	TYR A:69
		Karbon-Hidrojen Bağı	VAL A:285
		Pi-Pi	TRP A:277; TYR A:332
		Donör-Donör	PHE A:286
Kaemferol	-9.3 kcal/mol	Konvansiyonel Hidrojen Bağı	TYR A:121; PHE A:286
		Karbon-Hidrojen Bağı	TRP A:277; VAL A:285
		Pi-Pi	TYR A:328; PHE A:329; TYR A:332

Bu sonuçlara göre majör bileşik olan absisik asit için bağlanma enerjisi -7.9 kcal/mol, mirisetin için -9.2 kcal/mol ve kaemferol için -9.3 kcal/mol bulunmuştur. Aynı yöntem ile standart inhibitör takrin için bu değer -8.7 kcal/mol olarak ölçülmüştür. Burada düşük enerji seviyesi enzim ile molekül arasındaki daha yüksek bağlanma etkileşimini göstermektedir. Bitkide bulunan bu majör fenolik bileşikleri ile AChE enziminin standart inhibitörü olan takrinin birbirlerine yakın bağlanma enerjileri belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre bağlanma etkileşim seviyeleri sırasıyla kaemferol, mirisetin, absisik asit, takrin şeklinde olmuştur. Genel olarak bağlanma türleri Konvansiyonel

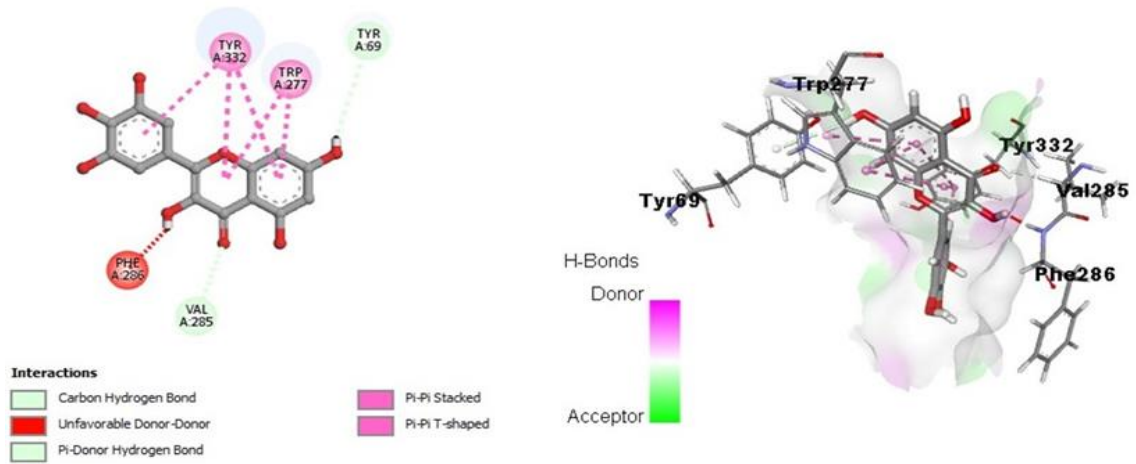
hidrojen bağları, Karbon-Hidrojen, Pi-Pi bağları ve diğer bağların detaylı olarak 2D ve 3D görüntüleri şekillerde gösterilmiştir.

Bu sonuçlara göre bitkinin majör fenolik bileşiği olarak tespit edilen absisik asit ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere absisik asit molekülü AChE enzimin aktif bölgesinin amino asit rezidüleri arasındaki etkileşimler; Konvansiyonel Hidrojen Bağı (TYR A:121), Pi-Alkil (TRP A:83; TYR A:328; PHE A:329; HIS A:438) ve Pi-Sigma (TYR A:332) şeklinde bulunmuştur.



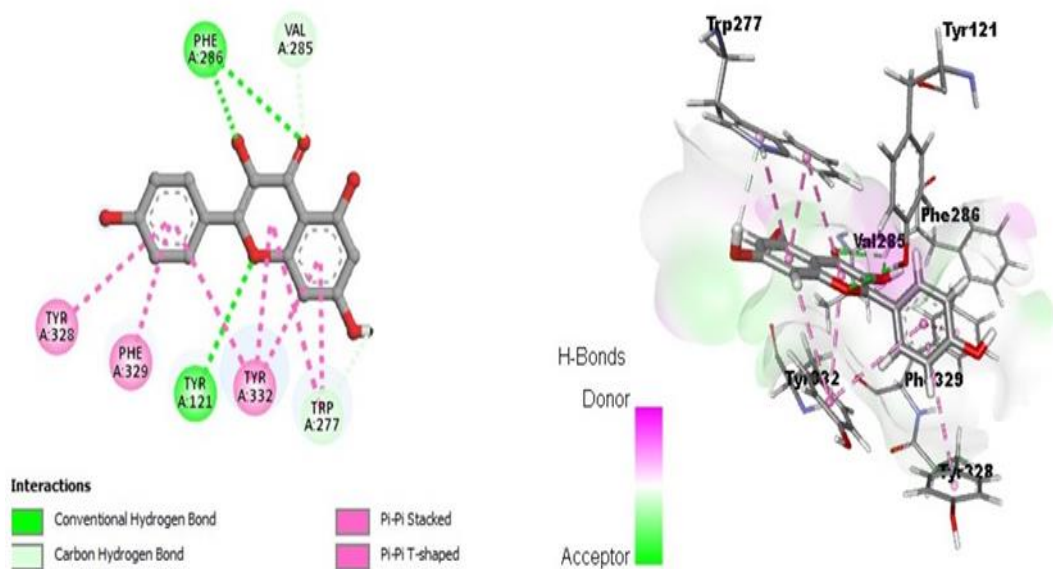
Şekil 4.11. AChE ile absisik asit arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri

Bu sonuçlara göre bitkinin ikinci sırada majör fenolik bileşiği olarak tespit edilen mirisetin ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere mirisetin molekülü AChE enzimin aktif bölgesinin amino asit rezidüleri arasındaki etkileşimler; Konvansiyonel Hidrojen Bağı (TYR A:69), Karbon-Hidrojen Bağı (VAL A:285), Pi-Pi bağı (TRP A:277; TYR A:332) ve Donör-Donör (PHE A:286) şeklinde bulunmuştur.



Şekil 4.12. AChE ile mirisetin arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri

Bu sonuçlara göre bitkinin diğer majör fenolik bileşiği olarak tespit edilen kaemferol ile AChE enzimi arasındaki moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere kaemferol molekülü AChE enzimin aktif bölgesinin amino asit rezidüleri arasındaki etkileşimler; Konvansiyonel Hidrojen Bağı (TYR A:121; PHE A:286), Karbon-Hidrojen Bağı (TRP A:277; VAL A:285) ve Pi-Pi (TYR A:328; PHE A:329; TYR A:332) şeklinde bulunmuştur.



Şekil 4.13. AChE ile kaemferol arasında moleküler etkileşimlerin 2D ve 3D görüntüleri

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisi, ülkemizde ve dünyada sağlık sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca gıda sanayisinde de kullanılmasına rağmen ekimi ve ziraatı sınırlı gerçekleştirilen geleneksel bir kültür bitkisidir. Eski çağlardan günümüze kadar yetiştirilmesinin sebebi tohumlarının yüksek yağ oranı içermesi ve yumru kapsüllerinin alkaloid bakımından zengin içeriğe sahip olmasıdır. İlaç sanayisinde haşhaşın kapsüllerinden ve kamış çubuğundan yararlanılırken; haşhaşın yumru tohumlarından ise fırıncılık ürünlerinde yararlanılmaktadır (Bernarth, 1998). Hızlı kuruma özelliğine sahip yağlardan olup sanayi, ressamcılık ve sabun imalatında yaygın olarak kullanılmaktadır. Haşhaş tohumlarının yağı çıkarıldıktan sonra kalan posa hayvanlara yem olarak değerlendirilmektedir (Özer, 2004). Bu posa özellikle büyükbaş hayvanlar için çok faydalıdır. Bu posayı tüketen hayvanların sütünden özellikle meşhur Afyon kaymağı elde edilmektedir (Küçük,1996).

Doğal ve aromatik bitkiler besin kaynağı olmalarının yanısıra antioksidan, antimikrobiyal, antibakteriyel gibi pek çok biyolojik aktiviteye de kaynak olacak içeriklere sahiptirler. Şimdiye kadar pek çok bitkinin serbest radikalleri gidererek antioksidan özellikler sağladığı belirlenmiştir (Bingöl ve Bursal 2018; Aras ve ark., 2018; Yılmaz ve ark., 2021).

Serbest radikaller oluşurken, insan sağlığına zarar verip çeşitli hastalıkların gelişmesine neden olmaktadır. Antioksidanlar, gıda endüstrisinde oldukça yaygın ve kolay erişilebilen maddelerdir. Tüketmekte olduğumuz hazır gıdaların birçoğunda katkı maddesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Antioksidanlar, yiyeceklerin erkenden küflenmemesine, bozulmamasına ve uzun süre saklı kalma da önemli role sahiptirler (Bursal ve ark., 2021). Antioksidan maddeler, lipid peroksidasyon zincir tepkimelerini meydana gelmesinde aktiftirler. Serbest radikaller ise bu reaksiyonu önlemede aktiftirler. Antioksidan moleküller, serbest radikalleri temizler ve etkisiz hale getirirler. Günümüzde hastalıkların önlenmesi için, bitkisel besinler sentetik maddelere kıyasla daha güvenilir ve tercih edilmektedir. Bu yüzden doğal antioksidan maddelerin önemi gün geçtikçe artmaktadır ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri araştırılmaya devam etmektedir.

Bu sebepten dolayı bu çalışmada haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin antioksidan aktiviteleri belirlemek hedeflenmiştir. Antioksidan tayinler için ABTS radikal giderme aktivitesi, DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi, FRAP (ferrik iyonları indirgeme gücü) ve CUPRAC (kuprik iyonları indirgeme

kapasitesi) *in vitro* biyoanalitik yöntemler olarak çalışıldı. Antioksidan çalışmalarda sonuçlar standart antioksidanlar BHT, askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) ile karşılaştırıldı.

Haşhaş bitki kısımlarının antioksidan tayininde kullanılan yöntemlerden olan ABTS ve DPPH yöntemleri maddelerin veya ekstrelerin radikal bileşikleri giderme esasına dayanmaktadır.

ABTS⁺ radikali giderme yöntemine göre haşhaş bitkisinin kapsül ekstresinde yüksek miktarlarda neredeyse standart antioksidanlar kadar katyon radikal giderme aktivitesi gösterdiği ve iyi bir antioksidan özelliklerine sahip olduğu görülmektedir. Diğer ekstrelerin ise kayda değer oranda antioksidan aktivite göstermediği belirlenmiştir.

DPPH serbest radikal giderme yöntemine göre ise de haşhaş bitkisinin kök, sap ve yaprak kısımlarının orta düzeyde antioksidan etki gösterdikleri görülmektedir. Ancak haşhaş bitkisinin kapsül kısmının ise diğer ekstrelere göre daha iyi bir antioksidan özelliklerine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Radikal giderme yöntemlerinin ikisinin de sonuçlarının birbiriyle anlamlı olduğu ve kapsül kısmının daha iyi antioksidan aktivite sergilediği sonucu çıkmaktadır.

Haşhaş bitki kısımlarının antioksidan tayininde kullanılan yöntemlerden FRAP ve CUPRAC yöntemleri ise maddelerin veya ekstrelerin radikal ve reaktifleri elektron vererek indirgeme gücü esasına dayanmaktadır.

FRAP yöntemine göre haşhaş bitkisinin kısımlarından elde edilen ekstrelerin konsantrasyon artışı ile absorbans artışı çok fazla gözlenmemiştir bu da çok güçlü antioksidan özellikleri taşımadığını veya az bir miktar özellik taşıdığı anlamına gelmektedir.

CUPRAC yöntemine göre de FRAP yöntemi gibi haşhaş bitkisinin ekstrelerinin konsantrasyon artışı ile absorbans artışı çok fazla gözlenmemiştir. FRAP ve CUPRAC indirgeme yöntemlerinin ikisinin de sonuçlarının birbiriyle anlamlı olduğu ve haşhaş bitkisinin orta düzeyde antioksidan aktivite sergilediği sonucu çıkmaktadır.

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin içerik analizleri HPLC ile belirlenmiş olup bitkinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının hepsinde de kantitatif olarak tespit edilen en fazla miktarda bulunan majör organik bileşik absisik asit olmuştur. Bunun yanında en fazla bulunan ikinci bileşik kapsül kısmı hariç üç kısımda da mirisetin, kapsül kısmında ise kaemferol olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonuçlarına göre haşhaş bitkisinin kök sap yaprak ve kapsül kısımlarının etnaol ekstrelerinde hem kalitatif hem de kantitatif olarak çok fazla miktarda

fenolik içeriğe sahip olduğu bulunmuştur. Bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlarda yer alan etkin madde analizi için fenolik bileşik içeriği tespiti oldukça önem arz etmektedir. Fenolik bileşik içerik tespiti ile biyolojik aktivite birbiri arasında ilişkilidir. Bu bağlamda bitkinin farklı kısımlarının fenolik bileşik içerik analizi birbirleri ile uyumlu olduğu ve antioksidan aktivitesi sonuçları ile de korelasyonel bir ilişkisi olduğu tespit edilmiştir (Kuskoski ve ark. 2005).

Enzim çalışmaları için sinir sisteminde önemli fonksiyonları olan AChE (asetilkolinesteraz) enzimi kullanılmıştır. Alzheimer için kullanılan ve amaçlanan ilaçlar, asetilkolin düzeylerini düzenlemek için kullanılmaktadır ve buna göre geliştirilmektedir (Heinrich ve Teoh 2004). Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin kısımlarının ekstrelerinin AChE enzimi üzerine etkisi *in vivo* ve *in silico* olarak belirlenmiştir.

In vivo enzim inhibisyonu çalışmasında asetilkolinesteraz enzimi için sıklıkla kullanılan biyoanalitik bir prosedür uygulanmıştır. Çalışmada AChE inhibisyon yüzdeleri 5 µg/mL-25 µg/mL konsantrasyonları aralığında ölçülmüştür. AChE enziminin standart bir inhibitörü kabul edilen takrinle kıyaslanmış ve haşhaş bitkisinin sap kısmı 20 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek inhibisyon yüzdesine sahip olmuştur. Haşhaş bitkisinin diğer kısımlarının ekstrelerinin asetilkolinesteraz enzimini aktive etmiş olup inhibe etmediği sonuçlardan görülmektedir. Sonuç olarak haşhaş bitkisinin kök, sap, yaprak ve kapsül kısımlarının AChE inhibitör potansiyeline sahip olmadığı aksine aktivatör olma potansiyelinin daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Haşhaş bitkisinin asetilkolinesteraz enzim inhibisyonunun farklı deney koşulları ve yöntemleri ile yapılmasının gerektiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında haşhaş bitkisinin farklı hastalıklara neden olan farklı enzimler üzerinde de enzim inhibisyon etkileri detaylı araştırılabilir.

In silico enzim inhibisyonunun tespiti için AutoDock Vina bilgisayar programı kullanılarak AChE enzimi ile absisik asit, mirisetin ve kaemferol bileşikleri arasındaki moleküler etkileşimler bulunmuştur. Absisik, mirisetin ve kaemferol fenolik bileşiklerinin bağlanma enerjileri olarak sırasıyla -7.9 kcal/mol, -9.2 kcal/mol ve -9.3 kcal/mol belirlenirken standart olarak bilinen takrin bileşiğinin bağlanma enerjisi -8.7 kcal/mol bulunmuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışması verilerine göre haşhaş bitkisinin orta düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğu anlaşılmaktadır. HPLC analizleri sonucunda da bitkinin zengin fenolik içeriklere sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu fenolik bileşiklerinin bitkinin antioksidan aktivitesinin yanında pek çok biyolojik aktivitesinin de kaynağı

olduğu düşünölmektedir. Haşaş bitkisinin ekstrelerinin veya etken maddelerinin farklı enzimler üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi çalışmalarının değerli olduğu ve bu alana katkı sunacağı düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- Abudak, M., 2014. Farklı renklerde Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Yağ asidi dağılımının ve Bazı Biyoaktif Bileşenlerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar
- Ames, B.M. Shigena, M.K. and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antiacidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 90, 7915-7922.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12 (7), 1496-1547.
- Aras, A., Doğru, M., Bursal E., 2016. Determination of antioxidant potential of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*, *Analytical Chemistry Letters*, 6:6, 758-765.
- Aras, A., Silinsin, M., Bingol, M. N., Bursal, E., 2017. Identification of bioactive polyphenolic compounds and assessment of antioxidant activity of *Origanum acutidens*. *International Letters of Natural Sciences*, 66.
- Aras, A., Bursal, E., Alan, Y., Turkan, F., Alkan, H., Kılıç, Ö., 2018. Polyphenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Satureja boissieri*. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 37(6), 209-219.
- Arslan, N., İpek, A., Sarıhan, E.O., Parmaksız, İ., Gümüşçü, A. ve Tanrıverdi, M.O. , 2011. Erzincan ilinde bulunan *Oxytona* Seksiyonundaki *Papaver Türlerinin* Tebain Yönünden Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar, *Türkiye IX. Tarla Bitkileri Kongresi 12-15 Eylül 2011*, Bursa
- Aslan R. Şekeroğlu, M.R. ve Bayıroğlu, F., 1995. Serbest radikal türlerin membran lipid perosidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma, *Sağlık Bilimleri Dergisi*.2,137-142.
- Atakişi, İ.K., 1991. Yağ bitkileri Yetiştirme ve Islahı, Ziraat Fakültesi Ders Notları Trakya Üniversitesi, Tekirda
- Baykal, A., 1998. Serbest radikaller, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, Kars.
- Baytop, T., 1974. Farmakognozi, *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, 1810, 1971-72.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 480.
- Bernarth, J., 1998. Poppy, The Genus *Papaver*, Harwood Academic Publisher, *The Netherlands*, Amsterdam.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*,181,1199-1200.
- Bingol, M.N., Bursal, E., 2018. LC-MS/MS Analysis of phenolic compounds and in vitro antioxidant potential of *Stachys lavandulifolia* Vahl. Var. *brachydon* Boiss. *International Letters of Natural Sciences*, 72, 28-36.
- Bozan, B., Temelli, F., 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*, 99: 6354-6359

- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, *Fen bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Buldurun, K., 2021. Chemical constituent and radical scavenging antioxidant activity of *Anthemis kotschyana* Boiss. *Natural Product Research*, 35(22), 4794-4797.
- Bursal, E., Yılmaz, M. A., Aras, A., Türkan, F., Yıldiko, Ü., Kılıç, Ö., Dey, A., 2021. Determination of phenolic content, biological activity, and enzyme inhibitory properties with molecular docking studies of *Rumex nepalensis*, an endemic medicinal plant. *Journal of Food and Nutrition Research*, 9(3), 114-123.
- Bursal, E., Abdülmelik, A., Doğru, M., Kılıç, Ö., 2021. Phenolic content, antioxidant potentials of *Saponaria prostrata* endemic plant. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 5(1), 1-8.
- Byers, T., Perry, G., 1992. Dietary catotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers, *Annual Review of Nutrition*. 12, 139-159, <https://doi.org/10.1146/annurey.nu12.070192.001035>
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192-208.
- Çapur, E., 2006. Haşhaş kapsüllerinde bazı metallerin atomik absorpsiyon spektrofotometre yöntemi ile saptanması ve orijin belirlemede önemi, Doktora Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara Üniversitesi, Ankara
- Çöllü, Z., 2007. *Urtica pilulifera* L. bitkisinin antioksidant aktivitesinin araştırılması, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- Davis PH., 1982. Türkiye Florası ve Doğu Ege Adası, Cilt. 7, *Edinburg Üniversitesi Yayınları*, Edinburg,
- Davis, P. H., Mill, R. R., and Tan, K., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 10. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- Demirel, F. (2021). Soyada Protein Disülfit İzomeraz'ların İn Silico Analizi . *Journal of Agriculture* , 4 (1) , 48-56 .
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V. and FeatherStone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109 Suppl 1: 69-75.
- Garnock-Jones P.J. and Scholes P., 1990. Alkaloid content of *Papaver somniferum* subsp. *setigerum* from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 28(3):367–369.
- Gevenkiriş A., Küçük Y. Nabi, Bulduk İ., Dinçer A., 2006. The development validation of the HPLC method for morphine content determination in concentrated poppystraw, *International Symposium on Chemistry Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids*, Antalya, Turkey, p:87

- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 pp. 909-930, 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Grutteridge, J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.
- Güzel E., Boğa R. And Bursal, E., 2013. Determination of antioxidant activities of *Asphodelus aestivus*. *Muş Alparslan University Journal of Science*, 1(1), 17-25.
- Haida, Z., Hakiman, M., 2019. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities *Food Science & Nutrition*, 7, 1555-1563, 10.1002/fsn3.1012.
- Hamre, K., Christiansen, R., Waagbø, R., Maage, A., Torstensen, B.E., Lygren, B., Lie, E., Wathne Albrektsen, S., 2004. Antioxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): Effects on growth performance and fillet quality *Aquaculture Nutrition*, 10 pp. 113-123, 10.1111/j.1365-2095.2003.00288.x.
- Hartman, R. E., 2010. Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. *Taylor & Francis Group, LLC*, chapter 16.
- Haspłova, K., Hudecova, A., Miadokova, E., et al., 2011. Biological activity of plant extract isolated from *Papaver rhoeas* on human lymphoblastoid cell line. *Neoplasma* 58 (5), 386–391.
- Hlinkova, A., Bednarova, A., Havrlentova, M. and Supova, J. , 2012. Poppy seed (*Papaver somniferum* L.): Effect of genotype and year of cultivation on variability in its lipid composition. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1:908-922.
- Ishtiaque S, Khan N, Siddiqui MA, Siddiqi R, Naz S. Antioxidant Potential of the Extracts, Fractions and Oils Derived from Oilseeds. *Antioxidants (Basel)*. 2013 Oct 15;2(4):246-56. doi: 10.3390/antiox2040246.
- İnan, Ş., Kaynak, M. A., Küçükbatan, F., 2016. Tarla Bitkileri. *Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (Özel sayı-):296-300
- İşler, N., Kolsarıcı, Ö., Gür, A., Başalma, D., Kaya, M.D., 2005. Yağlı Tohumlu Bitkiler Üretimi. Bursa.
- Jokanović, M., ve Maksimović, M., 1997. Abnormal cholinesterase activity: understanding and interpretation, *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 35(1), 11-16.
- Joy, P.P., Thomas, J., Mathew, S. and Skaria, B.P. 2001. Tropical Horticulture, Vol. 2, Chap. 4. *Medicinal Plants*. Naya Prokash, West Bengal, India. 771.
- Kadioğlu Y., 2011. Uşak' ta Haşhaş Tarımın Coğrafi Özellikleri. *Doğu Coğrafya Dergisi*. 12(18), 165-186
- Kaya N. , Lockwood B., 1999. A Study of the Alkaloids in callusing plant tissues from a range of Turkish cultivars of *Papaver somniferum*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23(4), 377-382. ,Türkiye
- Keha, E., Küfrevioğlu Ö. İ., 2000. Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, Erzurum

- Kıral, M., 2012. Turnike uygulanan ortopedi hastalarında İskemi- Reprefüzyon hasarı Sonucu oluşan oksidatif hasara karşı C ve E vitamininin koruyucu etkinliğinin araştırılması, Uzmanlık tezi, *Tıp fakültesi*, Başkent Üniversitesi, Ankara
- Kızılkaya, S., 2022. 1,2,3-triazol bileşiklerinin sentezi, karakterizasyonu, antioksidan aktiviteleri ve bazı metabolik enzimlere karşı In Vitro inhibisyon etkileri, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Muş Alparslan Üniversitesi, Muş.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732.
- Küçük Y.Ş.,1996."Türkiye`nin Çeşitli Yörelerinde Yetiştirilen Haşhaş Bitkilerinden Alkaloidlerin Ekstraksiyonu ve Ekstraktların Susuz Ortamlarda Özelliklerinin İncelenmesi", Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Krikorian, A.D., Ledbetter, M.C.,1975. Some observations on the cultivation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) for latex. *The Botanical Review*. 1975 Jan-Mar;41(1):30- 103.
- Larson, R.A., 1998. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.
- Mallis, R. J., Poland, B. W., Chatterjee, T. K., Fisher, R. A., Darmawan, S., Honzatko, R. B., & Thomas, J. A., 2000. Crystal structure of S-glutathiolated carbonic anhydrase III. *FEBS letters*, 482(3), 237-241.
- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levery, A., Duysen, E.G., ve Locridge, O., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine, *Neuroscience*, 110(4),627-639.
- Muhammad, A., Akhtar, A., Aslam, S., Khan, R. S., Ahmed, Z., Khalid, N., 2021. Review on phsicochemical medicinal and nutraceutical properties of poppyseeds: a potential functional food ingredient. *Functional Foods in Health and Disease*, 11(10), 522-547.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York. USA.
- Nelson, David L. and Michael M. Cox. 2008. Absolute Ultimate Guide for Lehninger Principles of Biochemistry.
- Palmer, T., Bonner, P. L., 2011. 1-An Introduction to Enzymes, Editor(s): Trevor Palmer, Philip L. Bonner, Enzymes (Second Edition), Woodhead Publishing, 2-13, ISBN 9781904275275, <https://doi.org/10.1533/9780857099921.1.2>.
- Oyaizu, M., 1986. Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özcan, M.M. & Atalay, Ç., 2006. Determination of seed and oil properties of some poppy (*Papaver somniferum* L.) varieties. *Grasas y Aceites*. 57(2) 169-174.
- Özer M., 2004. Tabiat Eczanesi. Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi. Bürde Yayınları.
- Pratt, D.E. and Hudson, B.J.F., 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants. Hudson B.J.F, Ed.; 17-192, Elsevier; Amsterdam, Netherlands.

- Pohanka, M., 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Papers*, 155(3),219-230,
- Pourmotabbed, A., Rostamian, B., Manouchehri, G., et al., 2004. Effects of Papaver rhoeas extract on the expression and development of morphine-dependence in mice. *J. Ethnopharmacol.* 95 (2–3), 431–435.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective *Journal of Controlled Release*, 113 pp. 189-207, 10.1016/j.jconrel.2006.04.015
- Rizvi, S., Raza, S.T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., Mahdi F., 2014. The role of Vitamin E in human health and some diseases, Sultan Qaboos University *Medical Journal*, J., 14 pp. 157-165/pmc/articles/PMC3997530/
- Rucker, RB. ve Steinberg, F., 2004. Vitamin C. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 4, 367-371.
- Rungratanawanich, W., Memo, M., & Uberti, D. 2018. Redox homeostasis and natural dietary compounds: Focusing on antioxidants of rice (oryza sativa L.). *Nutrients*, 10(11), 1605.
- Sarihan, E.O. 2004. Haşhaş (Papaver somniferum L.) Bitkisinin Verimi ve Bazı Özellikleri Üzerine Giberellik Asidin (GA3) Farklı Doz ve Uygulama Zamanlarının Etkisi, Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Saeed-Abadi, S., Ranjbaran, M., Jafari, F., et al., 2012. Effects of Papaver rhoeas (L.) extract on formalin-induced pain and inflammation in mice. *Pak. J. Biol. Sci.* 15 (21), 1041–1044.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekar, L. ve Leblebici, E., 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Ders Kitapları Serisi No: 116, Sayfa:396, İzmir
- Sise, H., 1997. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stres. Oxidative stres: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- Shapovalov, M. V., & Dunbrack, R. L., 2011. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*, 19(6), 844-858.
- Sharopov, F., Valiev, A., Gulmurodov, I., 2018. Alkaloid Content, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Various Parts of Papaver somniferum, *Pharmaceutical Chemistry Journal* , 52, 459–463. DOI: 10.1007/s11094-018-1839-9
- Smith, W. W., & Fletcher, H. R., 1949. XXII. The Genus Primula: Sections Cuneifolia, Floribundae, Parryi, and Auricula. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, 61(3), 631-686.
- Tanker, M. ve Tanker, N., 2003. Farmakognozi, Ankara Üni., Eczacılık Fak., Yayınları Cilt II. No: 66. Ankara.
- Teber, İ., 2019. Nepeta fissa ve nepeta nuda subsp. albiflora bitki türlerinin antioksidan aktivitelerinin farklı in vitro metotlar ile belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin hplc ile analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Muş Alparslan Üniversitesi, Muş

- Teber, I., & Bursal, E., 2020. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Nepeta nuda* subsp. *Albiflora*. *International Letters of Natural Sciences*, 79.
- TMO, 2020. Haşhaş Raporu 2019, *Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü*, Ankara,
- Todorova, T., Pesheva, M., Gregan, F., Chankova, S., 2014. Antioxidant, antimutagenic, and anticarcinogenic effects of *papaver rhoeas* L. extract on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Medicinal Food*. 18 (4), 460–467.
- Vašek, J., Čílová, D., Melounová, M., Svoboda, P., Vejl, P., Štikarová, R., & Ovesná, J., 2019. New EST-SSR markers for individual genotyping of opium poppy cultivars (*Papaver somniferum* L.). *Plants*, 9(1), 10.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview *Current Pharmaceutical Design* 10 pp. 1677-1694, 10.174/1381612043384655.
- Valko, M., Leibfritz, D., Monocol, J., Corinin, M. ve Mazur, M., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry ve Cell Biology*, 39, 44-84.
- Yeloğlu, İ., 2012. Karayosunlarının antioksidan aktivitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, *Eczacılık Fakültesi*, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Yücel Şengün, İ., Yücel, E. , Öztürk, B., Kılıç, G., 2020. Haşhaş (*Papaver somniferum*) çeşitlerinin tohum yağlarının yağ asidi kompozisyonu, toplam fenolik madde miktarı, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, *Gıda dergisi*, 45(5), 954-962. DOI: 10.15237/ gida.GD20061