

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜÇ *STACHYS* TAKSONUN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Sefa KOÇAK

**Danışman
Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2015**

© 2015 [Mehmet Sefa KOÇAK]

TEZ ONAYI

Mehmet Sefa KOÇAK tarafından hazırlanan "**Üç *Stachys* Taksonun Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU Süleyman Demirel Üniversitesi
Jüri Üyesi	Prof. Dr. İsmail ÖZMEN Süleyman Demirel Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Mehmet Sabih ÖZER Celal Bayar Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Cengiz SARIKÜRKÜ Süleyman Demirel Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Gökalg Özmen GÜLER Necmettin Erbakan Üniversitesi



Enstitü Müdürü **Doç. Dr. Yasin TUNCER**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Mehmet Sefa KOÇAK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Çalışmada Kullanılan Materyallerle İlgili Taksonomik Bilgiler	3
2.1.1. Lamiaceae familyası.....	3
2.1.2. <i>Stachys</i> cinsi.....	4
2.2. Çalışmada Kullanılan Bitkilerle İlgili Kaynak Özetleri	5
2.3. Enzimler ve Bazı Özellikleri.....	9
2.3.1. Enzimlerin üretim kaynakları	11
2.3.1.1. Bitkisel kaynaklı enzimler	11
2.3.1.2. Hayvansal kaynaklı enzimler	11
2.3.1.3. Mikrobiyal kaynaklı enzimler	12
2.3.2. Enzimlerin numaralandırılması ve sınıflandırılması	12
2.3.2.1. Oksidoretükteazlar.....	13
2.3.2.2. Transferazlar	13
2.3.2.3. Hidrolazlar.....	13
2.3.2.4. Liyazlar	13
2.3.2.5. İzomerazlar	14
2.3.2.6. Ligazlar	14
2.4. Çalışmada Kullanılan Enzimler	14
2.4.1. Kolinesterazlar	14
2.4.1.1. Alzheimer hastalığı nedir?.....	15
2.4.1.2. Asetilkolin metabolizması ve kolinesterazlar.....	16
2.4.1.3. Alzheimer hastalığının tedavisi ve kolinesteraz inhibitörleri	18
2.4.2. Tirozinaz.....	20
2.4.3. α -Amilaz ve α -Glukozidaz enzimi	22
2.5. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	23
2.5.1. Serbest radikaller.....	24
2.5.1.1. Serbest radikallerin çeşitli kaynakları.....	25
2.5.1.2. Serbest radikallerin biyomoleküllere hasarı	30
2.5.1.3. Serbest radikallerin fizyolojik rolü	32
2.5.2. Antioksidanlar	33
2.5.2.1. Antioksidanların etki mekanizmaları	34
2.6. Enzim Olan Antioksidanlar	36
2.6.1. Süperoksit dismutaz	36
2.6.2. Katalaz (CAT)	36
2.6.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), redüktaz ve transferaz	37
2.6.4. Sitokrom oksidaz.....	37
2.6.5. Ksantin oksidaz.....	38

2.7. Enzim Olmayan Antioksidanlar	39
2.7.1. E vitamini	39
2.7.2. C vitamini	40
2.7.3. Retinoid ve karotenoidler	40
2.7.4. Glutasyon	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	41
3.1. Materyaller	41
3.1.1. Çözücüler ve kimyasallar	41
3.1.2. Bitkisel materyallerin toplanması ve teşhis edilmesi	41
3.2. Yöntemler	42
3.2.1. Özütleme yöntemleri	42
3.2.1.1. Çözücü özütlerinin hazırlanması	42
3.2.2. Enzim inhibisyon kapasite tayin yöntemleri	43
3.2.2.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi	43
3.2.2.2. Tirozinaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi	43
3.2.2.3. α -Amilaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi	44
3.2.2.4. α -Glukozidaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi	44
3.2.3. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri	45
3.2.3.1. Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi	45
3.2.3.1.1. β -Karoten/linoleik asit yöntemi	45
3.2.3.1.2. Fosfomolibdenyum yöntemi	45
3.2.3.2. Serbest radikal süpürüm aktivitenin belirlenmesi	46
3.2.3.2.1. DPPH radikal süpürüm testi	46
3.2.3.2.2. ABTS radikal süpürüm testi	46
3.2.3.3. İndirgeme gücünün belirlenmesi	46
3.2.3.3.1. CUPRAC testi	46
3.2.3.3.2. FRAP testi	47
3.2.3.4. Şelatlama kapasitesinin belirlenmesi	47
3.2.3.5. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi	47
3.2.3.6. Toplam flavonoit bileşik miktarının belirlenmesi	48
3.2.3.7. Toplam saponin bileşik miktarının belirlenmesi	48
3.2.3.8. Bitki özütlerinin RP-HPLC ile fenolik içeriklerinin belirlenmesi	48
3.3. İstatistiksel Hesaplamalar	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	51
4.1. <i>Stachys</i> Taksonlarının Çözücü Özüt Verimleri	51
4.2. Çözücü Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi	51
4.2.1. Çözücü özütlerinin toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi	52
4.2.2. Çözücü özütlerinin radikal süpürüm aktivitelerinin belirlenmesi	55
4.2.3. Çözücü özütlerinin indirgeme gücü kapasitelerinin belirlenmesi	58
4.2.4. Çözücü özütlerinin şelatlama kapasitelerinin belirlenmesi	61
4.2.5. Çözücü özütlerinin toplam fenolik, flavonoit ve saponin içeriklerinin belirlenmesi	63
4.2.6. Çözücü özütlerinin RP-HPLC ile fenolik içeriklerinin belirlenmesi	66
4.3. Çözücü Özütlerinin Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi	68
4.3.1. Çözücü özütlerinin kolinesteraz enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi	69
4.3.2. Çözücü özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi	72

4.3.3. Çözücü özütlerinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi.....	73
4.4. Çözücü Özütlerinin Pearson Korelasyon Katsayılarının Belirlenmesi.....	76
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR.....	81
EKLER.....	93
EK A. Standart Fenoliklerin RP-HPLC Kromatogramları.....	94
EK B. <i>S. annua</i> subsp. <i>annua</i> var. <i>annua</i> Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları	95
EK C. <i>S. byzantina</i> Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları	98
EK D. <i>S. iberica</i> subsp. <i>iberica</i> var. <i>densipilosa</i> Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları	101
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÖZET

Doktora Tezi

ÜÇ *STACHYS* TAKSONUN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Sefa KOÇAK

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

Bu çalışmada, bazı *Stachys* türleri (*Stachys byzantina* C. Koch, *Stachys annua* (L.) L. subsp. *annua* (L.) L. var. *annua* Bhattacharjee ve *Stachys iberica* Bieb. subsp. *iberica* Bieb. var. *densipilosa* Bhattacharjee) çözücü özütlerinin (etil asetat, metanol ve su) antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri araştırıldı. Özütler içerisindeki toplam biyoaktif bileşik (fenolik, flavonoid ve saponinler) miktarları spektroskopik olarak belirlendi. Buna ilaveten, özütlerdeki fenolik bileşikler RP-HPLC-DAD ile tespit edildi. Antioksidan aktivite, radikal süpürüm aktivite (DPPH ve ABTS), indirgeme gücü (CUPRAC ve FRAP), toplam antioksidan aktivite (β -karoten renk açılım ve fosfomolibdenyum yöntemleri) ve metal şelatlama kapasitesi testleri gibi farklı testler kullanılarak belirlendi. Ayrıca özütlerin asetilkolin esterase, bütirilkolin esterase, tirozinaz, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon aktiviteleri de araştırıldı.

HPLC analizlerine göre, klorojenik asit ve (+)-kateşin *Stachys byzantina* bitkisi özütlerinde ana bileşen olarak tespit edildi. Buna rağmen *Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonunun tüm özütlerinin klorojenik asit bakımından zengin olduğu saptandı. Elde edilen bu sonuçlar, üç *Stachys* taksonunun insan sağlığı için değerli bir doğal ürün olması yanında gıda, kozmetik ve ilaç uygulamaları için de alternatif katkı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Stachys byzantina*, *Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua*, *Stachys iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa*, antioksidan aktivite, fenolik bileşik, HPLC

2015, 106 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF SOME BIOLOGIC ACTIVITIES OF THREE *STACHYS* TAXA

Mehmet Sefa KOÇAK

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

In this study, the antioxidant and enzyme inhibition activities of solvent extracts (ethyl acetate, methanol and water) from some *Stachys* species (*Stachys byzantina* C. Koch, *Stachys annua* (L.) L. subsp. *annua* (L.) L. var. *annua* Bhattacharjee and *Stachys iberica* Bieb. subsp. *iberica* Bieb. var. *densipilosa* Bhattacharjee) were evaluated. Total antioxidant components (phenolics, flavonoids, and saponins) in the extracts were determined spectrophotometrically. In addition, phenolic components in these extracts were detected by using reverse phase high-performance liquid chromatography-diode array detector (RP-HPLC-DAD). The antioxidant capacity were evaluated using different established methods, specifically free radical scavenging (DPPH and ABTS), reducing power (FRAP and CUPRAC), total antioxidant capacity (β -carotene bleaching and phosphomolybdenum methods) and metal chelating activity. Inhibitory activities of *Stachys* species on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, α -amylase, α -glucosidase and tyrosinase were also evaluated.

According to HPLC analysis, chlorogenic acid and (+)-catechin found as the major compounds for *Stachys byzantina*, while chlorogenic acid was the major phytochemical for the all fractions of *Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua*. These findings suggest that three *Stachys* taxa are valuable source of natural agents for human health and could be useful as additives for food, cosmetic or pharmaceutical applications.

Keywords: *Stachys byzantina*, *Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua*, *Stachys iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa*, antioxidant activity, phenolics, HPLC

2015, 106 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU, Doç. Dr. Cengiz SARIKÜRKÜ ve Doç. Dr. Mehmet Sabih ÖZER'e,

Tezde kullanılan bitkilerin botanik tanımlamalarını yapan Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim elemanı Dr. Olcay CEYLAN'a,

Laboratuvar çalışanlarının bir kısmının yapılmasındaki katkılarından dolayı Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK, Arş. Gör. Dr. Gökhan ZENGİN ve Doktora öğrencisi Ramazan CEYLAN'a,

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan değerli eşim Serpil KOÇAK, çocuklarım Salih Mehmet ve Sibel Hafsa'ya sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Mehmet Sefa KOÇAK
ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı.....	16
Şekil 2.2. Asetilkolin metabolizması.....	17
Şekil 2.3. Alzheimer hastalığının tedavisi için kolinesteraz inhibitörleri.....	20
Şekil 2.4. α -Amilaz enziminin şematik modeli	23
Şekil 4.1. <i>Stachys</i> taksonlarının çözücü özüt verimleri	51
Şekil 4.2. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin β -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri	53
Şekil 4.3. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin fosfomolibdenyum yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri	54
Şekil 4.4. DPPH radikal süpürüm mekanizması.....	55
Şekil 4.5. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri	56
Şekil 4.6. ABTS katyon radikal oluşum ve süpürüm mekanizmaları	57
Şekil 4.7. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin ABTS katyon radikal süpürüm aktiviteleri.....	57
Şekil 4.8. CUPRAC indirgeme gücü test mekanizması	59
Şekil 4.9. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin CUPRAC yöntemiyle indirgeme gücü kapasiteleri	59
Şekil 4.10. FRAP indirgeme gücü test mekanizması	60
Şekil 4.11. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin FRAP yöntemiyle indirgeme gücü kapasiteleri.....	61
Şekil 4.12. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin Fe(II) iyonları şelatlama kapasiteleri.....	62
Şekil 4.13. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları	64
Şekil 4.14. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin toplam flavonoit bileşik miktarları	65
Şekil 4.15. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin toplam saponin bileşik miktarları	66
Şekil 4.16. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerindeki fenolik bileşiklerin yapıları... ..	67
Şekil 4.17. Asetil/bütiril kolinesteraz metabolizması	69
Şekil 4.18. Asetil/bütiril kolinesteraz enzim mekanizması.....	70
Şekil 4.19. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin asetil kolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri	71
Şekil 4.20. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin bütiril kolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri	71
Şekil 4.21. Tirozinaz enzim mekanizması	72
Şekil 4.22. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon aktiviteleri.....	73
Şekil 4.23. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin α -amilaz enzim inhibisyon aktiviteleri.....	74
Şekil 4.24. α -Glukozidaz enzim mekanizması.....	75
Şekil 4.25. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. İnsan fizyolojisinde karşılaşılan serbest radikaller ve oksidanlar	24
Çizelge 2.2. Serbest radikallerin endojen kaynakları	27
Çizelge 2.3. Oksidatif stresin dış kaynakları.....	28
Çizelge 2.4. Oksidatif stresi tetikleyen bazı ilaçlar.....	30
Çizelge 2.5. Enzim olmayan bileşikler ve fonksiyonları	39
Çizelge 3.1. <i>Stachys</i> taksonları özütlerinin fenolik içerikleri için HPLC programı	49
Çizelge 3.2. Standart fenolik bileşiklere ait analitik karakteristikler	50
Çizelge 4.1. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütlerinin RP-HPLC ile fenolik bileşik içerikleri	68
Çizelge 4.2. <i>Stachys</i> taksonları çözücü özütleri için toplam biyoaktif bileşikler ile antioksidan ve enzim inhibisyon aktivite testleri arasındaki korelasyon katsayıları	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ACEs	Akarboz eşdeğer
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
dk	Dakika
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTAEs	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu eşdeğer
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
GAEs	Gallik asit eşdeğer
GALAEs	Galantamin eşdeğer
KAEs	Kojik asit eşdeğer
m	Metre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
REs	Rutin eşdeğer
RP-HPLC	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
TEs	Troloks eşdeğer

1. GİRİŞ

Bitkiler, eski çağlardan beri tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Günümüzde bitkisel ilaçlar birçok ülkede temel sağlık kaynağı olmuştur. Dünyada nüfusun %80'i hala geleneksel ilaçlara bağlı olduğu görülmektedir (Tiwari, 2008). Bunun yanı sıra bitkilerin tedavi amacıyla kullanılması ise ilk uygarlıklara kadar dayanmaktadır. Alman Kimyacı Serturmer 1805 yılında afyon bitkisinden ilk etken madde olan morfini izole etmiştir. Bunu 1820'de kınakının kabuklarından kinin, 1868'de yüksük otu (*Digitalis*) yapraklarından kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan digitalin ve 1890'da söğüt dalı kabuğundan asetilsalisilik asitin izolasyonu takip etmiştir. Daha sonraları doğal ilaçların sentetik türevleri sentezlenerek insanların hizmetine sunulmuştur. Bazı doğal ilaçların laboratuarda sentezi pahalı bir işlem olduğu için hala bitkisel droglardan elde edilmektedir. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bitkisel drogların tedavide kullanılmasının başka bir üstünlüğü de birkaç etkiye birden sahip olmalarıdır. Oysa sentetik ilaçlar sadece tek etkiye sahiptirler. Yeni geliştirilen ilaçların neredeyse yarısının doğal kaynakları esas alması, yürütülen çalışmaların yönünün doğaya yönlenmesine sebep olmuştur. Bu amaçla yeni doğal ilaç hammaddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Baytop, 1984; Newman vd., 2008; Fakılı, 2010; Bayın, 2014).

Bitkilerin bilimin araştırma konusu haline gelmesinde, ülkemizin gerek coğrafi koşulları gerekse iklim şartlarının çeşitliliği dolayısıyla geniş bir floraya sahip olması etkili olmuştur. Son yılların en önemli çalışmaları arasında, bitkilerden sekonder metabolitlerin izolasyonu konuları yer almaktadır. Etken maddelerin izolasyonu, farmakolojik etkilerinin ortaya konması, yapılarının belirlenmesi bu alandaki çalışmaların en önemli kısmını teşkil etmektedir. Günümüzde kullanılan ilaçların %80'i doğal ürünlerden oluşmakta ya da doğal ürünlerden elde edilen moleküllere farklı gruplar takılarak etkinliği arttırılmaktadır (Pezzuto, 1997).

Biyoloji, kimya, farmakoloji, toksikoloji gibi disiplinlerin özellikle modern bilimlerin gelişmesi ile kombine çalışmaları sonucunda, halk ilacı olarak kullanılan birçok bitkinin yapısında bulunan doğal bileşiklerin, fitokimyasal yapıları aydınlatılmakta ve biyolojik aktiviteleri saptanabilmektedir (Baykal, 1997; Dölger vd., 1999; Tadeğ vd., 2005).

Günümüzde bitkiler, tıbbın tamamlayıcısı olmakla beraber alternatif tıpta geniş kullanım alanı bulmaktadır. Ucuz olmaları, kolaylıkla elde edilebilmeleri, ham olarak ya da basit preparatları halinde kullanılabilmeleri, bu bitkilerin en önemli özelliklerindendir.

Bitkilerin şifalı olan kısımları (kökleri, yaprakları, dalları, kabukları, çiçekleri ve meyveleri) genellikle fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, tanninler, kumarinler, lignanlar ve ligninler) bakımından zengindir. Bu fenolikler antikanserojen, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gibi pek çok biyolojik etkiye sahiptirler (Kujala vd., 1999).

Yeryüzünde yetişen bitkiler âlemine bakıldığında, çok azının etken madde bakımından araştırılmış olduğu gözlenmektedir. Dolayısıyla daha birçok bitkinin keşfedilmeyi beklediği söylenebilir (Baytop, 1984; İlisulu, 1992; Bayın, 2014).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyallerle İlgili Taksonomik Bilgiler

2.1.1. Lamiaceae familyası

Lamiaceae familyası, yükseklik ve habitat tipi ayırt etmeksizin, dünyada hemen hemen her yerde yetişebilen ve sahip olduğu üyelerinin sayısına bakıldığında oldukça büyük familyalardan biridir (Watson ve Dallwitz, 1978).

Bu familyaya ait taksonların tropik yağmur ormanlarında yaşayan birkaç cinsi dışında genellikle açık arazi bitkileri olduğu bilinmekle beraber, dünyada en fazla Akdeniz havzasında yayılım göstermektedir (Watson ve Dallwitz, 1978; Morgarıs vd., 1982; Davis, 1988).

200 cins ve yaklaşık 3200 türe sahip olan Lamiaceae familyası, Türkiye’de 45 cins, 546 tür ve 731 takson ile temsil edilmektedir (Davis, 1982; Baytop, 1991; Leblebici, 2011). Bununla birlikte, Lamiaceae familyası, Türkiye’de %42 oranında endemizme sahip bir familya durumundadır (Baser, 1994).

Lamiaceae familyasına ait taksonlar, tek ya da çok yıllık çalı formunda olan ve nadiren odunsu özellik göstermekle beraber ekonomik açıdan değerli ve tıbbi özellikleri bulunan bitkilerdir. Gövde ve dallarının dört köşeli olması en karakteristik özelliğidir. Yaprakları, stipul bulundurmamakla beraber basit, kenarları dişli ve opposit-dekussat dizilişlidir (Watson ve Dallwitz, 1978; Baytop, 1991).

Lamiaceae familyasının büyük bir ekonomik öneme sahip olmaları, üyelerinin içermiş oldukları esansiyel yağlar ve aromatik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle Lamiaceae familyasının *Thymus*, *Mentha* ve *Origanum* türleri gıda sanayinde; *Pogestemon* ve *Lavandula* cinslerine ait bazı taksonları ise parfümeri sanayinde kullanılmaktadırlar (Watson ve Dallwitz, 1978; Baytop, 1991). Ayrıca halk arasında tedavi amaçlı kullanılan ve bu familyaya ait pek çok türün (*Stachys*, *Sideritis*, *Salvia*, *Lamium*, *Ajuga*, *Teucrium*, *Thymus*, *Phlomis* vs.) olduğu bilinmektedir (Baytop, 1984; 1991).

2.1.2. *Stachys cinsi*

İçerdiği 300 civarındaki tür ile *Stachys* L., Lamiaceae familyasının en büyük cinslerinden biridir. *Stachys* L. cinsi, Akdeniz ve Güneybatı Asya'nın ılıman bölgelerinde yoğun olmakla beraber Kuzey ve Güney Amerika ile Güney Afrika göze çarpmaktadır (Leblebici, 2011).

Bu cins Türkiye'de 121 taksonla temsil edilmekte ve tür seviyesinde %43.4 endemizm oranına sahip bulunmaktadır (Leblebici, 2011).

Stachys L. cinsinin tür sayısı bakımından iki merkezi bulunmaktadır. İlki, Güney ve Doğu Anadolu, Kafkasya, Kuzeybatı İran ve Güney Irak'ı içine alan bölge; ikincisi ise Balkan Yarımadası'dır. Cinsin türlerinin büyük bir bölümü kayalık alanlarda, özellikle de kalker kayalıklarda yayılış göstermektedir. Dünya da, yeni türlerin hala tatmin edici bir taksonomik çalışmalar yapılmamışken, çeşitli girişimler, eski dünya türleri için yeterli alttür tanımlamaları yapmıştır (Bhattacharjee, 1980).

Cinsin Türkiye florası, Bhattacharjee (1982) tarafından revize edilmiştir. *Stachys* L. cinsi bu çalışmaya göre, Türkiye Florası'nda 12 alt seksiyon, 15 seksiyon ve 2 alt cinse mensup 72 tür ile temsil edilmektedir (Bhattacharjee, 1982). Ayrıca bu türlerden 6 tanesini içeren *Infrarosularis* seksiyonu, 7 takson içerdiği bilinmektedir.

Stachys byzantina bitkisi çok yıllık olup taban yaprak kısmı verimsizdir. Genellikle yalın dalsız olmakla beraber düzensiz dallı az bulunur. Çiçekli gövde uzunluğu 1 m'dir. Tüyleri yoğun, yünsü-uzun, yumuşak ve sık tüylüdür. Yünsü-keçemsi, örümcek ağsı-keçemsi tüy az bulunur. Taban yaprakları dikdörtgensik, geniş mızraksızdır.

Bitkinin yapraklarında yoğun ipeksi-keçemsi tüyleri bulunur. Tepe küt uçlu, çoğunlukla tabanda dar yapraklıdır. Yuvarlak yapraklı ise az bulunur. Yaprak sapları 2-6 cm uzunluğundadır. Çiçek yaprakları sapsız, mızraksı ve üstteki yapraklar vertisillasterler kadardır. Vertisillat'lar 15-20 çiçekli, genelde aşağıda uzaklaşmışlardır. Bitkinin ucundaki vertisilat'lar ise birbirine yaklaşmışlardır.

Vertisillatları tamamen birbirinden uzaklaşmış az bulunur. Brakte'ler yumurtamsı mızraksı, şeritsi-mızraksı, ucu dikensi değil. Çiçek sapı 0.5-12 mm'dir. Kaliks yarı iki dudaklı, ters kaşık ve uzunluğu 8-10 mm'dir.

Kaliks dişleri yumurtamsı-üçgensiz tüpün 1/3'ü kadardır. Mucro sivri uçlu ve çok küçüktür mucronun uzunluğu 0.2-0.5 mm kadardır. Salgı tüyü bulunmaz ya da bir kaç tane bulunur. Çiçek rengi gül pembe (Davis, 1982).

S. byzantina bitkisi, Karadeniz Bölgesi, Marmara Bölgesi, iç Anadolu Bölgesi ve Ege Bölgelerinde yayılış göstermekle beraber Mayıs-Temmuz ayları çiçek açma zamanıdır. Bitkinin yetişme ortamı 30-2000 m aralığındaki yüksekliklerde bulunan kurak bayırlar, çalılıklar, açık alanlar ve açık ormanlıklardır (Geçibesler, 2009).

2.2. Çalışmada Kullanılan Bitkilerle İlgili Kaynak Özetleri

Genel olarak *Stachys* türleri karın ağrısı, kramplar, baş dönmesi, ateş, gut ve regl kaynaklı hastalıklara yönelik çeşitli bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek, orta dereceli kulak ağrıları ve astım semptomlarını hafifletmek, mukusu çözmek, öksürüğü rahatlatmak ve genital tümör ile kanserli ülser gelişimini engellemek amacıyla geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Yapılan farmakolojik çalışmalar *Stachys* genusuna ait bitkilerin özütlerinin ya da özüt bileşenlerinin önemli antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antiinflammatuar, hipotansif ve antinefritik gibi biyolojik aktivitelere sahip olduklarını göstermiştir (Tundis vd., 2014).

Farklı *Stachys* türleri halk tarafından yaban nanesi, böbrek burçağı ya da dağ çayı olarak bilinirler; İran ve Türkiye'de bitkisel çay olarak tüketilmektedirler (Goren vd., 2011).

Yapılan çalışmalar sonucunda *Stachys* cinsine ait birçok taksonun kimyasal içerikleri ve bu içeriklerin antimikrobiyal aktivite araştırmaları ortaya konulmuştur. Ayrıca *Stachys* cinsine ait türlerin bazı kısımlarında flavonoid glikozit, iridoid, phenethyl alkol glikoziti, labdane diterpenoid gibi maddeler

bulunduğu tespit edilmiştir (Nishimura vd., 1991; Paternostro vd., 2000; Kotsos vd., 2001).

Stachys cinsi taksonlarının toprak üstü kısımlarından elde edilen yağlarla yapılan çalışmalarda bu maddelerin güçlü antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Skaltsa vd., 1999; Digrak vd., 2001; Maleki vd., 2001; Rabbani vd., 2003).

Demirtaş vd. (2013), yaptıkları çalışmada, *S. byzantina* bitkisinden flavon türevleri izole etmişler ve izole edilen bu moleküllerin yüksek antikanser aktiviteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Takeda vd. (1997), *S. byzantina* türünden diğer bilinen glikozitlerin (icariside B2, blumeol C glikoziti, (6R,9R)- ve (6R,9S)-3-okso- α -ionol glikozitleri ve verbascoside) yanında iki yeni glikozit (byzantionosides A ve B) izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

S. byzantina bitkisinin toprak üstü kısımlarından asiklik diterpen olan fitil nonadekanoatı yapılan çalışmalar sonucunda izole edilmiştir. Buna ilave olarak iki normal alken bir yağ asidi ve iki stereol tanımlanmıştır. Ayrıca yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, *S. byzantina*'ın metanol ve aseton özütlerinin ağrı kesici ve ateş düşürücü noktasında etkili oldukları saptanmıştır (Khanavi vd., 2004).

Khanavi vd. (2004), *S. byzantina* bitkisinden su buharı destilasyonu ile 26 bileşen analiz etmişlerdir ve bu bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlarının α -kopaen, spatulenol ve β -karyofillen gibi seskiterpenler yönünden oldukça zengin olduklarını saptamışlardır.

S. byzantina bitkisinin de içinde olduğu bazı *Stachys* trlerinin uçucu yağ analizleri yapılmış ve analiz neticesinde *S. byzantina* bitkisinde büyük çoğunlukta piperitenon (%9.9), 6,10,14-trimetil pentadekan-2-on (%6.4) ve n-trikosan (%6.4) bileşenlerinin olduğu belirlenmiştir (Geçibesler, 2009).

Yapılan bir diğ er çalışmada, Lamiaceae familyasına ait bazı *Stachys* türlerinin antioksidan aktiviteleri  l   m ş ve bu çalışma sonucunda *S. byzantina* bitkisinin belirgin antioksidan aktivite g sterdiğı saptanmıştır (Erdemoglu vd., 2006).

Jassbi vd. (2014), içerisinde *S. byzantina* türünün de bulunduğı 9 farklı *Stachys* türünün stotoksik, antioksidan ve aktimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, diğ er türlerle kıyaslandığında *S. byzantina* türünün metanol özütünün orta derecede DPPH radikal süpürüm aktiviteye (IC₅₀: 135.1  g/ml) sahip olduğı belirlenmiştir. Ayrıca yine aynı türün metanol özütünün 23.9 mg gallik asit/g özüt olarak toplam fenolik i eriğ e sahip olduğı rapor edilmiştir.

Tepe vd. (2011), yaptıkları çalışmada *S. iberica* bitkisinin su özütünün antioksidan aktivitesinin farklı in vitro test sistemleriyle belirlemişlerdir. Bu çalışmada su özütünün iyi bir linoleik asit inhibisyon kapasitesi sergilediğı; ancak orta derecede radikal süpürüm aktivite ve metal şelatlama kapasitesine sahip olduğı rapor edilmiştir.

Kaya vd. (2001), yaptıkları bir çalışmada Türkiye’de yetişen *S. iberica* bitkisinin alt türü olan *S. iberica* subsp. *stenostachya* bitkisinin uçucu yağ bileşenlerini karakterize etmişler ve uçucu yağın %96’sını tanımlamışlardır. Bu çalışmada, bitki uçucu yağında linalil asetat (%42.2), linalool (%18.9) ve geranil asetat (%8.2) ana bileşenler olarak rapor edilmiştir.

Digrak vd. (2001), *S. annua* subsp. *annua* bitkisinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri üzerine bir araştırma yapmışlar ve araştırma sonucunda bitkinin hem antifungal hem de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak aktivitenin hangi moleküllerden kaynaklandığı ortaya konulmamıştır.

Bir başka çalışmada, *S. annua* bitkisinin etanol  z t n n *S. aureus*, *Y. ruckeri*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* ve *M. luteus* bakterilerine karşı g   l  antibakteriyel aktiviteye sahip olduğı belirlenmiştir (Digrak vd., 2001; Türker ve Karakaş, 2009; Yildirim vd., 2013).

Hajdari vd. (2012), Kosova'nın üç farklı bölgesinden topladıkları *S. sylvatica* bitkisinin yaprakları ve çiçeklerinden elde ettikleri özütlerin antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada özütlerin farklı derecelerde DPPH radikal süpürüm kapasitelerine sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bitkinin yaprak ve çiçek özütlerinde antioksidan testler ile fenolik ve flavonoidler arasında yüksek bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Bilušić Vundać vd. (2007), altı *Stachys* taksonunun (*S. alpina*, *S. palustris*, *S. recta* subsp. *recta*, *S. recta* subsp. *subcrenata*, *S. germanica* subsp. *salviifolia* ve *S. sylvatica*) metanol, etanol ve diklormetan özütlerinin antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmada bitki özütlerinin lipid peroksidasyonu ve ksantin oksidaza karşı herhangi bir inhibisyon etkisi göstermedikleri ancak DPPH radikaline karşı süpürücü etki sergiledikleri belirtilmiştir. Ayrıca polar özütlerin apolar özütlerle nazaran daha güçlü aktivite sergiledikleri tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada özütlerin radikal süpürüm kapasiteleri ile toplam flavonoid miktarları arasında düşük korelasyon gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Kukić vd. (2006), dört farklı *Stachys* taksonunun (*S. alpina* subsp. *dinarica*, *S. anisochila*, *S. beckeana* ve *S. plumosa*) çiçekli toprak üstü kısımları metanol özütlerinin antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları ile antioksidan testler arasında yüksek bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir.

Delazar vd. (2005), *S. bombycina* bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanol özütlerinden iki flavonoid türevi izole etmiş ve bu flavonoidlerin DPPH radikal süpürüm aktivitelerini belirlemişlerdir.

Couladis vd. (2003), içerisinde *S. spruneri* bitkisinin de aralarında bulunduğu Lamiaceae familyasına ait yirmi bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol özütlerinin in vitro antioksidan aktivitelerini belirlemişler ve bu özütlerin α -tokoferol kadar etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Conforti vd. (2009), altı farklı *Stachys* türünün (*S. cretica* subsp. *vacillans*, *S. germanica*, *S. hydrophila*, *S. nivea*, *S. palustris* ve *S. spinosa*) DPPH radikal

süpürüm yeteneklerini araştırmışlar ve *S. palustris* bitkisinin en yüksek aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Literatürde yapılan çalışmalar, radikal mekanizmaların neden olduğu yaşlılık ve diğer hastalıklara karşı tıbbi kullanımları nedeniyle *Stachys* genusu bitkilerinin iyi bir doğal antioksidan kaynakları olabileceğini göstermektedir.

2.3. Enzimler ve Bazı Özellikleri

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. 1878 yılında enzim terimi ilk kez Kuhne tarafından kullanılmıştır. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wiseman, 1987). Ayrıca 1897 yılında Eduard Buchner hücrelerden fonksiyonel enzimleri ekstrakte etmiştir (Paulo ve Gubitz, 2003).

Enzimler aktif bölge olarak adlandırılan yapılarındaki bölgelerde özel katlanmalarla substratlara bağlanırlar. Bir enzimin aktif bölgesi 2 anahtar bölge içerir. Birincisi reaksiyon boyunca substrat ile etkileşim içinde olan bölge, diğeri ise enzimin kimyasal gruplarının substratla etkileşmesini sağlayan bağlanma bölgesidir (Lerner ve Lerner, 2003; Haliskaranfil, 2012).

Birçok kimyasal ve fiziksel parametre enzimin katalizleme oranı üzerinde etkilidir. Bu değişikliğin nedeni protein yapısının etkilenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Paulo ve Gübitz, 2003; Haliskaranfil, 2012). Aktif bölgedeki amino asitlerin pH'sı, polaritesi ve hidrofobik durumu enzim aktivitesini etkileyen faktörlerdir. Enzimler sahip oldukları fizyolojik pH'da ve uygun bir ısıdaki sulu çözücülerde genel olarak oldukça aktiftirler.

Birçok enzim, elektronlar, atomlar ya da atom gruplarının transferini katalizlerler. Bilinen enzimlerin binlercesi bu şekildedir, fakat bunlar biyolojik aktivitelerine göre sınıflandırılacak olunursa 6 büyük grup içerisine girerler: Oksiredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır. Enzimlerin genel olarak optimum aktivite gösterdikleri pH aralığı vardır. Ortam pH'sı substrat iyonizasyonu ve aktif bölgedeki katalitik grupların

iyonizasyonunu etkileyecektir. Elektrostatik etkileşimler pH ile kontrol edilirler. Bir reaksiyonun pH'sı, makromolekülün 3 boyutlu yapısı için kritik amino asitleri etkileyerek enzimin konformasyonunu kontrol edebilir (Lerner ve Lerner, 2003; Haliskaranfil, 2012). Çok sayıda kimyasal madde, enzimlerin katalitik aktivitelerine indükleyici ya da inhibe edici yönde etki etmektedir. Birçok inorganik iyonun enzimleri aktive ettiği belirtilmiştir. Aktivatör iyon, koenzim ya da kosubstrat kompleksindeki reaksiyona doğrudan dâhil edilebilir. (Örneğin Fe iyonları ATP-Mg ya da flavin kompleksine bağlanır).

Diğer yandan iyon, enzimin bir parçasıdır ve hem aktif konformasyon için düzenleyici olarak etki gösterir (Alkalın fosfatazdaki Zn iyonları gibi) hem de aktif bölgeye doğrudan bağlanır (karboksipeptitazdaki Zn ya da Co iyonları gibi) (Aehle,2007; Haliskaranfil, 2012). İnhibitörler, enzimlerin bağlanmalarını değiştirerek aktivitelerini inhibe ederler. İnhibitörler substratın yapısına benzeyebilirler bu nedenle enzimin bağlanmasında substrat ile rekabet eder. İnhibitörler, büyük organik moleküller, küçük organik moleküller veya iyonlar olabilirler (Lerner ve Lerner, 2003; Haliskaranfil, 2012).

Hücredeki reaksiyonlar yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonlar %100 verimle sonuçlanır. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH'da ve canlının vücut sıcaklığında gerçekleşir. Biyokimyasal reaksiyonlar az enerji ve düşük sıcaklıkta gerçekleşir. Normal laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık ve fazla enerji gerektiren pek çok reaksiyon, enzimlerin kullanılmasıyla daha düşük sıcaklıkta ve enerjide gerçekleştirilebilir (Tüzün, 1997; Çörtenlioğlu, 2006).

Enzimler spesifik oluşları ve çok düşük derişimlerde bile substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanına sahiptirler.

Enzimler gıda ve kimya endüstrisinde; tıp, eczacılık, ziraat gibi alanlarda teşhis, tedavi ve biyolojik savaş gibi amaçlarla kullanılırlar (Park ve Hoffmann, 1993; Çörtenlioğlu, 2006).

2.3.1. Enzimlerin üretim kaynakları

Enzimin, fermentasyon teknikleri ile uygun küf, maya ve bakteri türleri kullanılarak üretimi gerçekleştirilmektedir (Adams ve Moss, 1995; Ray, 1996; Fadıloğlu ve Erkmén, 1999). Endüstride kullanılan enzimler genelde mikroorganizma kökenli olmakla beraber bitkisel ve hayvansal kaynaklı da olabilmektedir (John, 1987; Türker, 2014).

2.3.1.1. Bitkisel kaynaklı enzimler

Bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoteknolojik enzimler genellikle güvenilirliği doğrulanmış, toksik olmayan ve yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir (John, 1987; Türker, 2014). Bitkisel kökenli enzimlerden papain, bromelain ve ficin, soya fasulyesi lipoksigenazı ve tahıl amilolitik enzimleri, proteaz enzim sınıfında bulunmaktadır. Bitkisel kökenli enzimlerin kullanım durumu ise toprak işleme etkinliği, gelişim döngüsü ve iklim gibi faktörlere bağlı olup, artan talebi karşılayıp karşılayamayacağını belirleyen faktörlerdir. Bitkisel kökenli enzim ticaretinde, ulusal ve uluslararası politik kuruluşların tarımsal yaklaşımları da önemli bir unsurdur (Godfrey ve West, 1996; Türker, 2014).

2.3.1.2. Hayvansal kaynaklı enzimler

Hayvansal kaynaklı enzimler, insan yiyecek ürünlerinin hazırlanmasında uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Bu enzimler genelde tavuk yumurtasının beyazı, pankreas, domuz midesi, geviş getiren hayvanların karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilmektedir (John, 1987; Türker, 2014).

Hayvansal kökenli enzim kaynakları, pankreatik lipaz, pankreatik proteaz, pepsinler, pepsinlik esterazlar ve rennetlerdir. Bu enzimlerin üretiminde, yetiştirilen hayvanları kontrol eden ulusal ve uluslararası politik yaklaşımlar ve tarımsal kuruluşların izledikleri politikalar önemli rol oynamaktadır. Ayrıca yerli ticari hayvan ırklarının korunması, hayvansal dokuların bir ülkeden diğerine taşınması sırasında mevcut risklerin yayılımının engellenmesi sebebi ile hayvansal kökenli enzimlerin üretiminin kısıtlanması, mikrobiyal kaynaklı

enzimlerin daha önemli hale gelmesine sebep olmuştur (Godfrey ve West, 1996; Türker, 2014).

2.3.1.3. Mikrobiyal kaynaklı enzimler

Mikroorganizma kaynaklı enzimler, endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha kararlı ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri, katalitik aktivitelerinin yüksek olması ve istenmeyen yan ürün oluşturmamaları endüstride kullanılmaları konusunda başlıca avantajlarıdır (Wiseman, 1987; Türker, 2014). Mikroorganizmaların, kontrolü ve çoğaltılmasına ait genetik-fizyolojik bilgiler günümüzde mevcut olmakla beraber, istenilen birçok metabolik ürünler bu yollarla üretilmektedir (Okafor, 2007). Mikroorganizma kökenli enzimlerin zamanla öneminin arttığı ve buna, endüstride kullanılan birçok enzimin mikrobiyal kökenli olması sebep olarak gösterilmektedir (Demain ve Solomon, 1981; Türker, 2014). Ayrıca enzim üretim kaynağı olarak genellikle mikroorganizmanın tercih edilmesi, üretimin arttırılması için ise bunların modifiye edilmesini zorunlu hale getirmektedir. Enzim üretiminde *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* gibi mikroorganizmalar en çok kullanılan enzim kaynaklarıdır (Glazer ve Nikaido, 1995; Türker, 2014).

2.3.2. Enzimlerin numaralandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler ilk olarak etki ettikleri substratlara göre sonlarına -az eki getirilerek kullanılmıştır. Ancak bu sınıflandırma birden daha fazla enzim sistemini açıklamaya yetmemiştir. Daha sonra Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC), katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır.

Her gruptaki enzimlere özel kod numaraları (E.C.) verilir ve gruptaki enzimler alt gruplara ayrılarak 4 noktalama işareti kullanılır;

- İlk numara enzimin ait olduğu 6 sınıfın hangisini içerisine girdiğini göstermektedir,
- İkinci noktalama alt sınıfı

- Üçüncü noktalama enzimin alt-alt sınıfını ve
- Dördüncü noktalama ise enzimin içinde bulunduğu alt-alt sınıftaki seri numarasını

göstermektedir (Haliskaranfil, 2012).

Katalizledikleri reaksiyonlara göre sınıflandırılan enzimlerden, farklı enzimlerin aynı reaksiyonları gösterenlerine izoenzim denir. Enzimlerin gösterdikleri özelliklere göre sınıflandırıldığı altı grup aşağıdaki gibidir (Paulo ve Gübitz, 2003; Haliskaranfil, 2012).

2.3.2.1. Oksidoretükteazlar

Bu sınıf redoks reaksiyonlarını katalizleyen tüm enzimleri kapsar. İlk olarak dehidrojenaz olarak isimlendirilmişlerdir; ancak redüktaz olarak kullanılmaktadırlar. Oksidazlar yalnızca oksijen olduğunda kullanılan azaltıcı akseptörlerdir. Sistematik isimleri vericiye göre şekillenmiştir; akseptör oksidoredüktaz (Haliskaranfil, 2012).

2.3.2.2. Transferazlar

Transferazlar fosfat, glikozil, amino, açıl, metil gibi spesifik bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalizler. Normal olarak akseptör gruptransferaz ya da verici gruptransferaz ismi önerilmiştir. Sistematik ismi ise vericiye göre şekillenmiş akseptör grup transferaz'dır (Haliskaranfil, 2012).

2.3.2.3. Hidrolazlar

Hidrolazlar C-O, C-N, C-C ve diğer bazı bağların hidrolitik ayrılmalarını katalizlerler. Genellikle -az son eki ile substrat isminden ibaret bir isim önerilmiştir. Sistematik ismi her zaman hidrolaz içerir (Haliskaranfil, 2012).

2.3.2.4. Liyazlar

C-C, C-O, C-N ve diğer bağlar arasındaki ilişki liyazlar tarafından elemine edilir. Dekarboksilaz, aldolaz, dehidrataz gibi isimler alırlar (Sırasıyla; CO₂, aldehit ve

suyu elemine ederler). Sistematik isimleri ise substrat grup-liyaz şeklinde biçimlenir (Haliskaranfil, 2012).

2.3.2.5. İzomerazlar

İzomerazlar molekül içi geometrik ya da yapısal yeniden düzenlemeyi katalizlerler. İzomerizmin farklı tipleri, rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz veya sikloizomeraz gibi isimlendirmeler yol açmıştır (Haliskaranfil, 2012).

2.3.2.6. Ligazlar

Ligazlar iki molekülün bir birine bağlanmasını sağlamaktadırlar (Aehle, 2007).

2.4. Çalışmada Kullanılan Enzimler

2.4.1. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar, Henry Dale tarafından varlığı ilk kez 1914 yılında ileri sürülen ve detaylı çalışmaları 1930'lardan beri devam eden serin hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Aktif bölgenin aminoasit dizilimi ve aktif bölgede görev alan reaktif serinin belirlenmesi ilk olarak 1959'ların başından itibaren mümkün olmuştur. 1987'de Lockridge tarafından insan BChE'nin tam tüm dizisi eksiksiz olarak belirlenmiştir (Massoulie vd., 1993; Özturan Özer, 2012).

Ayrıca kolinesterazlar asetilkolin ve bütirilkoline olan substrat seçicilikleri nedeniyle 2 gruba ayrılır. Asetilkolinesteraz (AChE, asetilkolinasetilhidrolaz, EC 3.1.1.7) gerçek kolinesteraz; Bütirilkolinesteraz (BChE, açilkolinaçilhidrolaz, EC 3.1.1.8) psödokolinesteraz, serum kolinesterazı ya da nonspesifik kolinesteraz olarak adlandırılır. AChE ile BChE'ı birbirinden ayıran diğer bir önemli özellik de yüksek substrat derişimlerinde AChE'nin inhibe, BChE'nin ise aktive olmasıdır (Çokuğraş, 2003; Özturan Özer, 2012). Enzimler seçici inhibisyonları yönünden de birbirlerinden farklılık gösterirler. AChE seçici olarak 1,5-bis (4-allildimetilaminopropilpentan-3-on-dibromür) (BW284C51) ile inhibe olurken, BChE ise 10-(2-dietilaminopropil)-fenotiyazid (etopropazin) ve isotetramonoisopropilpirofosfattetramid (iso-OMPA) inhibisyonuna duyarlıdır.

Amino asit dizi içeriklerinde %65 benzerlik gösteren enzimler sırasıyla 7. ve 3. kromozomlarda kodlanırlar (Çokuğraş, 2003; Özturan Özer, 2012).

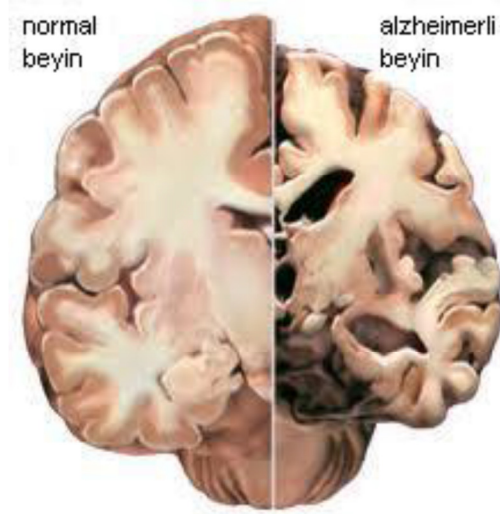
AChE'in beyin, kas ve eritrosit membranlarında yaygın olarak bulunduğu; BChE'in ise başlıca karaciğerde sentezlenip plazmaya salınarak geniş bir organ dağılımıyla yüksek aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Çokuğraş, 2003; Özturan Özer, 2012).

AChE'in bilinen en hızlı enzimlerden biri olup, etkin görevinin kolinerjik sinapslarda asetilkolinin hidrolizini katalizlemek olduğu bildirilmektedir (Massoulie vd., 1993; Özturan Özer, 2012). Ayrıca BChE'in temel fizyolojik fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemekle beraber enzim, süksinilkolin, karbamatlar, aspirin, kokain gibi ester yapıdaki ilaçları, organofasfat pestisitleri, amitriptilin, sertralin gibi antidepresan ilaçları ve kimyasal savaş ajanlarını parçalama özelliği nedeniyle hem farmakolojik hem de toksikolojik açıdan önem taşımaktadır (Çokuğraş, 2003; Doctor ve Saxena, 2005; Özturan Özer, 2012). AChE ve BChE'in menenjiyom (Sáez-Valero ve Vidal, 1996), glioma (Sáez-Valero vd., 1996), akciğer kanserleri (Brass vd., 1997), lösemi (Lapidot-Lifson vd., 1989) ve over tümörleri (Zakut vd., 1990) gibi birçok patolojik durumda da ekspresyonlarının arttığı bildirilmektedir.

2.4.1.1. Alzheimer hastalığı nedir?

Alzheimer hastalığı, bellekte ve öğrenme, konuşma, akıl yürütme, yargılama, iletişim ve günlük yaşam etkinliklerini sürdürme yetilerinde kademeli olarak yıkıma ve davranışlarda değişikliklere yol açan ilerleyici bir beyin hastalığıdır. Alzheimer hastalığı, halk arasında "bunama" diye adlandırılan demansın en sık nedenidir. Hastalık adını, Alman Doktor Alois Alzheimer'den almıştır. Dr. Alzheimer 1906 yılında Tübingen'de düzenlenen Güneybatı Alman Psikiyatristler konferansında Auguste adlı 51 yaşındaki kadın hastasını sunmuştur. Dr. Alzheimer ilk muayene sırasında bu hastada, ilerleyici hafıza, kavrama, konuşma ve yön bulma bozukluğu, işitsel halüsinasyonlar ve belirgin davranış bozuklukları olduğunu belirlemiştir. Hastayı ölene kadar izlemiş, hastanın ölümünden sonra yapılan otopside beyinde anormal kümeleşmeler ve

lif yumakları saptamıştır. Alzheimer beynin temel hücresi olan nöronları harab eder. Alzheimer'lı bir beyin ile normal bir beyni karşılaştırıldığında (Şekil 2.1) değişim önce beynin hafıza merkezi olan Hippokampus'da başlar sonra duyu ve düşüncede etkili bölümler ve korteks (beyin zarı) etkilenir, beyin kütlesi küçülür lisan becerisi ve muhakeme yeteneği azalır (Suh ve Checler, 2002; Karuncula, 2013).

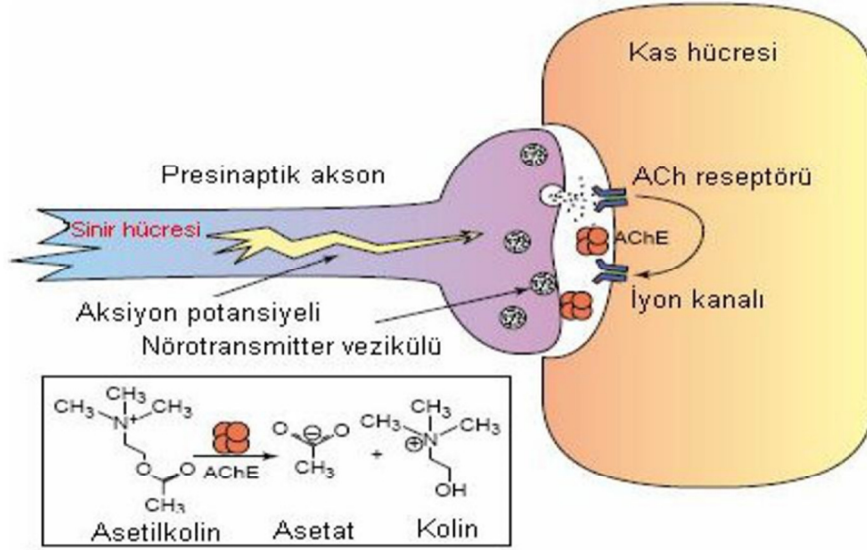


Şekil 2.1. Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı

2.4.1.2. Asetilkolin metabolizması ve kolinesterazlar

Alzheimer hastalığı semptomlarının oluşmasındaki ana mekanizma nörotransmitter değişimleridir. Asetilkolin miktarının azalması Alzheimer hastalığı ile paraleldir. Alzheimer hastalarında başta kolinerjik sistem olmak üzere kimi nörotransmitter sistemleri seçici olarak etkilenmektedir. Asetilkolinin sinaptaki varlığı, kolinasetiltransferaz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de derin bir ilişkisi bulunur ve bu yüzden beyinde asetilkolin içeren nöronlar mevcuttur. Asetilkolin belli nöronlarda kolin asetiltransferaz enzimi tarafından, kolin ve asetil-CoA'dan sentezlenir (Şekil 2.2). Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi yardımıyla kolin ve asetat'a (asetik asit tuzu) çevrilerek yıkılır. Presinaptik nöronda üretilen

asetilkolin molekülleri presinaptik terminallerdeki özelleşmiş kofullarda depolanır ve bu kofullar, nörona bir sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaps aralığına döker. Sinaps aralığına bırakılan asetilkolin moleküllerinin çoğu hemen postsinaptik reseptörlere bağlanır ve uyarıyı iletirken reseptörlere bağlanamayan moleküller asetilkolinesteraz tarafından etkisiz hale getirilirler. Postsinaptik reseptörlere bağlanan asetilkolin molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, asetilkolinesteraz tarafından yıkılır ve molekülden arta kalan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona döndürülür (Kent, 2000; Brenner ve Stevens, 2006; Karuncula, 2013).



Şekil 2.2. Asetilkolin metabolizması

Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki sınıfa ayrılmışlardır. AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolin asetilhidrolaz) ve bütiril kolinesteraz (BChE: E.C.3.1.1.8 ačilkolin ačilhidrolaz) spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak bilinir. AChE beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, BChE ise serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur (Karuncula, 2013).

AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil rolü oynar. İkinci basamakta ise, enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığıyla mükemmel bir parçalayıcı grup işlevi görür. AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır; fakat asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir. Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Daha düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak ve sonuç olarak bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alır. Bu durumu düzeltmek için uygulanacak yöntemlerden biri sinir hücrelerine asetilkolin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeyini arttırmak için uygulanacak diğer bir yöntem ise asetilkolini yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Asetilkolinin sinaptik boşlukta daha uzun zaman kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaca yönelik olarak çoğunlukla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (Temel, 2008; Karuncula, 2013).

2.4.1.3. Alzheimer hastalığının tedavisi ve kolinesteraz inhibitörleri

Alzheimer hastalığında kolinerjik kayıp olduğu bilgisi 1970'lerden itibaren tedavi için bir umut ışığı haline gelmiştir. Parkinson hastalığında dopamin eksikliğinin giderilmesi ile hastalığın belirtilerinin tedavi edilir hale gelmesi ile paralellik kurulmuş ve Alzheimer hastalarında da kolinerjik sistemin güçlendirilmesinin hastalığı tedavi edebileceğinden yola çıkılmıştır. Ancak zamanla araştırmalar göstermiştir ki Alzheimer hastalığının karmaşık yapısı sadece kolinerjik eksikliği değil, hem belirgin hücre kaybını, hem de diğer beyin kimyasallarının dengesinde kayda değer bir bozulmayı içermektedir.

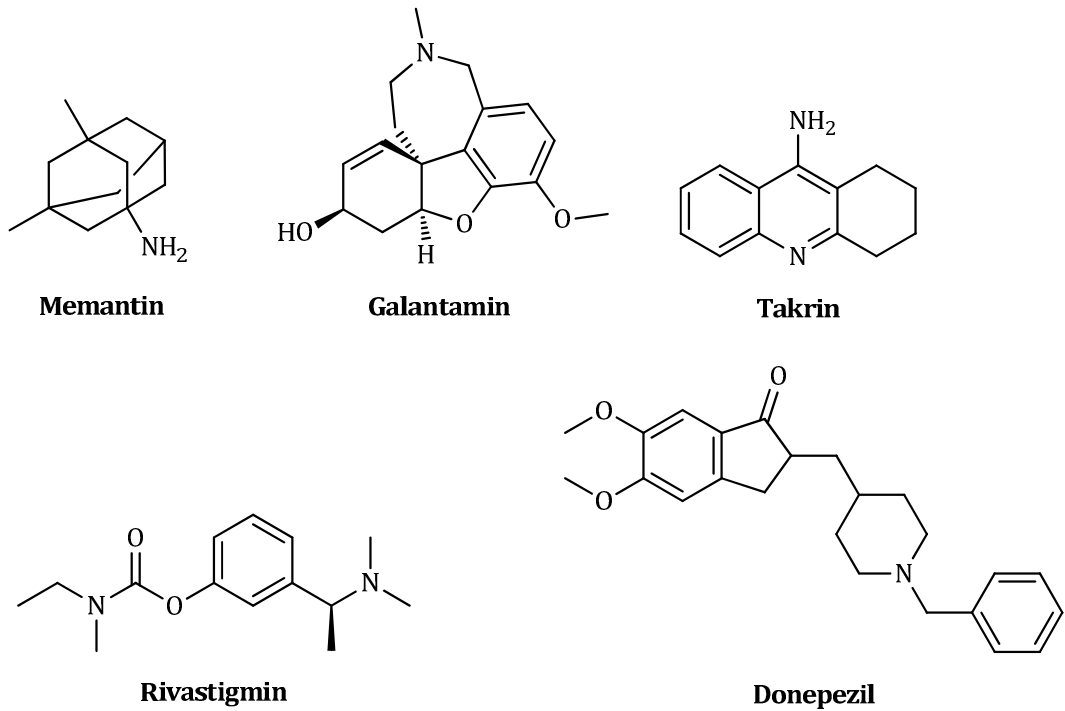
Kolinesteraz inhibitörleri 1990'larda Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanıma sunulmuştur (Şekil 2.3). Etki mekanizmaları asetilkolin adı verilen kimyasal habercinin yıkımını azaltarak kolinerjik etkinliği arttırabilmelerine

dayalıdır. Ülkemizde etken madde bakımından bu ilaçlardan üç tanesi bulunmaktadır: Donepezil ve Rivastigmin 1998'den beri, Galantamin ise 2003'den beri reçete edilebilmektedir. Huperzin A Çin'de kullanılan bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür ve oldukça etkilidir. Dünyada ilk çıkan antikolinesteraz olan Takrin'in tarihi eskiye dayanmaktadır. Adrian Albert tarafından ikinci dünya savaşında antiseptik ilaç yapmak amacıyla monoakridin türevleri sentezlenmiş daha sonra 1986 yılında Sydney Üniversitesi tarafından takrin bileşiği sentezlenmiştir. Takrin'in kullanım güçlüğü ve yan etkileri nedeniyle ülkemizde kullanıma hiç sunulmamıştır ve diğer ülkelerde de artık pek kullanılmamaktadır. Bu ilaçların hepsi asetilkolinin yıkımını engellerler. Asetilkolin dikkat ve bellek süreçlerinde özellikle önemli rol oynayan bir kimyasal habercidir. Yıkımının azalmasının, beyinde kullanılabilirliği artırması ve yukarıda sözedilen zihinsel süreçleri iyileştirmesi beklenir. Yapılan klinik çalışmalarda erken ve orta evre Alzheimer hastalarında bu ilaçların zihinsel işlevlerde kısmen iyileştirici ya da zihinsel yıkımı yavaşlatıcı etkisinin görüldüğü bildirilmiştir (Karuncula, 2013).

Diğer bir ilaç yaklaşımı Alzheimer hastalarının beyinlerinde artmış bir madde olan glutamatı azaltmaya yönelik olarak kullanılan Memantin'dir (Şekil 2.3). Bu ilaç kolinesteraz inhibitörü olmayan ve Alzheimer hastalığı tedavisi için dünyada onaylanan ilk farklı mekanizmalı ilaçtır. Ülkemizde 2003 sonu piyasaya verilmiştir. Bu ilaç 1982'den beri Almanya'da farklı nörolojik hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Memantin, glutamat adı verilen kimyasal habercinin aktivitesini düzenler. Glutamat, NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri denilen hücre algılayıcılarını uyararak bilgi işleyişinde ve bellek işlevlerinde önemli rol oynadığı düşünülen, uyarıcı etkili bir maddedir. Aşırı glutamat NMDA reseptörlerini aşırı uyaracak ve bu yüklenmenin sonucunda hücreler yıkıma uğrayabilecektir (glutamat toksisitesi). Sinir hücrelerinin yıkımı ile seyreden nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda glutamatın bu olası zararlı etkisi bir faktör olarak düşünülmektedir. Memantin NMDA reseptörlerini kısmen bloke ederek glutamatın aşırı uyarıcı etkisini ve bundan kaynaklanan hücre hasarını önleyebilir. Memantin'in etkisi hücre hasarını önlemeye yönelik

olduğu için daha çok orta ve ileri evre Alzheimer hastalığında kullanımı önerilmektedir (Qizilbash vd., 1998; Karuncula, 2013).

Klinik çalışmalar Memantin'in zihinsel işlevleri iyileştirmekten çok hastanın bakıma bağımlılık derecesini azalttığını ya da ilerleyişi yavaşlatabildiğini düşündürmektedir. Bazı klinisyenler Memantin ve kolinesteraz inhibitörlerini birlikte kullanmaktadırlar. Ancak henüz birlikte kullanımın klinik üstünlüğü kanıtlanmamıştır (Karuncula, 2013).



Şekil 2.3. Alzheimer hastalığının tedavisi için kolinesteraz inhibitörleri

2.4.2. Tirozinaz

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak da bilinir. Tirozinaz ismi substrat olarak enzimin tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliğı nedeniyle verilmiştir (Whitaker, 1994; Özçelik, 2005).

Tirozinaz, daha yaygın olarak bitkilerde bulunmasına rağmen, mikroorganizmalarda genellikle de funguslarda ve bazı hayvan organlarında çokça bulunmaktadır (Vámos-Vigyázó, 1981; Özçelik, 2005).

Tirozinaz doğada çok yaygın bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar tirozinazın özellikle mantar, yumru patates, şeftali, elma, muz, avokado, çay yaprakları, kahve tohumları ve tütün yapraklarında diğer kaynaklardakine göre daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir (Witkop, 1985; Özçelik, 2005). Ayrıca kayısı, yabani gül, enginar, yabani pirinç, ıspanak, yonca, buğday, yulaf, bezelye, şeker kamışı yaprağı, bakla yaprakları, fasulye, domates, mısır yaprakları, üzüm, armut, zeytin, gibi meyve ve sebzelerde de tirozinazın olduğu tespit edilmiştir (Vámos – Vigyázó, 1981, Oktay, vd.,1995; Özçelik, 2005). Dolayısıyla yapılan çalışmalar doğrultusunda tirozinaz enziminin muhtemelen bütün bitkilerde bulunduğu yorumu yapılabilir.

Bitki hücrelerinde bulunan enzim miktarı ve oranı, meyve veya bitkilerin türüne, yaşına ve olgunluğuna bağlıdır. Bitki yeşil yapraklarındaki enzimin büyük bir kısmı kloroplastlardadır. Patates yumrusunun hemen hemen bütün hücrel fraksiyonlarında protein miktarıyla orantılı bir değerde tirozinaz enzimi içerdiği tespit edilmesiyle birlikte, taze elmada kloroplast ve mitokondrilerde toplanmıştır. Üzümün kabuğunda, özsuyundan ve etli kısmından yüksek miktarda enzim olduğu bulunmuştur. Tirozinaz enzimi elmanın bütün kısımlarında tirozinaz enzimi tespit edilmesine rağmen elma ve armut suları tirozinaz aktivasyonundan hemen hemen yoksundur, dolayısıyla tirozinazın neredeyse tamamı posada kaldığı gözlenmektedir. Benzer sonuç onaltı şeftali, üç kiraz ve üç erik kültüründe de bildirilmiştir. Ayrıca kloroplast ve mitokondri fraksiyonlarından elde edilen enzimin substrat spesifikliği de farklıdır (Vámos-Vigyázó, 1981; Özçelik, 2005).

Yapılan çalışmalar sonucunda, şeker kamışı yapraklarında aktivite düzeyi, toprak eser element olarak bakır ile muamele edildiğinde arttığı gözlenmiştir, dolayısıyla bitkilerdeki tirozinaz içeriği tarımsal tekniklerden de etkilendiği tespit edilmiştir (Vámos-Vigyázó, 1981; Özçelik, 2005).

Tirozinaz bitkisel dokularda çoğunlukla inaktif formlar halinde bazende aktif formlar (örneğin dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya bir takım solunum metabolitlerince aktif hale getirilmektedirler) halinde sentezlenmektedir. Dolayısıyla çalışmalar sonucunda, aktif formdaki enzimlerin,

inaktif formdakilere oranı; ıspanaklarda 1:2, marullarda 2:1 ve domateslerde 1:1 olduğu halde bazı bakla, fasulye ve bezelye çeşitlerinde tüm tirozinaz enzimlerinin inaktif formda bulunabildiği belirlenmiştir (Cemeroglu vd., 2001; Özçelik, 2005).

Tirozinaz enzimi insanlar dahil olmak üzere hayvansal organizmaların özellikle de deri, saç ve göz pigmentlerinde bulunur (Witkop, 1985). Bazı bilim adamları yaptıkları çalışmalar sonucunda, siyah ırk tavşanların derilerinde, mürekkep balığının mürekkep kesesinde, bazı kabuklu hayvanların kanında ve eklem bacaklıların kanında tirozinaz enziminin var olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda derinin güneş ışığı ile bronzlaşmasının tirozinaz etkisiyle olduğunu bildirilmiştir (Nelson ve Dawson, 1944). Böceklerdeki dış iskelet oluşumunda da tirozinaz önemlidir (Wada vd., 1995; Özçelik, 2005).

2.4.3. α -Amilaz ve α -Glukozidaz enzimi

Endüstriyel açıdan önemli olan α -amilaz enzimi (Şekil 2.4), bilinen en eski enzimlerden biridir (Syu ve Chen, 1997; Türker, 2014). α -Amilaz enzimi ilk olarak Japonya'da 1939 yılında *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak üretilmiştir. Bu enzimi üretimi için, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* bakterileri 1970'li yıllarda geniş çapta kullanılmıştır. α -Amilaz enzimi, nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalayarak glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlamaktadır. Ayrıca glikoamilaz α -1,3, α -1,4 ve α -1,6 bağlarını kopararak glikoz molekülüne dönüştürmektedir. Mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Lee, 1996; Türker, 2014).

Fungal α -amilazların, unlu mamül ürünlerin endüstrisinde kullanımı yaygındır. α -Amilaz ve β -amilaz etkisinin prosesde ortaya çıkması sonucu glukoz ve maltoz, ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) tarafından kullanılarak karbondioksit ve etanol açığa çıkar. *Aspergillus oryzae*'nın ürettiği α -amilaz enziminin ısıya duyarlılığı oldukça düşük olması sebebi ile pişirme sırasında inaktive olmaz (Türker, 2014).



Şekil 2.4. α -Amilaz enziminin şematik modeli

Karbohidrat sindiriminde önemli olan bir diğer enzim olan α -glukozidaz ise, ince bağırsak epitelyumunda zar-bağılı enzim olup oligosakkaritler ve disakkaritleri glukoz birimlerine hidrolizlemektedir. α -Glukozidaz, karbohidratların sindiriminin son basamağında görev aldığından, bu enzimin inhibitörleri, karbohidratların tamamen sindirilme sürelerini uzatarak, sindirimini geciktirmektedirler (Kim vd., 2005). Bu nedenle α -glukozidaz inhibitörleri, karbohidratların hidrolizini ve emilimini yavaşlatarak tokluk kan şekeri yüksekliğini baskılayabilmektedirler. α -Glukozidaz inhibitörleri, glukoz emilim hızının azalmasına ve artmış olan tokluk kan glukoz oranının düşmesine sebep olduklarından, α -glukozidaz inhibisyonunun, Tip II diyabetin düzenlenmesinde önem kazanmaktadır (Ali vd., 2006; Hamdan ve Afifi, 2004).

2.5. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Oksijen paradoksu; aerobik organizmalar yaşamak için oksijene ihtiyaç duyar ama oksijenin serbest radikal üretimi ve oksidatif stresle ilişkili olması ve bu organizmalara toksik olması gerçeğiyle tanımlanır. Çeşitli serbest radikaller,

yaşamlarını sürdürebilmek için gerekli normal fizyolojik süreçlerindeki hücrelerin, solunum ve diğer biyokimyasal reaksiyonların yaygın ürünleridir. Oksijeninin toksik de olabilen bu etkisini yok etmek için, yaşayan organizmalar bu son derece reaktif olan serbest radikalleri nötralize edebilen su ve yağda çözünen antioksidanlar üretir (Davies, 1995; Ceylan, 2015). Sağlıklı yaşam için vücudun antioksidan savunması ve oksidatif stress arasındaki hassas denge korunmak zorundadır. Vücudun antioksidan mekanizması optimum düzeyde çalışmazsa aşırı serbest radikal üretimi sonucunda, lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitleri içeren çeşitli biyomoleküller zarar görebilir.

2.5.1. Serbest radikaller

Serbest radikal, bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren atom ya da molekül olarak tanımlanır. Homolitik, heterolitik veya redoks reaksiyonlarının ürünleri olarak oluşabilen serbest radikaller sıklıkla reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinden oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri, bir serbest radikal olmayan hidrojen peroksit gibi diğer reaktif oksijen türlerinin yanı sıra oksijen taşıyan serbest radikalleri içerir. Benzer bir şekilde reaktif azot türleri, hem azot içeren serbest radikalleri hem de tepkime merkezi azot olan diğer reaktif molekülüleri içerir (Turpaev, 2002; Ceylan, 2015). Yaygın serbest radikaller ve oksidanlar Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. İnsan fizyolojisinde karşılaşılan serbest radikaller ve oksidanlar

Serbest radikaller		Oksidanlar	
Süperoksit anyon radikali	$O_2^{\cdot -}$	Singlet oksijen	$^1O_2$
Hidroksil radikali	$HO^{\cdot}$	Ozon	O_3
Hidroperoksil radikali	$HOO^{\cdot}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Peroksil radikali	$L^{\cdot}$	Lipid hidroperoksit	$LOOH$
Lipid radikali	$LOO^{\cdot}$	Hipoklorit	$HOCl$
Lipid peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$	Nitröz asit	HNO_2
Lipid alkoksil radikali	$LO^{\cdot}$	Peroksinitröz asit	$ONOOH$
Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot -}$
Nitrozil katyon	NO^+	Dinitrojen trioksit	N_2O_3
Tiyil radikali	$RS^{\cdot}$	Nitril klorit	NO_2Cl
Protein radikal	$P^{\cdot}$	Nitroksil anyonu	$NO^{\cdot -}$

Gerçekleşen solunum ve hücresel fonksiyonlar boyunca serbest radikaller üretilmektedir. Normal fizyolojik koşullar altında, solunum esnasında insan vücudu tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık %2'si negatif yüklü bir serbest radikal olan süperoksit anyonuna ($O_2^{\cdot-}$) dönüştürülür (Winterbourn, 2008; Ceylan, 2015). İnsan vücudu çoğunluğunun hemoglobin ve diğer proteinlerde bulunan yaklaşık 4.5 mg demir ihtiva eder. Buna rağmen, çeşitli küçük moleküllerle kompleksler oluşturulmasında bulunan demirin küçük bir miktarı, hidroksil radikali üretiminde hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilir (Fenton reaksiyonu). Reaktif oksijen türleri olan, süperoksit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksi radikali gibi oksijen merkezli serbest radikaller ve azot oksit, oksidatif stress indüklenmesinde önemli rol oynarlar (Gülçin, 2012; Ceylan, 2015).

Nitrik oksit ve süperoksit hücrelerde üretilen başlıca reaktif türleri olmakla beraber sırasıyla reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri üreten diğer türlerle reaksiyona girebilir. Aynı zamanda nitrik oksit demir iyonları gibi geçiş metallerine bağlanabilir ve bu ikincil haberleşme sıklık guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunda önemli rol oynar (Powers ve Jackson, 2008). Genellikle, süperoksit anyon radikali ve nitrik oksit, normal fizyolojik fonksiyonlar boyunca hücreler tarafından üretilen temel serbest radikallerdir.

2.5.1.1. Serbest radikallerin çeşitli kaynakları

Serbest radikallerin, endojen kaynaklar ve ekzojen kaynaklar olmak üzere iki ana kaynağı vardır. Serbest radikallerin başlıca endojen kaynakları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve ozon en yaygın oksijen türlerindendir. Süperoksit oluşumu genellikle mitokondri içinde meydana gelmektedir. ATP'de depolanan enerjinin ana kaynağı, mitokondriyal elektron taşıma zinciridir. Oksitlenebilen organik moleküllerden moleküler oksijene elektronların hareketi, mitokondriyal elektron taşıma sistemi tarafından ATP üretimi için sorumludur. Bu süreç boyunca, süperoksit anyonları, oksijene elektronların sızmasıyla oluşmaktadır. Ayrıca süperoksit, mitokondride nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) ve ksantin oksidaz tarafından

aracılık edilen moleküler oksijenin indirgenmesi sürecinde enzimatik olarak da oluşmaktadır. Süperoksit radikali diğer serbest radikallere göre daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip iken, hidroksil radikalinden daha az reaktiftir. Ayrıca iltihaplı bölgelerdeki hücrelerde süperoksit radikali daha fazla miktarlarda üretilmektedir. Süperoksitin membran geçirgenliği yoktur fakat hücre içine diffüze olabilirler (Powers ve Jackson, 2008; Ceylan, 2015).

Serbest radikallerin bir diğer önemli kaynağı da peroksizomlardır. Peroksizomlar, yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve ürik asidin indirgenmesi gibi önemli fizyolojik fonksiyonları gerçekleştiren özelleşmiş sitoplazmik organellerdir. Ayrıca, peroksizomal oksidaz hidrojen peroksit üretebilme yeteneğine sahiptir. Ksantin ve ksantin oksidaz reaksiyonu, ürik asit oluşturmak için, moleküler oksijenin sırasıyla bir ve iki elektron indirgenmesiyle süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit üretir. Hidrojen peroksit, hücre membranlarından geçebilen nisbeten sabit bir ajandır. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi serbest radikaller üretebilmekle beraber, lipidleri ya da DNA'yı doğrudan oksidize edemezler. Dolayısıyla, hidrojen peroksidin sitotoksitesi, Fenton reaksiyonu gibi metal katalizli reaksiyonlar vasıtasıyla hidroksil radikali üretme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Ancak, hidroksil radikalleri oldukça reaktif olmalarından dolayı üretildikleri ortamdaki biyomoleküllere zarar verebilirler. Dolayısıyla, bu radikaller fizyolojide karşılaşılan en tehlikeli serbest radikallerden bazılarıdır (Halliwell, 1995; Ceylan, 2015).

Singlet oksijen, oksijenin elektriksel olarak reaksiyona girmede en yatkın formu olmasına rağmen serbest radikal değildir. Ancak, singlet oksijen suda süperoksit anyonunun dismutasyonu boyunca üretilen bir reaktif oksijen türüdür.

Endojen kaynaklı üretilen diğer bir oksijen serbest radikali ise peroksil radikalidir ($ROO\cdot$). Bunun en basit formu ise, süperoksidin protonlanmış formu olan hidroperoksil radikalidir ($HOO\cdot$). Hidroperoksil radikali, lipid peroksidasyonunu başlatmasıyla bilinmektedir. Nitrik oksit, pek çok hücre tipinde nitrik oksit sentetaz (NOS) vasıtasıyla L-arjininden sentezlenmektedir. Nitrik oksit radikali, suda çözünebilen vücutta sinyal molekülü olarak önemli rol

oynayan kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Protein ve DNA'ya zarar veren güçlü bir oksitleyici ajan olan peroksinitrit (ONOO-) nitrik oksit ile süperoksit reaksiyonu sonucunda üretilir (Choudhari vd., 2013; Ceylan, 2015).

Çizelge 2.2. Serbest radikallerin endojen kaynakları

Fizyolojik Proses	Açıklama
Mitokondriyal solunum	Yaşamın temel süreci süperoksit anyon radikali üretir
Otooksidasyon	İnsan vücudundaki pek çok biyolojik molekülün (hemoglobin, miyoglobin, katekolaminler vb.) otooksidasyonu serbest radikal üretebilir. Süperoksit oluşan temel serbest radikaldir
Enzimatik reaksiyon	Ksantin oksidaz, lipoksijenaz, aldehid oksidaz gibi pek çok enzimi içeren enzimatik reaksiyonlar serbest radikal oluşturabilirler
Solunum patlaması	Fagositoz boyunca fagositlerin oksijenin büyük bir miktarını tükettiği süreçtir
Metal iyonları	Vücut için esas olan demir ve bakır iyonları gibi metal iyonları serbest radikal üretmek için hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilir
Yorucu egzersiz	Serbest radikal üreten ksantin oksidaz aktive olabilir
Enfeksiyon	İşgalci mikroorganizmaları nötralize etmeye çalışan immun sistem de serbest radikaller üretebilir
İskemi/Reperfüzyon	Serbest radikal oluşumuna sebep olan ksantin oksidaz aktive olabilir

Fagositoz boyunca beyaz kan hücreleri gibi fagositik hücrelerin bol miktarda oksijen tüketmesi ile ortaya çıkan bir süreç olan solunum patlaması da endojen serbest radikallerin bir diğer kaynağıdır. Fagositoz, çoğunlukla süperoksit ve aynı zamanda hidrojen peroksit (solunum patlaması) gibi serbest radikaller üreten immun savunmanın önemli bir fonksiyonudur. Buna ek olarak miyeloperoksidaz da salgılar. Nötrofillerde yüksek düzeyde üretilen miyeloperoksidaz, kloridin fizyolojik konsantrasyonu varlığında hidrojen reaksiyona girer ve hipoklorit asit (HOCl) üretilmesi sağlanır. Bu kısa ömürlü ve difüze olabilen oksidan, patojen mikroorganizmaların öldürülmesinde önemli bir rol oynar (Carmona-Gutierrez vd., 2013; Ceylan, 2015). Serbest radikaller üreterek oksidatif strese sebep olan iskemi boyunca, ksantin enzimleri aktive edilebilir. Bununla birlikte antioksidan enzimlerin konsantrasyonu azalabilir.

Reperfüzyon boyunca da oksidatif stres artar. Yorucu egzersizde de serbest radikallerin üretiminden dolayı oksidatif stres artar, ama vücut bu aşırı serbest radikalleri nötralize etme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle düzenli egzersizin sağlıklı faydaları vardır (Wagner vd., 2010; Ceylan, 2015).

Serbest radikallerin oluşumuna dış kaynaklar da sebep olabilmektedir. Bulunduğumuz ortamda havanın kirli olması ve solunum sonucunda, insanları serbest radikallere maruz bırakabilir. Bu ekzojen kaynaklar Çizelge 2.3'te özetlenmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda çapı 10 µm'den daha az olan kirli havada bulunan küçük parçacıklar astım atakları ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarının riskini arttırabildiğini göstermiştir. Dolayısıyla kirli havadaki bu küçük parçacıklar, akciğer inflamasyonuna ve akciğer hücrelerine zarar veren serbest radikal aktivitelerine sahiptir (Li vd., 1996; Ceylan, 2015). Organik bileşikler ve metal iyonları bu parçacıkların temel bileşenleridir ve endüstriyel kaynaklardan kaynaklanabilir.

Çizelge 2.3. Oksidatif stresin dış kaynakları

Dış Kaynak	Açıklama
Hava kirliliği	Kirli havadaki partikül maddelere maruz kalma; astım, kardiyovasküler hastalıklar ve akciğer kanseri riskini arttırarak önemli bir oksidatif stres sağlayabilir
Havadaki inorganik partiküller	Endüstri serktöründe çalışan bireylerin havadaki mineral partiküllerini (özellikle kuvars, silis ve asbestos gibi) yutması oksidatif strese sebep olabilir
Sigara kullanımı	Sigara dumanında bulunan oksidanlar akciğer kanseri riskine sebep olabilirler
Bazı ilaçlar	Bleomisin, adriamisin ve sülfasalazin gibi ilaçlar oksidatif strese sebep olabilir
Endüstriyel çözücüler	Kloroform, karbon tetra klorit gibi endüstriyel çözücüler solunduklarında oksidatif strese sebep olabilir
Radyasyona maruz kalma	Aşırı ultraviyole ışığa maruz kalma, güneşe uzun süre maruz kalma (güneş banyosu) ve kanser tedavisinin bir parçası olan radyasyon tedavisi oksidatif stresi arttırır

Sigara dumanı ile ilişkili pek çok sağlık sorunları, sigarada var olan serbest radikaller ve oksitleyici bileşiklerin yüksek konsantrasyonu sonucudur.

Oksidatif strese bazı ilaçlar da sebep olabilmektedir. Örneğin; metotreksat, bleomisin, adriamisin, doksorubisin, topoizomeras inhibitörleri ve menadion gibi anti-kanser ilaçları oksidatif strese yol açtığı gözlenmektedir. Organ transplantasyonunda doku reddini önlemek için kullanılan mikofenolik asit, siklosporin A ve sirolimus gibi immün-baskılayıcı ilaçlar da oksidatif strese neden olabilir. Oksidan olan genel ilaçlar Çizelge 2.4'te özetlemiştir. Pek çok insan için, tıbbi gözetim altında alınan bu ilaçlar herhangi bir problem ortaya çıkartmadığı gözlenmektedir. Ancak, glukoz 6-fosfat eksikliği bulunan insanlarda bu ilaçların toksik olma riski daha fazladır. Hücrel redoks dengesi için önemli bir enzim olan glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, eritrositlerde bulunan temel bir antioksidan enzimdir ve kırmızı kan hücrelerinin fonksiyonunun stabilitesi ve uygunluğu için önemlidir. Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz eksikliği kalıtsal bir hastalıktır ve siyah bireylere göre beyaz ve Akdeniz bireylerinde daha yaygındır. Kırmızı kan hücrelerinde bu enzime yeterli miktarda sahip olunmadığı zaman glukoz 6-fosfat dehidrojenaz eksiliği oluşur. Böyle bir eksiklik, kırmızı kan hücrelerinin erken yıkımına sebep olur ve hemoglobin kan içine yayılır (hemoliz). Bu hastalarda; bazı ilaçlar, bakla gibi gıdalar, enfeksiyon ve aşırı stres kırmızı kan hücrelerinin tahribatını tetikler (Ho vd., 2007; Ceylan, 2015).

Diğer bir oksidatif stres kaynağı da alkollü içeceklerin (etanol) kullanımı olabilir. Özellikle alkol bağımlılığı çok ciddi bir sağlık tehlikesidir. Çünkü alkol, karaciğer sirozuna neden olan bir karaciğer toksini olarak bilinir. Aşırı alkol tüketimi özellikle alkoliklerde kayda değer oranda oksidatif strese nede olabilir (Das ve Vasudevan, 2007; Ceylan, 2015)

Karbon tetra klorür, kloroform, trikloretilen, benzen, ksilen ve toluen gibi endüstriyel çözücüler oksidatif strese neden olabilir ve aynı zaman da bu kimyasalların bazıları karsinojeniktir. Bu çözücüler karaciğerde ilaçların büyük oranda metabolizmasından sorumlu olan sitokrom P450 enzimlerini (özellikle CYP2E1) aktive edebileceği ve böylelikle oksidatif strese neden olabileceği önerilmiştir (Al-Ghamdi vd., 2003; Ceylan, 2015).

Çizelge 2.4. Oksidatif stresi tetikleyen bazı ilaçlar

İlaç tipi	Örnekler
Ağrı kesiciler	Aspirin, fenasetin
Anti kanser	Metotreksat, bleomisin, adriamisin, doksorubisin, topoizomeraz inhibitörleri, menadion
Anti malarial	Klorokin, meflokin, primakin, pamaquine
İmmün baskılayıcılar	Siklosporin A, sirolimus, takrolimus, mikofenolik asit
Antibiyotikler	Kloramfenikol, siprofloksasin, moksifloksasin, nalidiksik asit, norfloksasin, ofloksasin, sülfasetamid, Bactrim (sulfamethoxazole ve Trimetoprim), sülfadiazin, sülfanilamid, sulfasalazin, sulfafurazole
Antiretroviral ajanlar	Indinavir, atazanavir, azidotimidin
Diğer ajanlar	Etil alkol

2.5.1.2. Serbest radikallerin biyomoleküllere hasarı

Serbest radikaller reaktivitesinden dolayı, lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitleri içeren hemen hemen tüm biyomoleküllere zarar verebilir. Lipidler, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın en önemli kaynaklarındandır. Lipid peroksidasyonu, membran akışkanlık ve geçirgenliğinin değişmesiyle hücre membranlarına hasar verebilir. Serbest radikaller tarafından aracılık edilen lipid peroksidasyonu, başlama, uzama ve sonlanma aşamalarını içeren bir dizi zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonunu başlatabilen serbest radikallerden olan hidroksil radikali, alkoksil radikalleri, peroksil radikalleri ve peroksinitri radikalleridir. Demir ve bakır iyonları gibi metal iyonları da zincir başlangıcına katalitik olarak katkı sağlayabilirler. Lipid peroksidasyonundaki ilk adım, çoklu doymamış yağ asidi molekülünden bis allik hidrojenini (Çoklu doymamış yağ asitlerinde iki farklı karbon-karbon çift bağı ile ilişkili allik pozisyonundaki benzer karbon atomuna bağlı hidrojen atomu) ayrılması ile bir serbest radikal formunun oluşmasıdır. Bu radikal daha sonra oksijen molekülü ile birleşerek peroksil radikalini oluşturur ve oluşan bu radikal bir başka lipid molekülündeki çoklu doymamış yağ asidi parçası ile reaksiyona girebilir ve konjuge dien lipid hidroperoksit oluşur ve böylelikle oluşan yeni pentadienil radikali zincir reaksiyonu uzatır. Tüm çoklu doymamış yağ asitleri lipid peroksidasyonuna maruz kalabilir ve lipid peroksidasyon için reaksiyon hızı dokosahekzanoik asit>eikosapentaenoik

asit>araşidonik asit>linoleik asittir. Buna ek olarak, siklooksijenaz ve lipoksijenaz da çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumlu iki enzim ailesidir. Bu enzimler çoklu doymamış yağ asitlerini içeren çeşitli reaksiyonları katalizler ve prostoglandinler ile tromboksanları içeren çeşitli lipid türevleri üretilir (Xu vd., 2012; Ceylan, 2015). Buna rağmen, lipid peroksidasyonunun temel son ürünleri malonildialdehit, akrolein ve 4-hidroksi-2-noneal gibi aldehitlerdir. Akrolein ve az da olsa 4-hidroksi-2-noneal, protein, DNA ve fosfolipidlere zarar verebilen oldukça reaktif bileşiklerdir (Milne vd., 2011; Ceylan, 2015).

Amino grup asitler ve proteinler hidroksil radikali tarafından oksidatif hasara yatkındır. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri tarafından gerçekleştirilen protein oksidasyonu proteinlerin tüm aminoasit kalıntılarının yan zincirlerini içerir. Özellikle proteinlerin sülfür içerikli sistein ve metionin kalıntıları, hem reaktif oksijen hem de reaktif azot türleri tarafından oksidasyona en yatkın olanlarıdır. Sistein kalıntılarının oksidasyonu disülfidlerin oluşumuna yol açar ve metionin, metionin sülfoksit kalıntılarına okside olur. Ancak, insan vücudunda bulunan disülfid redüktaz enzimleri böyle hasarlanmaları tamir edebilir, ama bunlar sadece tamir edilebilen proteinlerin okside formları için geçerlidir. Bununla birlikte aromatik aminoasit kalıntıları da serbest radikal hasarına yatkındır. Triptofan kalıntıları kolayca formilkinürenin, kinürein ve çeşitli hidroksi türevlerine okside olur. Fenilalanin ve tirozin kalıntıları da verimli çeşitli hidroksi türevlerine okside olur. Aynı zamanda peroksinitrit serbest radikali metionin, sistein, tirozin ve triptofan aminoasitlerinde hasar oluşturabilir. Glutamil, aspartil ve prolil yan zincirleri ile reaktif oksijen türlerinin reaksiyonu sonucu peptid bağı kopması oluşabilir. Protein oksidasyonunun sonucu olarak, protein karbonil türevleri, serbest radikal kaynaklı protein hasarı derecesinin bir göstergesi olarak kullanılabileği anlaşılmıştır (Berlett ve Stadtman, 1997; Ceylan, 2015).

İleri glikasyonun son ürünleri; proteinlerin amino grupları ve karbohidratlar arasındaki reaksiyonlar sonucunda oluşmaktadır. Kan glukoz kontrol göstergesi olan Hemeoglobin A_{1c}, hemoglobinin glikasyon ürünüdür. Bu ileri glikasyon

ürünleri, Amadori, Schiff bazı ve Maillard ürünleri gibi çeşitli ara ürünler vasıtasıyla oluşmaktadır. Hidroksil radikalleri DNA'ya hasar vermenin yanı sıra mutajenez, karsinogenez ve yaşlanmadan da sorumludur. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri, nükleotid bazlı doğrudan modifikasyon, apuridik/pirimidinik sitelerin oluşumu, DNA tek sarmal kırıkları ve daha az sıklıkla DNA çift sarmal kırıklarının içerdiği DNA oksidasyonuna sebep olur. Tüm nükleotidler içinden guanın, oksidatif hasara en yatkın olanıdır. Hidroksil radikali, guanın imidazol halkasındaki C4, C5 ve C8 ile etkileşime girebilir ve 8-hidroksiguanin oluşumu, DNA hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca peroksinitrit de guaninle reaksiyona girebilir ve bu reaksiyonda oluşan 8-nitroguanin de nitrosatif DNA hasarının bir göstergesi olarak düşünülebilir. Tek sarmal kırıkları deoksiriboz ile hidroksil radikalının etkileşimi sonucunda olabilir (Smith vd., 2013; Ceylan, 2015). Oksidatif stres aynı zamanda mitokondriyal DNA'ya da hasar verebilir ve böyle hasarlar, insan derisini de içeren çeşitli dokularda kanser gelişimi ve yaşlanma ile ilgilidir (Birch-Machin vd., 2013; Ceylan, 2015). Reaktif oksijen türleri tarafından gerçekleştirilen RNA oksidasyonu da rapor edilmiştir, fakat DNA oksidasyonu gibi kapsamlı çalışmalarla incelenmemiştir. Hem ribozomal RNA hem de haberci RNA reaktif oksijen türleri tarafından okside olabilir.

Mitokondriyal DNA, nuklear DNA'sına göre oksidatif hasara daha yatkındır. Bunun sebebi ise mitokondriyal solunum esnasında üretilmiş olan reaktif oksijen türleridir. Yaşlanma süreci boyunca, mitokondriyal DNA mutasyonlarının birikimi ve oksidatif fosforilasyonun zarar görmesi ve antioksidan enzimlerinin ekspresyonlarındaki dengesizlik, reaktif oksijen türlerinin fazladan üretilmesi sonucunda oluşur (Wang vd., 2013; Ceylan, 2015).

2.5.1.3. Serbest radikallerin fizyolojik rolü

Serbest radikaller ve radikal türevli reaktif türlerin yüksek konsantrasyonları tüm biyomoleküllere zarar vermesine rağmen, bu serbest radikallerin ılımlı konsantrasyonları özellikle de süperoksit anyonu, ilgili reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit hücre sinyal prosesinde düzenleyici mediatörler olarak önemli rol oynarlar. Normal fizyolojik koşullar altında üretilen serbest radikallerin düzeyi

vücudun antioksidan savunması tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve böylece serbest radikaller için kararlı bir durum muhafaza edilmiş olur. Genellikle normal fizyolojik koşullarda hücreler redoks durumunda olmayı tercih eder ve bu durum hücresel fonksiyonları belirler. Hücreler, birbirleriyle iletişim halindedirler ve hücre sinyalizasyonu veya hücre transdüksiyonu olarak bilinen biyolojik mekanizma yoluyla dış uyaranlara yanıt verirler. Bu genellikle hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler tarafından uyarılırlar. Pek çok hücre tipi, sitokinler, büyüme faktörleri, çeşitli interleokinler, tümör nekroz faktörü α , anjiyotensin 2, sinir büyüme faktörleri ve fibroblast büyüme faktörleri tarafından uyarıldığı zaman düşük konsantrasyonlarda reaktif oksijen türleri üreten küçük bir oksidatif patlama ortaya çıkar. Bu yüzden reaktif oksijen türleri ikincil haberlarciler olarak fizyolojik rolü çok önemlidir (Valko vd., 2007; Ceylan, 2015). Reaktif oksijen türleri bağışıklıkta da önemli rol oynar. Oksidatif patlama, istilacı patojenleri öldüren immun hücreler tarafından reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ile karakterizedir. Oksidatif patlamaya inflamatuvar ortamlarda da karşılaşılır. Reaktif oksijen türleri hücre farklılaşmasını düzenler ve yaşlanmada önemli rol oynar. Reaktif oksijen türlerinin otofajiyi düzenlediği de bilinmektedir (Sena ve Chandel, 2012; Ceylan, 2015). Reaktif oksijen türlerinin çeşitli fizyolojik fonksiyonları aşağıda özetlenmiştir:

- Serbet radikaller hücre büyümesi ve hücre çoğalmasına yardım etme
- Sinyal iletimi
- Serbest radikaller hücre bölünmesine yardım etme
- Gen fonksiyonlarını düzenleyen protein kinazları aktive etme
- Hücrenin redoks dengesini sağlama
- İmmun fonksiyonu düzenleme

2.5.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir (Yıldız, vd., 2008; Çetinkaya, 2013). Organizmada oluşan anabolik ve katabolik

olayları ve tüm metabolizmayı etkileyen ve bir kısmı enzimlerin aktif gruplarında yer alan, yokluğu ve yetersizliği fizyolojik fonksiyonların durmasına ya da önemli ölçüde azalmasına neden olan antioksidan maddelere karşı ilgi artmış ve bilimsel araştırmalara konu olmuştur (Keleştemur ve Özdemir, 2011; Çetinkaya, 2013). Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan zararlı maddelerdir. Prooksidan terimi, reaktif türler için kullanılan bir terimdir (Cao ve Prior, 1999; Çetinkaya, 2013). Antioksidanlar birçok hastalıkta tedavi ajanları olarak önem kazanmıştır. İnsan antioksidan savunması katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimatik süpürücüler; üre, askorbat, glutatyon ve flavonoidler gibi hidrofilik süpürücüler; tokoferoller, karotenoidler ve ubiquinol gibi lipofilik radikal süpürücüler ile donatılmıştır (Ratnam, vd., 2006; Çetinkaya, 2013).

Antioksidan aktivitesi olan doğal gıdaların tüketimi hastalıklarla mücadelede etkili yol olarak kabul edilir. Antioksidan etki gücünü ölçmek gıda kalitesini değerlendirmek ve hastalıkların teşhis ve tedavisi için önemlidir (Özyürek, vd., 2011; Çetinkaya, 2013).

2.5.2.1. Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidan etki mekanizmaları aşağıdaki dört başlıkta özetlenebilir (Memişoğulları, 2005; Keleştemur ve Özdemir, 2011; Çetinkaya, 2013):

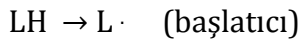
- *Temizleme etkisi:* Enzimler tarafından oksidan molekülleri zayıf hale getirilip oksijen ile reaksiyona girerek oksijen konsantrasyonunu azaltırlar.
- *Baskılama etkisi:* Vitaminler ve flavonoidler tarafından oksidanlara bir hidrojen atomu verilerek hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyip peroksidasyonun başlamasını önlerler.
- *Onarma etkisi:* Serbest radikallerin oluşturduğu hasarları onarırlar.

- *Zincir koparma etkisi:* Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar arasında fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olan α -tokoferoller yer almaktadır.

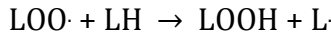
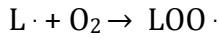
Antioksidanlar, yağların oksidasyonunu önlemeyi ve/veya yavaşlatmayı sağlarlar. Gıdalardaki antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyici veya mevcut olan serbest radikalleri etkisiz hale getirici özelliğe sahiptir.

Lipidlerin (L) radikalik oksidasyon zincir reaksiyonu:

Başlangıç

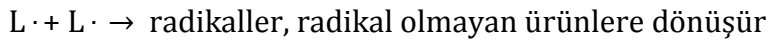
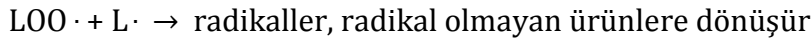
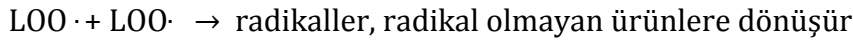


Çoğalma

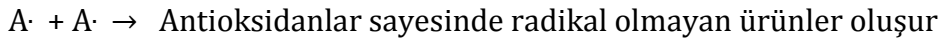
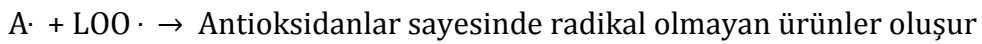


Oluşan $L\cdot$ radikali, ilk reaksiyona geri döner ve yeni $LOO\cdot$ oluşturur.

Zincirin son bulması



Antioksidanların bu zinciri kırıcı etkileri vardır.



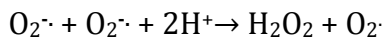
Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincir reaksiyonlarını (örneğin lipidlerin oksidatif parçalanmasına yol açan radikalik zincir reaksiyonunu) kırmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi (örneğin biyolojik makromolekülleri) koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam ederler (Shahidi, 1996; Çetinkaya, 2013).

Vücutta enzimatik (endojen) ve enzimatik olmayan (başlıca besinsel vitamin ve mikronürientler) olmak üzere birçok antioksidan görev yapmaktadır. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz, sitokrom oksidazlardan oluşur. Enzim yapısında olmayan antioksidanlar; vitamin E (tokoferol), vitamin C (askorbik asit), vitamin A (retinol), flavonoidler, tioller (glutatyon), ubikinon, melatonin, ürik asittir. Bilirubin, ferritin, seruloplazmin, albumin, demir, çinko, bakır, selenyum, manganez dolaylı antioksidan özellik gösterirler (Yalçın, 1998; Fang, 2002). Antioksidan sistemlerin etkinliği endojen antioksidan enzim yapımının miktarına ve besinsel alıma bağlıdır. Bu nedenle antioksidan etkinlik egzersiz, beslenme, yaşlılık gibi faktörlerden etkilenir (Dekkers vd., 1996; Fang, 2002).

2.6. Enzim Olan Antioksidanlar

2.6.1. Süperoksit dismutaz

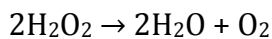
Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerinden korunmada ana mekanizmadır ve aynı zamanda oksidatif strese karşı savunmanın ilk basamağını oluşturur. SOD enzimi süperoksit anyonunun H_2O_2 ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizler.



Süperoksit dismutazın insanlarda 2 izoenzimi bulunur. Bakır-çinko içeren SOD sitozolde görev yaparken mangan içeren SOD ise mitokondride görev yapmaktadır (McCord, 2000; Powers ve Lennon, 2000). Kas hücrelerinde SOD aktivitesinin %65-85' i sitozolde bulunmaktadır (Powers ve Lennon, 2000; Altuğ, 2009).

2.6.2. Katalaz (CAT)

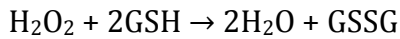
Katalaz (CAT) enzimi, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler.



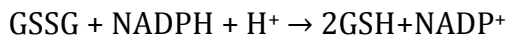
Katalaz organizmada tüm hücrelerde özellikle peroksizomlarda bulunur (Akkuş 1995; McCord 2000). Katalaz (H_2O_2 : H_2O_2 oksido-redüktaz) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz çoğunlukla peroksizomlarda daha az olarak da sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Aynı zamanda granüloamatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevi de görür. Hidrojen peroksidi (H_2O_2) ortadan kaldırarak hidroksil serbest radikali ($OH\cdot$) oluşumunu önler (Altınışık, 2000; Altuğ, 2009).

2.6.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), redüktaz ve transferaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), H_2O_2 ve lipid peroksitlerin detoksifikasyonunda görev alır. İndirgenmiş glutatyona ihtiyaç duyar. Peroksitten su oluşumunu sağlayan tepkimeyi katalize eder.



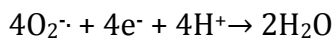
Yapılan çalışmalarda H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonlarında katalazın aktif olduğu, yüksek konsantrasyonlarında ise glutatyon peroksidazın aktif olduğu gözlenmektedir (McCord, 2000). Glutatyon redüktaz esas olarak glutatyon peroksidaz katalizasyonu sonucu oluşan okside glutatyonun indirgenmesi reaksiyonunu katalizler.



Glutatyon transferaz arasıdonik ve linoleik asit hidroperoksitleri başta olmak üzere lipid peroksitlerin detoksifikasyonunda görev alır (McCord, 2000; Altuğ, 2009).

2.6.4. Sitokrom oksidaz

Sitokrom oksidaz, mitokondride elektron taşıma zincirinde son basamakta yer alır ve süperoksit anyonunun suya dönüştürüldüğü reaksiyonu katalizler (McCord, 2000; Altuğ, 2009).



Mitokondriyal sitokrom oksidaz, solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksiti detoksifiye eder. Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyondur. Bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olur (Altuğ, 2009).

2.6.5. Ksantin oksidaz

Ksantin oksidaz (XO), süperoksit anyon radikalının en önemli enzimatik kaynaklarından birisidir. Bu enzim tüm çekirdekli hücrelerde yer alan metaloflavoprotein olmakla beraber pürin nükleotidin metabolizmasında hız kısıtlayıcı enzim olarak hipoksantin ve ksantinin ürik aside çevrilmesi reaksiyonunu katalizler. Bunun sonucunda, süperoksit anyon radikali üreten enzimin aktivitesi ksantin dehidrojenazın XO'ya proteolitik dönüşümüyle çok yüksek miktarlarda süperoksit anyon radikali üretebilir (Krenitsky vd., 1986; Altuğ, 2009).

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkabilmektedir. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak bulunur ve pürinlerin yıkım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden (O_2) çok NAD^+ kullanır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (İskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın, oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen perokside indirgenmektedir. Yoğun fiziksel egzersizin ürik asit konsantrasyonlarını arttırdığı bilinmektedir. Artan ürik asit kaslara difüze olarak kası oksidasyon hasarından korur. Serum ve kaslardaki ürik asit; singlet oksijen, HOCl, peroksi radikali ve peroksi nitrit ve ozon üzerine doğrudan

antioksidan etki gösterir. Bazı durumlarda plazmanın antioksidan kapasitesinin %50'den fazlasını oluşturur (Jenkins, 2000; Altuğ, 2009).

İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikali oluşur, bunların etkisiyle de iskemi/reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar. Ksantin oksidazın özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen iskemi/reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir.

2.7. Enzim Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidan türleri ve fonksiyonları Çizelge 2.5'te verilmiştir (Mccord ve Halliwell, 1993; Altuğ, 2009).

Çizelge 2.5. Enzim olmayan bileşikler ve fonksiyonları

Türü	Fonksiyonu
Askorbik asit	$O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ 'ı doğrudan yakalamak
Haptoglobülin	Serbest hemoglobini bağlamak
Hemopeksin	Serbest hem gruplarını bağlamak
Transferrin	Demir iyonlarını bağlayarak serbest radikal oluşumunu önlemek
Ürik asit	Radikal yakalamak lipid peroksidasyonu inhibe etmek
α tokoferol	Zincir kırıcı olarak peroksi ve alkoksi radikallerini engellemek
Glukoz	$OH^{\cdot}$ radikalini yakalamak
Bilirübin	Albümine bağlanarak yağ asitlerini peroksidasyondan korumak
Albümin	Cu^{2+} gibi geçiş metallerini bağlamak
Serüloplazmin	Demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırmak ve aynı zamanda ekstrasellüler SOD gibi davranarak etki göstermek

2.7.1. E vitamini

E vitamini yağda çözünen en güçlü antioksidandır. Hücrelerde oldukça bol miktarda bulunur ve lipid peroksidasyonunu durdurur. Çoklu doymamış yağ asitlerinden lipid hidroperoksitlerin oluşumunu önler ve bu nedenle zincir kırıcı antioksidan özelliğindedir (Evans, 2000). HDL, VLDL ve LDL yapısında bulunarak LDL oksidasyonunu önler (Muntenau vd., 2004; Altuğ, 2009).

2.7.2. C vitamini

Suda çözünebilme özelliklerinden dolayı, olasılıkla ekstraselüler sıvıların en önemli antioksidanıdır. Sıvılarda hidroksit, süperoksit, yağ asidi peroksi radikalleri, alkoksi radikallerini nötralize etme yeteneğine sahiptir. Vitamin E ve GSH'nın rejenerasyonunu sağlar (Carr ve Frei, 1999; Altuğ, 2009).

2.7.3. Retinoid ve karotenoidler

Retinoid ve karotenoidler, lipidlerin ve hücre zarlarının yapısında yer alır. Flavın ve porfirinlerin zararlı etkilerini önlemede singlet oksijeni baskılamada, peroksit radikallerini önlemede görev alır (Fang, 2002; Altuğ, 2009).

2.7.4. Glutasyon

Glutasyon, hem endojen hem de eksojen bir antioksidandır. Glutasyon, glutasyon peroksidazın katalize ettiği tepkime ile reaktif radikallere karşı korur. Glutasyon'un doğrudan antioksidan özellikleri vardır, vitamin E ve C' nin işlevsel antioksidan kapasitesini arttırır (Fang, 2002; Altuğ, 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Çözücüler ve kimyasallar

β -karoten, linoleik asit, gallik asit, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisal (BHA) Sigma Kimyasaldan (St. Louis, MO); Tween-40, kloroform, diğer tüm kimyasallar ve çözücüler E. Merck (Darmstadt, Germany)'den temin edildi. Kullanılan diğer tüm kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktadır.

3.1.2. Bitkisel materyallerin toplanması ve teşhis edilmesi

Üç *Stachys* taksonuna ait bitkiler aşağıdaki lokasyonlarından doğal ortamlarından çiçeklenme zamanlarında toplandı. Taksonların toprak üstü kısımları oda sıcaklığında ve gölgede kurutuldu. Taksonların taksonomik tanımlamaları Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim elemanı Uzman Dr. Olcay CEYLAN tarafından yapıldı. Her üç taksonun gölgede kurutulmuş toprak üstü kısımları (bitkinin çiçek, dal ve yapraklarını kapsayan ve toprak üstünde kalan kısımları) belli bir tane boyutuna öğütüldükten sonra çözücü özütlerinin elde edilmelerinde kullanılmak üzere analize hazır hale getirildi.

1. *Stachys annua* (L.) L. subsp. *annua* (L.) L. var. *annua* Bhattacharjee. Ankara, Çubuk, Karagöl, 1534 m, 13.07.2013. 40° 24' 47"K 32° 54' 52"D, (Herbaryum No: MUH1658).
2. *Stachys byzantina* C. Koch. Afyon, Bolvadin, Kemerkaya Kasabası, Tömsü Kalesi civarı, 1520 m, 23.06.2013. 38° 53' 59"K 31° 06' 13"D, (Herbaryum No: AFY18).
3. *Stachys iberica* Bieb. subsp. *iberica* Bieb. var. *densipilosa* Bhattacharjee. Afyon, Bolvadin, Avdan köyü, 1342 m, 23.06.2013. 38° 52' 28"K 31° 04' 27"D, (Herbaryum No: AFY13).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Özütleme yöntemleri

3.2.1.1. Çözücü özütlerinin hazırlanması

Bitkilerin çözücü özütlerinin elde edilmesinde farklı polariteye sahip çözücüler tercih edilerek aşağıdaki şekilde özütleme işlemi uygulandı:

1. Etil asetat özütlemesi: Kurutulmuş ve belli bir tane boyutuna getirilmiş bitki örneklerinin 15 gramı soxhlet haznesine yerleştirildi ve etil asetat ile 5 saat soxhlet özütlemesi uygulandı. Özütler beyaz bant süzgeç kağıdından süzöldükten sonra çözücü vakum altında döner buharlaştırıcıda 40 °C'de uzaklaştırıldı ve özütler analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.
2. Metanol özütlemesi: Kurutulmuş ve belli bir tane boyutuna getirilmiş bitki örneklerinin 15 gramı soxhlet haznesine yerleştirildi ve bu kez metanol ile 5 saat soxhlet özütlemesi uygulandı. Özütler beyaz bant süzgeç kağıdından süzöldükten sonra çözücü vakum altında döner buharlaştırıcıda 40 °C'de uzaklaştırıldı ve özütler analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.
3. Su özütlemesi: Kurutulmuş ve belli bir tane boyutuna getirilmiş bitki örneklerinin 15 gramı 300 ml kaynar saf su ile 30 dakika muamele edildi. Özütler beyaz bant süzgeç kağıdından süzöldükten sonra -18 °C'de donduruldu. Daha sonra -50 °C'de liyofilize (suyu uzaklaştırıldı) edildi ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.

Etil asetat ve metanol özütleri tekrar metanol içerisinde çözüldüröldü ve beyaz bant süzgeç kağıdından süzölerek 2 mg/ml derişimde stok çözeltiler hazırlandı. Su özütü ise tekrar saf suda çözüldüröldü ve bu özütten de 2 mg/ml derişimde stok çözeltili hazırlandı. Tüm testlerde hazırlanan bu çözeltiler kullanıldı.

3.2.2. Enzim inhibisyon kapasite tayin yöntemleri

3.2.2.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

Kolinesteraz inhibisyon aktivite testleri Ellman yöntemi kullanılarak 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirildi (Ellman vd., 1961). İçerisinde örnek çözeltisi (50 µl) bulunan mikrolaka kuyucuklarına 125 µl DTNB (5,5-Ditiyobis(2-nitrobenzoik) acid), 25 µl asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya butiriltiyokolin iyodür (BTCl) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra bu karışıma tris-HCl tamponunda (pH: 8.0) hazırlanmış 25 µl asetilkolin esteraz (AChE) veya bütirilkolin esteraz (BChE) enzim çözeltisi eklendi. Enzim çözeltisi yerine tris-HCl tamponu kullanılarak her bir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra hem kör hem de örneklerin 405 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin asetilkolin esteraz ve bütirilkolin esteraz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak galantamine eşdeğer olarak hesaplandı (mg GALAEs/g örnek).

3.2.2.2. Tirozinaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

Tirozinaz inhibisyon aktivite testleri L-DOPA molekülünün substrat olarak kullanıldığı dopakrom yöntemiyle 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirildi (Orhan vd., 2014). İçerisinde örnek çözeltisi (25 µl) bulunan mikrolaka kuyucuklarına 100 µl fosfat tamponu (pH:6.8) ve bu tamponda hazırlanmış 40 µl tirozinaz enzim çözeltisi ilave edildi. Enzim çözeltisi yerine fosfat tamponu kullanılarak her bir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra hem kör hem de örneklerin 492 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin tirozinaz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak kojik asit eşdeğer olarak hesaplandı (mg KAEs/g örnek).

3.2.2.3. α -Amilaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

α -Amilaz inhibisyon aktivite testleri Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (I_2/KI) yöntemi kullanılarak 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirildi (Zengin vd., 2014). İçerisinde örnek çözeltisi (25 μ l) bulunan mikrolaka kuyucuklarına 50 μ l nişasta çözeltisi ve fosfat tamponunda (pH: 6.9) hazırlanmış 25 μ l α -amilaz çözeltisi ilave edildi. Enzim çözeltisi yerine fosfat tamponu kullanılarak her bir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra tüm örnekler üzerine 25 μ l HCl çözeltisi (1 M) eklenerek tepkime durduruldu. Daha sonra tüm örnekler üzerine 100 μ l iyot-potasyum iyodür çözeltisi (I_2/KI) eklenerek hem kör hem de örneklerin 630 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin α -amilaz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak akarboz eşdeğer olarak hesaplandı (mmol ACEs/g örnek).

3.2.2.4. α -Glukozidaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

α -Glukozidaz inhibisyon aktivite testleri PNPG (4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit) molekülünün substrat olarak kullanıldığı bir yöntemle 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirildi (Palanisamy vd., 2011; Sarikurkcu vd., 2014). İçerisinde örnek çözeltisi (50 μ l) bulunan mikrolaka kuyucuklarına 50 μ l glutatyon, 50 μ l PNPG ve fosfat tamponunda (pH: 6.9) hazırlanmış 50 μ l α -glukozidaz çözeltisi ilave edildi. Enzim çözeltisi yerine fosfat tamponu kullanılarak her bir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerlerine 50 μ l Na_2CO_3 (0.2 M) eklenerek hem kör hem de örneklerin 400 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak akarboz eşdeğer olarak hesaplandı (mmol ACEs/g örnek).

3.2.3. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri

3.2.3.1. Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi

3.2.3.1.1. β -Karoten/linoleik asit yöntemi

Örneklerin toplam antioksidan aktivitesi, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin ve uçucu organik bileşiklerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β -karoten-linoleik asit sistemiyle belirlendi (Sarıkurkcu vd., 2013). β -karoten çözeltisi, 0.5 mg β -karotenin 1 ml kloroformda çözülmesiyle hazırlandı. Bu çözeltiye 25 μ l linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform döner buharlaştırıcıda uçurulduktan sonra 100 ml hava geçirilmiş safsu ile karıştırıldı. Bu emülsiyonunun 2.5 mililitresi örneklerin 0.5 mililitresine ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 0.5 ml metanol/su konuldu. Emülsiyon test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japan) kullanılarak 490 nm'deki başlangıç absorbans ölçümleri yapıldı. Tüpler 50 °C'de inkübasyona bırakıldı. β -karotenin rengi kayboluncaya kadar inkübasyona devam edildi (120 dakika). β -karoten renk açılım oranı (R), 1 eşitliğine göre hesaplandı:

$$R = \ln (a/b)/t \quad (1)$$

Burada; $\ln$ = doğal logaritma, a = başlangıç absorbansı, b = 120 dakika inkübasyondan sonraki absorbansı ifade etmektedir.

Toplam antioksidan aktivite (TAA) ise 2 eşitliğine göre hesaplandı:

$$TAA = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (2)$$

3.2.3.1.2. Fosfomolibdenyum yöntemi

İçerisinde örnek çözeltisi (0.1 ml) bulunan test tüplerine 3 ml reaktif çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ilave edildi. Test tüpleri 95 °C'de 90 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve köre karşı (kör, 3 ml reaktif çözelti ve 0.1 ml çözücü içermektedir) 695 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı (Zengin vd., 2010). Örneklerin toplam

antioksidan kapasiteleri standart troloks eşdeğer (TEs) olarak hesaplandı (mmol TEs/g örnek).

3.2.3.2. Serbest radikal süpürüm aktivitenin belirlenmesi

3.2.3.2.1. DPPH radikal süpürüm testi

Örneklerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Sarikurkcu, 2011). İçerisinde örnek çözeltisi (1 ml) bulunan test tüplerine metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi (1 ml, 0.4 mM) ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 1 ml metanol/su konuldu. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 517 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin DPPH radikalini süpürüm aktiviteleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı (mg TEs/g örnek).

3.2.3.2.2. ABTS radikal süpürüm testi

Bu testte ABTS⁺ radikal katyonu, 7.4 mM ABTS çözeltisi ile 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisinin tepkimesiyle elde edildi. Bu karışımının 12-16 saat karanlıkta bekletilerek aktif radikal oluşması sağlandı. Deneyden önce ABTS katyon radikal çözeltisi, 734 nm'de absorbansı 1.381 ± 0.020 olacak şekilde metanol ile seyreltilti. İçerisinde örnek çözeltisi (1 ml) bulunan test tüplerine ABTS katyon radikal çözeltisi (2 ml) ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 1 ml metanol/su konuldu. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 734 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı (Re vd., 1999; Zengin vd., 2014). Örneklerin ABTS katyon radikali süpürüm aktiviteleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı (mg TEs/g örnek).

3.2.3.3. İndirgeme gücünün belirlenmesi

3.2.3.3.1. CUPRAC testi

Örneklerin Cu²⁺/Cu⁺ indirgeme potansiyelleri literatürde belirtilen CUPRAC yöntemiyle analiz edildi (Apak vd., 2006; Zengin vd., 2014). İçerisinde örnek çözeltisi (0.5 ml) bulunan test tüplerine sırasıyla; CuCl₂ (1 ml, 10 mM),

amonyum asetat (1 ml, 1 M, pH:7.0) ve neokuproin (1 ml, 7.5 mM) çözeltileri eklendi. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin CUPRAC indirgeme potansiyelleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı (mg TEs/g örnek).

3.2.3.3.2. FRAP testi

Örneklerin Fe^{3+}/Fe^{2+} indirgeme potansiyelleri FRAP yöntemiyle belirlendi (Benzie ve Strain, 1996). Asetat tamponu (0.3 M, pH: 3.6), 40 mM HCl içinde hazırlanan 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (10 mM) ve $FeCl_3$ (20 mM) çözeltilerinin hacimce 10:1:1 oranında karıştırılması ile oluşturulan FRAP reaktifi (2 ml), içerisinde örnek çözeltisi (0.1 ml) bulunan test tüplerine eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımların 593 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin FRAP indirgeme potansiyelleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı (mg TEs/g örnek).

3.2.3.3.4. Şelatlama kapasitesinin belirlenmesi

Örneklerin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasiteleri Sarikurkcı vd. (2013) yöntemine göre belirlendi. İçerisinde özüt çözeltisi (2 ml) bulunan test tüplerine $FeCl_2$ (0.05 ml, 2 mM) çözeltisi ilave edildi. Tepkime ferrozin (0.2 ml, 5 mM) ilavesiyle başlatıldı. Karışım karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ferrozin yerine metanol/su (0.2 ml) kullanılarak her bir örnek için kör numune hazırlandı. Daha sonra hem kör hem de örneklerin 562 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin şelatlama kapasiteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak etilendiamin tetra asetik asit disodyum (EDTA) tuzu eşdeğer olarak hesaplandı (mg EDTAEs/g örnek).

3.2.3.3.5. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılarak gallik asit eşdeğer olarak belirlendi (Sarikurkcı vd., 2013). İçerisinde özüt çözeltisi (0.25 ml) bulunan test tüplerine FCR reaktifi (1 ml, 1:9

seyreltilmiş) ilave edildi ve 3 dakika sonrada bu karışıma Na₂CO₃ çözeltisi (0.75 ml, %1) eklendi. Son karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve ara sıra çalkalandı. Özütlerin 760 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı ve toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğer olarak hesaplandı (mg GAEs/ g özüt).

3.2.3.6. Toplam flavonoit bileşik miktarının belirlenmesi

Örneklerin toplam flavonoit bileşik miktarları AlCl₃ yöntemiyle belirlendi (Sarikurkcu vd., 2013). İçerisinde özüt çözeltisi (1 ml) bulunan test tüplerine metanolde hazırlanmış AlCl₃ çözeltisi (1 ml, %2) ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Kör örnek olarak özüt çözeltisi (1 ml) ve metanol (1 ml) içeren bir karışım hazırlandı. Örneklerin 415 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin flavonoit bileşik miktarları örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir özüt için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak rutin eşdeğer olarak hesaplandı (mg REs/g özüt).

3.2.3.7. Toplam saponin bileşik miktarının belirlenmesi

Özütlerin toplam saponin bileşik miktarları vanillin-sülfürik asit yöntemiyle belirlendi (Aktumsek vd., 2013). İçerisinde özüt çözeltisi (0.25 ml) bulunan test tüplerine vanilin (0.25 ml, %8) ve sülfürik asit (2 ml, %72) ilave edildi. Karışım 60 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğutulan özütlerin 538 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı ve toplam saponin bileşik miktarları quillaja eşdeğer olarak hesaplandı (mg QAEs/g özüt).

3.2.3.8. Bitki özütlerinin RP-HPLC ile fenolik içeriklerinin belirlenmesi

Üç *Stachys* taksonuna ait çözücü özütlerinin fenolik bileşik miktarları ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle (RP-HPLC, Shimadzu Scientific Instruments, Tokyo, Japan) tespit edildi. Fenolik bileşiklerin belirlenmesi ve miktarlarının tayin edilmesinde LC-10ADvp pompa, Diod Array Detektör, CTO-10Avp kolon ısıtıcı, SCL-10Avp system kontrolörü, DGU-14A degazör ve SIL-10ADvp otomatik örnekleyici (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) kullanılarak belirlendi. Ayırımlar 30 °C'de Agilent® Eclipse XDB C-18 ters faz

kolon (250 mm x4.6 mm, 5 µm tanecik boyut) üzerinde gerçekleştirildi. Elüatlar 280 nm’de tespit edildi. İki farklı mobil faz kullanıldı. Bunlardan A: %3’lük asetik asit ve B: Metanoldür. Analiz için örnekler metanol içerisinde çözündürüldü ve bu çözelti (20 µl) kolona enjekte edildi. 0.8 ml/dk akış hızında Çizelge 3.1’deki elüsyon gradient programı uygulandı.

Protokatesik asit, (+)-katesin, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, (-)-epikatesin, ferulik asit, benzoik asit, rutin, rosmarinik asit ve apigenin fenolik standartlar olarak kullanıldı. Özütlerdeki fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi, standartlarla karşılaştırılmalarıyla tespit edildi. Özütlerin içerdiği her bir fenolik bileşik miktarı ilgili fenolik standarttan elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı (mg/g özüt). Analizde kullanılan standart fenoliklere ait analitik karakteristikler Çizelge 3.2’ de verildi.

Çizelge 3.1. *Stachys* taksonları özütlerinin fenolik içerikleri için HPLC programı

Süre (dk)	Derişim A (%3 Asetik asit)	Derişim B (Metanol)
0.01	100	-
0.10	93	7
20	72	28
28	75	25
35	70	30
50	70	30
60	67	33
62	58	42
70	50	50
73	30	70
75	20	80
80	100	-
81	93	7

Çizelge 3.2. Standart fenolik bileşiklere ait analitik karakteristikler

Fenolik bileşikler	Linearite (mg/l)	Linear eşitlik	(R ²)	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
Protokateşik asit	0.20-25.0	y = 48107x-11153	0.9991	0.086	0.260
(+)-Kateşin	0.90-113	y = 20346x-29275	0.9988	0.172	0.522
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	0.20-25.0	y = 62896x-11801	0.9994	0.007	0.020
Klorojenik asit	0.35-45.0	y = 37172x-20503	0.9988	0.080	0.241
Kafeik asit	0.16-21.0	y = 101382x-18712	0.9993	0.054	0.162
(-)-Epikateşin	0.50-66.0	y = 30982x-22609	0.9990	0.170	0.514
Ferulik asit	0.12-17.0	y = 94621x-15153	0.9993	0.004	0.011
Benzoik asit	0.85-55.0	y = 9578.2x-2819.6	0.9998	0.111	0.335
Rutin	0.40-55.0	y = 26877x-18033	0.9990	0.180	0.550
Rosmarinik asit	0.40-55.1	y = 39556x-27953	0.9989	0.050	0.150
Apigenin	0.17-11.0	y = 95601x-6571.1	0.9997	0.034	0.104

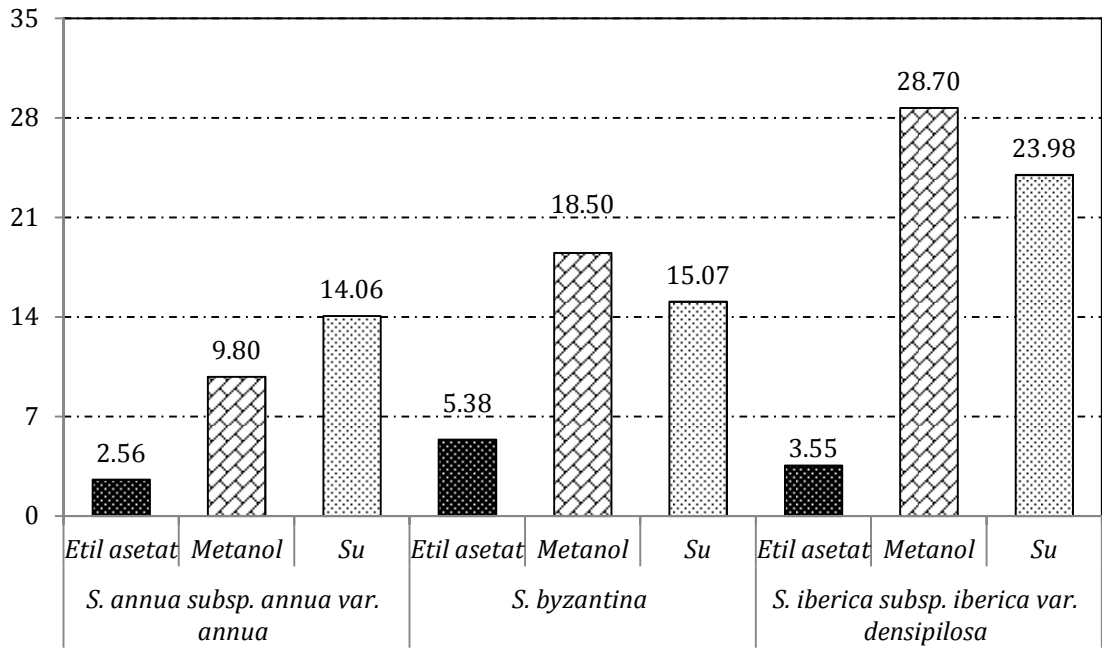
3.3. İstatistiksel Hesaplamalar

Bütün testler üç tekrarlı deneyler yapılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar üç tekrarlı deneylerin ortalaması ve standart sapması olarak verildi. Sonuçlar arasındaki anlamlılık testleri SPSS v22. programı kullanılarak ANOVA varyans analizi yardımıyla %95 güven aralığı seçilmek suretiyle ($\alpha=0.05$) Tukey testiyle belirlendi. Testler arasındaki korelasyon analizleri Pearson korelasyon testi kullanılarak gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *Stachys* Taksonlarının Çözücü Özüt Verimleri

Üç *Stachys* taksonuna (*Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua*, *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa*) ait bitkilerden etil asetat, metanol ve su özütleri hazırlandı. Bu taksonlara ait çözücü özüt verimleri Şekil 4.1’de verildi. *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonları için en yüksek özüt verimi metanol özütüne (sırasıyla; %18.50 ve %28.70) ait iken; *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* takasonu için en yüksek verim su özütünde (%14.06) tespit edildi.



Şekil 4.1. *Stachys* taksonlarının çözücü özüt verimleri (%)

4.2. Çözücü Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

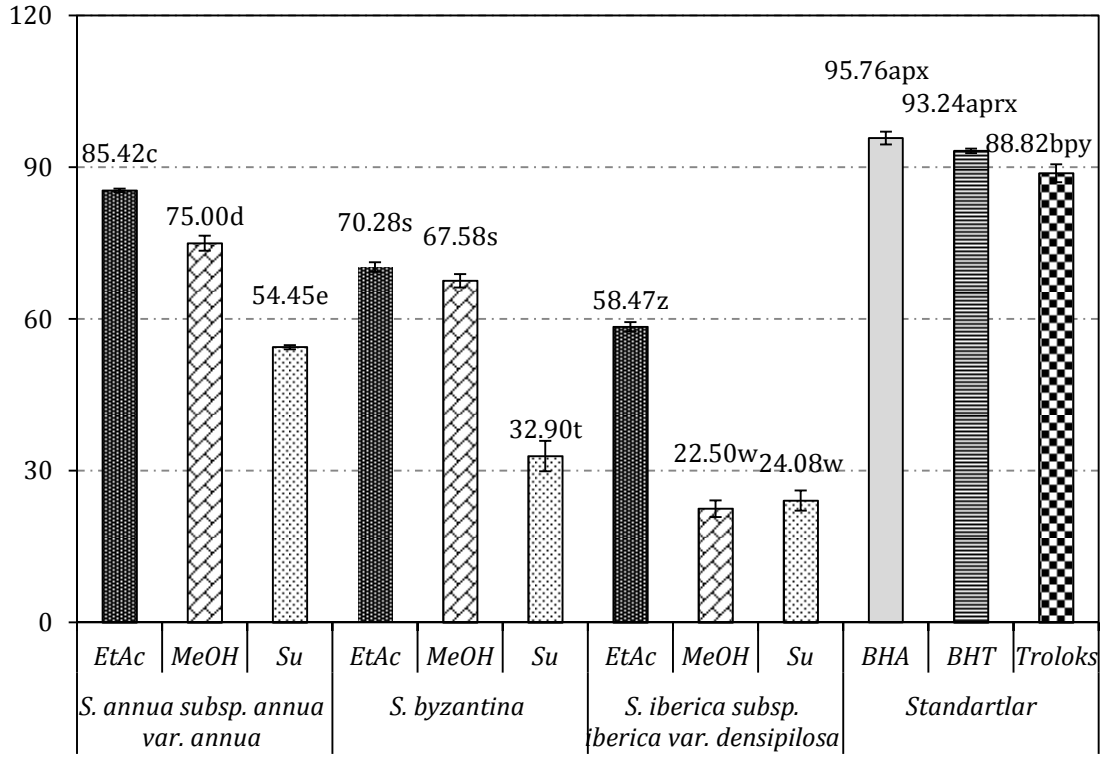
Literatürde herhangi bir türün antioksidan aktivisinin belirlenmesinde tek bir test analiz sonucuna göre değerlendirme yapılamayacağı belirtilmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında da her üç *Stachys* taksonunun çözücü özütlerinin antioksidan aktiviteleri toplam 9 farklı test sistemiyle belirlenerek sonuçların değerlendirilmesi yapıldı.

4.2.1. Çözücü özütlerinin toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

Üç *Stachys* taksonunun çözücü özütlerinin toplam antioksidan kapasiteleri literatürde sıklıkla kullanılan β -karoten-linoleik asit ve fosfomolibdenyum yöntemleri kullanılarak belirlendi.

β -karoten-linoleik asit yöntemi, aynı zamanda β -karoten renk açılımı olarak da bilinmektedir. β -karoten-linoleik asit emülsiyon sistemi içerisindeki linoleik asidin oksijenli ortamda inkübasyonu esnasında linoleik asitten peroksit, alkoksit gibi oksijen kaynaklı radikaller oluşmaktadır. Oluşan bu radikaller, yine aynı emülsiyon içerisindeki β -karoten ile tepkimeye giderek β -karotenin karakteristik sarı rengini açarlar. Bu durum emülsiyon sistemindeki β -karotene ait bu renk açılımının spektroskopik olarak takip edilmesine olanak sağlamaktadır. Test ortamında antioksidan türlerin olması durumunda linoleik asitten oluşan oksijen kaynaklı radikaller, β -karoten yerine bu antioksidanlarla tepkimeye girerler ve bunun sonucu olarak da β -karotenin karakteristik sarı rengi korunmuş olur. Dolayısıyla inkübasyon sonunda 490 nm’de analiz edilen örneğin daha yüksek absorbands değerine sahip olması daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği anlamına gelmektedir.

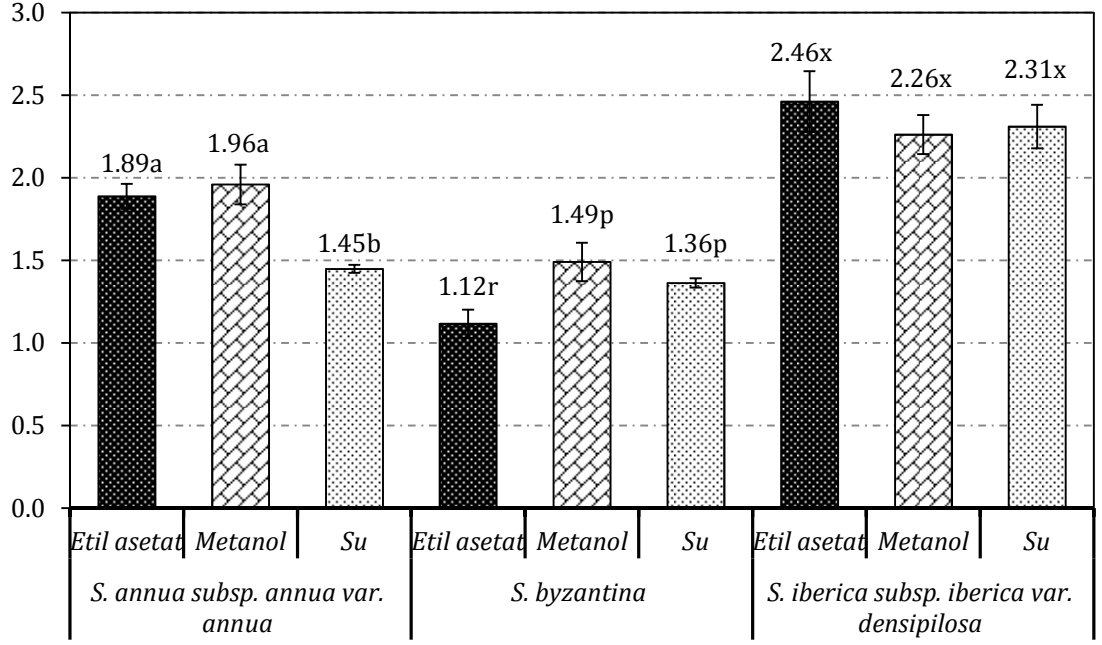
2 mg/ml derişimdeki çözücü özütlerinin β -karoten-linoleik asit sistemiyle yapılan toplam antioksidan aktivite analiz sonuçları Şekil 4.2’de verildi. Her üç takson için, etil asetat özütlerinin diğer özütlere nazaran bu test sisteminde daha yüksek aktiviteye sahip oldukları görüldü ($p<0.05$). Bu test sisteminde, tüm özütler arasında, 2 mg/ml derişimdeki *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonu etil asetat özütünün (%85.42) en yüksek toplam antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Ancak bu taksonun aynı özütüne ait olan bu aktivitenin standart antioksidan olan troloksunkine (%88.82) yakın ancak diğer standartlar olan BHA (%95.76) ve BHT’nin (%93.24) aktivitelerinden daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). Bununla birlikte Şekil 4.2’de de görüldüğü üzere, *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonunun ayrı ayrı özüt bazında diğer iki taksonun özütlerinden daha yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edildi.



Şekil 4.2. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin β -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri (% , 2 mg/ml derişimde)

Toplam antioksidan aktivitenin belirlenmesinde rutin olarak kullanılan diğer bir yöntem ise fosfomolibdenyum yöntemidir. Fosfomolibdenyum reaktifi içerisindeki Mo(VI) iyonlarının özütler içerisindeki antioksidan türler tarafından Mo(V)'e indirgenmesi ve oluşan bu Mo(V) iyonlarının 695 nm'de spektroskopik olarak takip edilmesi bu test sisteminin mantığını oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu dalga boyunda daha yüksek absorbansa sahip olan özüt daha yüksek toplam antioksidan aktivite sergiliyor anlamına gelmektedir.

Taksonların fosfomolibdenyum yöntemiyle yapılan toplam antioksidan aktiviteleri Şekil 4.3'te verildi. Bu test sisteminde *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonunun tüm özütlerinin (2.26-2.46 mmol TEs/g özüt) diğer taksonlarıkinden daha yüksek aktivite sergiledikleri ancak aynı taksonun özütleri arasındaki aktivite sonuçları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın bulunmadığı belirlendi ($p>0.05$).



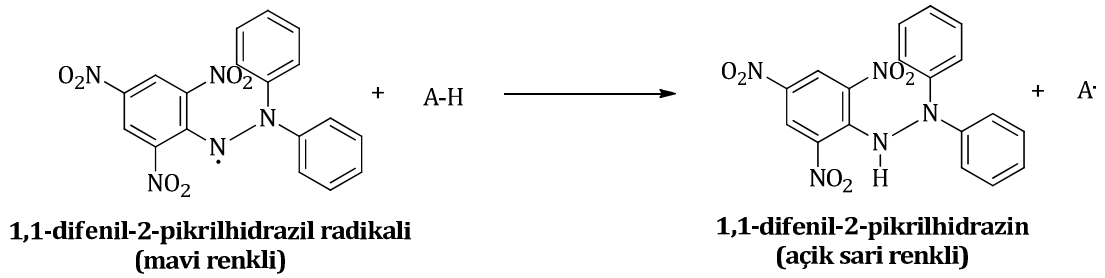
Şekil 4.3. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin fosfomolibdenyum yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri (mmol TEs/g özüt)

Bu tez çalışmasında değerlendirilen *Stachys* taksonlarının çözücü özütlerinin fosfomolibdenyum yöntemleriyle toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesine yönelik literatürde hiçbir veriye rastlanmamıştır. Bu nedenle bu test sistemiyle elde edilen analiz sonuçları literatür verileriyle karşılaştırılamamıştır. Ancak literatürde, *S. iberica* bitkisi su özütü için β -karoten-linoleik asit siteminde ve 2 mg/ml derişimde %88.14 aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Tepe vd., 2011). Bu çalışmada değerlendirilen *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonu su özütü bu test siteminde %24.08 toplam aktivite sergiledi. Bu farklılığın temel sebeplerinden birinin Tepe vd. (2011) tarafından yapılan çalışmadaki bitkisel materyal sadece *S. iberica* türüdür. Oysa bu çalışmada kullanılan bitki ise aynı türün alt türü hatta bu alt türün varyetesidir (*S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa*). Bu bakımdan çalışılan taksonlar farklılık arz etmektedir. Ayrıca diğer bir farklılık nedeni ise, yine aynı çalışmada özütlemenin oda sıcaklığında 24 saat maserasyon ile yapılmasıdır. Oysa bu çalışmadaki özütleme işlemi, 30 dakikalık sıcak maserasyon (infüzyon) ile demleme yöntemidir. Bu farklılık da özütlere geçen sekonder metabolitlerin hem türünde hem de miktarında farklılığa neden olmuş olabilir.

4.2.2. Çözücü özütlerinin radikal süpürüm aktivitelerinin belirlenmesi

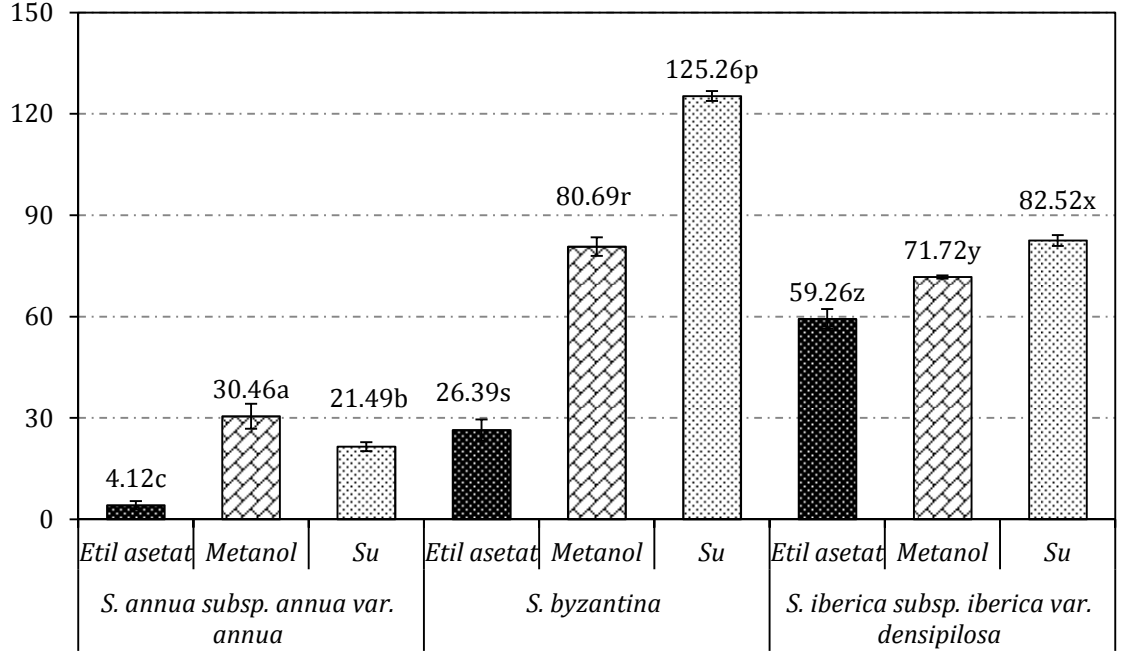
Stachys taksonlarının çözücü özütlerinin radikal süpürüm aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) ve ABTS katyon radikalleri kullanılarak belirlendi.

Bu testlerden ilki olan DPPH testi, ticari olarak satılan, oda sıcaklığında kararlı ve radikal süpürüm testlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu radikalın metanoldeki çözeltisi 517 nm’de soğurum yaptığından spektroskopik olarak takip edilmesi mümkündür. Dolayısıyla radikal süpürücü türler varlığında radikal daha kararlı hale gelebilmek için bu türlerden hidrojen radikali ya da elektron alabilmekte ve zamanla karakteristik mavi rengini kaybetmektedir (Şekil 4.4). Dolayısıyla bu test sisteminde ilgili türün 517 nm’deki absorbansı kontrol örneğine göre ne kadar düşükse o tür o kadar yüksek radikal süpürüm aktiviteye sahip anlamına gelmektedir.



Şekil 4.4. DPPH radikal süpürüm mekanizması

Taksonların DPPH radikal süpürüm aktiviteleri Şekil 4.5’te troluks eşdeğer olarak verildi. Bu test sisteminde, taksonlar arasında en düşük aktivite *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonunda tespit edildi (≤ 30.46 mg TEs/g özüt). Hem *S. byzantina* hem de *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonlarında çözücünün polaritesinin artmasıyla DPPH radikal süpürüm aktivitenin de buna paralel olarak etil asetat<metanol<su şeklinde arttığı görüldü. Tüm özütler arasında *S. byzantina* taksonunun su (125.26 mg TEs/g özüt) ve metanol (80.69 mg TEs/g özüt) özütlerinin bu test sisteminde en yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edildi. Ayrıca her taksonun özütlerinin aktiviteleri arasında anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p < 0.05$).

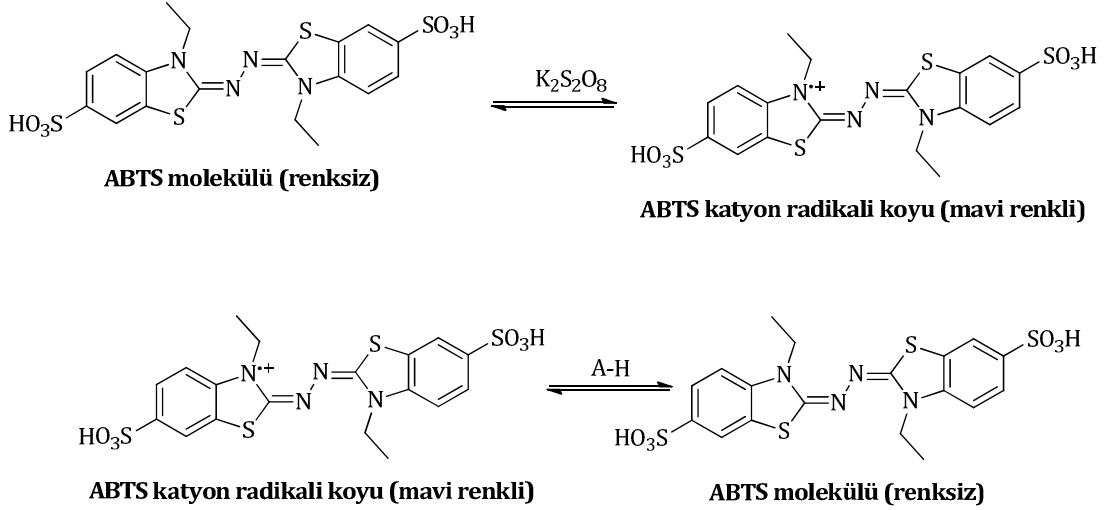


Şekil 4.5. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri (mg TEs/g özüt)

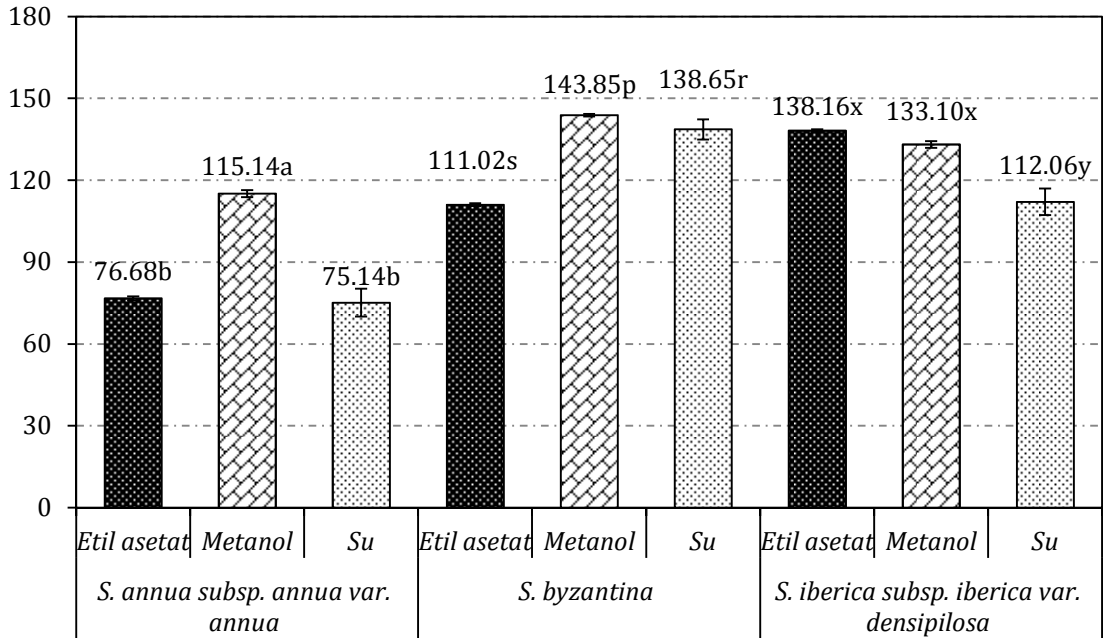
Radikal süpürüm aktivitenin belirlenmesine yönelik yapılan yöntemlerden bir diğeri ise, ABTS katyon radikal süpürüm testidir. ABTS katyon radikali, DPPH radikali gibi ticari olarak satılmadığından öncelikle laboratuvar şartlarında sentezlenmelidir. Radikal Şekil 4.6'da da gösterildiği gibi ABTS molekülü ile potasyum persülfatın ($K_2S_2O_8$) oda sıcaklığında yaklaşık 12 saatlik tepkimesiyle sentezlenir. 12 saat sonunda mavi renkli ve 734 nm'de soğurum yapan ABTS katyon radikali oluşmakta ve bu süreden sonra 4-5 saat kadar oda sıcaklığında kararlı kalabilmektedir. Tıpkı DPPH radikalinde olduğu gibi, radikal süpürücü türler varlığında ABTS katyon radikalinin mavi renki kaybolmakta ve bu da spektroskopik olarak takip edilmeye olanak sağlamaktadır (Şekil 4.6). Kontrol örneğine göre ilgili türün daha düşük absorbansa sahip olması o türün daha yüksek ABTS katyon radikal süpürüm aktiviteye sahip olması anlamına gelmektedir.

Taksonların ABTS katyon radikal süpürüm aktiviteleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.7'de verildi. DPPH testindekine paralel olarak yine taksonlar arasında en düşük aktivite *S. annua subsp. annua var. annua* taksonunda (≤ 115.14 mg TEs/g özüt) tespit edilirken; en yüksek aktivite diğer

iki taksonda belirlendi. *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonu etil asetat (138.16 mg TEs/g özüt) ve metanol (133.10 mg TEs/g özüt) özütlerinin ABTS kasyon radikal giderim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$).



Şekil 4.6. ABTS kasyon radikal oluşum ve süpürüm mekanizmaları



Şekil 4.7. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin ABTS kasyon radikal süpürüm aktiviteleri (mg TEs/g özüt)

Literatürde *S. byzantina* (Jassbi vd., 2014) ve *S. iberica* (Tepe vd., 2011) türlerinin DPPH süpürüm aktiviteleriyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Jassbi vd. (2014), yaptıkları çalışmada *S. byzantina* bitkisinin metanol özütünün DPPH radikal süpürüm aktivitesini %50 süpürüm yapan derişim (IC₅₀) cinsinden 135.1 µg/ml olarak hesaplamışlardır. Bir diğer çalışmada Tepe vd. (2011), *S. iberica* türü su özütünün 0.2, 0.4 ve 1.0 mg/ml derişimlerinin DPPH radikal süpürüm aktivitelerini sırasıyla; %13.57, %22.34 ve %46.63 olarak hesaplamışlardır. Bu tez çalışmasında kullanılan taksonların DPPH radikal süpürüm aktivite sonuçlarını hesaplama tekniklerinin farklı olması nedeniyle burada sunulan test sonuçlarıyla literatürde verilen test sonuçlarını karşılaştırmak doğru bir yaklaşım olmayacaktır. Ayrıca literatürde bu tez çalışmasında kullanılan taksonların ABTS katyon radikal süpürüm aktiviteleri üzerine bir çalışma bulunmadığından analiz sonuçlarını literatür verileriyle karşılaştırma yapılamamıştır.

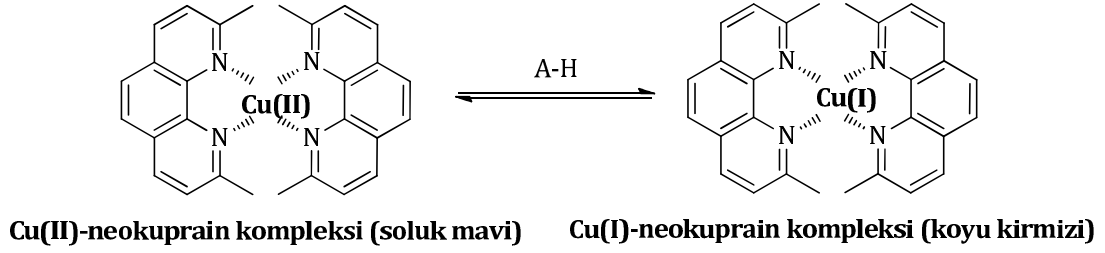
4.2.3. Çözücü özütlerinin indirgeme gücü kapasitelerinin belirlenmesi

Antioksidan kapasite tayin testlerinden bir diğeri de indirgeme gücü kapasite belirleme yöntemleridir. Literatürde indirgeme gücü kapasite analizleri kapsamında sıklıkla CUPRAC ve FRAP testlerinin tercih edildiğı görölmektedir.

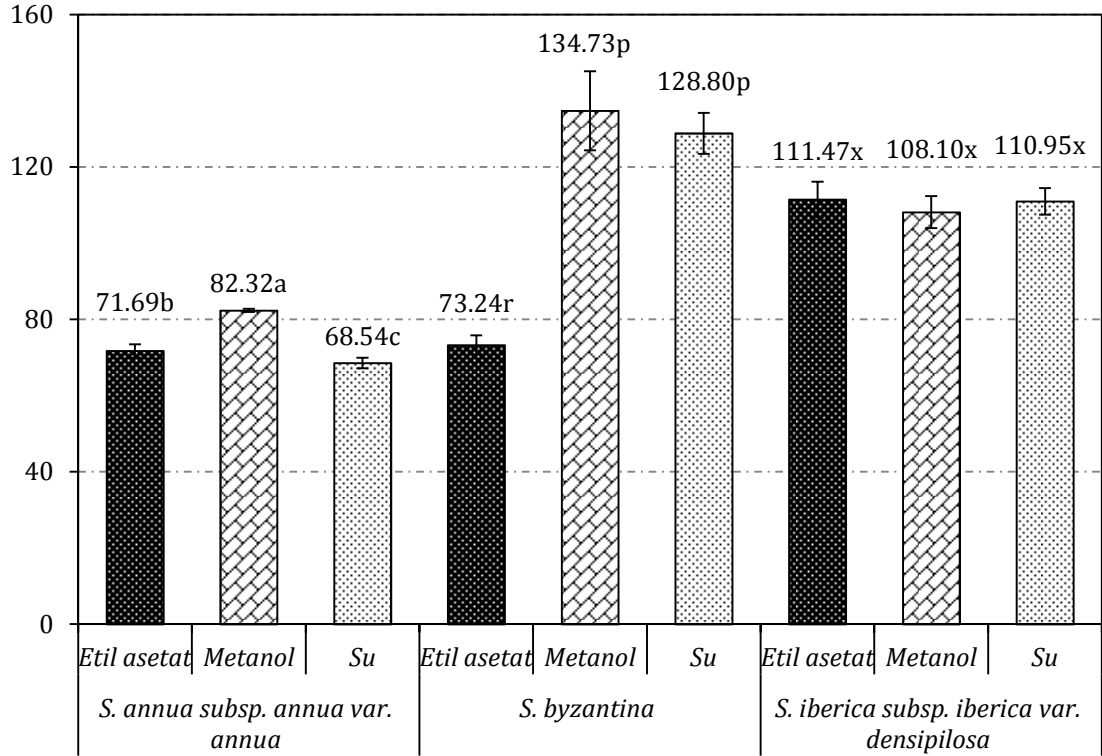
Bu yöntemlerden ilki olan ve bakırın kullanıldığı CUPRAC yönteminin esasını, indirgenler varlığında Cu(II) iyonlarının Cu(I) iyonlarına indirgenmesi ve indirgenen Cu(I) iyonlarının neokuproin ile kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 450 nm’de spektroskopik olarak takip edilmesi oluşturmaktadır. Dolayısıyla ilgili türün daha yüksek absorbands değerine sahip olması o türün daha yüksek indirgeme gücü kapasitesine sahip olması anlamına gelmektedir. Bu durum Şekil 4.8’deki gibi özetlenmektedir.

Taksonların CUPRAC yöntemiyle belirlenen indirgeme gücü kapasiteleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.9’da verildi. Şekilden de görüleceğı üzere, tıpkı DPPH ve ABTS katyon radikal testlerinde olduğu gibi bu test siteminde de taksonlar arasında en düşük indirgeme gücü kapasitesine *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonunun (≤82.32 mg TEs/g özüt) sahip

olduğu tespit edildi. Bununla birlikte *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonun tüm özütlerinin indirgeme gücü kapasiteleri (108.10-111.47 mg TEs/g özüt) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p>0.05$). Tüm özütler arasında, özellikle *S. byzantina* bitkisinin metanol ve su özütlerinin (sırasıyla; 134.73 ve 128.80 mg TEs/g özüt) CUPRAC testinde enyüksek indirgeme gücü kapasitesine sahip oldukları görüldü.

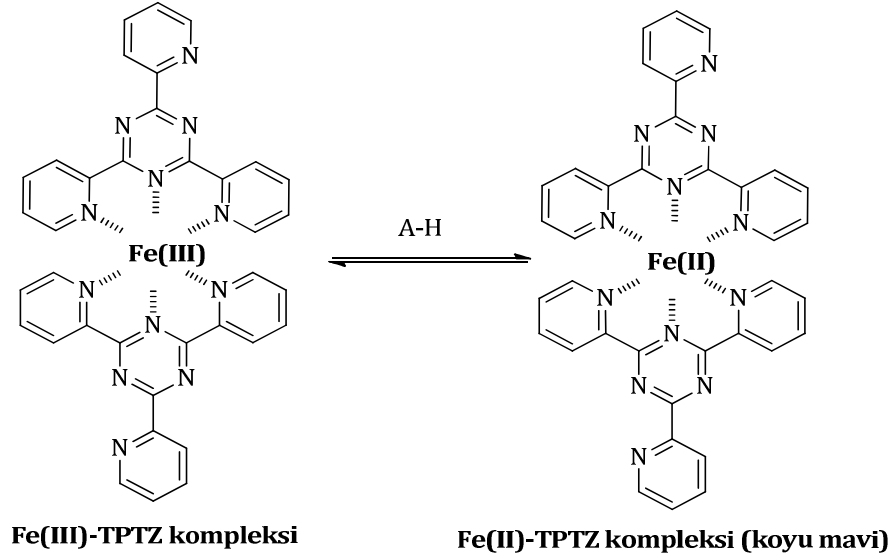


Şekil 4.8. CUPRAC indirgeme gücü test mekanizması



Şekil 4.9. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin CUPRAC yöntemiyle indirgeme gücü kapasiteleri (mg TEs/g özüt)

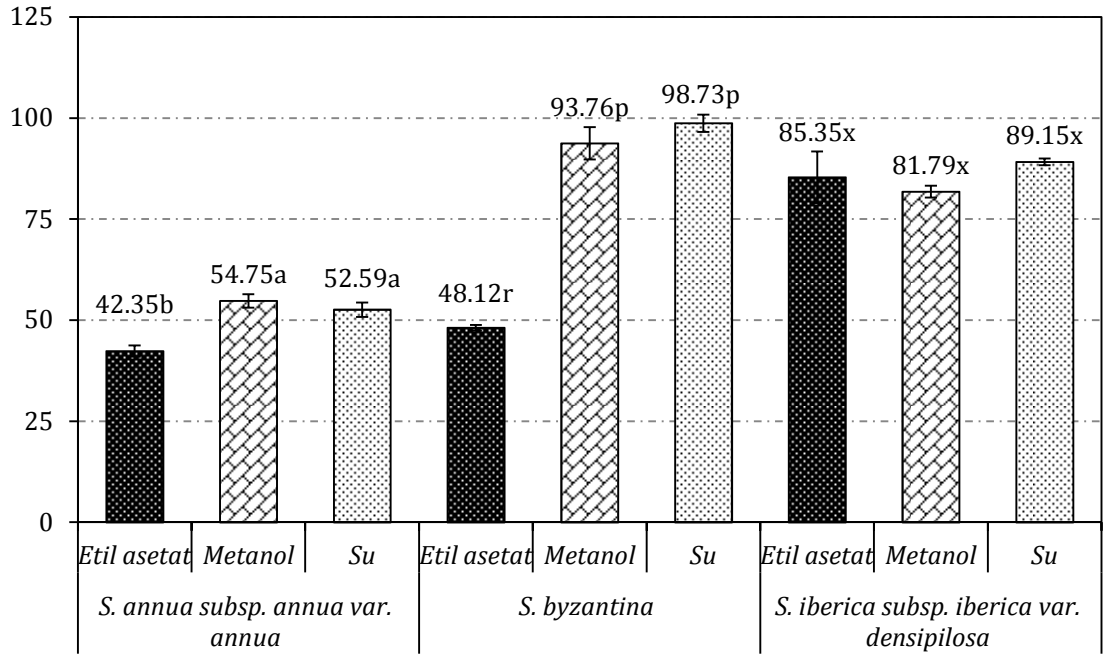
Diğer bir indirgeme gücü kapasitesi belirleme yöntemi ise FRAP yöntemidir. Bu testte örnekler içerisindeki indirgenler aracılığıyla Şekil 4.10'daki tepkime gereği Fe(III)-TPTZ kompleksi Fe(II)-TPTZ kompleksine indirgenerek koyu mavi renkli bir bileşik oluşmaktadır. Yöntem, oluşan bu renkli Fe(II)-TPTZ kompleksinin 593 nm'de spektroskopik olarak takip edilmesi temeline dayanmaktadır.



Şekil 4.10. FRAP indirgeme gücü test mekanizması

Taksonların FRAP testiyle yapılan indirgeme gücü kapasiteleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.11'de verildi. Bu test sistemindeki analiz sonuçlarının CUPRAC test sonuçlarıyla paralellik arzettiği görüldü. Yine bu test sisteminde de en yüksek indirgeme gücü kapasitesine sahip taksonların *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonları olduğu belirlendi. Yine aynı şekilde, *S. byzantina* metanol ve su özütlerinin (Sırasıyla; 93.76 ve 98.73 mg TEs/g özüt) aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmaksızın en yüksek indirgeme gücü kapasitelerine sahipken; *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonuna ait özütlerin indirgeme gücü kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$).

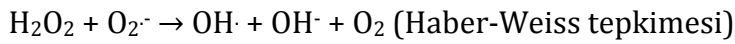
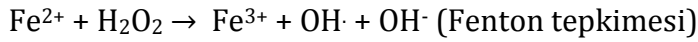
Literatürde bu taksonlara ait gerek CUPRAC gerekse de FRAP yöntemiyle yapılmış bir indirgeme gücü analiz sonuçlarına rastlanamadığından burada elde edilen sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılamamıştır.



Şekil 4.11. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin FRAP yöntemiyle indirgeme gücü kapasiteleri (mg TEs/g özüt)

4.2.4. Çözücü özütlerinin şelatlama kapasitelerinin belirlenmesi

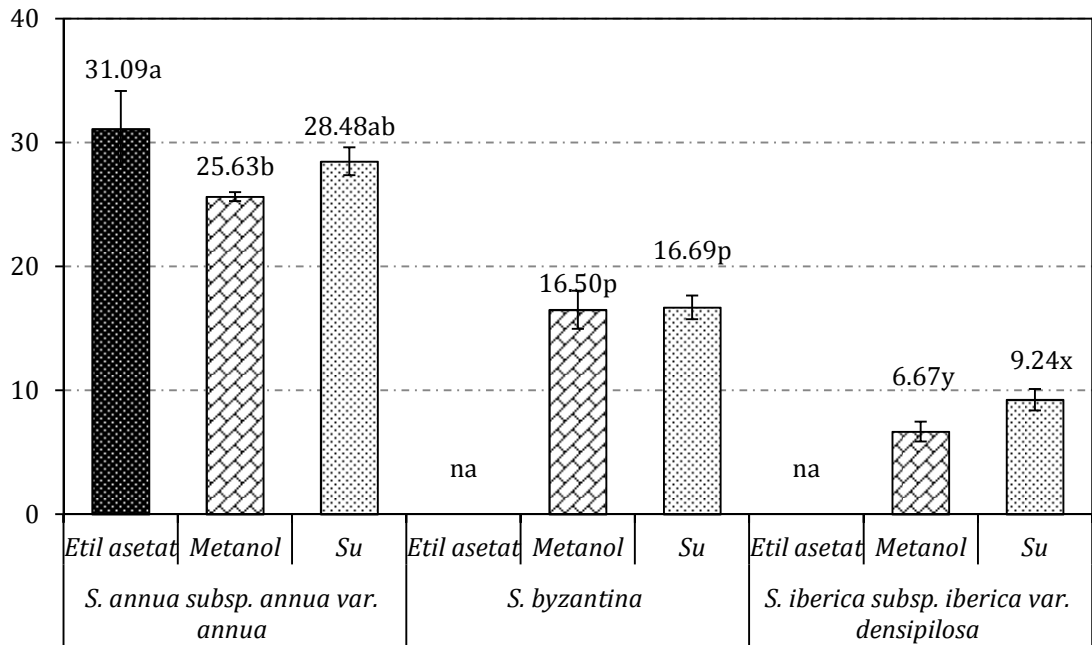
Geçiş metallerinin radikal oluşum mekanizmalarını Fenton ve Haber-Wiess tepkimeleriyle tetikleri bilinmektedir.



Dolayısıyla antioksidan aktivite analizleri yapılırken ilgili türlerin metal şelatlama kapasitelerinin de belirlenmesi rutin olarak yapılan testler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda literatürde sıklıkla Fe(II) iyonları ya da kısmen Cu(II) iyonları şelatlama kapasiteleri testlerine rastlanmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada da metal şelatlama kapasitesine yönelik taksonların çözücü özütlerinin Fe(II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri araştırıldı. Bu test sisteminde örnekler içerisindeki şelatlayıcı ajanların Fe(II) iyonları ile ferrozin arasında oluşan kompleksi ne kadar engelleyip engellemediği ve bunun da spektroskopik olarak takip edilmesi bu test sisteminin temelini oluşturmaktadır.

Taksonların çözücü özütlerinin Fe(II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri en iyi şelatlayıcı olarak bilinen etilen diamintetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA) eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.12’de verildi. Diğer testlerin aksine bu test sisteminde özellikle *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonunun tüm çözücü özütlerinin (25.63-31.09 mg EDTAEs/g özüt) oldukça yüksek ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonlarının şelatlama kapasitesinden yaklaşık 4 kat, *S. byzantina* taksonunun şelatlama kapasitesinden 1.5 kat daha fazla şelatlama kapasitesine sahip oldukları belirlendi. Ayrıca *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonlarının etil asetat özütlerinin Fe(II) iyonları şelatlama kapasitesine sahip olmadıkları tespit edildi. Bununla birlikte *S. byzantina* taksonunun metanol ve su özütlerinin (Sırasıyla; 16.50 ve 16.69 mg EDTAEs/g özüt) şelatlama kapasiteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$).

Literatürde sadece *S. iberica* türünün su özütünün 2 mg/ml derişimde %33.16 Fe(II) şelatlama kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Tepe vd., 2011). Diğer taksonların Fe(II) iyonlarını şelatlama kapasiteleriyle ilgili herhangi bir veri bulunmadığından sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılamamıştır.



Şekil 4.12. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin Fe(II) iyonları şelatlama kapasiteleri (mg EDTAEs/g özüt)

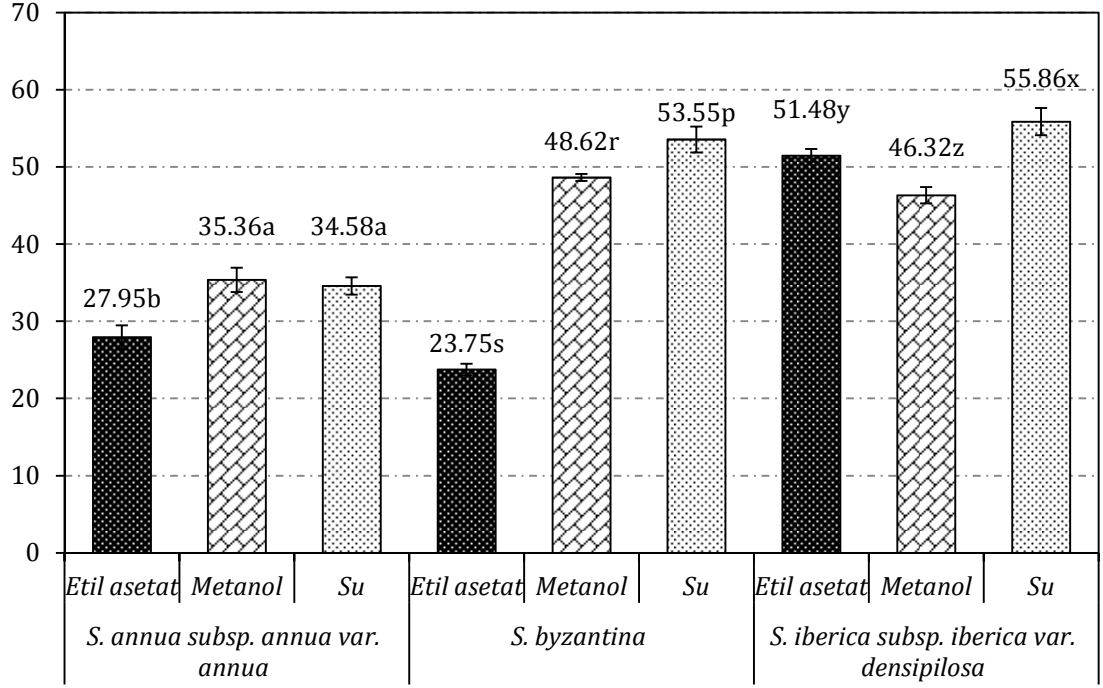
4.2.5. Çözücü özütlerinin toplam fenolik, flavonoit ve saponin içeriklerinin belirlenmesi

Fenolik ve flavonoit türü bileşikler yapılarında hidroksil grupları bulundurduklarından ve hidroksil gruplarındaki hidrojen radikalini rahatlıkla verebildiklerinden dolayı serbest radikal söndürme özellikleri bilinen bir durumdur. Bu özelliklerinden dolayı radikal süpürüm aktivite testlerini içeren antioksidan aktivite analizlerinde aktiviteye katkılarının tespit edilmesi açısından örneklerin toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarlarının bilinmesi oldukça önemli hale gelmektedir.

Taksonların çözücü özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları FCR reaktifi kullanılarak belirlendi ve sonuçlar standart fenolik bileşik olan gallik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki denklem yardımıyla gallik asit eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.13'te verildi.

$$A=47.21 \text{ (mg gallik asit)}-0.055 \text{ (R}^2 = 0.9959\text{)}$$

S. byzantina ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonlarının çözücü özütlerinin toplam fenolik içeriklerinin *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonununkilerden daha yüksek olduğu belirlendi. Aynı zamanda *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonunun metanol ve su özütlerinin (Sırasıyla; 35.36 ve 34.58 mg GAEs/g özüt) fenolik bileşik içeriklerinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sahip olmadığı belirlendi ($p>0.05$). *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonu su özütünün (55.86 mg GAEs/g özüt) en yüksek toplam fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu tespit edildi. Bu taksonun su özütüne ait bu veri Tepe vd. (2011)'nin *S. iberica* su özütü için buldukları 44.01 mg GAEs/g özüt fenolik bileşik içeriği ile uyum içinde olduğu söylenebilir. Ancak *S. byzantina* metanol özütü (48.62 mg GAEs/g özüt) için bu çalışmada bulunan toplam fenolik bileşik içeriğinin Jassbi vd. (2014) tarafından aynı türün metanol özütü (23.9 mg GAEs/g özüt) için bulunan fenolik içeriğiyle paralellik arzetmemektedir. Bu durumun her iki çalışmadaki özütleme tekniğinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

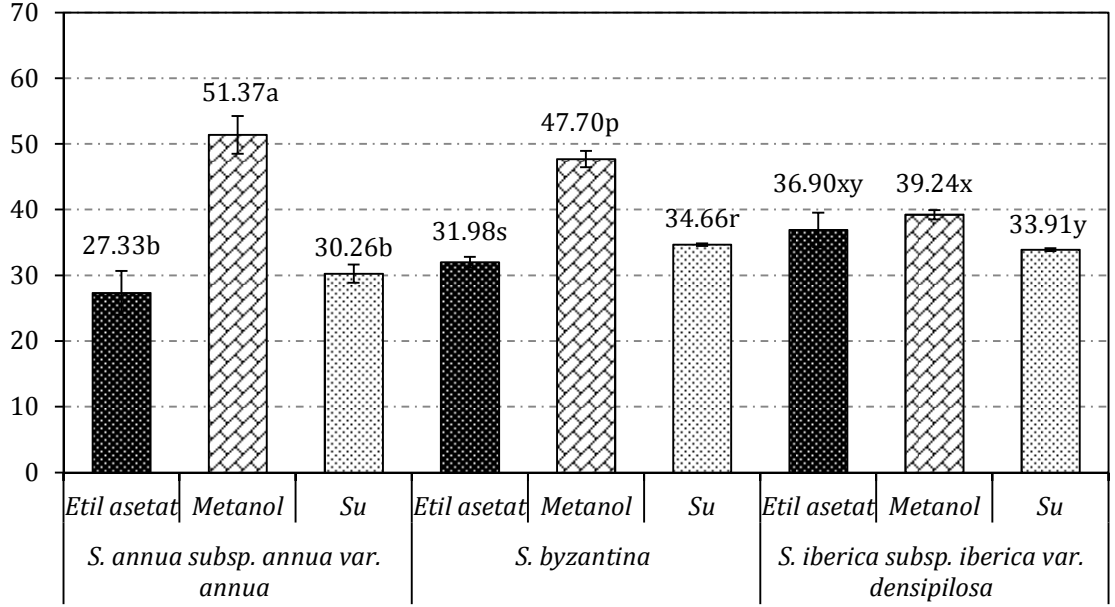


Şekil 4.13. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları (mg GAEs/g özüt)

Taksonların çözücü özütlerinin toplam flavonoit bileşik miktarları $AlCl_3$ yöntemine göre belirlendi. Sonuçlar standart flavonoit olan rutin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlikle rutin eşdeğer olarak hesaplandı ve sonucalar Şekil 4.14'te verildi.

$$A = 90.64 (\text{mg rutin}) - 0.012 (R^2 = 0.9969)$$

Stachys annua subsp. annua var. annua, *S. byzantina* ve *S. iberica subsp. iberica var. densipilosa* taksonları metanol özütlerinin diğer özütlere nazaran sırasıyla; 51.37, 47.70 ve 39.24 mg REs/g özüt değerleri ile daha yüksek toplam flavonoit bileşik içeriklerine sahip oldukları belirlendi. Buna ilaveten *S. iberica subsp. iberica var. densipilosa* taksonunun su özütünün toplam flavonoit bileşik içeriği 33.91 mg REs/g özüt olarak tespit edildi. Literatürde sadece *S. iberica* bitkisi su özütünün toplam flavonoit bileşik içeriği 5.97 mg kuersetin eşdeğer/g özüt olarak rapor edilmiştir (Tepe vd., 2011). Aynı tür için bu tez çalışmasında yapılan hesaplama tekniği aynı olmadığından bu iki sonucun karşılaştırılması anlamlı olmayacaktır.

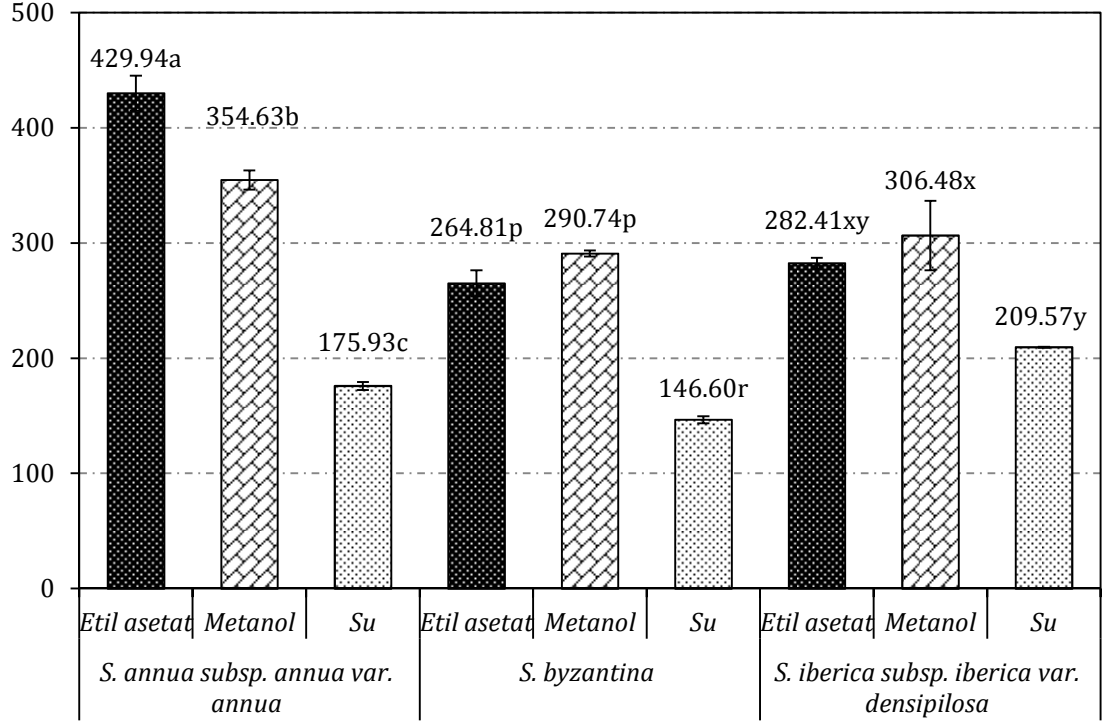


Şekil 4.14. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin toplam flavonoit bileşik miktarları (mg REs/g özüt)

Saponinler, yaygın olarak yüksek bitkilerde bulunurlar; devasa glukozit birimleri içerirler ve yüzey aktif özelliklere sahiptirler. Saponinlerin bu yüzey aktif özellikleri onları diğer glukozid içeren türlerden ayırmaktadır. Aynı zamanda bu bileşiklerin değişik farmakolojik özelliklere sahip oldukları rapor edilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada da taksonların çözücü özütlerinin toplam saponin bileşik içerikleri vanilin-sülfürik asit yöntemiyle belirlendi; quallija eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.15'te verildi.

S. annua subsp. annua var. annua taksonu etil asetat özütünün (429.94 mg QAEs/g özüt) en yüksek; *S. byzantina* taksonu su özütünün (146.60 mg QAEs/g özüt) ise en düşük toplam saponin bileşik miktarlarına sahip oldukları tespit edildi. Genel anlamda *S. annua subsp. annua var. annua* taksonu tüm özütlerinin diğer taksonlarından daha yüksek toplam saponin bileşik içeriğine sahip oldukları belirlendi.

Literatürde bu taksonların toplam saponin bileşik içeriklerinin belirlenmesine yönelik verilere rastlanmadığından burada elde edilen sonuçların literatür verileriyle karşılaştırılması yapılamamıştır.



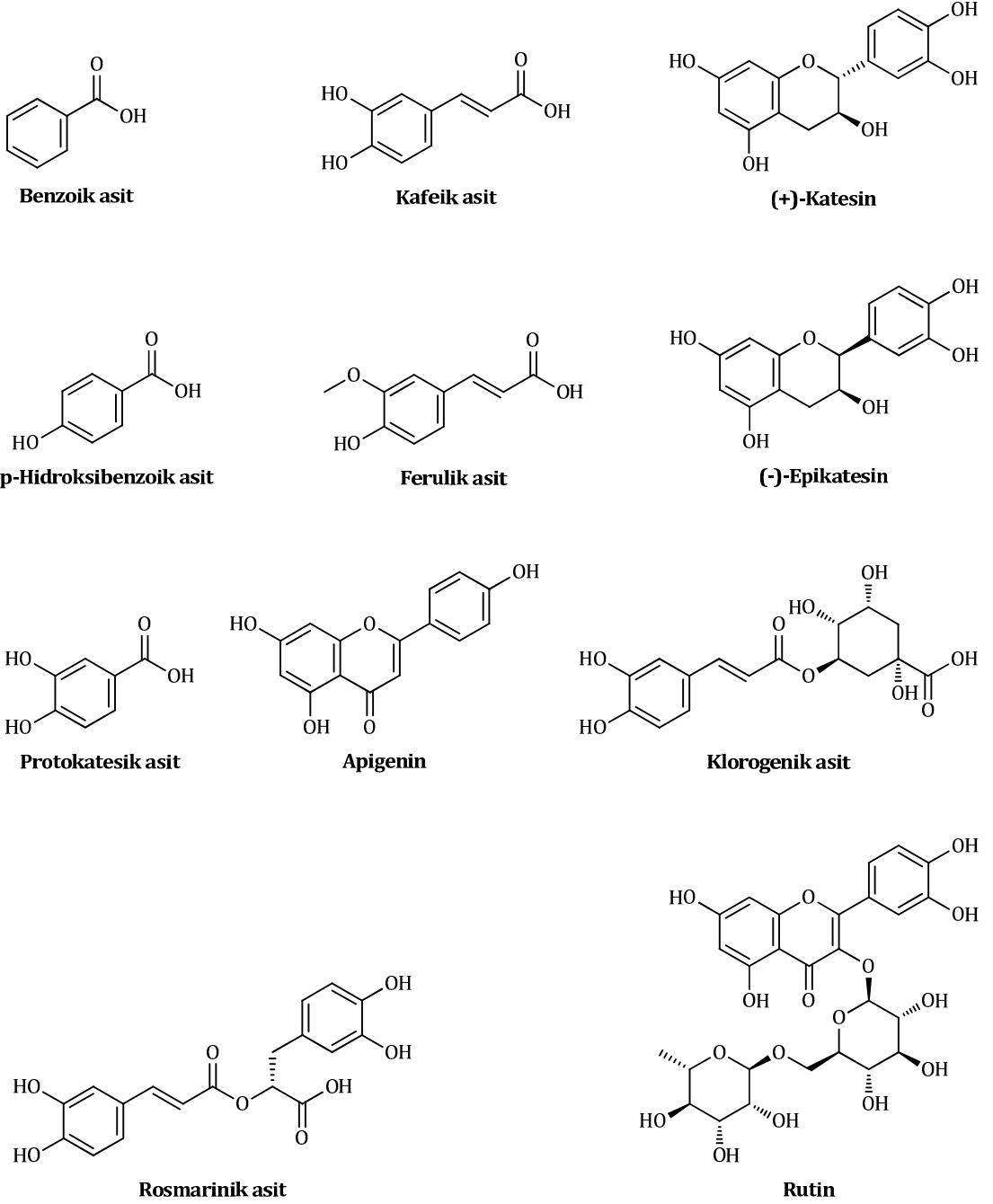
Şekil 4.15. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin toplam saponin bileşik miktarları (mg REs/g özüt)

4.2.6. Çözücü özütlerinin RP-HPLC ile fenolik içeriklerinin belirlenmesi

Her üç *Stachys* taksonu çözücü özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları spektroskopik olarak belirlenmişti. O test sisteminde sonuçlar standart fenolik olan gallik asite eşdeğer olarak verilmişti. Dolayısıyla özütlerdeki fenoliklerin hem türünü hem de miktarını belirlemek amacıyla üç *Stachys* taksonu çözücü özütlerinin fenolik bileşik miktarları RP-HPLC ile belirlendi. Özütler içerisinde Şekil 4.16'da kimyasal yapıları verilen toplam 11 standart fenolik bileşik tespit edildi ve analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verildi. Ayrıca çözücü özütlerinin ve standart fenoliklerin RP-HPLC kromatogramları EK-A, EK-B, EK-C ve EK-D'de verildi.

S. annua subsp. *annua* var. *annua*, *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonları metanol özütlerinin sırasıyla; 6.28, 11.93 ve 15.35 mg/g özüt olarak klorojenik asit bakımından zengin olduğu belirlendi. Ayrıca taksonların diğer tüm özütlerinin de yüksek miktarda klorojenik asite sahip olduğu tespit edildi. *S. byzantina* taksonunun tüm özütlerinde rosmarinik asit ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonunun tüm özütlerinde ise, benzoik

asit ve (-)-epikateşin fenolik bileşikleri tespit edilemedi. Genel olarak her üç taksonun etil asetat özütlerinde toplam 10 adet fenolik bileşik tespit edildi.



Şekil 4.16. *Stachys* taksonları çözücü özütlerindeki fenolik bileşiklerin yapıları

Çizelge 4.1. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin RP-HPLC ile fenolik bileşik içerikleri (mg/g özüt)*

Takson	Fenolik bileşik	Etil asetat	Metanol	Su
<i>S. annua</i>	Protokateşik asit	0.14 ± 0.003 ^a	0.15 ± 0.008 ^a	0.16 ± 0.004 ^a
subsp. <i>annua</i>	(+)-Kateşin	0.83 ± 0.060 ^a	0.13 ± 0.026 ^b	nd**
var. <i>annua</i>	<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	0.59 ± 0.020 ^a	0.31 ± 0.001 ^c	0.45 ± 0.027 ^b
	Klorojenik asit	0.54 ± 0.030 ^c	6.28 ± 0.153 ^a	1.70 ± 0.081 ^b
	Kafeik asit	0.18 ± 0.007 ^b	0.10 ± 0.005 ^c	0.59 ± 0.014 ^a
	(-)-Epikateşin	0.11 ± 0.007 ^a	nd	0.12 ± 0.009 ^a
	Ferulik asit	0.03 ± 0.001 ^b	nd	0.31 ± 0.009 ^a
	Benzoik asit	0.86 ± 0.020 ^b	6.12 ± 0.128 ^a	nd
	Rutin	0.06 ± 0.010	nd	nd
	Rosmarinik asit	0.30 ± 0.003 ^b	1.58 ± 0.077 ^a	nd
	Apigenin	nd	0.48 ± 0.026 ^a	0.24 ± 0.014 ^b
<i>S. byzantina</i>	Protokateşik asit	0.14 ± 0.003 ^b	0.24 ± 0.005 ^a	0.27 ± 0.023 ^a
	(+)-Kateşin	0.90 ± 0.060 ^a	0.59 ± 0.014 ^b	0.59 ± 0.011 ^b
	<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	0.27 ± 0.007 ^a	nd	0.13 ± 0.001 ^b
	Klorojenik asit	3.95 ± 0.070 ^b	11.93 ± 0.770 ^a	10.21 ± 0.605 ^a
	Kafeik asit	0.19 ± 0.007 ^a	0.15 ± 0.009 ^b	0.14 ± 0.007 ^b
	(-)-Epikateşin	0.07 ± 0.007 ^a	nd	nd
	Ferulik asit	0.15 ± 0.007 ^a	0.09 ± 0.009 ^b	0.12 ± 0.007 ^b
	Benzoik asit	nd	39.91 ± 0.676 ^a	nd
	Rutin	1.90 ± 0.040 ^b	2.42 ± 0.054 ^a	0.59 ± 0.011 ^c
	Rosmarinik asit	nd	nd	nd
	Apigenin	0.32 ± 0.010 ^a	nd	0.14 ± 0.011 ^b
<i>S. iberica</i>	Protokateşik asit	0.20 ± 0.004 ^b	0.26 ± 0.018 ^a	0.15 ± 0.003 ^c
subsp. <i>iberica</i>	(+)-Kateşin	3.10 ± 0.079 ^a	1.49 ± 0.052 ^b	0.22 ± 0.008 ^c
var.	<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	0.16 ± 0.007 ^a	nd	0.04 ± 0.001 ^b
<i>densipilosa</i>	Klorojenik asit	5.02 ± 0.071 ^c	15.35 ± 0.492 ^a	13.60 ± 0.429 ^b
	Kafeik asit	0.29 ± 0.007 ^a	0.09 ± 0.006 ^b	0.09 ± 0.005 ^b
	(-)-Epikateşin	nd	nd	nd
	Ferulik asit	0.09 ± 0.007 ^a	nd	nd
	Benzoik asit	nd	nd	nd
	Rutin	2.09 ± 0.042 ^a	1.88 ± 0.034 ^b	1.43 ± 0.030 ^c
	Rosmarinik asit	1.32 ± 0.078 ^b	1.66 ± 0.071 ^a	1.64 ± 0.054 ^a
	Apigenin	0.56 ± 0.010 ^a	0.19 ± 0.008 ^b	0.15 ± 0.008 ^c

*Her bir bitki için aynı satırdaki üstel farklı harfler, veriler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$)

** nd, tespit edilemedi

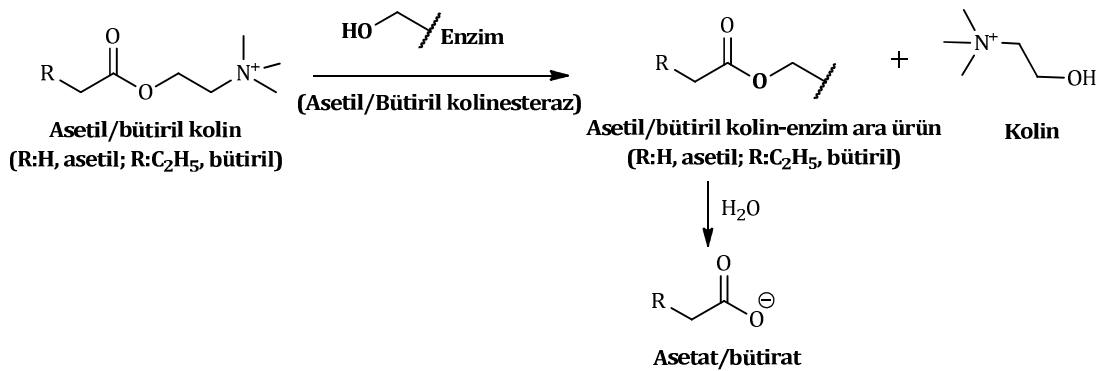
4.3. Çözücü Özütlerinin Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi

Geleneksel halk ilaçları, halkın çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlandığı ve nesilden nesile aktararak yıllar boyunca varlığını sürdüren ve aynı zamanda birçoğunu bitkisel olanların oluşturduğu doğal kökenli ilaçlar olarak bilinmektedirler. Dünyada birçok coğrafyada, halk tarafından kullanılan geleneksel halk ilaçları üzerindeki bilimsel çalışmalar modern ilaç araştırmaları için önemli ve yararlı bir kaynak oluşturmaktadır. İlaç geliştirmenin ve piyasaya arzının sağlanması, hem oldukça pahalı hem de çok uzun bir süreç gerektirdiği

düşünüldüğünde öncelikli olarak halk ilaçlarının değerlendirmeye alınmasının daha doğru bir bakış açısı olacaktır. Bu nedenle geneksel kullanıma sahip halk ilaçlarının güvenilirliklerinin ve etkinliklerinin bilimsel yöntemlerle kanıtlanması gerekmektedir. Buradan hareketle, *in vitro* aktivite çalışmaları yapılarak tedavide kullanım alanına sahip olası ilaç adaylarının belirlenmesine olanak sağlanmış olacaktır. Bu bağlamda çalışmanın bu kısmında, bazı hastalıkların oluşumunu tetikleyen kolinesteraz (Asetil ve bütiril), tirozinaz, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine üç *Stachys* taksonu özütlerinin inhibisyon etkileri araştırıldı.

4.3.1. Çözücü özütlerinin kolinesteraz enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi

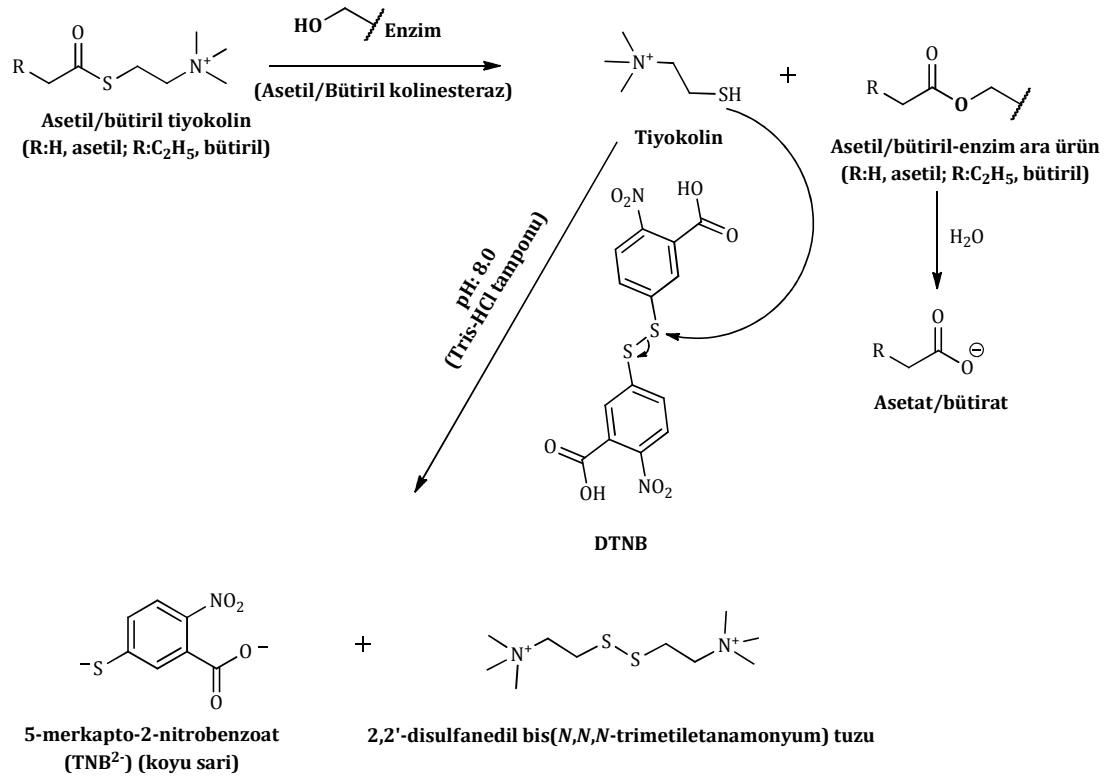
Alzhemier birçok insanı etkileyen demansın en yaygın formlarından biridir. Bu hastalığın nöropatolojik özellikleri yani nörofibriller yumak ve nörotik plakların yanı sıra nörokimyasal olarak ön beyindeki kolinerjik nöronlardaki nörotransmisyon kaybı ile karakterize edilmektedir. Asetilkolinesterazın temel rolü kolinerjik sinapslarda sinir impuls iletiminin son aşamasında asetilkolini hidrolize etmektir (Şekil 4.17). Dolayısıyla metabolizmada bu enzimin fazla çalışması Alzhemier hastalığını tetiklemektedir. Takrin, donepezil ve galantamin içerikli bazı sentetik ilaçlar Alzhemier hastalığında hafıza ve bilinç kaybının tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu bileşiklerin gastrointestinal bozuklukları ve problemleri içeren yan etkileri rapor edilmiş olup doğal kaynaklardan daha güvenli asetilkolinesteraz inhibitörlerinin bulunması gerekmektedir.



Şekil 4.17. Asetil/bütiril kolinesteraz metabolizması

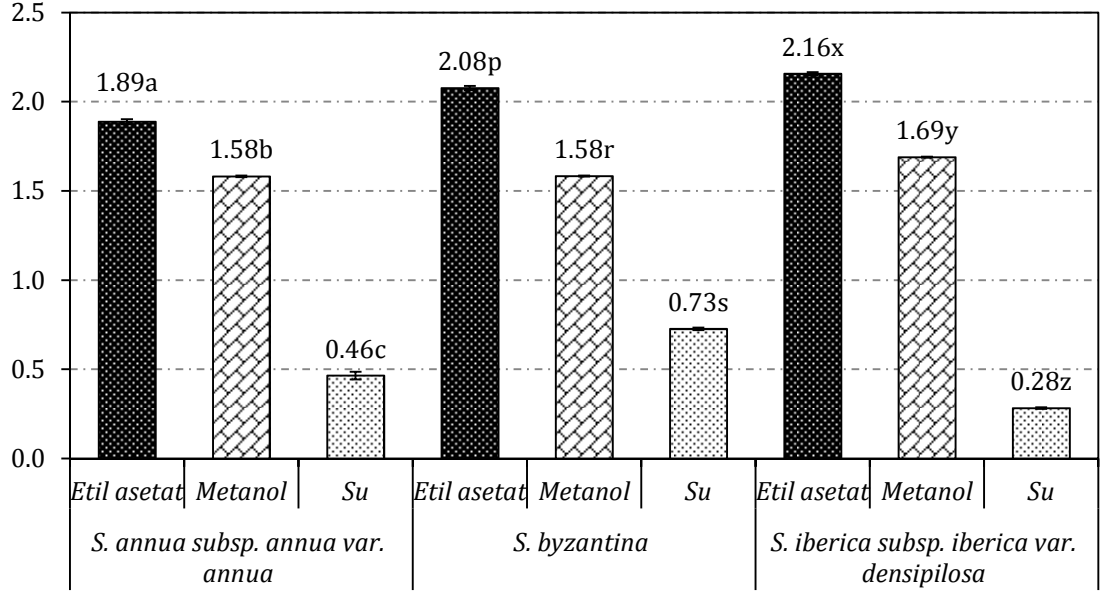
Bu çalışmada her üç *Stachys* taksonu çözücü özütlerinin hem asetil hem de bütiril kolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri Ellman yöntemiyle araştırıldı ve sonuçlar standart bir asetil/bütiril kolinesteraz inhibitör olan galantamin eşdeğer olarak hesaplandı.

Nötr ya da bazik ortamda asetil/bütiril tiyokolin substratının asetil/bütiril kolinesteraz enzimiyle hidrolizi sonucu oluşan tiyokolin molekülünün Ellman reaktifi içerisinde bulunan DNTB bileşiğindeki disülfid bağıyla yer değiştirmesi sonucu oluşan tiyonitrobenzoat (TNB^{2-}) anyonunun 405 nm'de spektroskopik olarak takip edilmesi bu yöntemin mantığını oluşturmaktadır (Şekil 4.18).



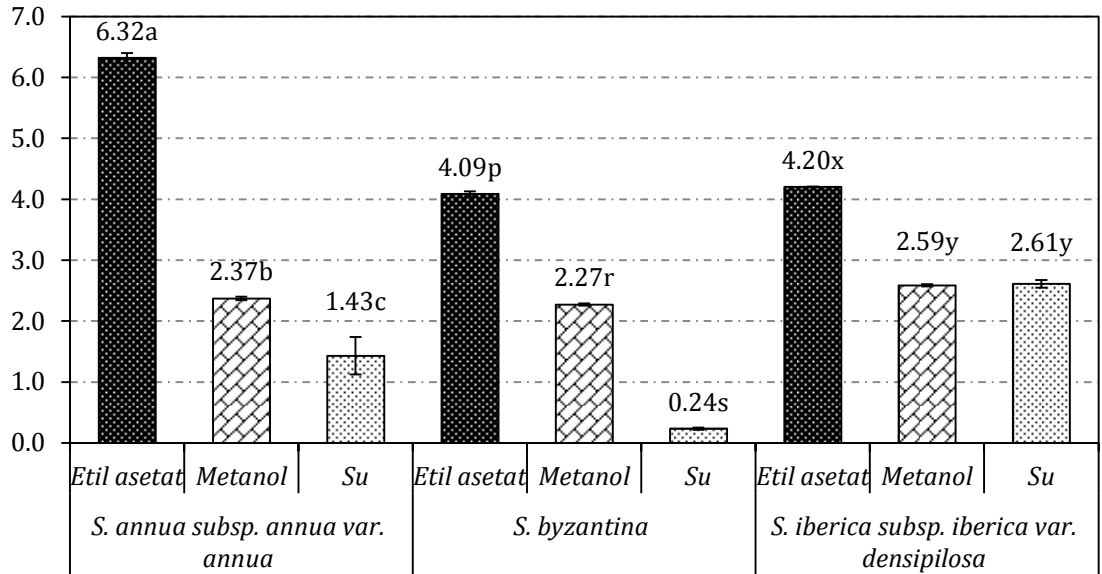
Şekil 4.18. Asetil/bütiril kolinesteraz enzim mekanizması

Her üç taksonun çözücü özütlerinin asetil kolinesteraz enzim inhibisyon aktivitelerinin benzer eğilimle etil asetat>metanol>su şeklinde değiştiği belirlendi ($p < 0.05$). Ayrıca tüm özütler arasında en yüksek inhibisyon aktivitenin *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* etil asetat özütüne (2.16 mg GALAEs/g özüt); en düşük aktivitenin ise, yine aynı taksonun su özütüne (0.28 mg GALAEs/g özüt) ait olduğu tespit edildi (Şekil 4. 19).



Şekil 4.19. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin asetil kolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri (mg GALAEs/g özüt)

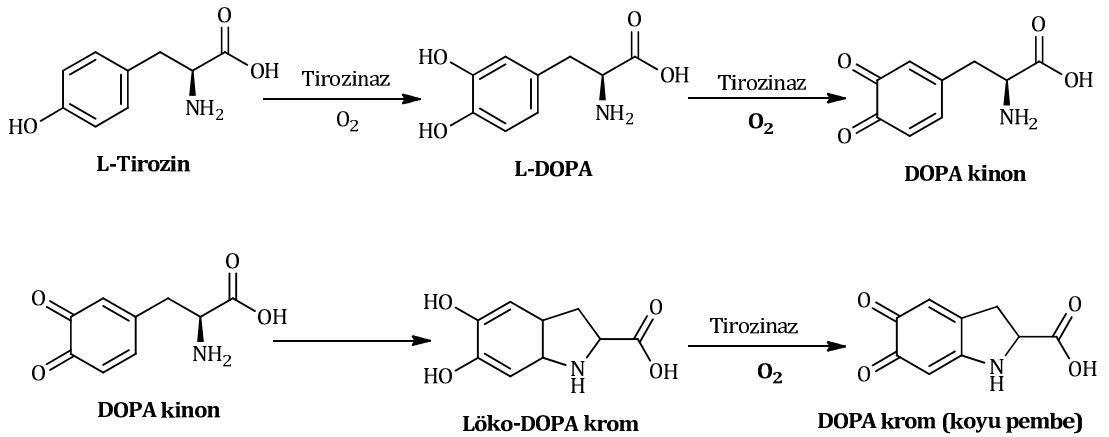
Bütiril kolinesteraz enzim inhibisyon testinde, yine asetil kolinesteraz inhibisyon testinde olduğu gibi özütler arasında aktivitenin yine etil asetat>metanol>su şeklinde değiştiği gözlemlendi. Bu test sisteminde *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* etil asetat özütünün (6.32 mg GALAEs/g özüt) en yüksek; *S. byzantina* su özütünün (0.24 mg GALAEs/g özüt) ise en düşük inhibisyon aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin bütiril kolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri (mg GALAEs/g özüt)

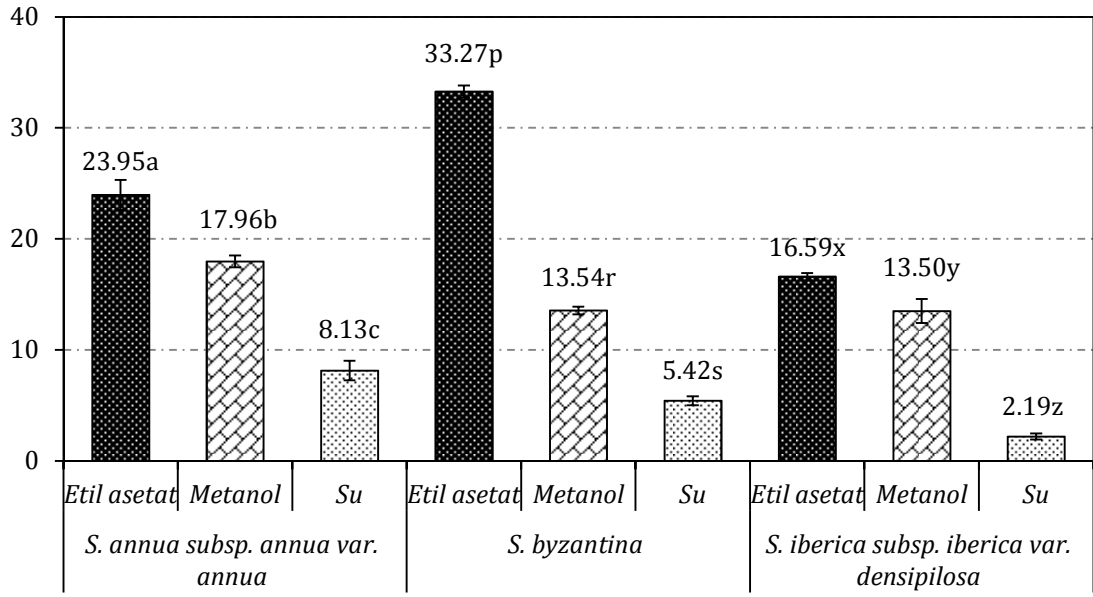
4.3.2. Çözücü özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi

Melanin sentezinde bakır merkezli anahtar bir enzim olan ve bu sayede cilt-deri rahatsızlıklarının önlenmesinde oldukça önemli olan tirozinaz enzimi aktif bölgesinde bakır iyonu bulunan bir metaloenzimdir. Yaşlılık lekeleri, melasma gibi çeşitli dermatolojik problemler epidermal pigmentasyonunun artışından kaynaklanmaktadır. Hidrokinon, kojik asit ve kortikosteroidler iyi bilinen tirozinaz inhibitörler arasındadır. Bu bileşiklerin dermatit, deri hasarı ve melanosit yıkımı gibi olumsuz tepkimelere yol açmaları nedeniyle bitkiler tarafından sentezlenen sentetik analoglarına alternatif yan etkileri olmayan tirozinaz inhibisyonuna etkili yeni bileşiklerin araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada taksonların çözücü özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon aktiviteleri DOPA-krom yöntemiyle araştırıldı. Bu yöntemde L-tirozin ya da L-DOPA substratlarının tirozinazla oksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin (DOPA kinon, DOPA krom gibi) 492 nm’de spektroskopik olarak takip edilmektedir (Şekil 4.21). *S. annua* subsp. *annua* var. *annua*, *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonları çözücü özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon sonuçları standart tirozinaz inhibitörü olan kojik asit eşdeğer (KAEs/g özüt) olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.22’de verildi.



Şekil 4.21. Tirozinaz enzim mekanizması

Şekil 4.22’de de görüleceği üzere, kolinesteraz enzim inhibisyonuna paralel olarak bu test sisteminde de özütlerin tirozinaz enzim inhibisyon aktivitelerinin etil asetat>metanol>su şeklinde azaldığı ve sonuçlar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu belirlendi ($p<0.05$). Etil asetat özütleri arasında *S. byzantina* taksonunun (33.27 mg KAEs/g özüt), metanol ve su özütleri arasında ise *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonunun (sırasıyla; 17.96 ve 8.13 mg KAEs/g özüt) daha yüksek tirozinaz inhibisyon aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.



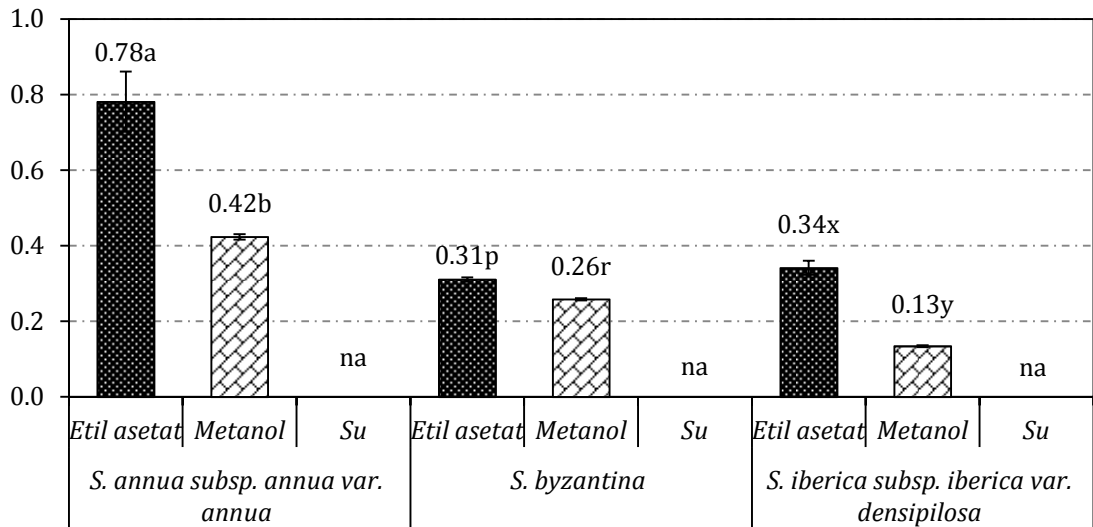
Şekil 4.22. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon aktiviteleri (mg KAEs/g özüt)

4.3.3. Çözücü özütlerinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi

Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen Diabetes Mellitus, günümüzde dünyanın karşı karşıya geldiği oldukça büyük tıbbi rahatsızlıklardan biridir. Bu yaygın metabolik hastalık yüksek plazma glukoz seviyesi ile karakterize edilmekte; diabetiknöropotik, retinopati ve kardiovasküler hastalıklar gibi büyük komplikasyonlara neden olmaktadır. Karbohidrat hidrolize eden enzimlerin inhibitörleri hipergliseminin kontrolünde oldukça faydalıdır ve bu amaçla akarboz ve vigliboz gibi etken maddelere sahip ilaçlar yaygın olarak α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörleri olarak kullanılmaktadırlar. Ancak bu

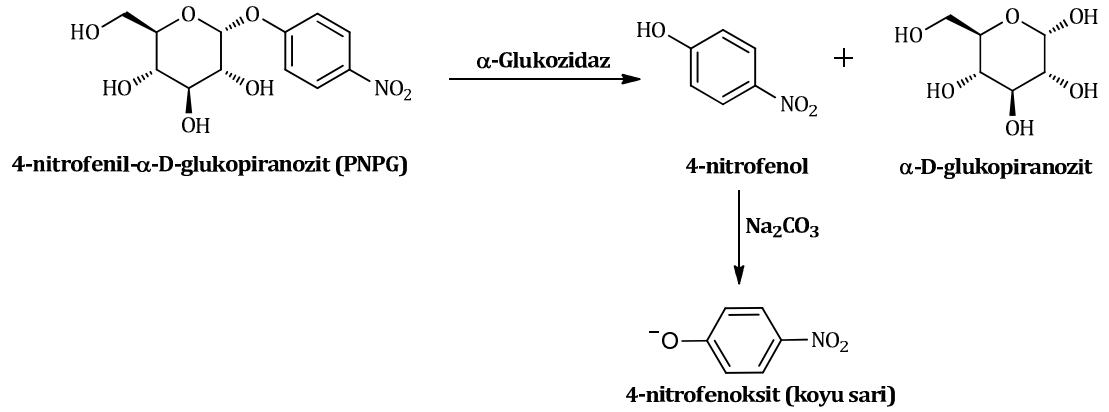
ilaçların şişkinlik, ishal ve gaz gibi yan etkilere sahip olmaları nedeniyle doğal kaynaklı yeni alternatif α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörlerin tespit edilmesi ihtiyacı duyulmaktadır. Bu çalışmada da *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon aktiviteleri araştırıldı. Sonuçlar standart α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibitörü olan akarboz eşdeğer (ACEs/g özüt) olarak hesaplandı.

α -Amilaz enzim inhibisyon testi, nişastanın enzimle glukoz birimlerine hidrolizlenme tepkimesinden oluşmaktadır. Özütler varlığında enzimin inhibisyonu ile tepkime ortamında kalan nişastanın, iyot/potasyum iyodür (I_2/KI) reaktifile renklendirilmesi sonucu oluşan kompleksin 630 nm'de spektroskopik olarak takip edilmesi bu test sisteminin mantığını oluşturmaktadır. Şekil 4.23'te görüldüğü gibi, her üç taksonun etil asetat ve metanol özütlerinin α -amilaz üzerinde bir inhibisyon aktiviteye sahip olduğu ancak su özütlerinin ise herhangi bir inhibisyon etki göstermediği belirlendi. Etil asetat ve metanol özütleri arasında özellikle *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* (sırasıyla; 0.78 ve 0.42 mmol ACEs/g özüt) taksonunun diğer taksonlara nazaran oldukça yüksek inhibisyon aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Her üç takson için etil asetat özütlerinin α -amilaz enzimi üzerinde daha güçlü bir inhibisyon etki gösterdiği görüldü.



Şekil 4.23. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin α -amilaz enzim inhibisyon aktiviteleri (mmol ACEs/g özüt)

Taksonların çözücü özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri, PNPG (4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit) molekülünün substrat olarak kullanıldığı ve bazik ortamda substratın enzimle hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenoksit tuzunun 400 nm’de spektroskopik olarak takip edilmesiyle analiz edildi (Şekil 4.24).

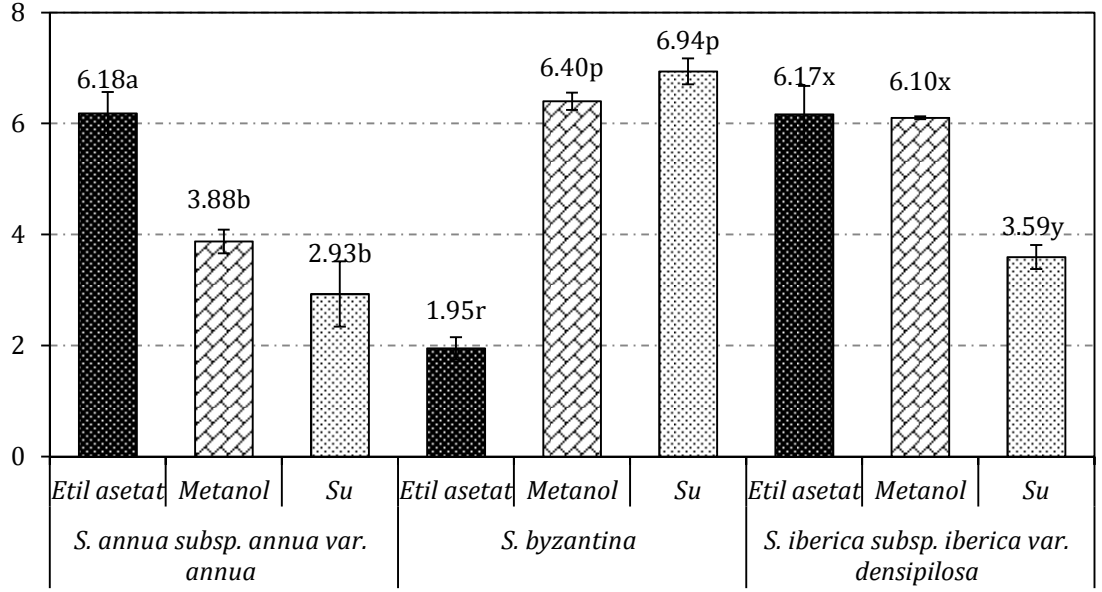


Şekil 4.24. α -Glukozidaz enzim mekanizması

Çözücü özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri akarboz eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.25’te verildi. *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksunu metanol ve su özütlerinin (Sırasıyla; 3.88 ve 2.93 mmol ACEs/g özüt), *S. byzantina* taksonunun metanol ve su özütlerinin (Sırasıyla; 6.40 ve 6.94 mmol ACEs/g özüt) ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonunun etil asetat ve metanol özütlerinin (Sırasıyla; 6.17 ve 6.10 mmol ACEs/g özüt) α -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$).

S. annua subsp. *annua* var. *annua* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonlarının etil asetat özütlerinin (sırasıyla; 6.18 ve 6.17 mmol ACEs/g özüt) α -glukozidaz enzim inhibisyon aktivitelerinin *S. byzantina* taksonu etil asetat özütününkinin (1.95 mmol ACEs/g özüt) yaklaşık 3 katı olduğu belirlendi.

Literatürde bu taksonlara ait ve bu çalışmada araştırılan enzimlerin inhibisyonuna yönelik herhangi bir veriye rastlanamadığından analiz sonuçlarının literatür verileriyle karşılaştırılması yapılamamıştır.



Şekil 4.25. *Stachys* taksonları çözücü özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri (mmol ACEs/g özüt)

4.4. Çözücü Özütlerinin Pearson Korelasyon Katsayılarının Belirlenmesi

Çözücü özütlerindeki toplam biyoaktif bileşiklerin (toplam fenolik, flavonoit ve saponin) hem antioksidan aktivite hem de enzim inhibisyon aktivite testleri üzerindeki etkilerini daha anlamlı bir şekilde açıklamak için her üç taksonun çözücü özütlerinin Pearson korelasyon analizleri de yapıldı (Çizelge 4.2).

S. annua subsp. annua var. annua taksonu çözücü özütlerinin toplam antioksidan ve enzim inhibisyon aktivite üzerinde toplam saponin içeriklerinin etkili olduğu tespit edildi. Çünkü toplam saponin-karoten (R: 0.999), toplam saponin-molibdat (R: 0.911), toplam saponin-asetil kolinesteraz (R: 0.996), toplam saponin-bütiril kolinesteraz (R: 0.841), toplam saponin-tirozinaz (R: 0.996), toplam saponin- α -amilaz (R: 0.983) ve toplam saponin- α -glukozidaz (R: 0.893) testleri arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi. Radikal süpürüm ve indirgeme gücü testlerinde ise toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarlarının etkili olduğu ($R \geq 0.388$) belirlendi. Ayrıca yapılan Pearson korelasyon analizi, HPLC ile belirlenen klorojenik asitin de bu testler üzerinde güçlü bir korelasyona sahip olduğunu gösterdi ($R \geq 0.770$).

Benzer bir durum *S. byzantina* taksonu çözücü özütlerinde görüldü. Pearson korelasyon analizi, karoten-toplam saponin (R: 0.973), toplam saponin-asetil kolinesteraz (R: 0.858), toplam saponin-bütiril kolinesteraz (R: 0.790), toplam saponin-tirozinaz (R: 0.599) ve toplam saponin- α -amilaz (R: 0.947) testleri arasında pozitif bir korelasyon; toplam saponin- α -glukozidaz (R: -0.437) testleri arasında ise, negatif orta dereceli bir korelasyon bulunduğunu gösterdi. Bununla birlikte diğer bütün testler üzerinde toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarlarının etkili olduğu belirlendi ($R \geq 0.560$). Fenolik bileşiklerden olan klorojenik asit ile yine bu testler arasında oldukça yüksek bir korelasyon tespit edildi ($R \geq 0.782$).

S. iberica subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonu çözücü özütlerinin bütiril kolinesteraz testi hariç diğer bütün enzim inhibisyon aktivite testleri üzerinde toplam saponin içeriklerinin baskın olduğu belirlendi ($R \geq 0.631$). Bununla birlikte yine toplam saponin ile ABTS katyon radikal süpürüm testleri arasında da pozitif güçlü bir korelasyon görüldü (R: 0.911). Ayrıca Pearson analiz sonuçları, toplam fenolik-CUPRAC (R: 0.813) ve toplam fenolik-FRAP (R: 0.998) testleri arasında pozitif ve güçlü; toplam fenolik-DPPH radikal süpürüm (R: 0.422) testleri arasında ise pozitif ama orta dereceli bir ilişki olduğunu gösterdi. Diğer iki takson çözücü özütlerinin aksine bu taksona ait özütler içerisinde tespit edilen klorojenik asitin ise DPPH radikal süpürüm (R: 0.801) testi hariç diğer testler üzerinde etkili olmadığı belirlendi.

Neticede, her üç *Stachys* taksonu çözücü özütleri için toplam saponin bileşik içeriklerinin enzim inhibisyon aktivite testleri üzerinde; toplam flavonoit ve fenolik bileşik miktarlarının ise antioksidan aktivite testleri üzerinde etkili olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* ve *S. byzantina* çözücü özütlerinde tespit edilen klorojenik asitin bu testlerin antioksidan aktiviteleri üzerinde etkili olduğu ancak aynı bileşiğin *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonu özütlerinin aktiviteleri üzerinde yeterince etkili olmadığı söylenebilir.

Çizelge 4.2. *Stachys* taksonları çözücü özütleri için toplam biyoaktif bileşikler ile antioksidan ve enzim inhibisyon aktivite testleri arasındaki korelasyon katsayıları (R) ^a

Taksonlar	Toplam antioksidan		İndirgeme gücü		Radikal süpürüm		Metal Şelatlama	Enzim inhibisyon aktivite				
	Karoten	Molibdat	CUPRAC	FRAP	DPPH	ABTS		Asetil	Butiril	Trozinaz	Amilaz	Glukozidaz
<i>S. annua</i> subsp. <i>annua</i> var. <i>annua</i>												
Toplam saponin	0.999*	0.911	0.436	-0.607	-0.457	0.262	0.266	0.996	0.841	0.996	0.983	0.893
Toplam flavonoit	0.075	0.517	0.945	0.717	0.829	0.989	-0.926	0.205	-0.438	0.028	-0.063	-0.341
Toplam fenolik	-0.693	-0.292	0.388	0.998*	0.970	0.552	-0.900	-0.592	-0.962	-0.726	-0.785	-0.928
Klorojenik asit	-0.006	0.447	0.916	0.770	0.871	0.975	-0.953	0.125	-0.509	-0.053	-0.143	-0.415
<i>Stachys byzantina</i>												
Toplam saponin	0.973	-0.012	-0.263	-0.429	-0.732	-0.205	-0.356	0.858	0.790	0.599	0.947	-0.437
Toplam flavonoit	0.295	0.855	0.697	0.560	0.215	0.739	0.624	-0.005	-0.126	-0.385	0.205	0.552
Toplam fenolik	-0.677	0.879	0.971	0.998*	0.952	0.955	0.990	-0.866	-0.920	-0.991	-0.742	0.998*
Klorojenik asit	-0.373	0.991	0.993	0.957	0.782	0.998*	0.977	-0.634	-0.723	-0.880	-0.457	0.954
<i>S. iberica</i> subsp. <i>iberica</i> var. <i>densipilosa</i>												
Toplam saponin	0.242	0.048	-0.581	-0.965	-0.693	0.911	-0.528	0.886	0.266	0.902	0.631	0.966
Toplam flavonoit	0.032	-0.163	-0.739	-0.999*	-0.525	0.804	-0.337	0.768	0.057	0.791	0.454	0.889
Toplam fenolik	0.086	0.278	0.813	0.998*	0.422	-0.729	0.224	-0.688	0.060	-0.714	-0.346	-0.830
Klorojenik asit	-0.993	-0.997*	-0.736	-0.140	0.801	-0.521	0.908	-0.570	-0.989	-0.539	-0.847	-0.377

^a Sunulan veriler Pearson korelasyon katsayısını (R) vermektedir

*Testler arasındaki anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ülkemizin farklı lokalitelerinde doğal olarak yetişen üç farklı *Stachys* taksonunun toprak üstü kısımlarının öncelikli olarak etil asetat, metanol ve su çözücü özütleri hazırlandı. Daha sonra tüm özütlerin farklı test sistemlerini içeren in vitro antioksidan aktivite belirlendi. Ayrıca yine tüm özütlerin farklı hastalıkların oluşmasını tetikleyen bazı enzimler üzerine inhibisyon çalışmaları yapıldı. Daha sonra ise, tüm özütlerdeki toplam fenolik, flavonoid ve saponin bileşik miktarları spektroskopik olarak tespit edildi. Bununla birlikte özütler içerisindeki fenolik bileşiklerin türü ve miktarları RP-HPLC ile analiz edildi.

Antioksidan aktivite analizleri bakımından taksonlar arasında özellikle *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonlarının *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* taksonu özütlerine oranla toplam antioksidan aktivite ve şeşletme kapasite testleri hariç daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlendi. Özütler arasında ise metanol ve su özütlerinin etil asetat özütlerine oranla daha yüksek aktivite sergiledikleri tespit edildi. Bu durum Şekil 4.13'te de görüleceği üzere, metanol ve su özütlerinin etil asetat özütlerine nispeten daha yüksek toplam fenolik bileşik miktarına sahip olmalarıyla açıklanabilir. Ayrıca çözücü özütlerindeki radikal süpürücü türlerin DPPH radikalinden ziyade ABTS katyon radikaline karşı daha duyarlı oldukları görüldü (Şekil 4.5 ve 4.7). Aynı zamanda özütlerdeki indirgenlerin Fe(III) iyonlarına nazaran Cu(II) iyonlarına daha duyarlı olduğu belirlendi (Şekil 4.11). Yapılan HPLC analizleri sonucunda özütlerin klorojenik asit bakımından zengin olduğu hatta metanol ve su özütlerindeki klorojenik asit miktarının etil asetat özütlerine nispeten daha yüksek olduğu tespit edildi. Şekil 4.16'da da görüleceği üzere, klorojenik asit pirokatekol yapısında fenolik bir halka içermektedir. Bu pirokatekol halkasının antioksidan aktivite üzerinde olumlu katkı sağladığı literatürde bilinmektedir. Dolayısıyla özellikle metanol ve su özütlerinin etil asetat özütlerine kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaları bu özütlerin daha yüksek klorojenik asit içermeleriyle açıklanabilir.

Bununla birlikte, *S. annua* subsp. *annua* var. *annua*, *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonları için bu tez çalışmasında yapılan analizler bu taksonlara ait ilk veriler olma niteliğindedir.

Sonuçta, özellikle *S. byzantina* ve *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* taksonları metanol ve su özütlerinin bu çalışmada kullanılan enzimlerin tetiklediği hastalıkların tedavisine ve antioksidan aktivite sonuçları bakımından da gıda endüstrisinde oksidatif sürecin yönetilmesine yönelik alternatif doğal ürün olarak değerlendirilebileceği söylenebilir. Ancak bu özütlerin toksik etkilerinin araştırılması ve ayrıca benzer aktiviteleri *in vivo* sistemlerde de sergileyip sergilemediklerinin araştırılması ve elde edilen sonuçların bu tez çalışmasında elde edilen bulgularla birlikte değerlendirilerek nihayi bir kanaata varılması daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R., Moss, M.O., 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 252-302.
- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry Production and Applications. Third, Completely Revised Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA. Germany, 99-262p.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S., Duran, A., 2013. Antioxidant Potentials and Anticholinesterase Activities of Methanolic and Aqueous Extracts of Three Endemic *Centaurea* L. Species. Food and Chemical Toxicology, 55, 290-296.
- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., 2006. alpha-Amylase Inhibitory Activity of Some Malaysian Plants Used to Treat Diabetes; with Particular Reference to *Phyllanthus amarus*. Journal of Ethnopharmacology, 11, 449-455.
- Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J., Yaqoob, M.M., 2003. Acute Solvent Exposure Induced Activation of Cytochrome P4502E1 Causes Proximal Tubular Cell Necrosis by Oxidative Stress. Toxicology in Vitro, 17 (3), 335-341.
- Altınışik, M., 2000. 'Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın.
- Altug, M., 2009. Sağlıklı Erişkinlerde Fiziksel Aktivitenin Eritrosit ve Plazmadaki Oksidan/ Antioksidan Parametreler Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi Ve Yüksek Antioksidan Özelliği Olduğu Bilinen Nar Suyunun Bu Parametreler Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, 50s Ankara.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., Ercag, E., 2006. The Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity and Polyphenolic Content of Some Herbal Teas. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 57, 292-304.
- Baser, K.H.C., 1994. Essential Oils of Labiatae From Turkey: Recent Results. Lamiales Newsletter, 3, 6-11.
- Bayın, N., 2014. *Phlomis nissolii* L.'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 61s, Ankara.
- Baykal, T., 1997. Doğal Kaynaklı Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Yönünden Değerlendirilmesi ve Tedavideki Yeri. GE, 46, 21-22.

- Baytop, T., 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No:3225.
- Baytop, T., 1991. Farmasotik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, No: 3687.
- Benzie, I.E.F., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as A Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (33), 20313-20316.
- Bhattacharjee, R., 1980. Taxonomic Studies in *Stachys* II, A New Infrageneric Classification on *Stachys* L. Notes From the Royal Botanic Garden. *Edinburg*, 38 (65)- 96.
- Bhattacharjee, R., 1982. *Stachys* L. Davis, P.H. (ed.), *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburgh University Pres. Edinburgh. 19, 7 (199)-262.
- Bilušić Vundac’, V., Brantner, A.H., Plazibat, M., 2007. Content of Polyphenolic Constituents and Antioxidant Activity of Some *Stachys taxa*. *Food Chemistry*, 104, 1277–1281.
- Birch-Machin, M.A., Russell, E.V., Latimer, J.A., 2013. Mitochondrial DNA Damage As a Biomarker for Ultraviolet Radiation Exposure and Oxidative Stress. *British Journal of Dermatology*, 169 (s2), 9-14.
- Brass, N., Rácz, A., Heckel, D., Remberger, K., Sybrecht, G.W., Meese E.U., 1997. Amplification of the Genes BChE and SLC2A2 in 40% of Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Cancer Research*, 57, 2290-2294.
- Brenner, G.M., Stevens, C.W., 2006. *Pharmacology*, Saunders, Philadelphia, PA.
- Cao, G., Prior, R.L., 1999. The Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples, *Methods in Enzymology*, 299, 50- 62.
- Carmona-Gutierrez, D., Alavian-Ghavanini, A., Habernig, L., Bauer, M., Hammer, A., Rossmann, C., Madeo, F., 2013. The Cell Death Protease Kex1p is Essential for Hypochlorite-Induced Apoptosis in Yeast. *Cell Cycle*, 12 (11), 1704-1712.
- Carr, A., Frei, B., 1999. Toward a New Recommended Dietary Allowance for Vitamin C Based on Antioxidant and Health Effects in Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1086-1107.
- Cemeroglu, B., Yemenicioglu, A., Özkan, M., 2001. Meyve ve Sebzelerin Bilesimi Cilt No:24, Gıda Teknolojisi Yayınları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 138.

- Ceylan, R., 2015. Türkiye Endemiği *Lathyrus Czezzottianus* (Fabaceae)'Un Antioksidan Kapasitesi Ve Bazı Farmasötik Enzimler Üzerine İnhibitör Etkilerinin İncelenmesi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 61s, Konya.
- Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadail, A.R., Joshi, V., 2013. Nitric Oxide and Cancer: A Review. World Journal of Surgical Oncology, 11, 118.
- Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N. A., Piozzi, F., 2009. Comparative Chemical Composition, Free Radical-Scavenging and Cytotoxic Properties of Essential Oils of Six *Stachys Species* From Different Regions of the Mediterranean Area. Food Chemistry, 116 (4), 898-905.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C., 2003. Screening of Some Greek Aromatic Plants for Antioxidant Activity. Phytotherapy Research, 17 (2), 194-195.
- Çetinkaya, A., 2013. Antioksidanların Reaktif Oksijen Türleri Tüketimiyle Cuprac Antioksidan Kapasitesi Arasındaki İlişki İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 55s, İstanbul.
- Çokuğraş, A.N., 2003. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. Turkish Journal of Biochemistry, 28, 54-61.
- Çörtenlioğlu, E., 2006. Tirozinaz Enzimi Kullanılarak L – Dopa Üretimi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 50s, Ankara.
- Das, S.K., Vasudevan, D.M., 2007. Alcohol-Induced Oxidative Stress, Life Sciences, 81 (3), 177-187.
- Davies, K.J., 1995. Oxidative Stress: The Paradox of Aerobic Life. In: Biochemical Society Symposia, Portland Press-London.
- Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey and The East Aegaen Islands, 7, Edinburg University Press.
- Davis, P.H., 1988. Flora of Turkey and The East Aegaen Islands, 10, Edinburg University Press.
- Dekkers, J., Vandoornen, L.J., Kemper, H.C., 1996. The Role of Antioxi-Dant Vitamins and Enzymes in the Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. Sports Medicine, 21, 213-238.
- Delazar, A., Celik, S., Göktürk, R.S., Unal, O., Nahar, L., Sarker, S.D., 2005. Two Acylated Flavonoid Glycosides from *Stachys Bombycina*, and Their Free Radical Scavenging Activity. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 60 (11), 878-880.

- Demain, A.L., Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman&Company, San Francisco.
- Demirtas, I., Gecibesler, I.H., Yaglioglu, A.S., 2013. Antiproliferative Activities of Isolated Flavone Glycosides and Fatty Acids from *Stachys byzantina*. *Phytochemistry Letters*, 6 (2), 209-214.
- Digrak, M., Alma, M.H., İlçim, A., 2001. Antibacterial and, Antifungal Activities of Turkish Medicinal Plants, *Pharmaceutical Biology*, 39 (5), 346-350.
- Doctor, B.P., Saxena, A., 2005. Bioscavengers for the Protection of Human Against Organophosphate Toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158, 167-171.
- Dülger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M., Ugurlu, E., 1999. *Artemisia absinthium* L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turkish Journal of Biology*, 23 (3) 377-384.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961, A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Erdemoglu, N., Turan, N. N., Cakoco, I., Sener, B., Aydon, A., 2006. Antioxidant Activities of Some Lamiaceae Plant Extracts. *Phytotherapy research*, 20 (1), 9-13.
- Fadıloğlu, S., Erkmén, O., 1999. Lipase Production by *Rhizopus Oryzae* Growing on Different Carbon and Nitrogen Sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1936-1938.
- Fakılı, O., 2010. Türkiye’de Kekik Adı ile Anılan Bitkiler Konusunda Yapılan Çalışmaların Envanteri, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 435s, Adana.
- Fang, Y., 2002. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Geçibesler, H.İ., 2009. *Stachys byzantina* C. Koch. (Dağ Çayı) Bitki Ekstresinin Antikanserijen ve İnsektisit Aktivitelerinin İncelenmesi ve Aktif Bileşenlerin İzolasyonu Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 115s, Tokat.
- Glazer, A. N., Nikaido, H., 1995. *Microbial Insecticides*. *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*, WH Freeman and Company, New York, 209-229.
- Godfrey, T., West, S., 1996. *Introduction to Industrial Enzymology*. *Industrial Enzymology (Second Edition)*. Ed. by T. Godfrey and S. West. Stockton Press, New York.

- Goren, A.C., Piozzi, F., Akcicek, E., Kılıç, T., Çarıkçı, S., Mozioglu, E., Setzer, W.N., 2011. Essential Oil Composition of Twenty-two *Stachys* Species (Mountain Tea) and their Biological Activities. *Phytochemistry Letters*, 4(4), 448-453.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant Activity of Food Constituents, an Overview, *Archives of Toxicology*, 86 (3), 345-391.
- Hajdari, A., Novak, J., Mustafa, B., Franz, C., 2012. Essential Oil Composition and Antioxidant Activity of *Stachys sylvatica* L. (Lamiaceae) from Different Wild Populations in Kosovo. *Natural product research*, 26 (18), 1676-1681.
- Haliskaranfil, S., 2012. Termoalkalifilik Amilaz ve Selüloz Enzim (multienzim) Üreticisi *Bacillus* sp. İzolasyonu, Enzimlerin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 180s, Adana.
- Halliwell, B., 1995. How to Characterize an Antioxidant: an Update. In, *Biochemical Society Symposium*, 61, 73-101.
- Hamdan, I.I., Afifi, F.U., 2004. Studies on the in vitro and in vivo Hypoglycemic Activities of some Medicinal Plants Used in Treatment Of Diabetes in Jordanian Traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), 117-121.
- Ho, H.Y., Cheng, M.L., Chiu, D.T.Y., 2007. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase—from Oxidative Stress to Cellular Functions and Degenerative Diseases, *Redox Report*, 12 (3), 109-118.
- İlisulu, K., 1992. İlaç ve Baharat Bitkileri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1256, 1-6s, Ankara, Türkiye.
- Jenkins, R., 2000. Exercise and Oxidative Stress Methodology: a Critique. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72 (2-Supplement), 670-674.
- Jassbi, A.R., Miri, R., Asadollahi, M., Javanmardi, N., Firuzi, O., 2014. Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Nine Species of Woundwort (*Stachys*) Plants. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 62-67.
- John, F.K., 1987. *Enzyme Technology* (H.J. Rehm., G. Reed, editors). *Biotechnology*, 7A, 37-62.
- Karuncula, C., 2013. *Leucojum aestivum* L. Bitkisinden Alkaloidlerin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz İnhibisyon Aktivitelerinin (Anti-Alzheimer) İncelenmesi Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 107s, Edirne.

- Kaya, A., Demirci, B., Baser, K.H.C., 2001. The Composition of the Essential Oil of *Stachys iberica* subsp. *stenostachya* Growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 37(4), 326-328.
- Keleştemur, G.T., Özdemir, Y., 2011. Balıklarda Antioksidan Savunma ve Oksidatif Stres, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4 (1), 69-73.
- Kent, M. 2000. *Advanced Biology*. Oxford University Press.
- Khanavi, M., Hadjiakhoondi, A., Amin, G., Amanzadeh, Y., Rustaiyan, A., Shafiee, A., 2004. Comparison of the Volatile Composition of *Stachys persica* Gmel. and *Stachys byzantina* C. Koch. Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59 (7-8), 463-467.
- Kim, Y.M., Jeong, Y.K., Wang, M.H., Lee, W.Y., Rhee, H.I., 2005. Inhibitory Effect of Pine Extract on alpha-Glucosidase Activity and Postprandial Hyperglycemia. *Nutrition*, 21(6), 756-61.
- Kotsos, M., Aligiannis, N., Mitaku, S., Skaltsounis, A.L., Charvala, C., 2001. Chemistry of Plants from Crete: Stachyspinoside, A New Flavonoid Glycoside and Iridoids from *Stachys spinosa*, *Natural Product Letters*, 15, (6), 377-386.
- Krenitsky, T., Spector, T., Hall, WW., 1986. Xanthine Oxidase from Human Liver: Purification and Characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247, 108-119.
- Kujala, T.S., Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuroela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., 1999. Antioxidant Activity of Plants Extracts Containing Phenolic Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kukić, J., Petrović, S., Niketić, M., 2006. Antioxidant Activity of four Endemic *Stachys taxa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (4), 725-729.
- Lapidot-Lifson, Y., Prody, C., Ginzberg, D., Meytes, D., Zakut, H., Soreq, H., 1989. Coamplification of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Genes in Blood Cells: Correlation With Various Leukemias and Abnormal Megakaryocytopoiesis. *Proceedings in National Academy of Science USA*, 86, 4715-4719.
- Leblebici, S., 2011. Kütahya ve Eskişehir’de Yayılış Gösteren Endemik *Stachys* sp. Türleri Üzerinde Anatomik ve Ekolojik İncelemeler Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 97s, Kütahya.
- Lee, B.H., 1996. *Fundamentals of Biotechnology*, VCH Publishers, USA, 431 p.
- Lerner, K.L., Lerner, B.W., 2003. *World of Microbiology and Immunology*. The Gale Group, Inc, USA

- Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K., MacNee, W., 1996. Free Radical Activity and Pro-Inflammatory Effects of Particulate Air Pollution (PM10) in Vivo and in Vitro, *Thorax*, 51 (12), 1216-1222.
- Maleki, N., Garjani, A., Nazemiyeh, H., Nilfouroushan, N., Sadat, A.T.E., Allameh, Z., Hasannia, N., 2001. Potent Anti-inflammatory Activities of Hydroalcoholic Extract from Aerial Parts of *Stachys inflata* on Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 75, (2-3), 213-218.
- Massoulie, J., Pezzement, S., Bon, S., Krejci, E., 1993. Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41 (1), 31-91.
- Mccord, J., 2000. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *American Journal of Medicine*, 108, 652-659.
- Mccord, J., Halliwell, B., 1993. Human Disease; The Oxidant-Antioxidants Balance. *Clinical Biochemistry*, 26, 351-357
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Milne, G.L., Yin, H., Hardy, K.D., Davies, S.S., Roberts, L.J., 2011. Isoprostane Generation and Function, *Chemical Reviews*, 111 (10), 5973-5996.
- Morgaris, N., Koedam, A., Vokou, D., 1982. *Aromatic Plants* Martinus Nijhoff Publisher 7, 265-269, London.
- Muntenau, A., Zingg, J.M., Azzi, A., 2004. Anti-Atherosclerotic Effects of Vitamin E, Myth or Reality. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8, 59-76.
- Nelson, J.M., Dawson, C.R., 1944. Tyrosinase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 4, 99-152.
- Newman, D.J., Gragg, G.M., Snader, K.M., 2008. The Influence of Natural Products upon Drug Discovery, *Natural Product Reports*, 17, 215- 234.
- Nishimura, H., Sasaki, H., Inagaki, N., Chin, M., Mitsunashi, H., 1991. Nine Phenethyl Glycosides from *Stachys sieboldii*, *Phytochemistry*, 30 (3), 965-969.
- Okafor N., 2007. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Department of Biological Sciences Clemson University, South Carolina, 22, 398-406.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçaliskan, I., Sakiroğlu, H., 1995. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. *Journal of Food Science*, 60 (3), 494 – 496.
- Orhan, D.D., Senol, F.S., Hosbas, S., Orhan, I.E., 2014, Assessment of Cholinesterase and Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Properties of

- Viscum album* L. Samples Collected from Different Host Plants and its Two Principal Substances. *Industrial Crops and Products*, 62, 341-349.
- Özçelik, D., 2005. Mantardan (*Agaricus bisporus*) Tirozinaz Enziminin İzole Edilmesi Ve Fenol Giderilmesinde Kullanılması Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65s, Ankara.
- Özturan Özer, E., 2012. Alzheimer Hastalığında Oluşan B-Amiloid Fibrillerin Yeni Sentezlenen Kolinesteraz İnhibitörleri İle Destabilizasyonu. Hacettepe Üniversitesi.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011. The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (4), 652-664.
- Palanisamy, U.D., Ling, L.T., Manaharan, T., Appleton, D., 2011, Rapid Isolation of Geraniin from *Nephelium lappaceum* Rind Waste and its Anti-hyperglycemic Activity. *Food Chemistry*, 127 (1), 21-27.
- Park, T.G., Hoffmann, A.S., 1993. Thermal Cycling Effects on the Bioreactor Performances of Immobilized β -Galactosidase in Temperature Sensitive Hydrogel Beads, *Enzyme Microbial Technology*, 15 (476-556).
- Paternostro, M.P., Maggio, A.M., Piozzi, F., Servettaz, O., 2000. Labdane Diterpenes from *Stachys plumosa*, *Journal of Natural Products*, 63 (8), 1166-1167.
- Paulo, A.C., Gubitz, G.M., 2003. *Textile Processing With Enzymes*. CRC Press, Cornwall, England. ISBN 1 85573 610 1.
- Pezzuto, J.M., 1997. Plant-Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology*, 53 (2), 121-133
- Powers, S., Lennon, S.L., 2000. Analysis of Cellular Responses to Free Radicals: Focus on Exercise and Skeletal Muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 1025-1033.
- Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production, *Physiological Reviews*, 88, 1243-1276
- Qizilbash, N., Whitehead, A., Higgins, J., Wilcock, G., Schneider, L., Farlow, M., Dementia Trialists' Collaboration, 1998. Cholinesterase Inhibition for Alzheimer Disease, a Meta-Analysis of the Tacrine Trials. *Jama*, 280 (20), 1777-1782.
- Rabbani, M., Saijadi, S.E., Zarei, H.R., 2003. Anxiolytic Effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the Elevated Plus-Maze Model of Anxiety in Mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 89 (2-3), 271-276.

- 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, 189–207.
- Ray, B., 1996. *Fundamental Food Microbiology*. CRC press, Inc., New York, pp. 169-180.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, 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, 1231–1237.
- Sáez-Valero, J., Poza-Cisneros, G., Vidal, C.J., 1996. Molecular Forms of Acetyl- and Butyrylcholinesterase in Human Glioma. *Neuroscience Letters*, 206, 173-176.
- Sáez-Valero, J., Vidal, C.J., 1996. Biochemical Properties of Acetyl- and Butyrylcholinesterase in Human Meningioma. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1317, 210-218.
- Sarikurkcü, C., 2011. Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Endemic *Cyclamen mirabile* Hildebr. Tubers and Leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 831-839.
- Sarikurkcü, C., Ozer, M. S., Cakir, A., Eskici, M., Mete, E., 2013. GC/MS Evaluation and in vitro Antioxidant Activity of Essential Oil and Solvent Extracts of an Endemic Plant Used as Folk Remedy in Turkey: *Phlomis bourgaei* Boiss. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Sarikurkcü, C., Uren, M.C., Tepe, B., Cengiz, M., Kocak, M.S., 2014. Phenolic content, enzyme inhibitory and antioxidative activity potentials of *Phlomis nissolii* and *P. pungens* var. *pungens*. *Industrial Crops and Products*, 62, 333-340.
- Sena, L.A., Chandel, N.S., 2012. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*, 48 (2), 158-167.
- Shahidi, F., 1996. *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
- Skaltsa, H.D., Lazari, D.M., Chinou, I.B., Loukis, A.E., 1999. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Stachys candida* and *Stachys chrysantha* from Southern Greece, *Planta Medica*, 65 (3), 255-6.
- Smith, J.A., Park, S., Krause, J.S., Banik, N.L., 2013. Oxidative Stress, DNA Damage, and the Telomeric Complex as Therapeutic Targets in Acute Neurodegeneration, *Neurochemistry International*, 62 (5), 764-775.
- Suh, Y.H., Checler, F., 2002. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacological Reviews*, 54 (3), 469-525.

- Syu M.J., Chen, Y.H., 1997. A Study on the α -Amylase Fermentation Performed by *Bacillus amyloliquefacien*. Chemical Engineering Journal, 65, 237-247.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., Mariam, T.G., 2005. Antimicrobial Activities of Some Selected Traditional Ethiopian Medicinal Plants Used in The Treatment of Skin Disorders. Journal of Ethnopharmacology, 100 (1), 168-175.
- Takeda, Y., Zhang, H., Masuda, T., Honda, G., Otsuka, H., Sezik, E., Yesilada, E., Sun, H., 1997. Megastigmane Glucosides from *Stachys byzantina*, Phytochemistry, 44(7), 1335-1337.
- Temel, H.E., 2008. Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri İle Değişimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Eskişehir.
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., Sarikurkcu, C., 2011. Determination of Chemical Profile, Antioxidant, DNA Damage Protection and Antiamoebic Activities of *Teucrium Polium* and *Stachys iberica*. Fitoterapia, 82 (2), 237-246.
- Tiwari, S., 2008. Plants: A Rich Source of Herbal Medicine. Journal of Natural Products, 1 27-35.
- Tundis, R., Peruzzi, L., Menichini, F., 2014. Phytochemical and Biological Studies of *Stachys* Species in Relation to Chemotaxonomy: A Review. Phytochemistry, 102, 7-39.
- Turpaev, K.T., 2002. Reactive Oxygen Species and Regulation of Gene Expression. Biochemistry, 67, 281-292.
- Türker, C., 2014. α -Amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65s, Osmaniye.
- Türker, H.Y., Karakaş, F.P., 2009. Bakterilerin Hassasiyet Balık gelen bazı şifalı Bitkiler için izole, Balıkçılık ve Su Bilimleri, 9(2), 181-190.
- Tüzün, C. 1997. Biyokimya Üçüncü Baskı, Palme Yayınları, Ankara, 124-125.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39 (1), 44-84.
- Vámos-Vigyázó, L., 1981. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 15 (49-127).

- Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K., 1995. Removal of Phenols and Aromatic Amines from Wastewater by a Combination Treatment With Tyrosinase and a Coagulant *Biotechnology and Bioengineering*, 45 (304-309).
- Wagner, K.H., Reichhold, S., Hölzl, C., Knasmüller, S., Nics, L., Meisel, M., Neubauer, O., 2010. Well-Trained, Healthy Triathletes Experience no Adverse Health Risks Regarding Oxidative Stress and DNA Damage by Participating in an Ultra-Endurance Event, *Toxicology*, 278 (2), 211-216.
- Wang, C.H., Wu, S.B., Wu, Y.T., Wei, Y.H., 2013. Oxidative Stress Response Elicited by Mitochondrial Dysfunction: Implication in the Pathophysiology of Aging, *Experimental Biology and Medicine*, 238 (5), 450-460.
- Watson, L., Dallwitz, M.T., 1978. *The Families of Flowering Plants*, Oxford University Press, London.
- Whitaker, J. R., 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences* Second Edition, Marcel Dekker, Inc, New York, America 517 – 520.
- Winterbourn, C.C., 2008. Reconciling the Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, pp. 274-373.
- Witkop, G. J., 1985. Inherited Disorders of Pigmentation, *American Journal of Clinical Dermatology*, 3 (1), 70 – 134.
- Xu, Y., Gu, Y., Qian, S.Y., 2012. An Advanced Electron Spin Resonance (ESR) Spin-Trapping and LC/(ESR)/MS Technique for the Study of Lipid Peroxidation, *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (11), 14648-14666.
- Yalçın, A., 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, 11, 342-346.
- Yıldız, L., Başkan, K., Tütem, E., Apak, R., 2008. Combined HPLCCUPRAC (Cupric İon Reducing Antioxidant Capacity) Assay of Parsley, Celery Leaves, and Nettle, *Talanta*, 77, 304–313.
- Yildirim, A.B., Karakas, F.P., Turker, A.U., 2013. In Vitro Antibacterial and Antitumor Activities of Some Medicinal Plant Extracts, Growing in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 616-624.
- Zakut, H., Erlich, G., Ayalan, A., Prody, C.A., Malinger, G., Seidman, S., Ginzberg, D., Kehlenbach, R., Soreq, H., 1990. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Genes Coamplify in Primary Ovarian Carcinomas. *Journal of Clinical Investigation*, 86, 900–908.
- Zengin, G., Cakmak, Y.S., Guler, G.O., Aktumsek, A., 2010. In Vitro Antioxidant Capacities and Fatty Acid Compositions of Three *Centaurea* Species

Collected from Central Anatolia Region of Turkey. Food and Chemical Toxicology, 48(10), 2638-2641.

Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., 2014. *Sideritis galatica* Bornm.: A Source of Multifunctional Agents for the Management of Oxidative Damage, Alzheimer's's and Diabetes Mellitus. Journal of Functional Foods, 11, 538-547.

EKLER

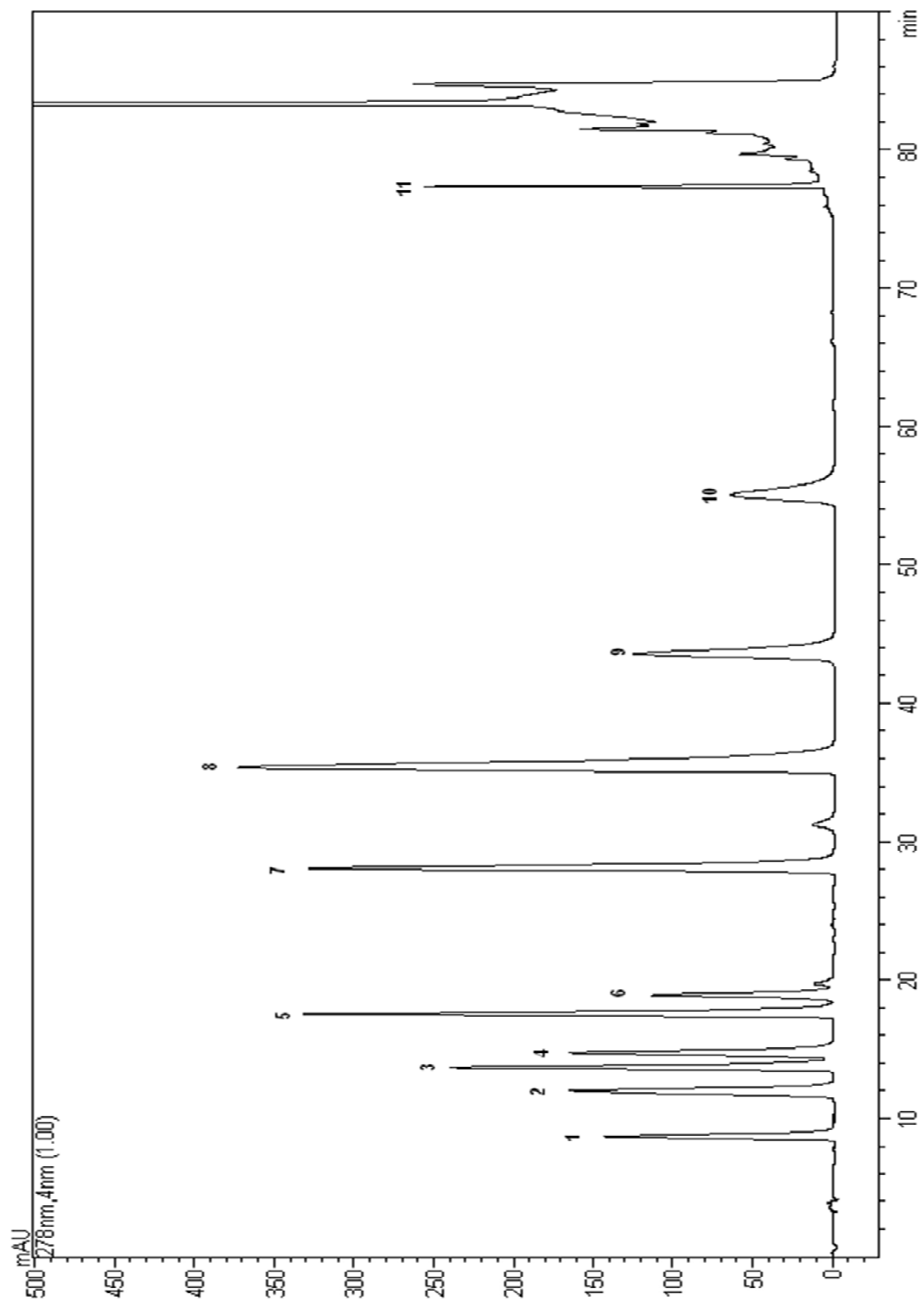
EK A. Standart Fenoliklerin RP-HPLC Kromatogramları

EK B. *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları

EK C. *S. byzantina* Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları

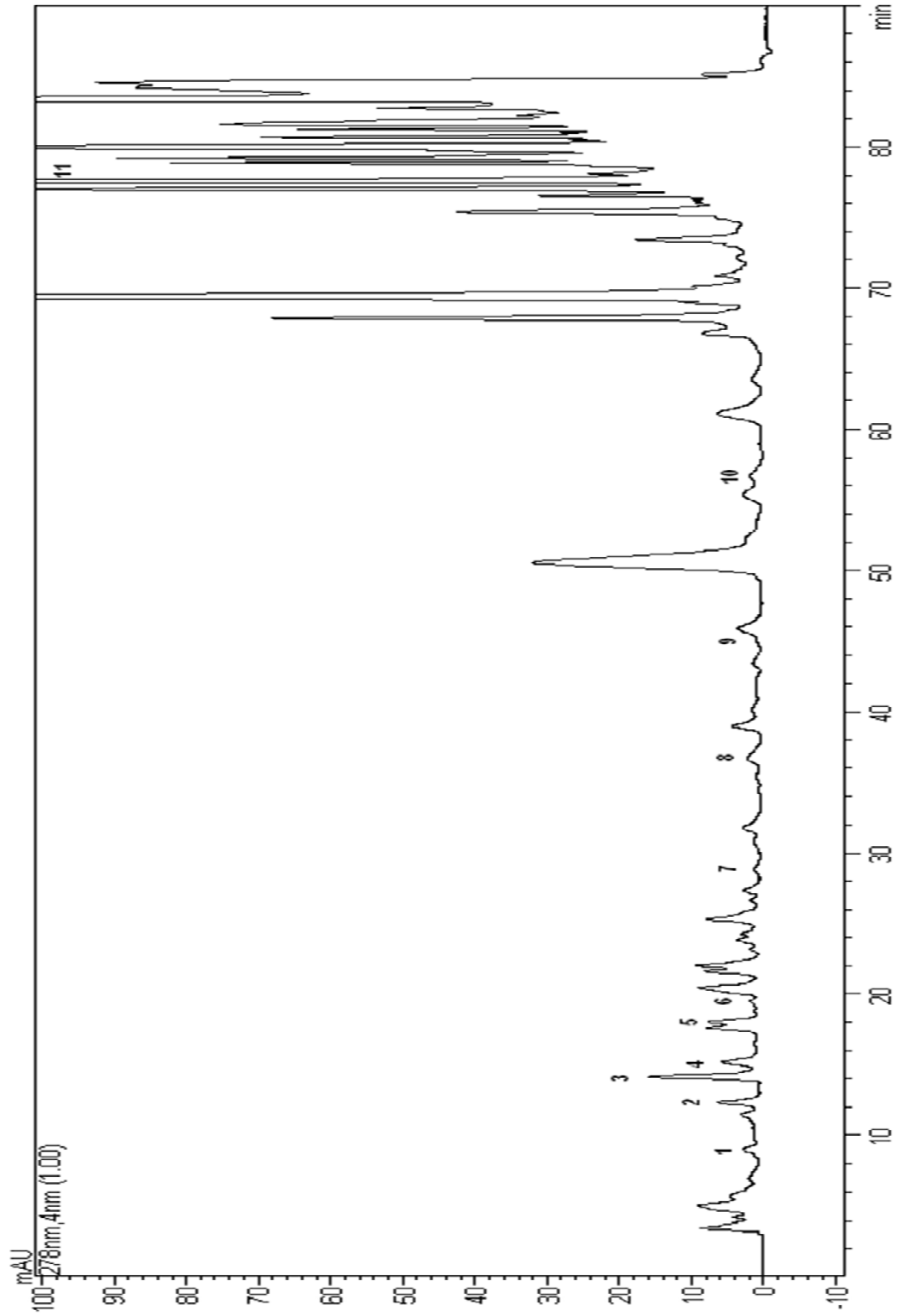
EK D. *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları

EK A. Standart Fenoliklerin RP-HPLC Kromatogramları

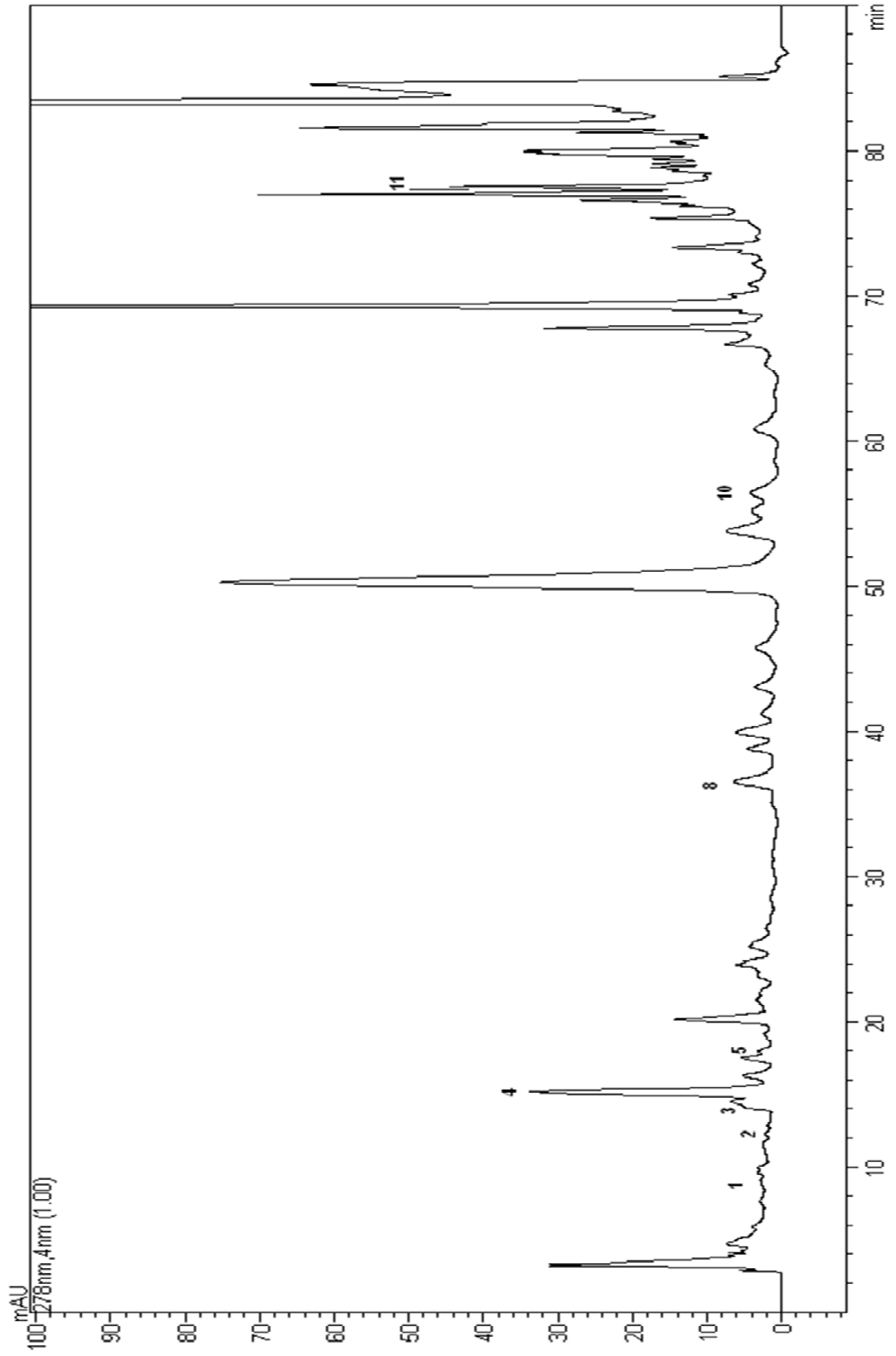


Şekil A.1. Standart fenolik bileşiklerin RP-HPLC kromatogramları (1. Protokateşik asit, 2. (+)-Kateşin, 3. p-Hidroksibenzoik asit, 4. Klorojenik asit, 5. Kafeik asit, 6. (-)-Epikateşin, 7. Ferulik asit, 8. Benzoik asit, 9. Rutin, 10. Rosmarinik asit, 11. Apigenin)

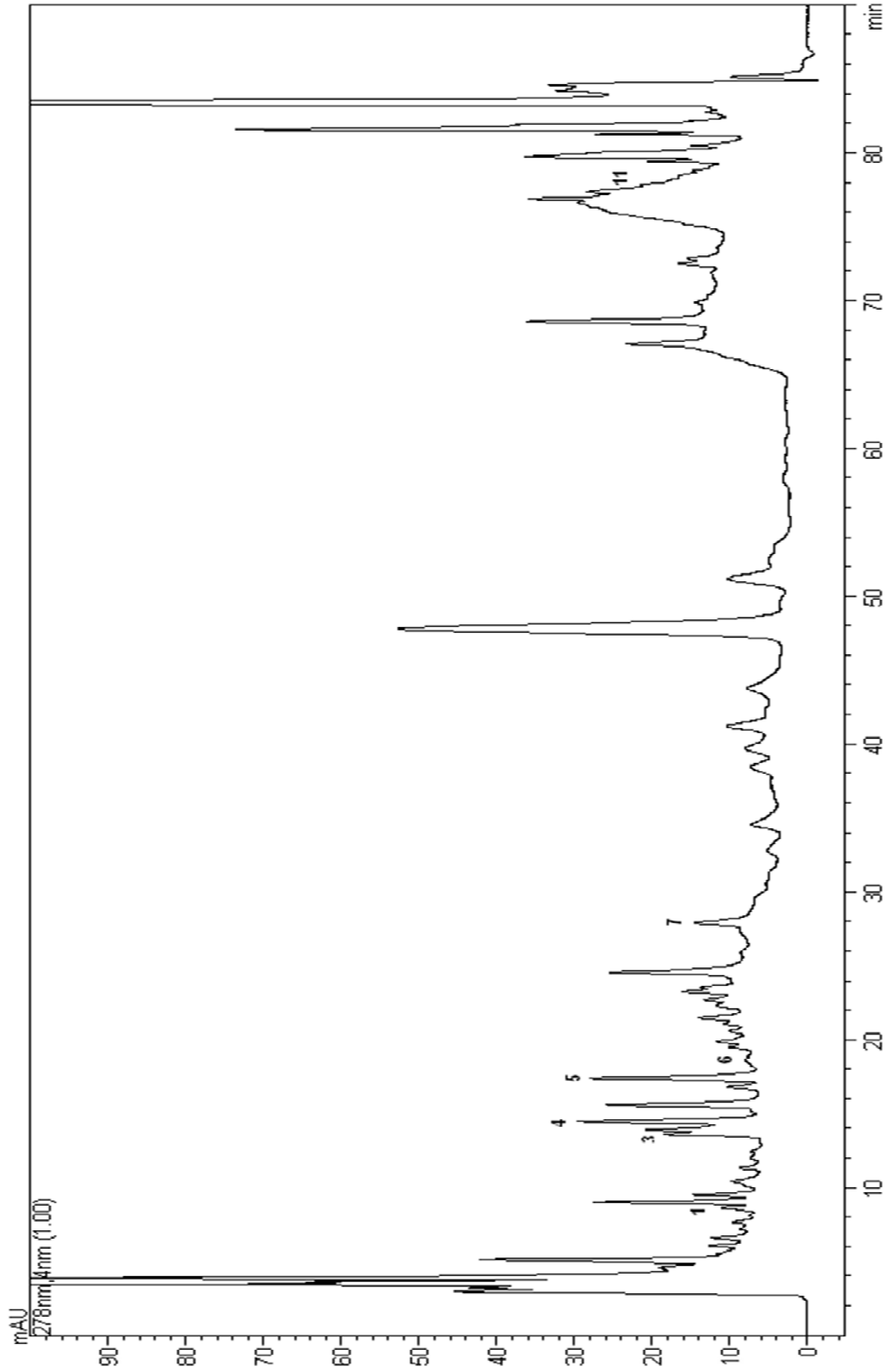
EK B. *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları



Şekil B.1. *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* etil asetat özütü RP-HPLC kromatogramı

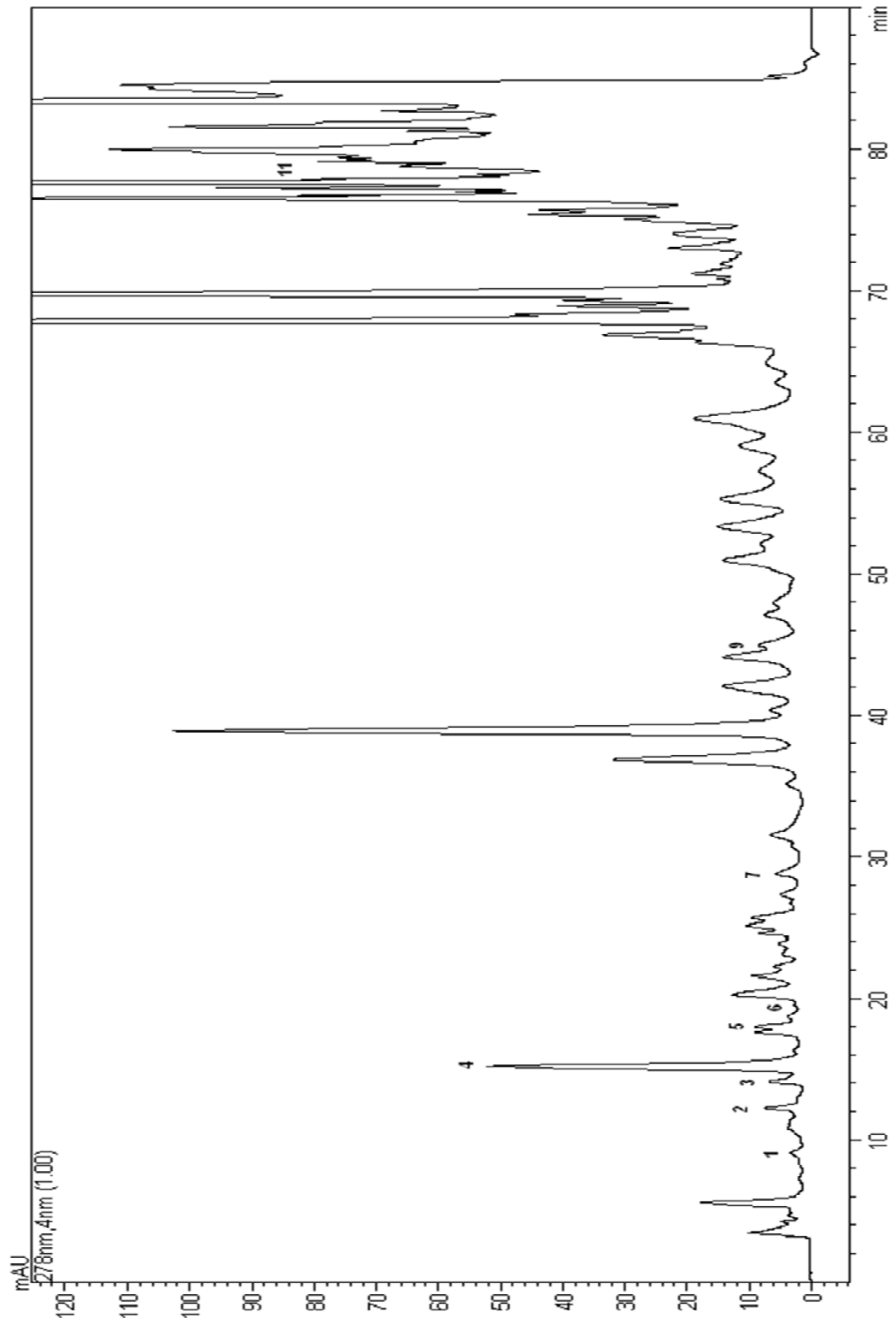


Şekil B.2. *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* metanol özütü RP-HPLC kromatogramı

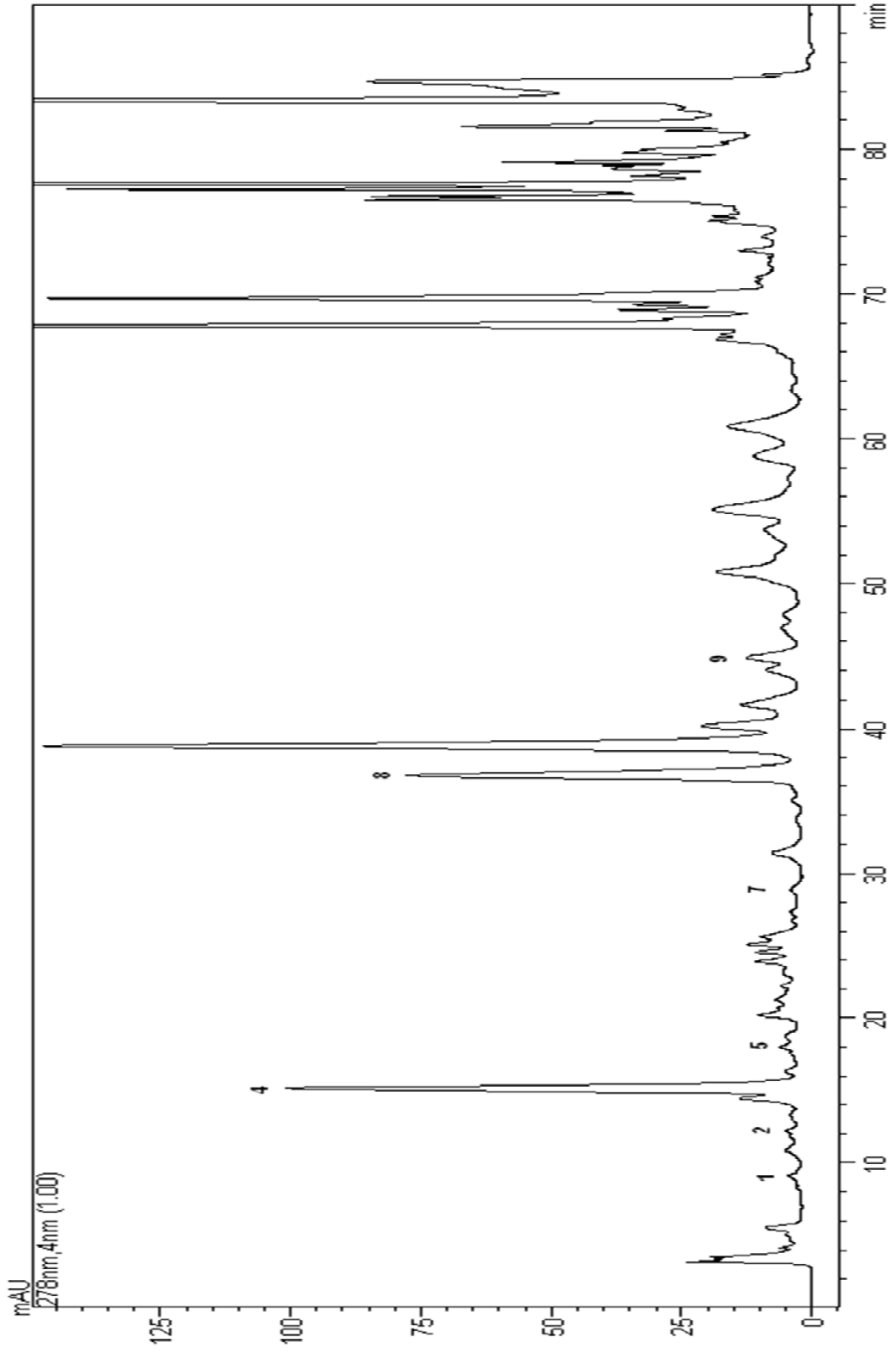


Şekil B.3. *S. annua* subsp. *annua* var. *annua* su özütü RP-HPLC kromatogramı

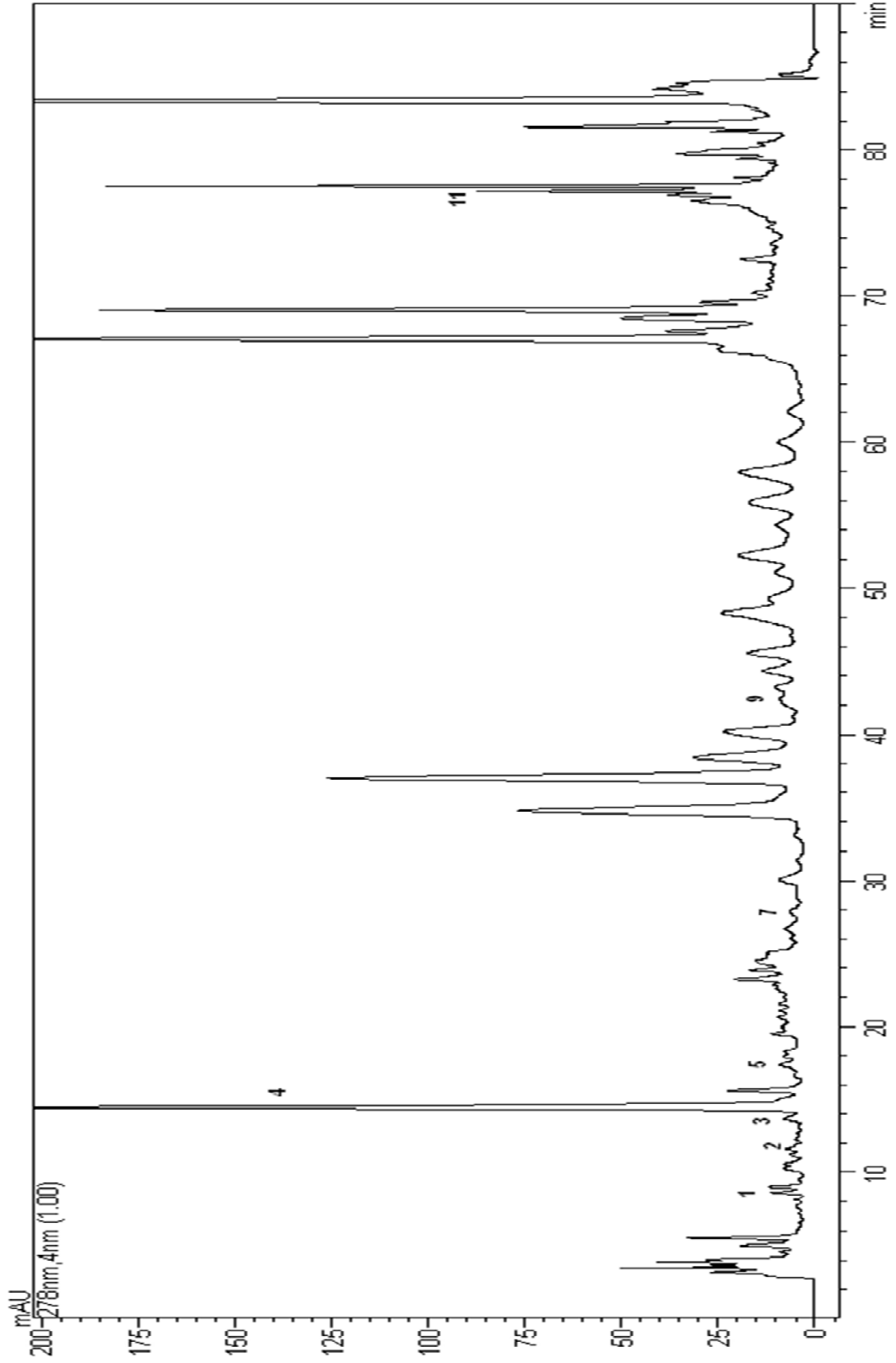
EK C. *S. byzantina* Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları



Şekil C.1. *S. byzantina* etil asetat özütü RP-HPLC kromatogramı

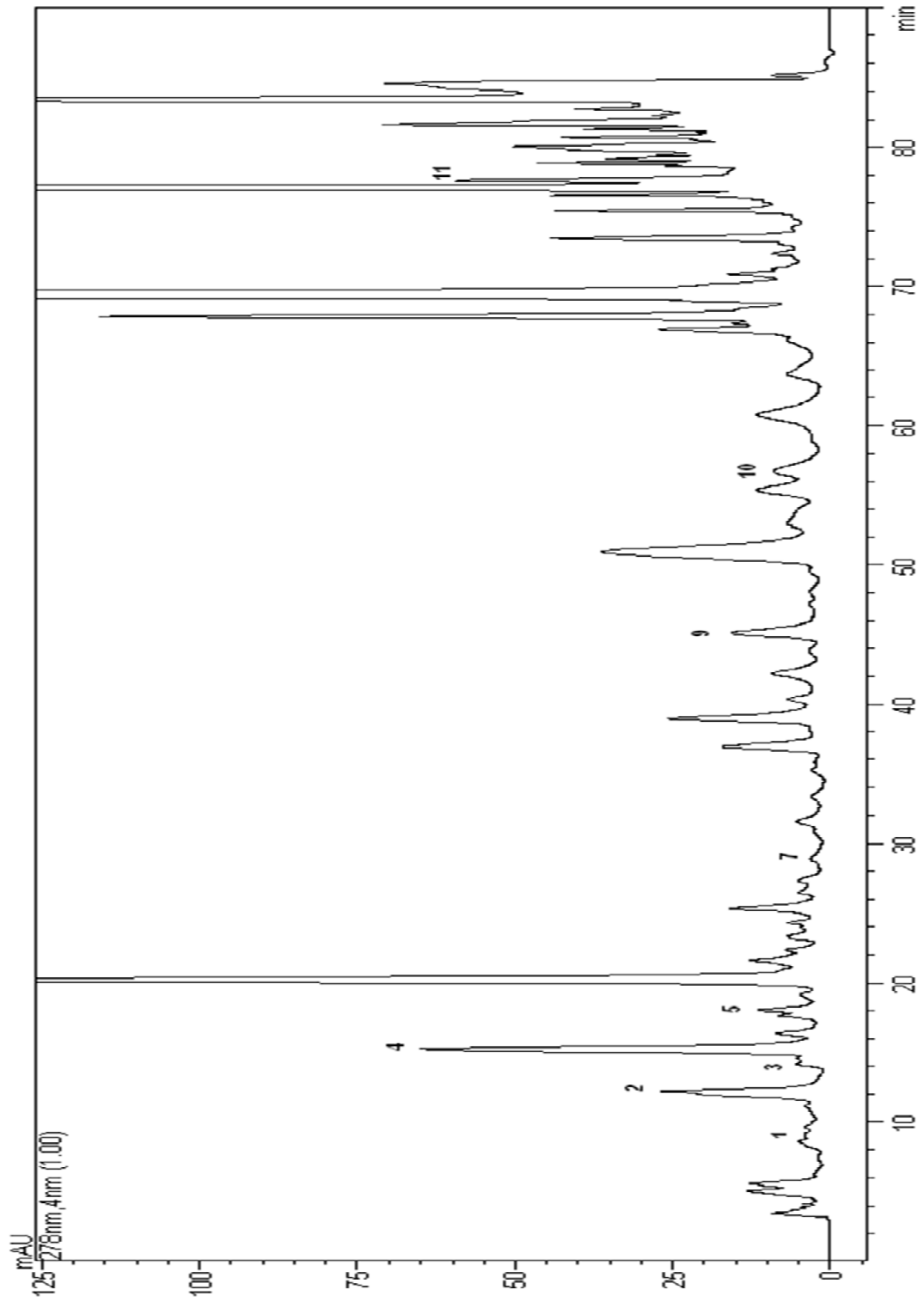


Şekil C.2. *S. byzantina* metanol özütü RP-HPLC kromatogramı

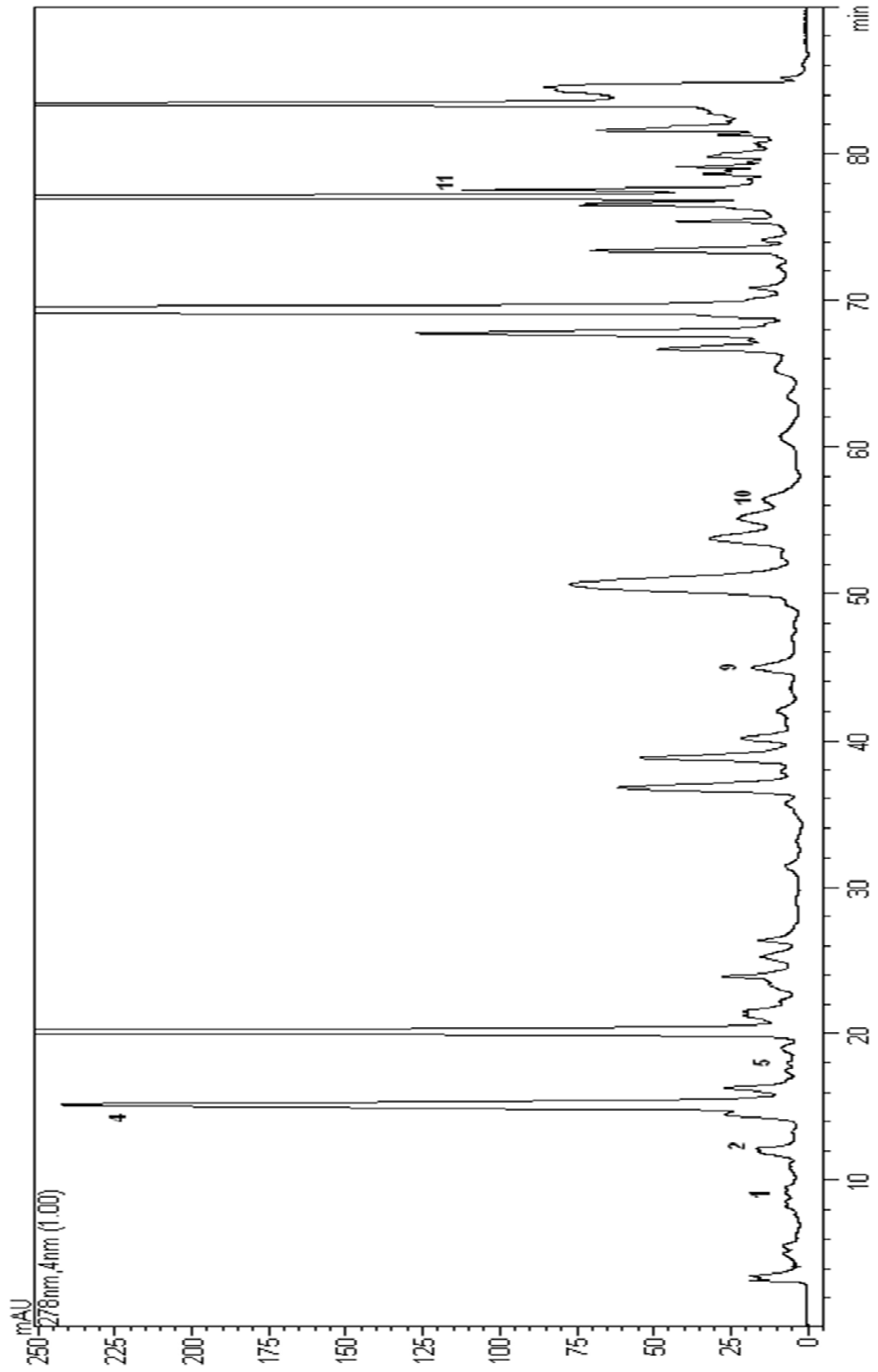


Şekil C.3. *S. byzantina* su özütü RP-HPLC kromatogramı

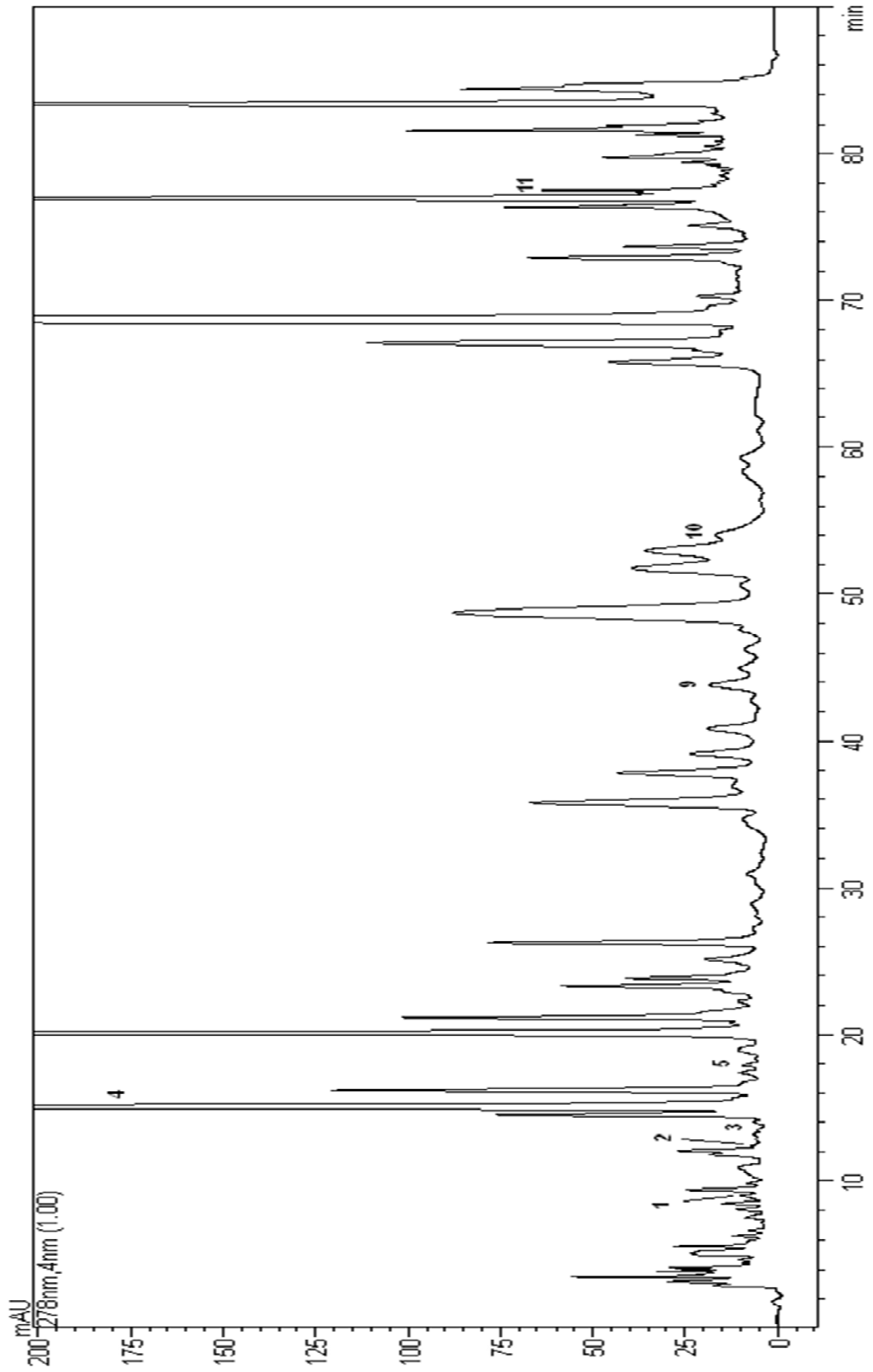
EK D. *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları



Şekil D.1. *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* etil asetat özütü RP-HPLC kromatogramı



Şekil D.2. *S. iberica subsp. iberica var. densipilosa* metanol özütü RP-HPLC kromatogramı



Şekil D.3. *S. iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa* su özütü RP-HPLC kromatogramı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Sefa KOÇAK
Doğum Yeri ve Yılı : Adana, 1981
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mehmetkocak@sdu.edu.tr



Eğitim Durumu

Lise : Adana Abdulkadir Paksoy Lisesi, 2001
Lisans : Muğla Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Bölümü, 2007
Yüksek Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Anabilim Dalı, 2011

Mesleki Deneyim

Şükür Sofrası Yemek Fabrikası 2009-2011
Öğretim Görevlisi
SDÜ Atabey MYO 2013-- Devam

Yayınları

SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. Sarikurkcu, C., Uren, M.C., Tepe, B., Cengiz, M., Kocak, M.S., 2014. Phenolic content, enzyme inhibitory and antioxidative activity potentials of *Phlomis nissolii* and *P. pungens* var. *pungens*. Industrial Crops and Products 62, 333-340.
2. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Uyar, P., Aktumsek, A., Uysal, S., Kocak, M.S., Ceylan, R., 2015. *Crepis foetida* L. subsp. *rhoeadifolia* (Bieb.) Celak. as a source of multifunctional agents: Cytotoxic and phytochemical evaluation. Journal of Functional Foods 17, 698-708.

3. Sarikurkcü, C., Tepe, B., Kocak, M.S., Uren, M.C., 2015. Metal concentration and antioxidant activity of edible mushrooms from Turkey. Food Chemistry 175, 549-555.
4. Sarikurkcü, C., Kocak, M.S., Tepe, B., Uren, M.C., 2015. An alternative antioxidative and enzyme inhibitory agent from Turkey: *Robinia pseudoacacia* L. Industrial Crops and Products 78, 110-115.
5. Sarikurkcü, C., Uren, M.C., Tepe, B., Cengiz, M., Kocak, M.S., 2015. *Phlomis armeniaca*: Phenolic compounds, enzyme inhibitory and antioxidant activities. Industrial Crops and Products 78, 95-101.

Ulusal toplantıda sunularak özet metin olarak yayımlanan bildiri

1. Cengiz Sarıkürkcü, Mehmet Sefa Koçak, Ayşegül Polat, Zülkifl Keskin, "Isparta Yöresinde Halk Tarafından Çay Olarak Tüketilen Yayla Çayının (*Sideritis perfoliata* L.) Farklı Çözücü Özütlerinin Antiradikal, Toplam Antioksidan, İndirgeme Gücü, Metal Şelatlama Aktivitelerinin Karşılaştırılması" 4. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 18-20 Mayıs, Manisa, 2013.
2. Seda Kaplan, Armağan Filizfidan, Mehmet Sefa Koçak, Cengiz Sarıkürkcü, "Yalancı Akasya Ağacı (*Robinia pseudoacacia*) Çiçeklerinin Çözücü Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi" 4. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 18-20 Mayıs, Manisa, 2013.
3. Başak Gökçe, Cengiz Sarıkürkcü, Mehmet Cemil Üren, Mustafa Cengiz, Mehmet Sefa Koçak, "*Phlomis armeniaca* Bitkisinin Çözücü Özütlerinin Antiradikal Potansiyellerinin Araştırılması" 4. Kozmetik Kongresi, 14-16 Şubat, Antalya, 2014.
4. Mehmet Cemil Üren, Hatice Ebru Soylu, Mehmet Sefa Koçak, Halil Güngör, Cengiz Sarıkürkcü, "*Rhizopogon luteolus* Fr. Yenilebilir Mantarının Alzheimer ve Diyabet II Hastalıklarının Tedavilerinde Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi" Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Uygulamaları Kongresi, 24-26 Nisan, Manisa, 2014.
5. Cengiz Sarıkürkcü, Mehmet Sefa Koçak, Mustafa Calapoğlu, Mehmet Cemil Üren, "*Stachys iberica* BIEB. subsp. *iberica* BIEB. var. *densipilosa* BHATTACHARJEE Bitkisinin Alzheimer, Diyabet II Hastalıklarının Tedavilerinde Kullanılabilirliğinin in vitro Olarak Araştırılması", 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, 21-23 Mart, Antalya, 2014.
6. Ayça Yılmaz, Büşra Orakçı, Mehmet Sefa Koçak, Mehmet Cemil Üren, Halil Güngör, Cengiz Sarıkürkcü, "Antioksidan Potansiyele Sahip Yenilebilir Bir Mantar: *Ramaria aurea* (Schaeff.) Quél.", 5.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 17-19 Mayıs, İstanbul, 2014.

7. Emine Yalvaç, Elif Acar, Mehmet Cemil Üren, Mehmet Sefa Koçak, Halil Güngör, Cengiz Sarıkürkcü, "*Hymenogaster aromaticus* Velen Mantarının Metanol ve Su Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi", 5.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 17-19 Mayıs, İstanbul, 2014.
8. Cengiz Sarıkürkcü, Mehmet Cemil Üren, Mehmet Sefa Koçak, "Yenilebilir bazı mantarların metal içeriklerinin belirlenmesi", ES-An-2014 III. Eser Analiz Çalıştayı, 15-18 Mayıs, Tokat, 2014.
9. Cengiz Sarıkürkcü, Mehmet Cemil Üren, Mustafa Cengiz, Mehmet Sefa Koçak, "*Phlomis armeniaca* WILLD. Bitkisi Üzerine Enzim İnhibitör ve Antioksidan Aktivite Çalışması", 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, sayfa 762 (B-P1-11), 23-27 Haziran, Eskişehir, 2014.
10. Mehmet Cemil Üren, Mehmet Sefa Koçak, "*Phlomis nissolii* L. Bitkisi Uçucu Yağının Kimyasal Karakterizasyonu ve Bazı Hastalıkların Tedavilerinde Alternatif Doğal Ürün Olarak Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi", 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 20-22 Mart, Antalya, 2015.
11. Mehmet Cemil Üren, Mehmet Sefa Koçak, "Endemik *Phlomis armeniaca* WILLD. Bitkisi Uçucu Yağının Alzheimer, Diyabet II Hastalıklarının Tedavilerinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması", 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 20-22 Mart, Antalya, 2015.
12. Mehmet Sefa Koçak, Cengiz Sarıkürkcü, Mehmet Cemil Üren, "Deli Çay (*Stachys iberica* subsp. *iberica* var. *densipilosa*) Bitkisi Çözücü Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi", 6. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, Sayfa 123 (64), 17-19 Mayıs, İzmir, 2015.
13. Mehmet Sefa Koçak, Cengiz Sarıkürkcü, Mehmet Cemil Üren, " *Phlomis pungens* var. *pungens* Bitkisi Uçucu Yağının Kimyasal Karakterizasyonu ve Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması", 6. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, Sayfa 124 (65), 17-19 Mayıs, İzmir, 2015.