T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

Ülkemizde Yetişen Bazı *Polygonum* Türlerinin Resveratrol İçeriği ve Kozmetik İlişkili Enzim İnhibitör Etkileri Bakımından Değerlendirilmesi

Proje No: 02/2020-08

Bağımsız Bilimsel Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Fatma Sezer ŞENOL DENİZ
Farmakognozi AD/Eczacılık Meslek Bilimleri

Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN
Farmakognozi AD/Eczacılık Meslek Bilimleri

Prof. Dr. Osman TUGAY
Farmasötik Botanik AD/Selçuk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Öğr. Gör. Ayhan İbrahim AYSAL
Farmasötik Kimya AD/ Eczacılık Meslek Bilimleri

Arş. Gör. Tuğsen DOĞRU
Farmakognozi AD/ Selçuk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Haziran 2021

ANKARA

TEŞEKKÜR

Projede araştırmacı olarak görev alan Arş. Gör. Tuğsen Doğru'nun Mayıs 2021 tarihinde Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi programı kapsamında başarıyla tamamladığı yüksek lisans tez çalışmasına 02/2020-08 kodlu proje ile maddi olanak sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne çok teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. *Polygonum* L. Cinsi	8
2.2. Resveratrol	9
2.3. Resveratrol kaynakları ve bazı *Polygonum* türlerinin resveratrol içerikleri	9
2.4. Kozmetik ilişkili enzimler	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1. Gereç	10
3.2. Yöntem	11
3.2.1. Ekstraksiyon ve örneklerin hazırlanması	11
3.2.2. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile resveratrol analizi	11
3.2.3. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile yapılan miktar tayini	12
3.2.4. Enzim inhibisyon tayin yöntemleri	12
4. BULGULAR	13
4.1. Ekstre verimine ait bulgular	13
4.2. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile resveratrol analizi tayinine ait bulgular	14
4.3. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile yapılan miktar tayinine ait bulgular	19
4.4. Enzim inhibisyon tayinlerine ait bulgular	19
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	20
6. KAYNAKLAR	22
EKLER	24

Ülkemizde Yetişen Bazı *Polygonum* Türlerinin Resveratrol İçeriği ve Kozmetik İlişkili Enzim İnhibitör Etkileri Bakımından Değerlendirilmesi

ÖZET

Bitkilerde patojenlere karşı oluşan fenolik yapıdaki resveratrol bir fitoaleksindir ve yerfıstığı (Arachis hypogea L.) ile şarabın yanı sıra üzüm kabuğu (*Vitis vinifera* L.) ve Japon madımağı (*Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.) gibi tıbbi bitkiler de ana kaynağını oluşturmaktadır. Resveratrol antienflamatuvar, kardiyoprotektif, antikanser, antioksidan, yaşlanma karşıtı etki gibi farklı farmakolojik özellikleri nedeniyle gıda desteği olarak satılmakta ve kozmetik ürünlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Polygonaceae familyasında yer alan *Polygonum* L. cinsi, ülkemizde 8'i endemik olmak üzere 43 takson ile temsil edilmektedir. Farklı türler üzerinde yara iyi edici, antienflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antioksidan, immünomodülatör, yaşlanma karşıtı ve östrojenik etki çalışmaları *in vitro*/*in vivo*/*in silico* yöntemler ile yapılmış olup, bu aktivitelerin bazılarından içeriğinde bulunan resveratrolün sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle *Polygonum* türleri, halk arasında gıda olarak ve tıbbi etkilerinden dolayı kullanılmasının yanı sıra resveratrol kaynağı olması nedeniyle de dikkat çekmektedir. Proje materyallerimizden *Polygonum aviculare* L., *P. cognatum* Meissn., *P. patulum* Bieb. subsp. *patulum* ve *P. setosum* Jacq. subsp. *setosum*, Konya ilinden Mayıs 2020'de toplanmıştır. Bitkilerin farklı kısımlarından hareketle hazırlanan etanollü ekstrelerde LC-MS QTOF analizi ile resveratrol saptanmamıştır. Ancak yapılan literatür taramasında son zamanlarda yapılan çalışmalar ile Japonya'da ve Çin'de resveratrol kaynağı olarak kullanılan *P. cuspidatum* türünün *Polygonum* cinsinden ayrılarak *Reynoutria* cinsine geçtiği ve tür isminin *Reynoutria japonica* olarak kabul edildiği saptanmıştır. *Polygonum* türlerinin toprak üstü kısımlarından ve köklerinden hazırlanan etanol ekstreleri, literatürdeki çalışmalar da dikkate alınarak kozmetik ilişkili elastaz, kolajenaz ve tirozinaz (TYR) enzim inhibitör aktiviteleri yönünden farklı konsantrasyonlarda ELISA mikroplak okuyucu kullanılarak test edilmiştir. *Polygonum* türlerinin kök ekstrelerinin orta derecede TYR inhibitör aktiviteye sahip olduğu, *P. cognatum* kök ekstresinin kolajenaz enzimine karşı güçlü inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. *P. aviculare* kök ekstresinin 333 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek anti-elastaz aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Ekstreler üzerinde yapılan LC-MS QTOF analizi ile kateşin ve kersetin glukozitlerinin etkiden sorumlu bileşikler olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Polygonum*, LC-MS QTOF, resveratrol, elastaz, kolajenaz, tirozinaz

Evaluation of Resveratrol Content and Cosmetic-Related Enzyme Inhibitory Activities of Some *Polygonum* Species Growing in Turkey

ABSTRACT

Resveratrol is a phytoalexin with a phenolic structure occurs against pathogens in plants and medicinal plants such as grape skin (*Vitis vinifera* L.) and Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) are its main source, as well as peanuts (*Arachis hypogea* L.) and wine. Resveratrol is sold as a food supplement due to its different pharmacological properties such as antiinflammatory, cardioprotective, anticancer, antioxidant, and anti-aging effects and is frequently used in cosmetic products. The genus *Polygonum* L., which is in the Polygonaceae family, is represented by 43 taxa, 8 of which are endemic in Turkey. The biological activity studies like wound healing, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antioxidant, immunomodulator, anti-aging, and estrogenic effects on different *Polygonum* species were conducted with *in vitro*/*in vivo*/*in silico* methods, and it was concluded that resveratrol was responsible for some of these activities. For this reason, *Polygonum* species attract attention because of being a source of resveratrol as well as being used as food and for medicinal effects in traditional medicine. The plant material of *P. aviculare* L., *P. cognatum* Meissn., *P. patulum* Bieb. subsp. *patulum* and *P. setosum* Jacq. subsp. *setosum* was collected from Konya in May 2020. Resveratrol was not detected by LC-MS QTOF in ethanolic extracts prepared from different parts of the plant species. However, based on the literature survey on recent studies, the *P. cuspidatum* species, which is used as a source of resveratrol in Japan and China, was distinguished from the *Polygonum* genus and passed into the Reynoutria genus; hence, now the accepted plant name is *Reynoutria japonica*. The ethanol prepared from the aerial parts and roots of *Polygonum* species were tested for cosmetic-related elastase, collagenase and tyrosinase (TYR) enzyme inhibitory activities at different concentrations using an ELISA microplate reader, considering the similar studies in the literature. Root extracts of *Polygonum* species were found to have moderate TYR inhibitory activity, and *P. cognatum* root extract showed potent inhibition against collagenase. Our results indicated that *P. aviculare* root extract had the highest anti-elastase activity at a concentration of 333 µg/mL. With the LC-MS QTOF analysis performed on the extracts, we concluded that catechin and quercetin glucosides might be the compounds responsible for the activities.

Keywords: *Polygonum*, LC-MS QTOF, resveratrol, elastase, collagenase, tyrosinase

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde bitkiler eski çağlardan beri insanlar tarafından, günlük semptomları gidermek, hastalıklardan korunmak, hastalıkları tedavi etmek gibi tıbbi amaçlarla kullanılmışlardır. Sentetik ilaçların geliştirilmesi ile eski popülerliğini kaybeden bitkiler, tıp dünyasının gelişmesi, yeni tedavi arayışları içerisine girilmesi, tamamlayıcı tedavi kavramının doğmasıyla yeniden önemli hale gelmiştir. Günümüzde ise bitkiler gerek doğrudan standardize ekstre formunda gerekse bitkinin hammadde kaynağı olarak kullanılması ile birçok hastalığın tedavisinde rol oynamaktadırlar. Bu nedenle yeni ilaç molekülü keşfinde bitkiler kolay erişilebilirlik ve ekonomik olmaları nedeniyle oldukça önemli kaynaklar arasındadır. *Artemisia annua* L. bitkisinde artemisininden geliştirilen antimalaryal ilaçlar ve *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill meyvelerinden geliştirilen hepatit tedavisinde kullanılan terapötik ajanlar, bitkisel kaynaklardan başarılı ilaç keşfinin tipik örnekleridir (Pan ve diğerleri, 2013). 2000-2006 yıllarında, aralarında galantamin, fizostigmin, artemisinin, kinin, tübokürarin, morfin, kamptotesin, paklitaksel gibi bileşiklerin de dahil olduğu toplam 26 adet bitki orjinli bileşik, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere piyasaya sürülmüştür (Saklani ve Kutty, 2008). Bu çalışmada yer alan *Polygonum* L. cinsi; kersetin, poligohomoizoflavanon, kemferol 3-glikozit, kardamomin, rutin, resveratrol, tetrahidroksistilbenglukozit, proantosiyanidin B2, ökaliptol, emodin, parietin, asetofen, β sitosterol, siteorezin, α-karyofilen, epikateşin, klorojenik asit ve skualen gibi önemli fitokimyasalları içermektedir (Narasimhulu, Reddy ve Mohamed, 2014; Nkuété, Migliolo, Wabo, Tane ve Franco, 2015).

Bu nedenle *Polygonum* türleri ekstre olarak kullanımlarının yanı sıra önemli bileşikleri barındırması nedeniyle önemli bir tıbbi bitkidir. Bu tez çalışmasında yurtdışında resveratrol kaynağı olarak kullanılan kabul edilen ismi *Reynoutria japonica* Houtt. olan *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. köklerinden yola çıkılarak, ülkemizde yetişen dört *Polygonum* türünün toprak üstü ve toprak altı kısımları resveratrol içerikleri yönünden LC-MS QTOF ile ilk defa incelenmiştir. Resveratrol, polifenolik yapıda bir fitoaleksindir ve bitkilerde stres durumlarına veya mantar enfeksiyonlarına karşı cevap olarak üretilmektedir. İlk defa *Veratrum grandiflorum* Loes. köklerinde tanımlanmış olup, kırmızı üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı ve Japon madımağı olarak bilinen *P. cuspidatum* türünün köklerinde yüksek oranda bulunmaktadır (Ratz-Lyko ve Arct, 2019). Resveratrol antienflamatuvar, kardiyoprotektif, antioksidan, antiaging ve antikanser gibi farklı farmakolojik özellikleri nedeniyle sağlık ve kozmetik ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Amerika'da gıda takviyesi olarak satılan resveratrol kapsüllerinin çoğu P. cuspidatum ekstresi içermekte, geriye kalanlarda ise kırmızı şarap veya kırmızı üzüm ekstreleri yer almaktadır. Toplanan *Polygonum* türlerinden hareketle hazırlanan etanol ekstreleri resveratrol içeriklerinin yanı sıra *P. multiflorum* kozmetik ürünlerde aktif ekstre olarak yer aldığı için ekstrelerin kozmetik ürünlerde kullanımı ile ilgili potansiyelleri de *in vitro* enzim inhibisyonu yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Elastin ve kolajen, bağ dokusunun ana bileşeni olan iki önemli proteindir. Elastin lifleri, cildin ana yük taşıyıcı bileşeni olan kolajen lifleri arasında dağınık, hassas bir ağ oluşturur (Oxlund, Manschot ve Vııdık, 1988). Bu proteinler cildin direnç ve elastikiyetinden sorumludur ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile indüklenen elastaz ve kolajenaz enzimleri ile parçalanmaları cilt yaşlanmasına eşlik eden kırışıklıklara neden olur. Tirozinaz (TYR) enzimi

ise mikroorganizma, bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan ve bakır içeren melanojenik bir enzimdir. Tirozinaz meyve ve mantarlarda enzimatik esmerleşmeye, insanlarda ise melanogenezise neden olmaktadır. Son zamanlarda hiperpigmentasyon tedavisi, cilt beyazlatıcı ve leke giderici amaçla kullanılmak üzere güvenli ve etkili TYR inhibitörleri arayışı önemli hale gelmiştir (Chang, 2009; Seo, Sharma ve Sharma, 2003).

Bu bilgiler ışığında *P. setosum* Jacq., *P. aviculare* L., *P. patulum* Bieb. ve *P. cognatum* Meissn. türlerinden hareketle hazırlanan ekstrelerin, kozmetik ilişkili elastaz, kolajenaz ve tirozinaz enzimlerini inhibe etme kapasiteleri de araştırılmıştır.
Bu nedenle bu çalışma ile ülkemizde yaygın olarak yetişen ve endemik tür açısından zengin olan *Polygonum* türlerinin resveratrol içeriklerinin değerlendirilmesi, alternatif kaynakların ortaya çıkarılması ve yeni biyolojik aktivitelerinin araştırılması açısından literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Polygonum* L. cinsi

Tek yıllık, çok yıllık veya çalımsı bitkiler veya tırmanıcı, periant segmentleri; hemen hemen eşit, serbest veya birleşik, petaloit, stamenler genellikle 8, stigmalar 2 veya 3 adet, meyveler üç açılı veya merceksi fındıksı, meyvede en azından periantın bir kısmı kalıcıdır (Coode ve Cullen, 1970).
Proje kapsamında topladığımız türlere ait bilgiler aşağıda yer almaktadır:

Polygonum aviculare L. (köyotu)
Tek yıllık otsu, gövde genellikle dik. Okrea internodlardan çok daha kısa, tabanda kahverengimsi, belirsiz damarlı. Yapraklar eliptik, en üstteki yaprakların aksillerinde çiçekler demet halinde. Periantlar 3 mm'den daha kısa, pembemsi veya beyaz, periant tüpü loblardan daha kısadır. Tohum 2,5-3 mm. Çiçeklenme zamanı: Temmuz-Kasım. Yükseklik 700 m (Coode ve Cullen, 1970).

Polygonum cognatum Meisn. (madımak)
Çok yıllık, ince odunsu, gövde yatıksı ve yaprağa benzer yeşil renkte. Okrea şeffaf, üç damarlı, göze çarpan, internod boyunca veya internodlardan daha uzun (nadiren daha kısa ve daha gevşek). Yapraklar oblong-eliptik, saplı ve genellikle hafif mukronat. Çiçekler, yaprak aksillerinde küme halinde. Periant pembemsi, 4-5 mm, meyvede büyüme devam etmekte. Tohum parlaktır. Çiçeklenme zamanı: Mayıs-Eylül. Yol kenarları, kayalık (Coode ve Cullen, 1970).

Polygonum patulum M. Bieb. (atmercimeleği)
Tek yıllık tüysüz, dik ve yükselici, boyu 20-60 cm. Gövde ince, beyazımsı çizgili, en fazla 3 mm kalınlığında. Yapraklar eliptik, darca eliptik veya linear oblong, 12-45 x 2-12 mm, dökülücü. Brakteler yapraklardan çok daha küçük. Çiçek durumu gevşek, uçta, her bir nodda 2-3 çiçekli, çiçekler 3-4 cm. Periant kalıcı ve tohumu çevreler, üç kanatlı-ovoit. Tohumlar genellikle parlak ve beneklidir. Çiçeklenme zamanı: Mayıs-Ağustos. 500-1800 m (Coode ve Cullen, 1970).

Polygonum setosum Raf. (ebemekmeği)

Çok yıllık, sert ve odunsu, gövde hemen hemen dallanmamış, dik, sıkı, tüysüz, 10-40 cm. Alttaki okrealar çentikli ve şeffaf. Yapraklar lineardan linear-lanseolata, düz veya nadiren dışa doğru kıvrık, grimsi yeşil, 5 mm'den daha az genişlikte. Çiçek durumu dallanmış spika. Periant beyazdan pembeye, pembe damarlı, yaklaşık 3 mm, braktelerden daha kısadır. Çiçeklenme zamanı: Temmuz-Eylül. Eğimli, kayaklı, yamaçlar. Yükseklik 1300-3500 m (Coode ve Cullen, 1970).

2.2. Resveratrol

Resveratrol, üzüm (*Vitis vinifera* L.), yer fıstığı (*Arachis hypogaea* L.), Japon madımağı (*P. cuspidatum* Sieb.et Zucc.) gibi bazı bitkilerin, mantar enfeksiyonu (*Botrytis cinereu*) gibi patolojik olaylar sonucunda veya ultraviyole (UV) zararına karşı bitkinin kendisini korumak amacıyla sentezlediği bir fitoaleksindir (Fremont, 2000; Giovinazzo, Ingrosso, Paradiso, Gara ve Santino, 2012). İlk olarak 1940 yılında keşfedilmiş, 1963 yılında *P. cuspidatum* köklerinden izole edilmiştir (Berman, Motechin, Wiesenfeld ve Holz, 2017; Nonomura ve diğerleri, 1963). Ayrıca *Botryosphaeria, Penicillium, Cephalosporium, Aspergillus, Geotrichum, Mucor* ve *Alternaria* gibi pek çok mantar türünün de resveratrol içerdiği tespit edilmiştir (Kataria ve Khatkar, 2019).

Resveratrolün 3,4,5-trihidroksi-*cis*-stilben ve 3,4′,5-trihidroksi-*trans*-stilben olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır ve biyolojik aktivitelerinden *trans* izomeri sorumludur (Fremont, 2000). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin terminolojisine göre; resveratrol, 5-[(E)-2-(4-hidroksifenil)etenil]benzen-1,3-diol olarak adlandırılmaktadır. Temel yapısında iki fenolik halka arasında çifte stiren bağı içermektedir. Bu nedenle doğada *trans* ve *cis* formları olarak bulunmaktadır (Thapa, Pandey, Park ve Sohng, 2019).

Resveratrol üzerinde antioksidan, antikanser, nöroprotektif, kardiyoprotektif, antienflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal, fotoyaşlanmayı önleyici ve fitohormonal etki çalışmaları bulunmakla beraber, resveratrolün çok geniş bir terapötik uygulamaya sahip potansiyel bir ilaç adayı olduğu da kanıtlanmıştır (Pangeni, Sahni, Ali, Sharma ve Baboota, 2014).

2.3. Resveratrol kaynakları ve bazı *Polygonum* türlerinin resveratrol içerikleri

İlk olarak 1940 yılında *Veratrum grandiflorum* (Maxim. ex Miq.) O. Loes. bitkisinde tespit edilen resveratrolün (3,4,5-trihidroksistilben), üzüm, çam ağaçları, yaban mersini ve baklagiller dahil olmak üzere 70'in üzerinde bitki türünde bulunduğu tespit edilmiştir (Cai, Knorr ve Smetanska, 2012; Takaoka, 1939). En zengin kaynaklardan biri olarak da Japon ve Çin geleneksel tıbbında önemli bir rol oynayan *P. cuspidatum* kökleri gösterilmektedir (Nonomura, Kanagawa ve Makimoto, 1963). Çin, *P. cuspidatum* kök ekstrelerinden hareketle *trans*-resveratrolün elde edilmesinde öncü ülkelerdendir. Birçok Çinli şirket (örneğin; Wuxi Gorunjie Technology Co. ve Shanghai DND PharmTechnology Co.), farklı saflık derecelerine sahip *trans*- resveratrol elde etmektedir (Kiselev, 2011).

2.4. Kozmetik ilişkili enzimler

Cildin genel yapısı dıştan içe doğru epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere 3 katmandan meydana gelmektedir. Epidermisten sonraki tabaka olan dermis; ince papiller

tabaka ve daha kalın retiküler tabaka olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Dermis, kolajen, elastin ve yapısal proteoglikanları üreten fibroblastlar ile immünokompetan mast hücreleri ve makrofajları içerir. Cildin özelliklerini korumasının yanı sıra cilt için nem kaynağı görevi yapar (Bensouliah ve Buck, 2006; Kusumawati ve Indrayanto, 2013). Cilt yaşlanması; zamanla oluşan kronik yaşlanma ve güneşe maruziyet ile oluşan fotoyaşlanma olmak üzere 2 tiptir. Yaşlanma ile yara iyileşme kapasitesinde azalma, kırışıklık oluşumu, elastikiyet kaybı, azalan oksijen ve besin kaynağı nedeniyle solgun bir cilt meydana gelir (Zouboulis ve Makrantonaki, 2011). UV radyasyon ile cilt yüzeyinin aşırı etkileşimi sürekli serbest oksijen radikallerinin oluşması ile fotoyaşlanma meydana gelir. Bu süreç matriks metalloproteinazlardan kolajenaz ve elastaz enzimlerinin ekspresyonunu artırarak ekstrasellüler matriks bileşenlerinden ve cildin korunması için gerekli olan kolajen ile elastinin parçalanmasına neden olur. Bu durum da cildin dayanıklılığını ve elastikiyetini etkiler, cildin kurumasına ve kırışıklık oluşmasına yol açar (Farage ve diğerleri., 2008; Kusumawati ve Indrayanto, 2013; Lee ve diğerleri., 2019). Bu bilgiler ışığında elastaz ve kolajenaz enzim inhibitörlerinin yaşlanma-karşıtı bileşik olarak değerlendirilme potansiyelleri bulunmaktadır.

Melanin, normal fizyolojik şartlarda UV radyasyonun %50-75'ini absorblayarak ve serbest oksijen radikallerini süpürerek fotoprotektif etki gösterir. Biyosentezinde TYR, L-tirozin'in 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin'e (L-DOPA) hidroksilasyonu ve L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonundan sorumludur. Cildin uzun süre UV radyasyona maruz kalması ile melanin üretimi artarak çiller, yaşa bağlı lekeler ve melazma gibi dermatolojik rahatsızlıklara neden olur. Yapılan çalışmalar melanin sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan TYR inhibisyonunun melanin birikimini azaltmada etkili bir yöntem olarak göstermektedir (Pillaiyar ve diğerleri., 2017; Lee ve diğerleri, 2019). Farklı *Polygonum* türleri üzerinde bahsi geçen enzimlere karşı etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da literatürde bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Deneysel çalışmalarımızda kullanılan bitkisel materyallerin toplanma veya temin edilme yerleri ve tarihleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Toplanan bitki materyalleri yaygın herbaryum tekniklerine göre preslenerek kurutulmuştur. Herbaryum materyali haline getirilen örnekler Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu'nda (KNYA) saklanmaktadır. Kurutulan örneklerin, Türkiye Florası ve Türkiye Bitkileri Listesi kaynakları kullanılarak bilimsel isimleri teşhis edilmiş ve Türkçe adları belirlenmiştir (Coode ve Cullen, 1970; Güner ve diğerleri, 2012).

Çizelge 3.1. *Polygonum* türlerinin toplanma yerleri, rakımı, tarihleri ve herbaryum numaraları

Tür Adları	Toplanma Yerleri, Rakımı ve Toplanma Tarihleri	Herbaryum no
Polygonum aviculare	C4 Konya; Çumra, Bozkır arası, step, 1060 m, 31.05.2020, *O.Tugay* 17.510 & *T.Doğru*	27634
Polygonum cognatum	C4 Konya; Hadim, Çalca mevkii, 1600 m, 31.05.2020 *O.Tugay* 17.528	27632
Polygonum patulum	C4 Konya; Çumra, Bozkır arası, step, 1060 m, 31.05.2020, *O.Tugay* 17.511 & *T.Doğru*	27633
Polygonum setosum	C4 Konya; Seydişehir yolu, 1570 m, 06.06.2020, *O.Tugay* 17.545 & *T.Doğru*	27631

3.2. Yöntem

3.2.1. Ekstraksiyon ve örneklerin hazırlanması

Toplanan bitki materyalleri, toprak üstü ve toprak altı kısımlarına ayrılmış, gölgede kurutulmuş ve toz edilmiştir. Daha sonra her bir örnek tartılmış ve üzerine %96'lık etanol ilave edilerek oda sıcaklığında 7 gün boyunca maserasyona bırakılmıştır. Gün boyunca çalkalayıcı yardımıyla çalkalanarak ekstraksiyonun verimi arttırılmıştır. Elde edilen ekstre, filtre kağıdından süzülmüştür. Kalan süzüntü, 40 °C'de düşük vakum altında rotavaporda (Büchi, İsviçre) kuruluğa kadar yoğunlaştırılıp, çözücüsüden kurtarılmıştır. Elde edilen kuru ekstre tartılarak verimleri (a/a) cinsinden hesaplanmıştır. Daha sonra enzim inhibisyonu deneylerinde ve kantitatif analizlerde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

Biyolojik aktivite çalışmaları arasında yer alan enzim inhibisyon tayin yöntemlerini gerçekleştirmek üzere ekstreler uygun miktarda tartılmış ve stok konsantrasyonları 5 mg/mL olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck, Almanya) içinde çözülmüştür. Taramaya dahil edilen saf maddeler de stok konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde DMSO içinde çözülmüşlerdir. İnhibisyonları yüksek çıkan ekstrelerden farklı dilüsyonlar hazırlanarak deneyler tekrarlanmış ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

3.2.2. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile resveratrol analizi

<u>Analiz parametreleri</u>

Analizler Agilent 1260 serisi HPLC sistemi ve bu sisteme bağlı Agilent 6550 iFunnel Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometre cihazında yapılmıştır (Agilent Technologies, Inc., CA, USA). MS sistemi Çift spreyli Agilent Jet Stream Elektrosprey iyonlaşma tekniğinde kullanılmış ve negatif modda analizler yapılmıştır. MS çalışma modu 2 GHz Extended Dynamic Range olarak belirlenmiş, kromatografik ayrım için Thermo Hypersil Gold C-18 (4.6 mm x 150 mm x 3 µm) kolon kullanılmıştır. Analiz ve veri değerlendirmelerde Agilent MassHunter Yazılım B06.00 ve Metlin Metabolit veritabanı kullanılmıştır. HPLC ve MS parametreleri Çizelge 3.2'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.2. HPLC ve MS parametreleri

Kolon	Thermo Hypersil Gold C-18 (4,6 mm x 150 mm x 3 µm)
Kolon Fırını	30 ◦C
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Analiz süresi	60 min.
Mobil Faz A	5 mM amonyum asetat
Mobil Faz B	Asetonitril
Akış	0,6 mL/dk
Akış programı	0 dk- 5 % B
	0,5 dk- 5 % B
	20 dk- 20 % B
	30 dk-40 % B
	38 dk- 70 % B
	42 dk- 90 % B

	50 dk- 90 % B
	50,1 dk- 5 % B
İyonlaşma modu	Negatif
Kurutucu gaz sıcaklığı	250 ◦C
Kurutucu gaz akış, N_2	14 L/dk
Nebulizer	20 psi
Sheath gaz sıcaklığı	375◦C
Sheat gaz akış, N_2	12 L/dk
Kapiler Voltaj	4500 V
Nozzle Voltaj	2000 V
Kütle okuma aralığı	100-1700 amu
Referans iyonlar	966,725

3.2.3. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile yapılan miktar tayini

Ekstrelerde resveratrol analizi için uygulanan koşulların aynısı kullanılmıştır. *Polygonum* ekstrelerinde kütüphane taraması ve literatür verileri ile varlığı saptanan kateşin, kersetin 3-glikozit ve kersetin 3-galaktozit bileşikleri için standart madde enjeksiyonu yapılarak doğrulama ve miktar tayinleri yapılmıştır.

3.2.4. Enzim inhibisyon tayin yöntemleri

<u>Elastaz inhibisyonu</u>

Elastaz enzim inhibisyonu Kraunsoe ve diğerleri'nin, Lee ve diğerleri tarafından modifiye edilmiş spektrofotometrik yöntemi kullanılarak test edilmiştir (Kraunsoe, Claridge ve Lowe, 1996; Lee ve diğerleri, 2009). Enzim kaynağı olarak domuz pankreatik elastazı (Tip IV, Sigma, EC 3.4.21.36) kullanılırken, substrat olarak N-Suc-(Ala)3-p-nitroanilit (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Yöntemin esası, substrattan salınan nitroanilin'in 410 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. 1,015 mM substrat 0,1 M Tris-Cl (pH 8,0) tamponunda hazırlanmış ve bu çözelti (130 µL) DMSO'da çözülen ekstreler (10 µL) ile 96 kuyucuklu mikroplakta karıştırılmıştır. Mikroplak 25 C°'de 5 dk ön-inkübasyona bırakıldıktan sonra 0,5 ünite/mL (15 µL) enzim solüsyonu eklenmiştir. Enzim eklendikten sonra mikroplak 25°C'de 30 dk inkübe edilmiş ve substrattan salınan p-nitroanilin miktarı 410 nm'de ELİSA mikroplak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Referans olarak oleanolik asit (Sigma), kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır Örneklerin % elastaz inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 4 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 4 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir.

% İnhibisyon = $100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$

A_1= Örnek çözeltilerinin 410 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2= Kontrol çözeltilerinin 410 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

<u>Kolajenaz inhibisyonu</u>

Kolajenaz enzim inhibisyonu Wart ve Steinbrink tarafından geliştirilen, modifiye edilmiş spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür (Barrantes ve Guinea, 2003; Van Wart ve

Steinbrink, 1981). Enzim kaynağı olarak *Clostridium histolyticum* kolajenazı (Sigma, EC 3.4.24.3) kullanılırken, substrat olarak N-(3-[2-furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. 0,8 ünite/mL enzim 50 mM trisin tamponunda (10 mM $CaCl_2$ ve 400 mM NaCl ile pH 7,5) çözülmüştür. Substrat FALGPA 2 mM olacak şekilde aynı tamponda çözülmüştür. 25 µL tampon, 25 µL DMSO veya ekstre ve 25 µL enzim 96 kuyucuklu mikroplak kuyucuğunda karıştırılmıştır. 15 dk ön-inkübasyondan sonra 50 µL substrat eklenmiştir. Absorbans 340 nm'de 20 dk boyunca 2 dk aralıkla ELISA mikroplak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Referans olarak (-)-epigallokateşin gallat (EGCG, Sigma), kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin % kolajenaz inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 4 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 4 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir.

% İnhibisyon = $100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$

A_1= Örnek çözeltilerinin 340 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2= Kontrol çözeltilerinin 340 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

<u>Tirozinaz inhibisyonu</u>

TYR enzim inhibisyonu Masamato ve diğerleri tarafından geliştirilen L-DOPA'nın (Sigma, ABD) substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik bir yöntemle tayin edilmiştir. (Lee ve diğerleri, 2009; Masamoto ve diğerleri, 1980). Substratın enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan dopakromun absorbansının 492 nm dalga boyunda ölçülmesi yöntemin esasını oluşturmaktadır. Yönteme göre, 96 kuyucuklu mikroplağa 10 µL örnek çözeltisi veya DMSO eklenecektir. Ardından 80 µL 67 mM fosfat tamponu (pH 6,8) ve 30 µL 5 mM L- DOPA ilave edilmiştir. 37°C'de 10 dk inkübasyonun ardından 30 µL mantar kaynaklı TYR (Sigma, EC 1.14.18.1) enzim solüsyonu eklenmiştir. 20 dk daha inkübasyondan sonra 492 nm'de absorbans ELISA mikroplak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) ölçülmüştür. Referans olarak alfa-kojik asit, kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin %TYR inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 4 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 4 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir.

% İnhibisyon = $100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$

A_1= Örnek çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2= Kontrol çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

4. BULGULAR

4.1. Ekstre verimlerine ait bulgular

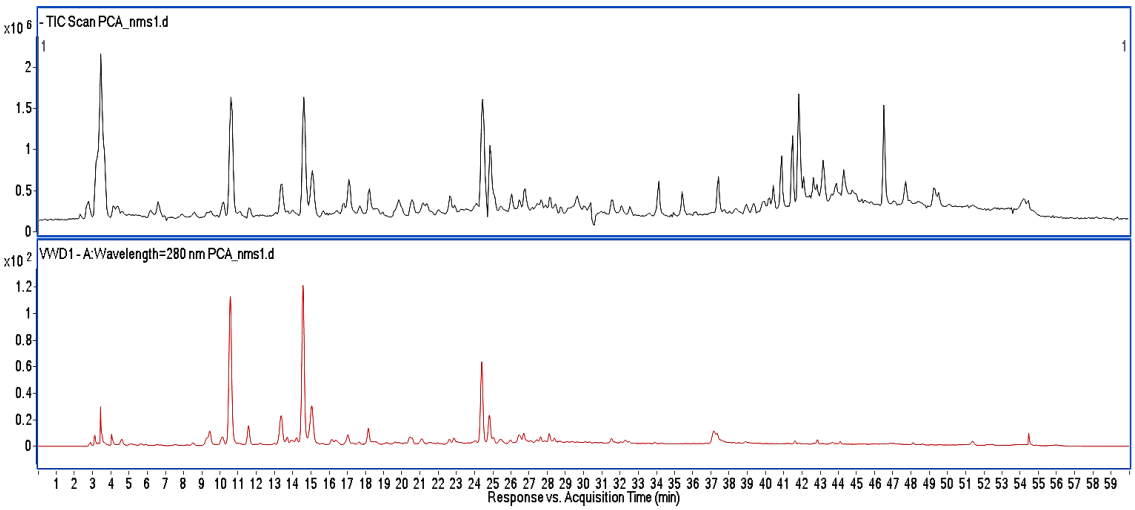
Proje gereçlerimizi teşkil eden bitkisel materyallerden hareketle hazırlanan etanol ekstreleri tartılarak hesaplanan % verimleri (a/a) Çizelge 4.1'de verilmektedir.

Çizelge 4.1. Hazırlanan etanol ekstrelerinin % verimleri (a/a)

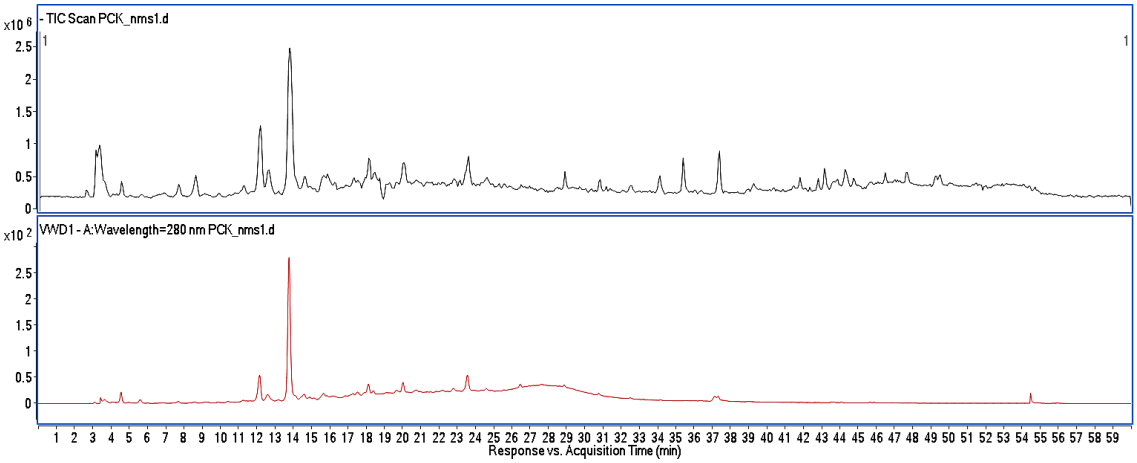
Bitki	Kısım	Tartılan bitki kısmı	Tartılan ekstre	% Verim (a/a)
P. aviculare	Toprak üstü	28,38 g	1,4928 g	5,26
	Toprak altı	29,43 g	1,4168 g	4,81
P. cognatum	Toprak üstü	14,6 g	0,765 g	5,24
	Toprak altı	52,26 g	2,2549 g	4,31
P. patulum	Toprak üstü	19,31 g	1,5271 g	7,91
	Toprak altı	7,71 g	0,135 g	1,75
P. setosum	Toprak üstü	20.07 g	0,9858 g	4,91
	Toprak altı	53,25 g	0,8315 g	1,56

4.2. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile resveratrol analizi tayinine ait bulgular

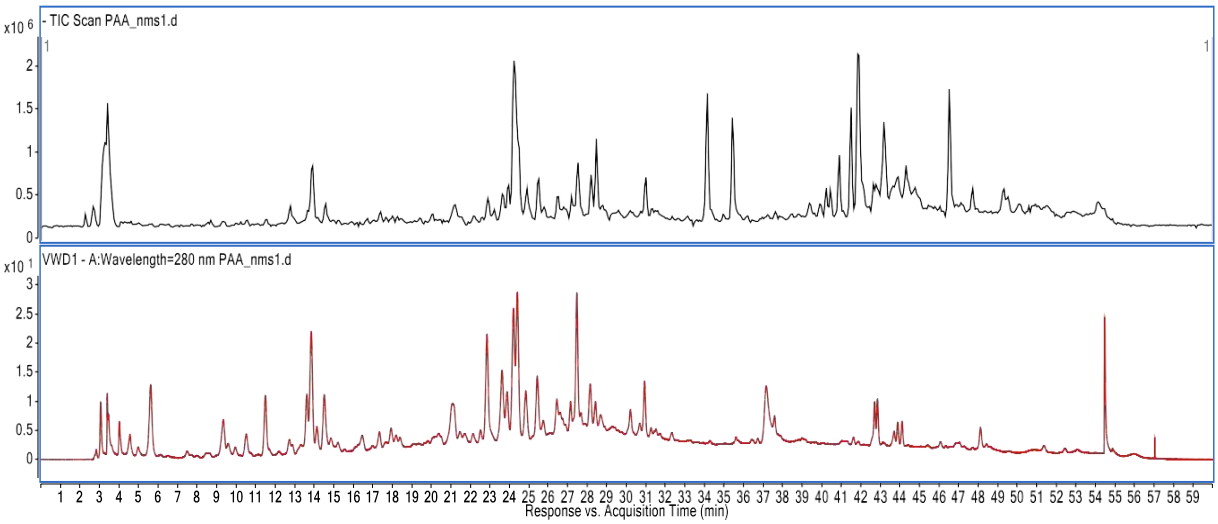
Polygonum örneklerinden hazırlanan etanollü ekstrelerin, içerdiği bileşenlere ait kromatogram görüntüleri Şekil 4.1- Şekil 4.8'de, resveratrole ait kromatogram görüntüleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmektedir. Şekil 4.11'de resveratrole ait ön kütüphane taraması görüntüsü verilmektedir. Resveratrole ait kalibrasyon grafiği Çizelge 4.2'de yer almaktadır.



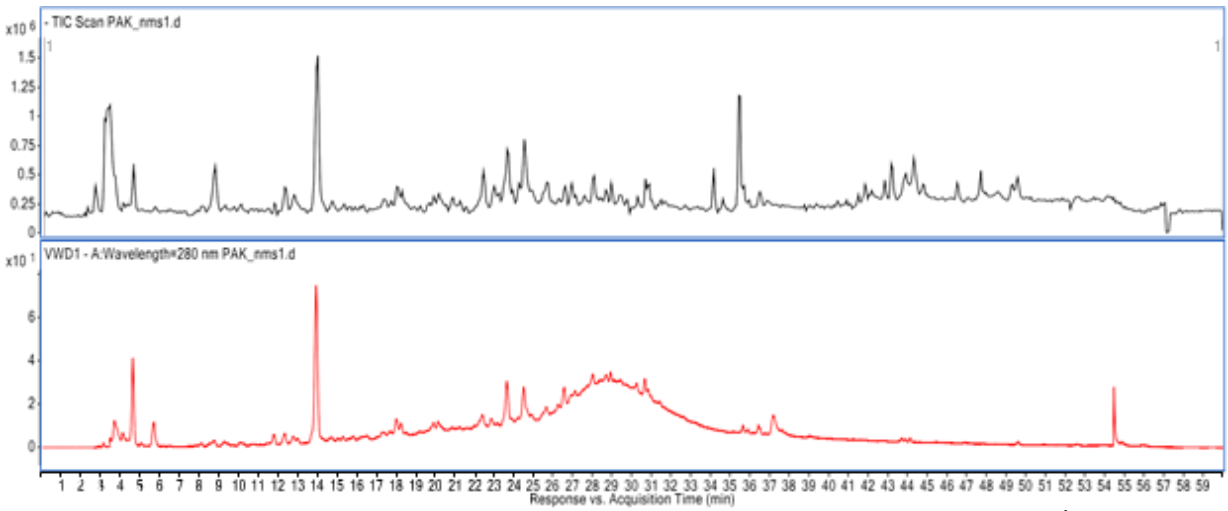
Şekil 4.1. *P. cognatum* toprak üstü ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



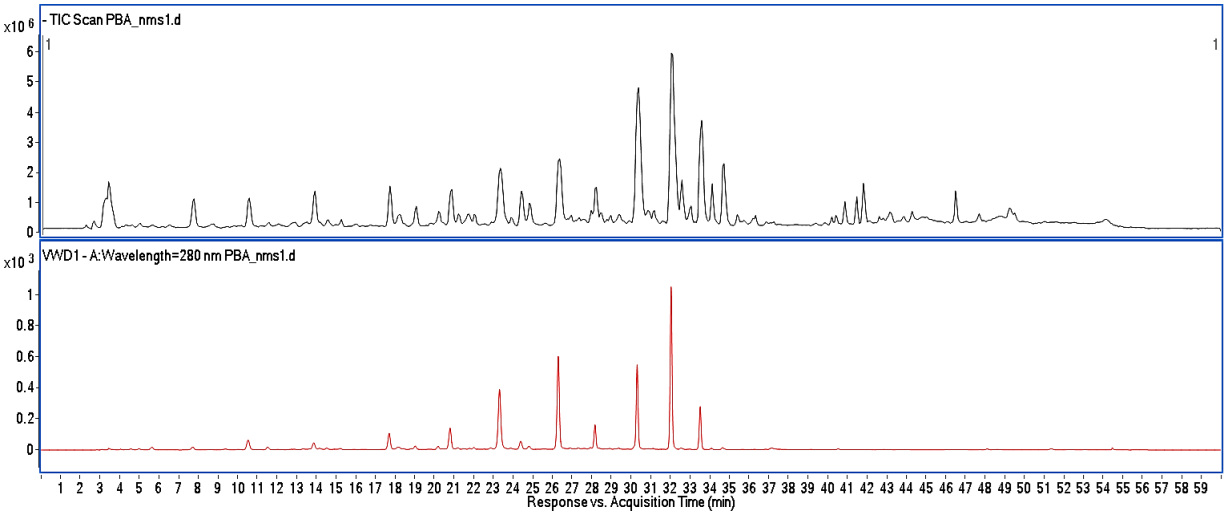
Şekil 4.2. *P. cognatum* kök ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



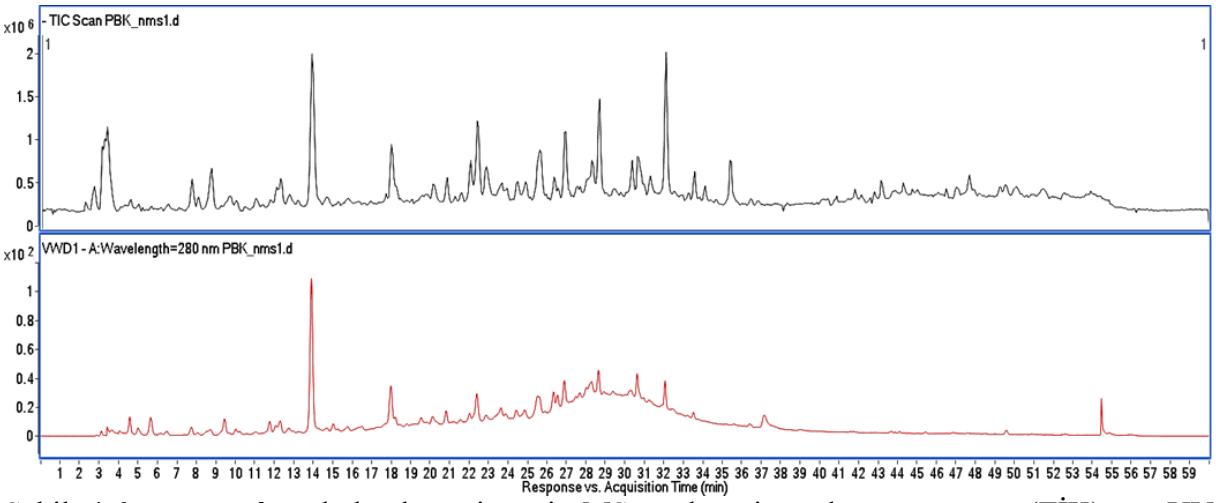
Şekil 4.3. *P. aviculare* toprak üstü ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



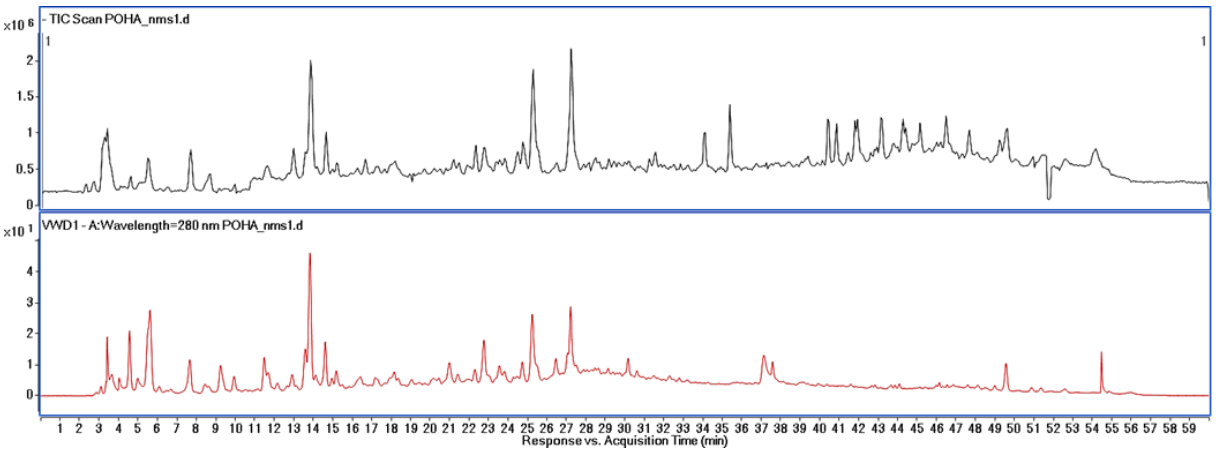
Şekil 4.4. *P. aviculare* kök ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



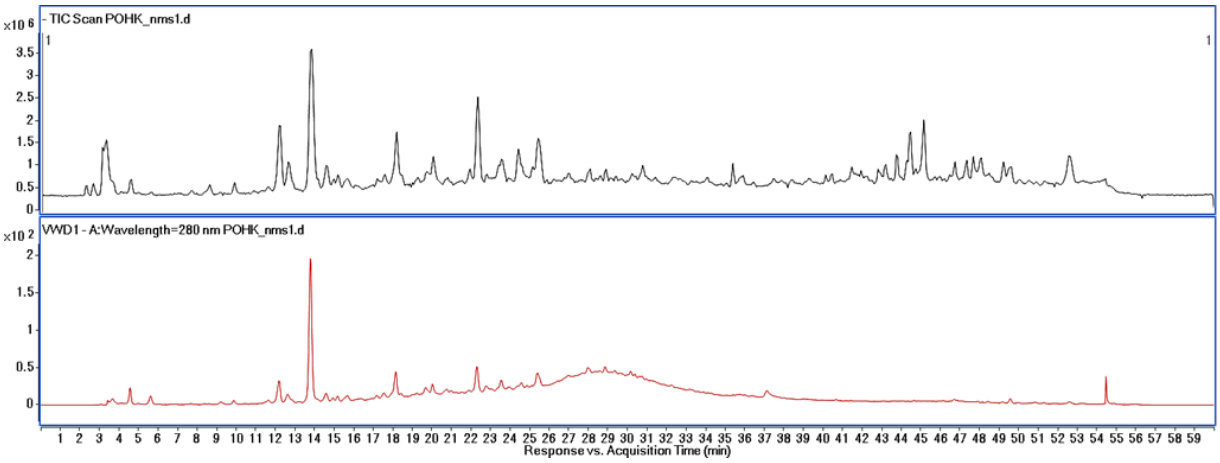
Şekil 4.5. *P. patulum* toprak üstü ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



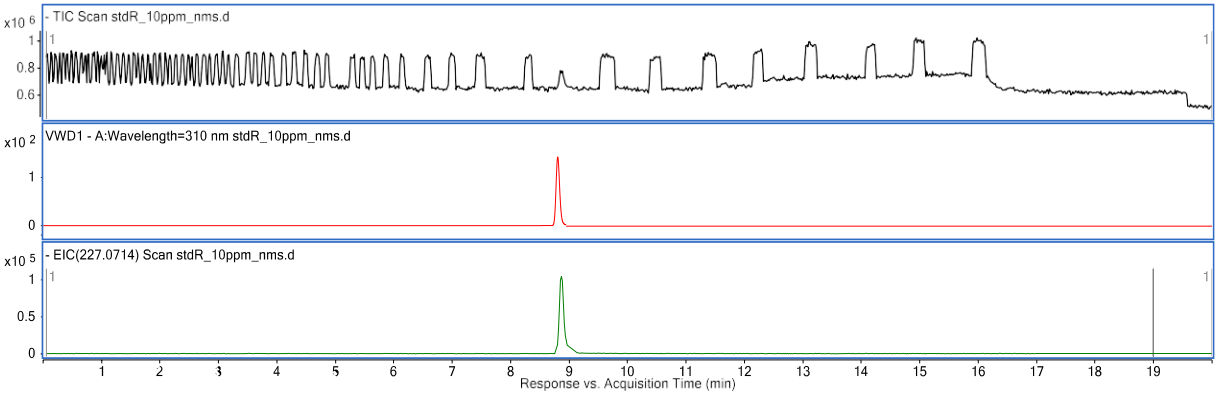
Şekil 4.6. *P. patulum* kök ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



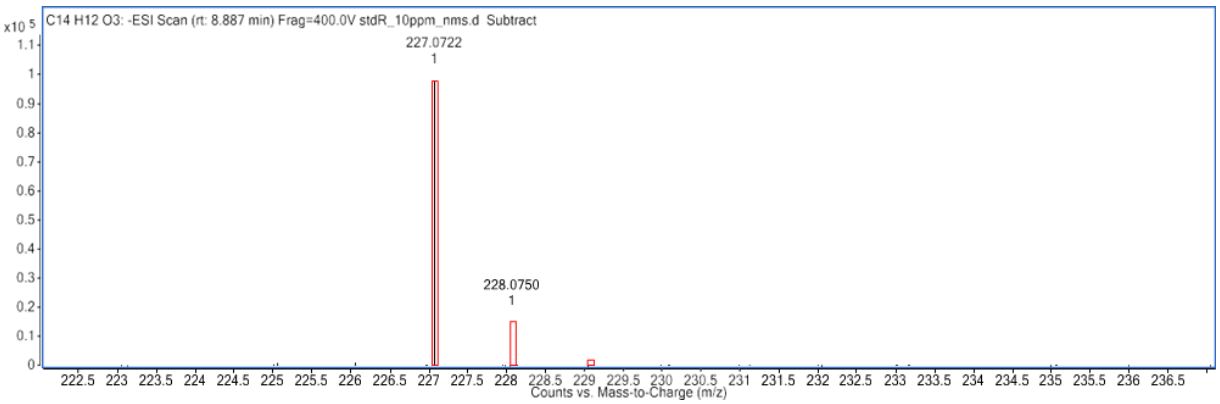
Şekil 4.7. *P. setosum* toprak üstü ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



Şekil 4.8. *P. setosum* kök ekstresine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK) ve UV kromatogramı



Şekil 4.9. Resveratrol bileşiğine ait MS toplam iyon kromatogramı (TİK), UV kromatogramı, resveratrol'e ait ekstrakte edilmiş iyon kromatogramı (EIC)



Şekil 4.10. Resveratrol bileşiğine ait MS spektrumu ve izotopik dağılımı

Şekil 4.11. LC-MS QTOF cihazında resveratrole ait MS spektrumu sonucu için yapılan kütüphane taraması ve eşleşme değerleri

Çizelge 4.2. Resveratrol kalibrasyon eğrisine ilişkin sonuçlar

Madde	**Rt (dk)**	**Kalibrasyon denklemi**	**r^2**
Resveratrol	8,887	y=43947,490421x+ 28658,658664	0,999

y: pik alanı, x: analit konsantrasyonu, r: regresyon katsayısı

Sonuç olarak *Polygonum* ekstrelerinde LC-MS QTOF analizi sonucunda retansiyon zamanı, parçalanma ürünleri ve kütüphane taramasına göre bulunduğu tespit edilen bileşikler Çizelge 4.3.'de verilmektedir (Wu ve diğerleri, 2019).

Çizelge 4.3. *Polygonum* ekstrelerinde LC-MS QTOF analizi sonucu bulunan bileşikler

Madde ismi	**Rt (dk)**	**Kapalı formül**	**M-H iyonu**
Kinik asit	3,46	$C_7H_{12}O_6$	191.0560
Galloilfruktoz/glukoz	3,69	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0630
Galloilfruktoz/glukoz	4,6	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0595
Gallik asit	5,69	$C_7H_6O_5$	169.0141
1-*O*- Galloilfruktoz	7,72	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0631
Gallokateşin/Epigallokateşin	8,66	$C_{15}H_{14}O_7$	305.0597
Prosiyanidin B1	12,2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	577.1165
Kateşin	13,82	$C_{15}H_{14}O_6$	289.0662
Epikateşin	17,34	$C_{15}H_{14}O_6$	289.0657
3-Galloilprosiyanidin B1/B2	18,19	$C_{37}H_{30}O_{16}$	729.1206
Kateşin /Epikateşin gallat	23,62	$C_{22}H_{18}O_{10}$	441.0698
Kersetin 3-glukozit	23,86	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0792

Rutin	23,89	$C_{30}H_{26}O_{14}$	609.1327
Kersetin 3-galaktozit	24,79	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0798
Kersetin	31,55	$C_{15}H_{10}O_7$	301.0316

4.3. Ekstrelerde LC-MS QTOF ile yapılan miktar tayinine ait bulgular

Ekstrelerde kütüphane taraması ve standart doğrulaması ile tespit edilen kateşin, kersetin 3-glikozit/3-galaktozit majör bileşiklerinin miktar tayini sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

4.4. Enzim inhibisyonu tayinlerine ait bulgular

Proje gereçlerimizi teşkil eden bitkisel materyallerden hareketle hazırlanan etanollü ekstrelerin, 333 µg/mL final konsantrasyondaki elastaz, kolajenaz ve TYR enzim inhibisyonlarına ait bulgular Çizelge 4.5'te verilmektedir.

Çizelge 4.4. *Polygonum* ekstrelerinde LC-MS QTOF analizi sonucu bulunan bileşiklerin miktar tayini sonuçları

Bitki kısmı	**Kateşin (mg/g)**	**Kersetin 3-glikozit / 3-galaktozit (mg/g)**
P. aviculare toprak üstü kısmı	2,78	0,93
P. aviculare toprak altı kısmı	4,09	1,36
P. cognatum toprak üstü kısmı	1,38	0,46
P. cognatum toprak altı kısmı	4,62	1,54
P. patulum toprak üstü kısmı	5,86	1,95
P. patulum toprak altı kısmı	8,18	2,72
P. setosum toprak üstü kısmı	5,06	1,69
P. setosum toprak altı kısmı	10,46	3,48

Çizelge 4.5. *Polygonum* ekstrelerinin elastaz, kolajenaz ve TYR enzim inhibisyonları

Bitki	**Kısım**	**TYR Enzim İnhibisyonu (% İnhibisyon ± S.S.[a]) 333 µg/mL[b]**	**Elastaz Enzim İnhibisyonu (% İnhibisyon ± S.S.[a]) 333 µg/mL[b]**	**Kolajenaz Enzim İnhibisyonu (% İnhibisyon ± S.S.[a]) 333 µg/mL[b]**
P. aviculare	Toprak üstü	-[c]	-	33,13 ± 4,07[d]
	Toprak altı	24,95 ± 1,83	68,87 ± 0,29 (IC_{50}: 169,33 ± 3,58 µg/mL)	69,63 ± 2,92 (IC_{50}: 220,50 ± 1,13 µg/mL)
P. cognatum	Toprak üstü	-	16,47 ± 0,94	56,87 ± 5,66 (IC_{50}: 220,35 ± 3,46 µg/mL)
	Toprak altı	48,64 ± 1,66	11,04 ± 1,22	74,46 ± 3,53 (IC_{50}: 200,30 ± 2,26 µg/mL)
	Toprak üstü	-	13,6 5 ± 1,22	27,52 ± 2,50

P. patulum	Toprak altı	42,87 ± 0,59	50,97 ± 0,35 (IC_{50}: 326,63 ± 2,84 µg/mL)	55,54 ± 3,52 (IC_{50}: 297,70 ± 2,40 µg/mL)
P. setosum	Toprak üstü	-	6,90 ± 1,76	36,31 ± 2,31
	Toprak altı	45,99 ± 2,30	62,92 ± 0,98 (IC_{50}: 247,50 ± 5,02 µg/mL)	16,37 ± 2,51[d]
Referans		84,56 ± 0,27[e] (IC_{50}: 0,68 ± 0,05 µg/mL)	46,90 ± 3,66[f]	44,64 ± 2,87[g]

[a] Standart sapma (n=4), [b] Final konsantrasyon, [c] Etki gözlenmedi, [d] Absorbans okunamadığı için final konsantrasyon 166 µg/mL, [e] Kojik asit (133 µg/mL), [f] Oleanolik asit 1 mM, [g] Epigallokateşin gallat 1 mM

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyoaktif bileşenler arasında sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle büyük önem taşıyan resveratrol, üzüm kabuklarında yüksek oranda bulunmakla beraber 70'in üzerinde bitkide tespit edilmiştir. Bileşik anti-enflamatuvar ve antioksidan etkilerinden dolayı kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer), metabolik hastalıklar (diyabet, obezite) gibi pek çok hastalığın tedavisi için araştırılmıştır (Pasquariello ve diğerleri, 2020). Bitkilerde bulunan polifenolik yapıdaki resveratrolün, MAP kinazlar, NF-κB ve MMP'ler dahil UV aracılı fotoyaşlanma ile ilişkili hücresel sinyalleme mekanizmaları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Hücresel proliferasyonu, mRNA survivin ekspresyonunu ve survivin fosforilasyonunu belirgin bir şekilde inhibe ettiği ve ROS seviyelerini azalttığı belirlenmiştir (Baxter, 2008). Çeşitli etki mekanizmaları nedeniyle resveratrol birçok kozmetik preparatın içeriğinde aktif bileşen olarak bulunmaktadır (Kiselev, 2011).

Resveratrolün bu tip hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici etkileri ile ilgili birçok literatür çalışması mevcutken, olası toksisitesi ve yan etkileri hakkında az sayıda rapor bulunmaktadır. Araştırılan yan etkiler arasında resveratrolün, hipersensiviteye neden olduğu, beyaz kan hücreleri, alanin aminotransferaz, TNF-α ve IL-6 seviyelerini düşürdüğü, kemoterapötik dozlarda normal hücreler için sitotoksik olabileceği yer almaktadır (Shaito, 2020). İnsanlarda resveratrol takviyesinin uzun vadeli kullanımları hakkında sınırlı veriler bulunmasına rağmen güçlü farmakolojik etkilerinden dolayı hastalıkların tedavisinde araştırmalarına devam edilmektedir.

Resveratrolün biyolojik etkileri üzerine yapılan araştırmaları resveratrol içeren bitkilerin araştırılıp ortaya çıkarılması takip etmektedir. Resveratrol yaklaşık 100 türde ve 34 familyada yer almaktadır. Genellikle köklerden, gövdelerden, yapraklardan, çiçeklerden, meyvelerden ve tohumlardan elde edilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Paeonia suffruticosa* Andr. (8,7×10-1 g kg-1) tohumlarındaki resveratrol içeriği en yüksek bulunurken; *P. cuspidatum* (4,209×10-1 g kg-1) kökleri bu türü takip etmektedir (Tian ve Liu, 2020).

Çin'de ve Japonya'da *P. cuspitadum* kökleri, iltihap, enfeksiyon, sarılık, cilt yanıkları ve hiperlipemi gibi hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *P. cuspidatum* taşıdığı resveratrol nedeniyle sıklıkla araştırılmıştır (Vrchotová, Sera ve Triska, 2007). Pandemi nedeniyle proje kapsamında planlanandan daha az sayıda *Polygonum* türü toplanmış olup *P. aviculare, P. setosum, P. patulum, P. cognatum* toprak altı ve toprak üstü ekstrelerinde LC-MS QTOF ile resveratrol saptanmamıştır. Yaptığımız literatür taramasında *P. cuspidatum* ismi artık *Reynoutria japonica* türünün sinonimi olarak kayıtlarda yer

almaktadır. Aynı şekilde resveratrol içerdiği tespit edilen *P. cillinerve* (757,319-894,658 µg/g) ve *P. multiflorum* (178,00 ±9,89 µg/g) türlerinin de yürütülmüş filogenetik çalışmalar ile *Reynoutria* cinsine aktarıldığı tespit edilmiştir. Türkiye'de 2019 yılında yapılan bir çalışmada, *R. japonica* bitkisi ülkemizde ilk defa Samsun ilinden toplanmış ve teşhis edilmiştir (Karaer, Terzioğlu ve Kutbay, 2020). Bu nedenle ilerleyen çalışmalarımızda arazi çalışması ile *R. japonica* bitkisinin farklı kısımları toplanarak içeriğindeki olması muhtemel resveratrol ve türevlerinin araştırılması planlanmaktadır.

Proje kapsamında yapılan *in vitro* kozmetik ilişkili enzim inhibisyon tayinlerinin sonuçlarına bakıldığında ise*; P. cognatum* kök ekstresi en yüksek kolajenaz enzim inhibitör (IC_{50}: 200,30 ± 2,26 µg/mL) aktivitesi gösterirken; *P. aviculare* (IC_{50}= 220,50 ± 1,13 µg/mL) ve *P. patulum* kökleri (IC_{50}= 297,70 ± 2,40 µg/mL), *P. cognatum* toprak üstü kısımları (IC_{50}=220,35 ± 3,46 µg/mL) ise referans olarak kullanılan EGCG'e (%44,64) kıyasla oldukça yüksek derecede kolajenaz enzim inhibisyon aktivitesi göstermiştir. *P. aviculare*'nin toprak üstü etanollü ekstresinde elastaza karşı anlamlı bir aktivite gözükmezken bitkinin köklerinde (IC_{50}= 169,33 ± 3,58 µg/mL) diğer bitki kısımlarına göre yüksek anti-elastaz aktivite görülmüştür. *P. setosum* ve *P. patulum* kök ekstrelerinin elastaza karşı IC_{50} değerleri sırasıyla 247,50 ± 5,02 µg/mL; 326,63 ± 2,84 µg/mL olarak bulunmuştur. Referans olarak kullanılan oleanolik asite göre *P. aviculare, P. setosum* ve *P. patulum* kökleri yüksek derecede elastaz inhibitör etki göstermiştir. *P. patulum* (%13,65), *P. cognatum* (%16,47), *P. setosum* (%6,90) toprak üstü kısımları ve *P. cognatum* kökleri (%11,04) elastaza karşı orta derecede inhibisyon oluşturmuştur. Ekstrelerin TYR inhibe edici etkileri değerlendirildiğinde, *Polygonum* türlerinin toprak üstü kısımlarında aktivite saptanmazken; tüm türlerin kök ekstrelerinin [*P. aviculare* (%24,95), *P. patulum* (%42,87), *P. cognatum* (%48,64) ve *P. setosum* (%45,99)] TYR karşı orta derece inhibisyon aktivitesi saptanmıştır.

Çalışmamızda, *Polygonum* ekstrelerinde LC-MS QTOF analizi sonucu tespit edilen bileşikler arasında majör olarak bulunan kateşin üzerinde yapılan bir çalışmada; yeşil çay polifenollerinin (kateşin ve EGCG) kolajenaz tarafından oluşan kolajenolitik aktivite üzerine inhibisyonu değerlendirilmiştir. Kateşin (%70) ve EGCG (%88) kolajene karşı kolajenazın kolajenolitik aktivitesini doza bağlı olarak yüksek oranda inhibe etmiştir (Madhan, Krishnamoorthy, Rao ve Nair, 2007). Başka bir çalışmada *Callistemon lanceolatus* Sm. türünden izole edilen kateşinin elastaz enzimine karşı yüksek derecede inhibisyon (IC_{50}=20,2 µg/mL) gösterdiği bulunmuştur (Kim, Byun, Hyun ve Lee, 2009). Yeşil çayda bulunan polifenolik bileşenlerin anti-TYR etkisinin incelendiği çalışmada; kateşin, epikateşin ve epigallokateşin inhibisyon aktivitelerine bakılmıştır. Üç bileşik de çalışmada orta derecede TYR inhibisyon aktivitesi göstermiştir (No ve diğerleri, 1999). Ekstrelerde LC-MS QTOF ile yaptığımız kateşin ve kersetin glikozit miktar tayini sonuçları değerlendirildiğinde bu bileşiklerin toprak altı ekstrelerinde toprak üstü ekstrelerine göre daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Kök ekstrelerinin enzim inhibisyonunun daha yüksek olması, bahsi geçen bileşikleri toprak üstü kısımlarına göre daha yüksek oranda içermeleri ile açıklanabilir. Çalışılan 4 *Polygonum* taksonu dışında ülkemizde 8'i endemik olmak üzere toplam 43 takson yetişmektedir. Pandemi dönemi nedeniyle kısıtlı sayıda tür toplanmış olsa da bu ön çalışmadan alınan olumlu sonuçlar ile ilerleyen zamanlarda daha fazla *Polygonum* türü üzerinde benzer çalışmaların yürütülmesi planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Barrantes, E., Guinea, M. (2003). Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and Aloe gel. *Life Sciences*, 72(7), 843-850.

Baxter, R. A. (2008). Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7, 2–7.

Bensouliah, J., Buck, P. (2006). Skin structure and function, in: Bensouliah, J., Buck, P. (Editörler), Aromadermatology: Aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions. Radcliffe publishing, İngiltere, s. 1-11.

Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *Precision Oncology*, 1, 35.

Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I. (2012). Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-L- glutamine and insect saliva. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 29–34.

Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440-2475.

Coode, M. J. E., Cullen, J. (1970). *Polygonum* L. In Davis, P.H. (Ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 2. Edinburgh, pp. 269-281.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., Maibach, H.I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(2), 87-95.

Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663-673.

Giovinazzo, G., Ingrosso, I., Paradiso, A., Gara L. D., Santino, A. (2012). Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 191-199.

Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., ve Babaç, M. T. (Editörler). (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği

Karaer, F., Terzioğlu, S., Kutbay, H. G. (2020). A new genus record for the Flora of Turkey: *Reynoutria* (Polygonaceae). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 23(3), 606-610.

Kataria, R., Khatkar, A. (2019). Resveratrol in various pockets: a review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(2), 116–122.

Kim, J. H., Byun, J. C., Hyun, C. G., Lee, N. H. (2009). Compounds with elastase inhibition and free radical scavenging activities from *Callistemon lanceolatus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 914-920.

Kiselev, K. V. (2011). Perspectives for production and application of resveratrol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 417–425.

Kraunsoe, J. A. E., Claridge, T. D. W., Lowe, G. (1996). Inhibition of human leukocyte and

porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 35(28), 9090-9096.

Kusumawati, I., Indrayanto, G. (2013). Natural antioxidants in cosmetics, in: Rahman, A. (Editör), Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier, s. 485-505.

Lee, K.E., Bharadwaj, S., Yadava, U., Kang, S.G. (2019). Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using in silico and *in vitro* approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34, 927-936.

Lee, S. H., Sancheti, S., Sancheti, S., and Seo, S. Y. (2009). Potent antielastase and antityrosinase activities of *Astilbe chinensis*. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(4), 127-129

Madhan, B., Krishnamoorthy, G., Rao, J. R., Nair, B. U. (2007). Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 16-22.

Masamoto, Y., Iida, S., Kubo, M. (1980). Inhibitory effect of Chinese crude drugs on tyrosinase. *Planta Medica*, 40(4), 361-365.

Narasimhulu, G., Reddy, K. K., Mohamed, J. (2014). The genus *Polygonum* (Polygonaceae): an ethnopharmacological and phytochemical perspectives –review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 21-45.

Nkuété, A. H. L., Migliolo, L., Wabo, H. K., Tane, P., Franco, O. L. (2015). Evaluation of multiple functions of *Polygonum* genus compounds. *European Journal of Medicinal Plants*, 6(1), 1-16.

No, J. K., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T., Chung, H. Y. (1999). Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences*, 65(21), 241- 246.

Nonomura, S., Kanagawa, H., Makimoto, A. (1963). Chemical constituents of Polygonaceous plants. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc). *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 83, 988- 90.

Oxlund, H., Manschot, J., Vııdık, A. (1988). The role of elastin in the mechanical properties of skin. *Biomechmics*, 21(3), 213-218.

Pan, S. Y., Zhou, S. F., Gao, S. H., Yu, Z. L., Zhang, S. F., Tang, M. K., Sun, J. N., Ma, D. L., Han, Y. F., Fong, W. F., Ko, K. M. (2013). New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: cam's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 25.

Pasquariello, R., Verdile, N., Brevini, T. A., Gandolfi, F., Boiti, C., Zerani, M., Maranesi, M. (2020). The role of resveratrol in mammalian reproduction. *Molecules*, 25(19), 4554.

Pangeni, R., Sahni, J. K., Ali, J., Sharma, S., Baboota, S. (2014). Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(8), 1285-1298.

Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32, 403-425.

Ratz-Lyko, A., Arct, J. (2019). Resveratrol as an active ingredient for cosmetic and dermatological applications: a review. *Journal of Cosmetıc and Laser Therapy*, 21, 84–90.

Saklani, A., Kutty, K. S. (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*, 13(3-4), 161-171.

Seo, S. Y., Sharma, V. K., Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2837-2853.

Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Pintus, G. (2020). Potential adverse effects of resveratrol: a literature review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2084.

Takaoka, M. (1939). Resveratrol, a new phenolic compound from *Veratrum grandiflorum*. *Journal of Chemical Society of Japan*, 60, 1090–1100.

Thapa, S. B., Pandey, R. P., Park, Y. I., Sohng, J. K. (2019). Biotechnological advances in resveratrol production and its chemical diversity. *Molecules*, 24(14), 2571.

Tian, B., Liu, J. (2020). Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1392-1404.

Van Wart, H.E., Steinbrink, D.R.A. (1981). Continuous spectrophotometric assay for *Clostridium hystolyticum* collagenase. *Analytical Biochemistry*, 113, 156–165.

Wu, Z., Wang, X., Chen, M., Hu, H., Cao, J., Chai, T., Wang, H. (2019). A Study on tissue-specific metabolite variations in *Polygonum cuspidatum* by high-resolution mass spectrometry-based metabolic profiling. *Molecules*, 24(6), 1058

Zouboulis, C.C., Makrantonaki, E. (2011). Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging, *Clinics in Dermatology*, 29(1), 3-14.

EKLER

Projede araştırmacı olarak yer alan Arş. Gör. Tuğsen Doğru'nun Mayıs 2021 tarihinde Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi programı kapsamında başarıyla tamamladığı yüksek lisans tez çalışmasına ait kapak sayfası, teşekkür sayfası ve tez onay sayfası ekte verilmektedir.

ÜLKEMİZDE YETİŞEN BAZI *POLYGONUM* L. TÜRLERİNİN RESVERATROL İÇERİĞİ BAKIMINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğsen DOĞRU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAYIS 2021

TUĞSEN DOĞRU tarafından hazırlanan ÜLKEMİZDE YETİŞEN BAZI *POLYGONUM* L. TÜRLERİNİN RESVERATROL İÇERİĞİ BAKIMINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ." adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Fatma Sezer ŞENOL DENİZ
Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

İkinci Danışman: Prof. Dr. Osman TUGAY
Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Selçuk Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Esra AKKOL
Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN
Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM
Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 18/05/2021

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşarak çalışmalarımı en doğru ve özverili şekilde yürütmemi sağlayan, her zaman örnek aldığım ve alacağım, tez konumun belirlenmesinden çalışmaların gerçekleştirilmesine kadar tüm aşamalarda bana destek olan, anlayışını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, Değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Fatma Sezer ŞENOL DENİZ'e tüm emekleri için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübeleriyle değerli yorum ve önerilerini benimle paylaşan, tez konumu belirlemede yardımcı olan, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Değerli Hocam Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince 2. Danışmanım olarak bana her türlü desteği veren, tezimde araştırma materyallerimin teminini ve teşhisini sağlayan, çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen, Sayın Hocam Prof. Dr. Osman TUGAY'a her şey için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgi ve tecrübelerini eksik etmeyen Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı hocalarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini benden esirgemeyen, Arş. Gör. Esengül KARAHİSAR'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına 02/2020-08 kodlu proje ile maddi olanak sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne çok teşekkür ederim.