



Determination of Antioxidant and Anticholinesterase Activity of *Trifolium repens* L. Extract

Erkan Öner^{1,a,*}, Ilter Demirhan^{1,b}

¹Adiyaman University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, 02090, Adiyaman, Türkiye

²Harran University, Vocational School of Health Services, Biomedical Device Program, 63300, Sanlıurfa, Türkiye

*Corresponding author

| ARTICLE INFO | ABSTRACT |
|--|---|
| <p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 12.05.2025 Accepted : 04.06.2025</p> <p>Keywords: DPPH Anticholinesterase Maceration <i>Trifolium repens</i> Antioksidan</p> | <p>Alzheimer's disease affects especially the elderly population and its prevalence is increasing. It is still important to investigate the place of natural therapeutic targets in the treatment of Alzheimer's disease due to the high side effects of the drugs used to suppress Alzheimer's disease instead of treating it. In this study, we aimed to investigate the antioxidant and anticholinesterase properties of <i>T. repens</i> extract. In this study, <i>Trifolium repens</i> L. extract was made with methanol solvent by maceration method. DPPH radical scavenging test was applied for antioxidant activity in <i>Trifolium repens</i> extract. Anticholinesterase activity was also determined spectrophotometrically in accordance with the literature. According to the results of DPPH radical scavenging test, it was determined that <i>T. repens</i> extract has high antioxidant power to affect free radicals strongly. The anticholinesterase enzyme inhibition result of <i>T. repens</i> extract was compared with tacrine compound. <i>T. repens</i> extract had moderate anticholinesterase enzyme inhibition. In summary, the good antioxidant power and moderate anticholinesterase effect of <i>T. repens</i> extract suggest that it is promising but should be supported by in vitro and in vivo studies.</p> |

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 13(8): 2224-2228, 2025

Trifolium repens L. Ekstresinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

| MAKALE BİLGİSİ | ÖZ |
|---|--|
| <p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 12.05.2025 Kabul : 04.06.2025</p> <p>Anahtar Kelimeler: DPPH Antikolinesteraz Maserasyon <i>Trifolium repens</i> Antioksidan</p> | <p>Alzheimer hastalığı özellikle yaşlı popülasyonu etkilemekte olup geçtikçe de prevalansı yükselmektedir. Tedavisinde kullanılan ilaçlarında alzheimeri tedavi etmek yerine baskılamak için kullanılması ile birlikte yan etkilerinin fazla olması sebebiyle doğal terapötik hedeflerin alzheimer tedavisindeki yerinin araştırılması halen önemli bir durumdadır. Bu çalışma da, <i>Trifolium repens</i> L. ekstresinin antioksidan ve antikolinesteraz özelliklerinin araştırılması amaçlandı. Bu çalışmada <i>T. repens</i> ekstraktı maserasyon yöntemiyle metanol çözgeni ile yapıldı. <i>Trifolium repens</i> ekstraktında antioksidan aktivite için DPPH radikal süpürme testi uygulandı. Antikolinesteraz yöntemi de spektrofotometrik olarak literature uyumlu olarak tayin edildi. <i>T. repens</i> ekstresinin DPPH radikal süpürme testi sonucuna göre serbest radikalleri güçlü bir şekilde etkileyeceği antioksidan gücünün fazla olduğu belirlendi. <i>T. repens</i> ekstraktının antikolinesteraz enzim inhibisyon sonucu ise takrin bileşiği ile kıyaslandı. <i>T. repens</i> ekstraktının orta güçlükte antikolinesteraz enzim inhibisyonu vardı. Özetle <i>T. repens</i> ekstraktının iyi antioksidan gücü ve orta düzeyde antikolinesteraz etkisi umut vadeden olduğu ancak in vitro ve in vivo çalışmalar ile desteklenmesi daha uygun olacağını düşündürmektedir.</p> |

^a erkanoner0803@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-6332-6484>

^b ilterdemirhan@harran.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0003-0054-7893>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Alzheimer hastalığı (AD), yaşlı popülasyonda karmaşık patogeneze sahip çok yönlü nörodejeneratif bir hastalıktır. 2018 Dünya Alzheimer Raporu'na göre, dünya çapında demans hastası sayısı şu anda 50 milyona ulaşmış olup bunların %50-75'i AD hastasıdır. Bu sayı 2050 yılına kadar 152 milyona ulaşacak ve bu da dünyada her üç saniyede bir kişinin AD'ye yakalanacağı anlamına geliyor (Alzheimer's Association, 2018). Yaşlılar için AD, kalp hastalığı, kanser ve felçten sonra dördüncü en büyük katil haline gelmiştir (Zhou ve ark., 2019; Sevindik ve ark., 2024).

Alzheimer hastalığına yönelik güncel farmakolojik müdahaleler, muhtemelen tau proteini birikimi ve nöronal işlev bozukluğundan kaynaklanan nörotransmitter dengesizliklerini düzeltmeyi amaçlamaktadır (Massoud and Léger ve ark., 2011). AD'nin bilişsel semptomlarını tedavi etmek için FDA tarafından onaylanan güncel ilaçlar asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI) ve bir glutamat düzenleyicisi olan memantindir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri, hafıza, dikkat ve öğrenmede önemli bir nörotransmitter olan asetilkolin seviyelerini artırır (Massoud and Léger ve ark., 2011). Memantin, AD'de görülen nörotoksistide rol oynadığı düşünülen glutamat seviyelerini azaltır (Breijyeh and Karaman ve ark., 2020; Atri, 2019). Bu iki ilaç sınıfı yalnızca AD semptomlarını tedavi etmede etkilidir, ancak onu önlemez veya iyileştirmez. Dahası, AChEI ilaçları AD'li hastaların bilişini iyileştirmede düşük etkinlik göstermiştir ve ishal, mide bulantısı, kusma, bradikardi ve senkop gibi birden fazla yan etki ile ilişkilidir (Moreta ve ark., 2021). AChEI'lerin tartışmalı etkinliği ve yan etkileri göz önüne alındığında, ilacın risk-fayda ilişkisi belirsizdir. Memantin üzerine yapılan çalışmaların sonuçları belirsizdir ve bazı klinik deneyler AD'de tedavisine dair yetersiz kanıtlar göstermektedir (Matsunaga ve ark., 2015; Schneider ve ark., 2011). AD etiyopatolojisinin karmaşıklığı hastalığı önlemeyi ve tedavi etmeyi zorlaştırmaktadır. Dahası, mevcut ilaçlar, doğrudan beta-amiloid ve tau proteinlerinin birikimini, oksidatif stresi veya AD ilerlemesini yönlendirdiği varsayılan iltihabı ele almayan nörotransmitter dengesizlikleri gibi alt akış fenomenlerine saldırmaktadır (Korczyn, 2012; Passamonti ve ark., 2019; Tan ve ark., 2019; El-Chaghaby ve ark., 2024).

Oksidatif stres, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif koşullarda rol oynayan başlıca faktörlerden biridir (Huang ve ark., 2016). Oksidatif stres, antioksidanlar ve oksidantlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır ve ikincisinin çok fazla olması söz konusudur. Beyin, kolayca oksitlenebilen lipitlerden oluşması ve yüksek oksijen tüketimi nedeniyle reaktif oksijen türlerine karşı özellikle savunmasızdır (Smith ve ark., 2000; Huang ve ark., 2016; Sevindik ve ark., 2023). Mekanik olarak, reaktif oksijen türleri, Alzheimer hastalığı patolojisinde rol oynayan iki protein olan beta amiloid proteinlerinin üretimini ve tau proteinlerinin fosforilasyonunu ve polimerizasyonunu artırabilir (Zhao ve ark., 2013; Chauhan ve ark., 2006). Meyve ve sebzeler gibi antioksidan açısından zengin bitki bazlı gıdaların tüketilmesiyle oksidatif stresin azaltılabileceğine dair güncel kanıtlar mevcuttur (Halliwell ve ark., 1996; Ávila-Escalante ve ark., 2020; Saridogan ve ark., 2021).

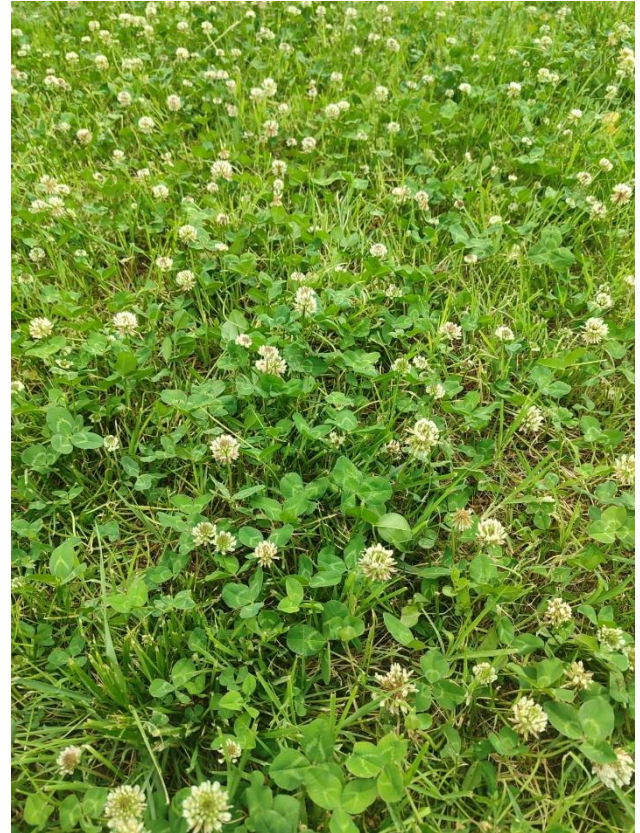
Yonca, *Trifolium* olarak da bilinir ve tarımsal değeri ve içerdiği tür sayısı açısından önemli bir aile olan Leguminosae ailesine aittir. *Trifolium* cinsi genellikle yarımkürelerin her iki tarafındaki subtropikal ve ılıman bölgelerde bulunur ve yaklaşık 240 türden oluşur (Zoric ve ark., 2012). Günümüzde *Trifolium* bitkileri terapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Birkaç çalışma, *Trifolium* türlerinin biyolojik özelliklerini bildirmiştir. Flavonoidler, izoflavonoidler ve diğer farklı antioksidan bileşikler içerdiği bulunmuştur (Engelmann ve ark., 2009). Bu değerli bileşiklerin varlığı nedeniyle, bazı *Trifolium* türleri antiseptik, analjezik, antiinflamatuvar ve antikanser ajanlar ve anjiyogeneze terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Leporatti, & Ivancheva, 2003).

Bu çalışma, *Trifolium repens* (beyaz yonca) bitkisinin metanol ekstraktının antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DPPH testi, bitki ekstraktlarının serbest radikalleri nötralize etme potansiyelini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca antikolinesteraz aktivitesi analiz edildi.

Materyal ve Yöntem

Bitki Eldesi

Trifolium repens bitki materyalleri Türkiye'nin Adıyaman ilinde bulunan 37.73237080000001, 38.232776499999999 lokasyonundan toplanmıştır. Bitkiye ait görsel Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. *Trifolium repens* bitki materyali (Bitki Materyali Toplama Lokasyonu: 37.73237080000001, 38.232776499999999, Adıyaman)

Figure 1. *Trifolium repens* plant material

Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

T. repens bitki materyalleri maserasyon yöntemine göre metanol çözücüsünde 48 saat bekletildi daha sonra süzülür. Bu işlem, çözücü renksizleşene kadar tekrarlandı. İşlem sonunda elde edilen çözücü ekstre karışımı, rotary evaporatörde çözücüsü uçurularak ekstreler elde edildi. Ekstreler deney gününe kadar +4°C ve ışık görmeyen ortamda saklandı (Taşkın ve ark., 2020).

DPPH Metodu

Trifolium repens ekstraktının ve standart antioksidanların DPPH- serbest radikal süpürme aktivitesi Blois yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Blois, 1958). 1 L 0,1 mM DPPH- çözeltisi etanol içinde hazırlandı ve farklı konsantrasyonlarda çözeltiler eklenerek 3 ml'ye ayarlandı. Hazırlanan çözeltiler iyice vortekslenildi ve 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Absorbans spektrofotometre ile 517 nm'de ölçüldü. DPPH radikal süpürme aktivitesi (DPPH_S) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH_S(\%)} = \frac{(\text{KANA})}{\text{KA}} \times 100$$

KANA: Kontrol absorbansı vs.numune absorbansı
KA : Kontrol absorbansı

Asetilkolin Esteraz Enzim Aktivitesi

AChE enzim inhibisyonunun mekanizmasını belirlemek için kinetik çalışmalar Ellmans Yöntemleri ve farklı inhibitör konsantrasyonları (0, 0,43, 0,86 µM) ve inhibitör substratının (bütiriltiyokolin iyodür (BTCl)) 0,03, 0,06, 0,12 ve 0,24 µM dahil olmak üzere farklı konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirildi (Ellman ve ark., 1961). Enzim, her kuyucuk için 0,2 mg/mL konsantrasyon elde etmek üzere de-iyonize suda çözüldü ve inhibitör substratı bir sodyum fosfat tamponunda çözüldü. Reaksiyon karışımı, 1 dk aralıklarla 25°C'de 30 dakika inkübe edildi. Absorbans, 96 kuyucuklu plakayı (ChemWell, ABD) tutarak bir ELISA okuyucusu kullanılarak 412 nm'de ölçüldü.

Bulgular

DPPH kararlı bir serbest radikaldir ve kararlı bir diamanyetik molekül haline gelmek için bir elektron veya hidrojen radikali alır (Ndhlalav e ark., 2010). Çizelge 1, hem *T. Repens* ekstraktının radikal süpürme kapasitesine bağlı olarak DPPH radikali konsantrasyonundaki azalmayı göstermektedir. 400 µg/mL *T. Repens* ekstraktının DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkisi serbest radikal süpürme aktivitesi açısından etkili olduğunu göstermiştir (Çizelge 1 ve Şekil 2). AChE enzim aktivite sonucu

Çizelge 1. *Trifolium repens* ekstraktının DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkisi

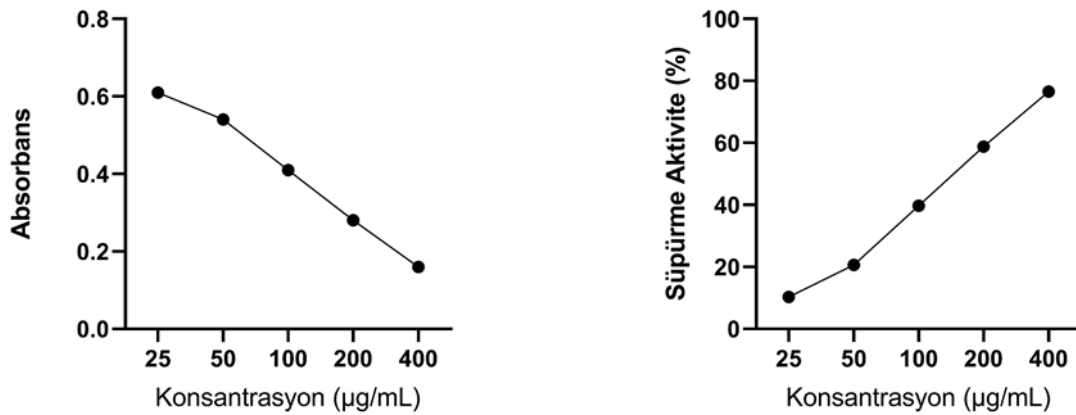
Table 1. The scavenging effect of *Trifolium repens* extract on DPPH radicals

| Konsantrasyon (µg/mL) | Absorbans (517 nm) | Süpürme Aktivitesi (%) |
|-----------------------|--------------------|------------------------|
| 25 | 0,610 | 10,3 |
| 50 | 0,540 | 20,6 |
| 100 | 0,410 | 39,7 |
| 200 | 0,280 | 58,8 |
| 400 | 0,160 | 76,5 |

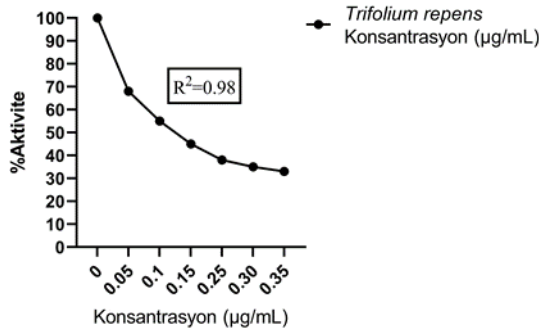
Çizelge 2. *T. repens* ekstresinin AChE aktivite sonuçları

Table 2. AChE activity results of *T. repens* extract

| Bileşik/Ekstre | IC ₅₀ (AChE inhibitörü) | R ² |
|---------------------------|------------------------------------|----------------|
| Takrin (Tacrine) | 78 Nm | 0,95 |
| <i>T. repens</i> ekstresi | 268 µg/MI | 0,98 |



Şekil 2. *T. repens* ekstresinin konsantrasyona göre absorbans ve süpürme aktivitesi
Figure 2. Absorbance and scavenging activity of *T. repens* extract according to concentration



Şekil 3. *Trifolium repens* ekstraktının AChE enzim aktivite sonucu

Figure 3. AChE enzyme activity result of *Trifolium repens* extract

T. repens methanol ekstresinin (1:1v/v) AchE'yi 268 µg/mL IC50 değeri ile inhibe etmiştir. İnhibisyon sonuçları Çizelge 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir.

Tartışma

Elde edilen sonuçlara göre, *Trifolium repens* ekstresi, DPPH serbest radikallerini doza bağımlı bir şekilde etkili biçimde süpürmüştür. IC₅₀ değeri yaklaşık 135 µg/mL olarak hesaplanmış olup, bu da bitkinin orta düzeyde antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu etki, büyük olasılıkla bitkinin içerdiği fenolik ve flavonoid bileşiklerden kaynaklanmaktadır.

Asetilkolinesteraz aktivitesi, asetilkolinetin daha uzun süre sinapslarda kalmasını sağlayan kolinerjik terapi stratejisi ile inhibe edilir. Bu nedenle, hastanın günlük aktiviteleri ve zihinsel keskinliği artar. Bununla birlikte, Alzheimer hastalığı için nöroprotektif tedaviler olan kolinerjik ilaçların ters etkileri vardır. Bu nedenle, daha az yan etkiye sahip ilaç arayışları son zamanlarda artmıştır (Braak & Tredici, 2011; Ugur & Guzel, 2023; Mohammed ve ark., 2024). Bu anlamda, düşük toksisiteye sahip tıbbi bitkilerin kolinerjik aktiviteleri araştırma konusu olmuştur. Bu çalışmada *Trifolium repens* ekstraktının antikolinerjik etkisi incelenmiş olup takrin bileşiğine kıyasla orta güçlükte etki göstermiştir.

Campbell ve ark. tarafından açıklandığı gibi bir pilot çalışma yürütüldü (Campbell ve ark., 2004); ancak, bu çalışma günde 86 mg izoflavon üretilen ve farelere uygulanan kırmızı yonca üzerindeydi ve antioksidan belirteci üzerinde çok az etki gösterdi. Ancak Mu ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, formononetin (*T. pratense* türevi) uzun vadeli uygulaması gerçekleştirildi (Mu ve ark., 2009). Fareler çalışma için seçildi ve beş gruba ayrıldı, kontrol grubu; günde 0,05 g/kg uygulanan düşük doz formononetin grubu; günde 0,5 g/kg yüksek doz formononetin grubu; sahte ameliyat grubu ve yumurtalıkları alınmış grup. Sonunda, glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimlerin aktivitelerinde önemli bir artış ve lipid peroksidasyonunda azalma kaydedildi. *T. repens*'in antioksidan özellikleri içerdiğinde bulunan flavonoidler, izoflavonoidler, klovamidler, saponinler ve diğer değerli bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir.

DPPH radikallerinin indirgeme kapasitesi, antioksidanların indüksiyonu sonucunda 517 nm'de absorbansın azalmasıyla belirlenmiştir. Kararlı bir DPPH-

radikalinin etanol içindeki maksimum absorbansı 517 nm olarak kaydedilmiştir. Antioksidan molekülleri DPPH-radikaline bir hidrojen protonu bağışlayarak inaktif bir radikal haline getirirler. Bu reaksiyon sonucunda düşük absorbans elde edilir. Bu etkileşimde mordan sarıya doğru bir renk değişimi görsel olarak fark edilir. Bu nedenle, DPPH- genellikle antioksidan moleküllerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için bir substrat olarak kullanılır (Re ve ark., 1999; Kulkarni ve ark., 2009).

Bu çalışma, *Trifolium repens* methanol ekstresinde in vitro antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivite açısından *Trifolium repens* methanol ekstresi DPPH testinde yüksek antioksidan özellik gösterdi. Bu da *Trifolium repens*'in serbest radikal giderici kapasiteye sahip olduğunu gösterdi. Antikolinesteraz aktivite bakımından da takrin ile kıyaslandığında orta düzeyde inhibisyon gücü göstermiş olsa da ilaçların yan etkileri düşünüldüğünde doğal kaynaklardan üretilen terapötiklerin kullanılmasının daha iyi olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu çalışmaların desteklenmesi için daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışma *T. repens* bitkisinin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri açısından dikkate değer bir doğal kaynak olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, bitkinin farmakolojik açıdan daha geniş kapsamlı araştırmalara konu edilmesini desteklemektedir ve özellikle yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi veya destek tedavisinde kullanılabilecek fitoterapötik ajanlar arasında değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır.

Beyanlar

Etik Onay Bilgisi

This study does not require ethics committee approval because it involves in vitro analysis.

Yazar Katkı Beyanı

EO: Proje yönetimi, gözetim, kavramsallaştırma, metodoloji, inceleme ve düzenleme, veri toplama, araştırma, resmi analiz ve orijinal taslağın yazılması,

ID: resmi analiz, metodoloji

Fon Beyanı

Finansman yoktur.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir

Kaynaklar

- Alzheimer's Association 2018 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Dement. 2018; 14:367-429. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.001. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Atri, A. (2019). Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. Semin. Neurol. 39,227-240. doi: 10.1055/s-0039-1678581.

- Ávila-Escalante M.L., Coop-Gamas F., Cervantes-Rodríguez M., Méndez-Iturbide D., Aranda-González I.I. (2020). The effect of diet on oxidative stress and metabolic diseases-Clinically controlled trials. *J. Food Biochem.* 44: e13191. doi: 10.1111/jfbc.13191.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Braak, H., Del Tredici, K. (2011). Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta Neuropathology*, 121, 589–595. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0825-z>
- Breijyeh, Z., Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25,5789. doi: 10.3390/molecules25245789.
- Campbell, M, Woodside, J, Honour, J, Morton, M, Leathem, A. (2004). Effect of red clover-derived isoflavone supplementation on insulin-like growth factor, lipid and antioxidant status in healthy female volunteers: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58:173.
- Chauhan V., Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. (2006). *Pathophysiology*. 13:195–208. doi: 10.1016/j.pathophys.2006.05.004.
- El-Chaghaby, G. A., Mohammed, F. S., Rashad, S., Uysal, I., Kocer, O., Lekesiz, Ö., ... & Sevindik, M. (2024). Genus *Hypericum*: General properties, chemical contents and biological activities. *Egyptian Journal of Botany*, 64(1), 1-26.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., Featherstone, R.M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* 1961;7,88–95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- Engelmann, NJ, Reppert, A, Yousef, G, Rogers, RB, Lila, MA. (2009). In vitro production of radiolabeled red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 98,147–156.
- Halliwell B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic. Res.* 25:57–74. doi: 10.3109/10715769609145656.
- Huang W.J., Zhang X., Chen W.W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed. Rep.* 4:519–522. doi: 10.3892/br.2016.630.,
- Korczyn, A.D. (2012). Why have we failed to cure Alzheimer's disease? *J. Alzheimer's Disease*, 29,275–282. doi: 10.3233/JAD-2011-110359.
- Kulkarni, A., Patil, S.A., Badami, PS. (2009). Synthesis, characterization, DNA cleavage and in vitro antimicrobial studies of La(III), Th(IV) and VO(IV) complexes with Schiff bases of coumarin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 2904–2912.
- Leporatti, ML, Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 87,123–42.
- Massoud, F., Léger, G.C. (2011). Pharmacological treatment of Alzheimer disease. *Can. J. Psychiatry*, 56,579–588. doi: 10.1177/070674371105601003.
- Matsunaga, S., Kishi, T., Iwata N. (2015). Memantine monotherapy for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10: e0123289. doi: 10.1371/journal.pone.0123289.
- Mohammed, F. S., Sevindik, M., Uysal, İ., Česko, C., & Koraqi, H. (2024). Chemical composition, biological activities, uses, nutritional and mineral contents of cumin (*Cuminum cyminum*). *Measurement: Food*, 100157.
- Moreta, M.P.G., Burgos-Alonso, N., Torrecilla M., Marco-Contelles J., Bruzos-Cidón C. (2019). Efficacy of Acetylcholinesterase Inhibitors on Cognitive Function in Alzheimer's Disease. *Review of Reviews. Biomedicines*, 9,1689. doi: 10.3390/biomedicines9111689.
- Mu, H., Bai, Y.H., Wang, S.T., Zhu, Z.M., Zhang, Y.W. (2009). Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine*, 16,314–9.
- Ndhkala, A.R., Moyo, M., Van Staden, J. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*. 15: 6905-6930.
- Passamonti, L., Tsvetanov, K.A., Jones, P.S., Bevan-Jones, W.R., Arnold, R., Borchert, R.J., Mak, E., Su, L., O'Brien, J.T., Rowe, J.B. (2019). Neuroinflammation and Functional Connectivity in Alzheimer's Disease: Interactive Influences on Cognitive Performance. *Journal of Neuroscience*, 39,7218–7226. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2574-18.2019.
- Re, R., Pellegrini, N., Protegente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237.
- Saridogan, B. G. O., Islek, C., Baba, H., Akata, I., & Sevindik, M. (2021). Antioxidant antimicrobial oxidant and elements contents of *Xylaria polymorpha* and *X. hypoxylon* (Xylariaceae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(5), 5400-5404.
- Schneider, L.S., Dagerman, K.S., Higgins, J.P.T., McShane, R. (2011). Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 68,991–998. doi: 10.1001/archneurol.2011.69.
- Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K., Perry G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1502:139–144. doi: 10.1016/S0925-4439(00)00040-5.
- Sevindik, M., Gürgen, A., Khassanov, V. T., & Bal, C. (2024). Biological activities of ethanol extracts of *Hericium erinaceus* obtained as a result of optimization analysis. *Foods*, 13(10), 1560.
- Sevindik, M., Mohammed, F. S., & Uysal, I. (2023). Autism: plants with neuro-psychopharmacotherapeutic potential. *Prospects in Pharmaceutical Sciences*, 21(3), 38-48.
- Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K., Perry G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1502:139–144. doi: 10.1016/S0925-4439(00)00040-5.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W.P.P., Sulaiman Rahman, H. (2018). Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9,1162. doi: 10.3389/fphar.2018.01162.
- Taskın, T., Doğan, M., Çam, M.E., Sahin, T., Senkardes, İ. (2020). In vitro anti-urease, antioxidant, anticholinesterase, cytotoxic and in vivo anti-inflammatory potential of *Satureja cuneifolia* Ten. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(2),222-232.
- Uğur, Y., Güzel, A. (2023). Determination of phytochemical content by LC-MS/MS, investigation of antioxidant capacity, and enzyme inhibition effects of nettle (*Urtica dioica*) *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 5, 1793-1800 DOI: 10.26355/eurev_202303_31540.
- Zhao Y., Zhao B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013:316523. doi: 10.1155/2013/316523.
- Zhou, M., Wang, H., Zeng, X., Yin, P., Zhu, J., Chen, W., Li, X., Wang, L., Wang, L., Liu, Y. (2019). Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 394,1145–1158. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30427-1.
- Zoric, L, Merkulov, L, Lukovic, J, Boza, P. (2012). Comparative analysis of qualitative anatomical characters of *Trifolium L.* (Fabaceae) and their taxonomic implications: preliminary results. *Plant Systematic Evolution* ,298:205–19.