



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***BARBAREA AURICULATA VAR. PALUDOSA,
B. INTEGRIFOLIA VE B. PLANTAGINEA
(BRASSICACEAE)'NIN BİYOKİMYASAL,
FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI***

Merve BADEM

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ

TRABZON-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***BARBAREA AURICULATA VAR. PALUDOSA,
B. INTEGRIFOLIA VE B. PLANTAGINEA
(BRASSICACEAE)'NIN BİYOKİMYASAL,
FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI***

Merve BADEM

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU (İkinci Danışman)

TRABZON-2019

ONAY

Bu tez Doktora Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



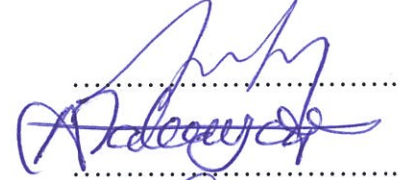
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Merve BADEM'in hazırladığı “*Barbarea auriculata* var. *paludosa*, *B. integrifolia* ve *B. plantaginea* (Brassicaceae)'nın Biyokimyasal, Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ



Doç. Dr. Atila Taner KALAYCIOĞLU



Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN



Prof. Dr. Hasan SEÇEN



Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih:/.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

../../2018

Merve BADEM

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocalarım Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ'a ve Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU'na,

Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN'e,

Doktora tezime katkıları bulunan Prof. Dr. Ali KANDEMİR'e, Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ'a, Doç. Dr. Emine ŞALVA'ya, Kübra KABAN'a,

Lisans ve yüksek lisans öğrencilik sürecim boyunca emeği geçen tüm hocalarıma,
Her zaman beni desteklediğini bildiğim arkadaşlarım Arş. Gör. Sıla Özlem ŞENER, Arş. Gör. Nuriye KORKMAZ, Arş. Gör. Şeyda AKKAYA'ya,

Lisansüstü eğitimim boyunca desteğinden dolayı TÜBİTAK'a,

Doktora tez çalışmamı THD-2018-7353 proje koduyla destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi'ne,

Manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu bildiğim eşim Batuhan BADEM'e ve sevgili ailelerimize,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ve ONAY

BEYAN

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

vi

TABLolar DİZİNİ

x

ŞEKİLLER DİZİNİ

xii

RESİMLER DİZİNİ

xvii

KISALTMALAR

xviii

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

6

4.1. Botanik Bilgiler

6

4.1.1. Brassicaceae (Cruciferae) Familyası

6

4.1.2. *Barbarea* Cinsi

6

4.1.3. *Barbarea auriculata* var. *paludosa*

7

4.1.4. *Barbarea plantaginea*

8

4.1.5. *Barbarea integrifolia*

9

4.2. *Barbarea* Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

10

4.2.1. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Glukosinolatlar ve Hidroliz Ürünleri

10

4.2.2. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Flavonoidler

11

4.2.3. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Saponozitler

12

4.2.4. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Fenolik Asitler

12

4.2.5. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Yağ Asitleri, Protein ve Şeker Türevleri

12

4.3. *Barbarea* Türlerinin Kullanılışı ve Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

12

4.3.1. Antitiroit Etki

13

4.3.2. Tirozinaz İnhibitör Etki

13

4.3.3. Antifungal Etki

13

4.3.4. Antinörodejeneratif Etki

14

4.3.5. Anti-inflamatuvar Etki	15
4.4. Serbest Radikal Türleri ve Kaynakları	15
4.5. Serbest Radikallerin Yararlı Etkileri	20
4.6. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri	21
4.7. Canlı Sistemlerinde Bulunan Antioksidan Sistemler	23
4.7.1. Endojen Antioksidanlar	25
4.7.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	25
4.7.1.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar	26
4.7.2. Ekzojen Antioksidanlar	27
4.7.3. Total Antioksidan Belirleme Yöntemleri	31
4.7.3.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	31
4.7.3.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini	32
4.7.3.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayin Yöntemi (Folin-Ciocalteu Reaktifi, FCR)	33
4.7.3.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini	33
4.8. Fitokimyasallar ve Antimikrobiyal Etkileri	33
4.9. Enzimler Hakkında Genel Bilgiler	35
4.9.1. Enzim İnhibisyonu	37
4.9.1.1. Reversibl (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu	37
4.9.1.2. İrreversibl (Geri dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu	39
4.9.2. Tirozinaz Enzimi Hakkında Genel Bilgi	39
4.9.2.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Tirozinaz İnhibitörleri	41
4.9.2.2. Tirozinaz İnhibitörlerinin Uygulama Alanları	43
4.9.3. Asetilkolin ve Metabolizması	45
4.9.3.1. Kolinesterazlar Hakkında Genel Bilgi	47
4.9.3.2. Alzheimer (AH) ve AChE Enzim İlişkisi	48
4.9.3.3. Alzheimer Hastalığında AChE İnhibitörlerinin Kullanılması	49
4.9.3.4. Bitkilerden AChE İnhibitörleri	50
4.10. Sitotoksisite ve Belirleme Yöntemleri	54
4.10.1. Doğal Kaynaklı Antikanser Ajanlar	55
4.11. Kromatografik Yöntemler	56

4.12. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi (HPLC)	57
5. GEREÇ ve YÖNTEM	59
5.1. Bitki Örneklerinin Toplanması, Teşhisi, Kurutulması ve Öğütülmesi	59
5.2. Türlerin Ekstraksiyonu	59
5.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	60
5.3.1. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	60
5.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler	60
5.3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	61
5.3.4. <i>Barbarea</i> Türlerinde Antioksidan Aktivite Çalışmaları	63
5.3.4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	63
5.3.4.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini	63
5.3.4.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	64
5.3.4.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini	65
5.3.5. <i>Barbarea</i> Türlerinde Antimikrobiyal Aktivite Tayini	65
5.3.5.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu	65
5.3.5.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi	66
5.3.6. <i>Barbarea</i> Türlerinde Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini	67
5.3.7. <i>Barbarea</i> Türlerinde Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini	68
5.3.8. <i>Barbarea</i> Türlerinde Sitotoksite Tayini	68
5.4. Fitokimyasal Çalışmalar	70
5.4.1. Fitokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	70
5.4.2. Fitokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	70
5.4.3. <i>Barbare</i> Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC ile Belirlenmesi	72
5.4.4. İzolasyon Çalışmalarında Kullanılan Kromatografik Yöntemler	73
5.4.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	74
5.4.4.2. Açık Kolon Kromatografisi (KK)	74
5.4.4.3. Kullanılan Kolonların Hazırlanması	74
5.4.4.4. Numunenin Kolona Tatbik Edilmesi	74
5.4.5. Kloroform Ekstresi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları	75
5.4.6. Etil Asetat Ekstresi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları	75
5.4.7. Arta Kalan Su Fraksiyonu Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları	76

5.5. İstatistiksel Olarak Verilerin Değerlendirilmesi	77
6. BULGULAR	79
6.1. <i>Barbarea</i> Türlerinde Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	79
6.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Sonuçları	79
6.1.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları	80
6.1.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları	81
6.1.4. CUPRAC Tayini Sonuçları	83
6.2. <i>Barbarea</i> Türlerinde Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları	84
6.3. <i>Barbarea</i> Türlerinde Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları	89
6.4. <i>Barbarea</i> Türlerinde Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	94
6.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Sonuçları	94
6.4.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi Sonuçları	95
6.5. <i>Barbarea</i> Türlerinin Sitotoksosite Tayinine Ait Bulgular	96
6.5.1. <i>Barbarea</i> Türlerinin L929 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite Sonuçları	96
6.5.2. <i>Barbarea</i> Türlerinin Hep3B Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite Sonuçları	98
6.5.3. <i>Barbarea</i> Türlerinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite Sonuçları	100
6.5.4. <i>Barbarea</i> Türlerinin HCT116 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite Sonuçları	102
6.5.5. <i>Barbarea</i> Türlerinin MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite Sonuçları	104
6.5.6. <i>Barbarea</i> Türlerinin A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite Sonuçları	106
6.5.7. <i>Barbarea</i> Türlerinin PC-3 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite Sonuçları	108
6.6. <i>Barbare</i> Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC Analiz Sonuçları	110
6.7. İzolasyon Çalışmasına Ait Sonuçlar	112
6.7.1. β -Sitosterol	113
6.7.2. Rozmarinik Asit	121
6.7.3. Kemferol 7-O-L- α -ramnozit-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukozil)- β -D-glukozit)	129
6.7.4. Glukonastutin Kolin Tuzu	143
6.7.5. Glukonasturtin (2-Feniletil Glukosinolat)	156
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	163
8. KAYNAKLAR	171
9. ÖZGEÇMİŞ	205

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Türkiye’de yetişen <i>Barbarea</i> taksonları	4
Tablo 2. Radikal-nonradikal oksijen ve azot türleri	16
Tablo 3. Doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri ve elde edildiği kaynaklar	43
Tablo 4. AChE inhibitör etkinliğine sahip olduğu bildirilen bitkiler	51
Tablo 5. AChE inhibitör etkinliği olan fitokimyasallar	53
Tablo 6. Antikanser etkinliği olan bazı fitokimyasallar	56
Tablo 7. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri	60
Tablo 8. Kullanılan kimyasal maddeler	61
Tablo 9. Kullanılan çözeltiler	62
Tablo 10. Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan cihazlar	70
Tablo 11. Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	70
Tablo 12. Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	71
Tablo 13. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri	71
Tablo 14. Gradient elüsyonda kullanılan çözücü oranları ve zaman	73
Tablo 15. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstrelerin antioksidan aktivite tayini sonuçları	84
Tablo 16. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstrelerin tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları	89
Tablo 17. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstrelerin ChE enzim inhibisyonu sonuçları	94
Tablo 18. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstrelerin inhibisyon zon çapları	95
Tablo 19. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstrelerin MİK değerleri	96
Tablo 20. <i>Barbarea</i> türlerinin L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	97
Tablo 21. <i>Barbarea</i> türlerinin Hep3B hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	99
Tablo 22. <i>Barbarea</i> türlerinin MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	101
Tablo 23. <i>Barbarea</i> türlerinin HCT116 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	103
Tablo 24. <i>Barbarea</i> türlerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	105
Tablo 25. <i>Barbarea</i> türlerinin A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	107
Tablo 26. <i>Barbarea</i> türlerinin PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	109
Tablo 27. Türlerin içerdiği fenolik bileşiklerin miktarları	110
Tablo 28. β -Sitosterol (Bİ-1) bileşiğinin ^1H -NMR spektral değerleri	113
Tablo 29. β -Sitosterol (Bİ-1) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri	114

Tablo 30. Rozmarinik asit (Bİ-2) bileşiğinin ^1H -NMR spektral değerleri	121
Tablo 31. Rozmarinik asit (Bİ-2) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri	122
Tablo 32. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozit-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) bileşiğinin ^1H -NMR spektral değerleri	130
Tablo 33. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozit-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri	131
Tablo 34. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) bileşiğinin ^1H -NMR spektral değerleri	144
Tablo 35. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri	144
Tablo 36. Glukonasturtin (Bİ-5) bileşiğinin ^1H -NMR spektral değerleri	156
Tablo 37. Glukonasturtin (Bİ-5) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri	157

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Endojen ve ekzojen antioksidanların sınıflandırılması	24
Şekil 2. Fitokimyasalların sınıflandırılması	30
Şekil 3. DPPH radikalının indirgenme reaksiyonu	32
Şekil 4. FRAP reaktifi ile antioksidan molekül arasındaki tepkime	32
Şekil 5. Yarışmalı enzim inhibisyonu	38
Şekil 6. Yarışmalı olmayan enzim inhibisyonu	38
Şekil 7. Yarışmasız enzim inhibisyonu	39
Şekil 8. Tirozinaz enziminin kresolaz ve katekolaz aktivitesi	40
Şekil 9. Tirozinaz tarafından tirozinden melanin oluşumu	41
Şekil 10. Tirozinaz tarafından katekol o-kinonların ve diğer ROS'lerinin üretilmesi	45
Şekil 11. ACh metabolizması	46
Şekil 12. ACh'nin AChE tarafından parçalanması	48
Şekil 13. AChE inhibitörlerinin etki mekanizması	50
Şekil 14. Bir HPLC cihazının şematik gösterimi	58
Şekil 15. <i>B. integrifolia</i> izolasyon şeması	78
Şekil 16. Fenolik madde miktar tayininde kullanılan gallik asit'e ait grafik	79
Şekil 17. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstraktların fenolik madde miktar tayini sonuçlarının karşılaştırılması	79
Şekil 18. FRAP tayininde kullanılan troloks'a ait grafik	80
Şekil 19. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstraktların FRAP tayini sonuçlarının karşılaştırılması	80
Şekil 20. DPPH radikali giderme aktivitesi tayininde kullanılan BHT'a ait grafik	81
Şekil 21. Türlerin su ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları	81
Şekil 22. Türlerin metanol ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları	82
Şekil 23. Türlerin etil asetat ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları	82
Şekil 24. Türlerin kloroform ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları	82

Şekil 25. <i>Barbarea</i> Türlerine ait ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçlarının karşılaştırılması	83
Şekil 26. <i>Barbarea</i> türlerine ait ekstrelerin CUPRAC tayini sonuçlarının karşılaştırılması	83
Şekil 27. α -kojik asit'e ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	84
Şekil 28. <i>B. integrifolia</i> 'nın metanol ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	85
Şekil 29. <i>B. integrifolia</i> 'nın etil asetat ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	85
Şekil 30. <i>B. integrifolia</i> 'nın kloroform ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	85
Şekil 31. <i>B. integrifolia</i> 'nın su ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	86
Şekil 32. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın metanol ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	86
Şekil 33. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın etil asetat ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	86
Şekil 34. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın kloroform ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	87
Şekil 35. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın su ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu	87
Şekil 36. <i>B. plantaginea</i> 'nın metanol ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	87
Şekil 37. <i>B. plantaginea</i> 'nın etil asetat ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	88
Şekil 38. <i>B. plantaginea</i> 'nın kloroform ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	88
Şekil 39. <i>B. plantaginea</i> 'nın su ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	88
Şekil 40. Galantamin'in kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	89
Şekil 41. <i>B. integrifolia</i> 'nın su ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	90
Şekil 42. <i>B. integrifolia</i> 'nın etil asetat ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	90

Şekil 43. <i>B. integrifolia</i> 'nın kloroform ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	90
Şekil 44. <i>B. integrifolia</i> 'nın metanol ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	91
Şekil 45. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın su ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	91
Şekil 46. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın etil asetat ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	91
Şekil 47. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın kloroform ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	92
Şekil 48. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın metanol ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	92
Şekil 49. <i>B. plantaginea</i> 'nın metanol ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	92
Şekil 50. <i>B. plantaginea</i> 'nın su ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	93
Şekil 51. <i>B. plantaginea</i> 'nın etil asetat ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	93
Şekil 52. <i>B. plantaginea</i> 'nın kloroform ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği	93
Şekil 53. <i>Barbarea</i> türlerinin L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	98
Şekil 54. <i>Barbarea</i> türlerinin Hep3B hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	100
Şekil 55. <i>Barbarea</i> türlerinin MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	102
Şekil 56. <i>Barbarea</i> türlerinin HCT116 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	104
Şekil 57. <i>Barbarea</i> türlerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	106
Şekil 58. <i>Barbarea</i> türlerinin A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	108
Şekil 59. <i>Barbarea</i> türlerinin PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi	110
Şekil 60. Fenolik bileşiklerin standartlarının HPLC kromatogramı	111
Şekil 61. <i>B. plantaginea</i> 'nın metanol ekstresine ait HPLC kromatogramı	111
Şekil 62. <i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın metanol ekstresine ait HPLC kromatogramı	112
Şekil 63. <i>B. integrifolia</i> 'nın metanol ekstresine ait HPLC kromatogramı	112
Şekil 64. β -Sitosterol (Bİ-1) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu-I	116

Şekil 65. β -Sitosterol (Bİ-1) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu-II	117
Şekil 66. β -Sitosterol (Bİ-1) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu-I	118
Şekil 67. β -Sitosterol (Bİ-1) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu-II	119
Şekil 68. β -Sitosterol (Bİ-1) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu-III	120
Şekil 69. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I	124
Şekil 70. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-II	125
Şekil 71. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) spektrumu-I	126
Şekil 72. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) spektrumu-II	127
Şekil 73. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) spektrumu-III	128
Şekil 74. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I	134
Şekil 75. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-II	135
Şekil 76. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) Spektrumu	136
Şekil 77. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-I	137
Şekil 78. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-II	138
Şekil 79. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-III	139
Şekil 80. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-I	140
Şekil 81. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-II	141
Şekil 82. Kemferol 7- <i>O</i> - α -L-ramnozid-3- <i>O</i> - β -D-((2- <i>O</i> - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, homonükleer korelasyonlu spektrum (COSY)	142

Şekil 83. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I	147
Şekil 84. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-II	148
Şekil 85. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) spektrumu	149
Şekil 86. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-I	150
Şekil 87. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-II	151
Şekil 88. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-I	152
Şekil 89. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-II	153
Şekil 90. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D- ^1H , homonükleer korelasyonlu spektrum (COSY)	154
Şekil 91. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) kütle spektrumu	155
Şekil 92. Glukonasturtin (Bİ-5) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I	159
Şekil 93. Glukonasturtin (Bİ-5) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-II	160
Şekil 94. Glukonasturtin (Bİ-5) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) spektrumu	161
Şekil 95. Glukonasturtin (Bİ-5) kütle spektrumu	162

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. <i>Barbarea auriculata</i> var. <i>paludosa</i>	8
Resim 2. <i>Barbarea plantaginea</i>	9
Resim 3. <i>Barbarea integrifolia</i>	9



KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

AChE	Asetilkolinesteraz
A549	İnsan akciğer kanser hücresi
ATP	Adenozin trifosfat
BHT	Bütil hidroksi toluen
BAE	<i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın etil asetat ekstresi
BAM	<i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın metanol ekstresi
BAK	<i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın kloroform ekstresi
BAS	<i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> 'nın su ekstresi
BİE	<i>B. integrifolia</i> 'nın etil asetat ekstresi
BİK	<i>B. integrifolia</i> 'nın kloroform ekstresi
BİM	<i>B. integrifolia</i> 'nın metanol ekstresi
BİS	<i>B. integrifolia</i> 'nın su ekstresi
BPE	<i>B. plantaginea</i> 'nın etil asetat ekstresi
BPK	<i>B. plantaginea</i> 'nın kloroform ekstresi
BPM	<i>B. plantaginea</i> 'nın metanol ekstresi
BPS	<i>B. plantaginea</i> 'nın su ekstresi
BuChE	Bütirilkolinesteraz
CHCl₃	Kloroform
cm	Santimetre
Cu(II)-Nc	Bakır(II)-neokuproin kompleksi
DMEM	Dulbecco's modified eagles's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit
E	Enzim
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokateşin gallat
EtOAc	Etilasetat
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi

GAE	Gallik asit eşdeğeri
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi
H₂O	Su
HCT116	İnsan kolon karsinom hücresi
Hep3B	İnsan hepatoselüler karsinom hücresi
HI-FBS	Heat inactivated fetal bovine serum
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi
IC₅₀	%50'sinin inhibe olduğu gözlenen konsantrasyon
IEC	Uluslararası Enzim Komisyonu
İTK	İnce tabaka kromatografisi
L929	Normal fare fibroblast hücresi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi- kütle spektroskopisi/kütle spektroskopisi
L-DOPA	3,4-dihidroksi-l-fenilalanin
MCF-7	İnsan meme kanseri hücresi
MDA	Malonildialdehit
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücresi
MeOH	Metanol
MHA	Müller Hinton Agar
MIK	Minimal inhibisyon konsantrasyon
mM	Milimolar
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
MDR	Çoklu ilaç direnci
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat anhidrit
NaH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Nc	Neokuproin
NK	Negatif kontrol
nm	Nanometre
NO	Nitrikoksit
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standard
P	Ürün

PEITC	2-fenil etilizotiyosiyanat
PC-3	İnsan prostat kanser hücresi
RKT	Reaktif klor türleri
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RST	Reaktif kükürt türleri
S	Substrat
TEAC	Troloks eşdeğeri
TPTZ	Tripiridiltiazin
UV	Ultraviyole
VC	Vinkristin

1. ÖZET

***Barbarea auriculata* var. *paludosa*, *B. integrifolia* ve *B. plantaginea* (Brassicaceae)'nın Biyokimyasal, Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması**

Barbarea cinsi (Brassicaceae)'nin Avrupa ve Asya'da yaklaşık 20 türü; Türkiye'de ise 9'u endemik, 12 türü bulunmaktadır. *Barbarea* türlerinin genç yaprakları, halk tarafından yiyecek olarak (salata yapımında), yara iyi edici ve idrar artırıcı olarak kullanılmaktadır.

Doktora tez kapsamında *B. auriculata* var. *paludosa*, *B. integrifolia* ve *B. plantaginea* türlerinin topraküstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresi, metanol ekstresinden hareketle hazırlanan kloroform, etil asetat ve arta kalan su alt fraksiyonları üzerinde, ilk kez, biyolojik aktivite (antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyonu ve sitotoksik aktivite) ve fitokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Türlerin antioksidan kapasiteleri, Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini, FRAP Ölçümü, CUPRAC Tayini ve DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini ile belirlenmiştir. Biyolojik aktivite çalışmalarının sonucunda, türlerin iyi bir antioksidan, antimikrobiyal kapasiteye ve sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenirken; tirozinaz, AChE ve BuChE enzimleri üzerinde orta seviyede inhibitör etkili oldukları gözlenmiştir.

Biyolojik aktivite çalışmalarında, *B. integrifolia*'nın diğer türlere göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu tür üzerinde çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak izolasyon çalışmaları yapılmıştır. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları spektroskopik yöntemler [¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR (COSY, HMQC, HMBC) ve MS] kullanılarak tayin edilmiştir. Türün toprak üstü kısmından 1 steroid (β -Sitosterol), 1 fenolik asit (Rozmarinik asit), 1 flavonol heteroziti (Kemferol 7-O- α -L-ramnozit-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) ve 2 glukosinolat (Glukonasturtin ve Glukonasturtin'in kolin tuzu) olmak üzere 4 farklı kimyasal gruba ait, 5 ana bileşik izole edilmiştir. Glukonasturtin kolin tuzu olarak doğada ilk kez izole edilmiştir. Ayrıca *Barbarea* türlerinden ilk kez rozmarinik asit ve kemferol 7-O- α -L-ramnozit-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukozil)- β -D-glukozit izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal, Antioksidan, *Barbarea*, Bitki Kimyası, Brassicaceae, Enzim İnhibisyonu, Sitotoksik Aktivite

2. SUMMARY

Investigation of *Barbarea auriculata* var. *paludosa*, *B. integrifolia* and *B. plantaginea* (Brassicaceae)'s Biochemical, Phytochemical and Biological Activities

Barbarea genus has been presented about 20 species in Europe and Asia, 12 species, 9 taxon are endemic, in Turkey. The leaves of *Barbarea* species have been used as food (for making salad), wound healing and diuretic.

With PhD thesis, biological activities (antioxidant, antimicrobial, enzyme inhibition and cytotoxic activity) and phytochemical studies have been carried out on methanolic extracts from the aerial parts of *B. auriculata* var *paludosa*, *B. integrifolia*, and *B. plantaginea* species and chloroform, ethyl acetate, and the remaining aqueous phases prepared using by methanolic extracts for the first time. Antioxidant capacity of the species have been determined by using Total Phenolic Content, FRAP, CUPRAC, and DPPH Radical Scavenging Activity Tests. As a result of these studies, it was observed that the species have been a good antioxidant, antimicrobial capacity and cytotoxic effect, while the extracts have been moderate tyrosinase, AChE and BuChE inhibitory activity.

In the biological activity studies, it has been observed that *B. integrifolia* have been higher activity than other species. The isolation studies on its have been performed using several chromatographic methods. The chemical structures of isolated compounds have been identified by means of ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-NMR (COSY, HMQC, HMBC), and MS. 5 major compounds, 1 steroid (β -Sitosterol), 1 phenolic acid (Rosmarinic acid), 1 flavonol heteroside (Kaempferol 7-O- α -L-rhamnoside-3-O- β -D-((2-O- β -D-glucosyl)- β -D-glucoside) and 2 glucosinolates (Gluconasturtiin, its choline salt), belong to 4 different chemical groups have been isolated from the aerial parts of the plant. Gluconasturtiin have been isolated as its choline salt for the first time.

Key Words: Antioxidant, Antimicrobial, *Barbarea*, Brassicaceae, Cytotoxic Activity, Enzyme Inhibition, Phytochemistry

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanoğlu çevresindeki bitkileri beslenme, korunma, barınma, ısınma ve savunma gibi değişik amaçlar doğrultusunda kullandıkları bilinmektedir. Anadolu'da bitkilerle insanlar arasındaki ilişkiyi gösteren en eski kanıtların 1957-1961 yıllarında Irak'ın Kuzeyinde, Zağros dağlarında bulunan Şınadar Mağarası'nda yapılan kazılarda ortaya çıkarıldığı bilinmektedir. Bu kazılar sırasında yaklaşık 60 bin yıl öncesinden günümüze gelen ve bir şamana ait olduğu düşünülen mezarda civanperçemi, kanarya otu, mor sümbül, hatmi, peygamber çiçeği, gül ve efedra gibi türlere ait fosilleşmiş polenler tespit edilmiştir (1). Anadolu'da tıbbi bitkilerin kullanıldığını belgeleyen en eski yazılı kayıtlar ise Hititler'in başkenti Hattuşaş'ta bulunan Hitit tabletlerinde yer almaktadır. Bu kayıtlardan mazı, hardal, meyan, badem, adamotu, sarımsak, üzerlik, söğüt ve zeytinin yer aldığı reçete örneklerine ulaşılmaktadır (2, 3). Bu bilgiler, halkın sosyal yaşamında ve sağlığının korunmasında bitkilerin önemli yer tuttuğunu göstermektedir.

Tıbbi bitkilere olan ilginin, 1900'lü yıllarda sanayi devrimi ile birlikte azaldığı ancak sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olması, bitkisel ilaçların daha ucuz ve kolay temin edilmesi, bitkisel ürünlerin birden fazla etkiye sahip olması gibi sebeplerin tıbbi bitkileri ve bunlardan elde edilen biyolojik olarak aktif bileşikleriyeniden ilgi odağı haline getirdiği kabul edilmektedir (4-6).

Üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği Türkiye'nin, tıbbi ve endemik bitkiler açısından önde gelen ülkelerden biri olduğu bilinmektedir. Bugün Türkiye florasında 1000'den fazlası ilaç hammaddesi ve baharat olarak kullanılan, 174 familyaya ait 1251 cins ve 12000'i aşkın bitki taksonu yer almaktadır (6-8).

Brassicaceae familyası, dünyada 338 cins ve 3709 tür ile temsil edilirken, Türkiye'de 91 cinse ait 571 tür, 65 alttür, 24 varyete ve 660 taksonu bulunmaktadır. Doktora tez kapsamında çalışılan *Barbarea* cinsinin Avrupa ve Asya'da yaklaşık 20 türü bulunmakta iken Türkiye'de 9'u endemik olmak üzere 12 türü (15 takson) bulunmaktadır (9).

Tablo 1. Türkiye’de yetişen *Barbarea* taksonları

	Türkiye’de Yetişen <i>Barbarea</i> taksonları	Kaynak
1	<i>Barbarea vulgaris</i> Br.	10
2	<i>B. verna</i> (Mill.) Aschers.	10
3	<i>B. intermedia</i> Bor.	10
4	<i>B. trichopoda</i> Hausskn. Ex Bornm. (Endemik)	10
5	<i>B. auriculata</i> var. <i>auriculata</i> Hausskn. Ex Bornm. (Endemik)	10
6	<i>B. auriculata</i> var. <i>paludosa</i> Hausskn. Ex Bornm. (Endemik)*	10
7	<i>B. lutea</i> Cullen & Coode (Endemik)	10
8	<i>B. plantaginea</i> DC.*	10
9	<i>B. platycarpa</i> Hausskn. Ex Bornm. (Endemik)	10
10	<i>B. integrifolia</i> DC. (Endemik)*	10
11	<i>B. minor</i> var. <i>minor</i> C. Koch	10
12	<i>B. minor</i> var. <i>robusta</i> Cullen & Code (Endemik)	10
13	<i>B. minor</i> C. koch var. <i>eriopoda</i>	10
14	<i>B. minor</i> C. koch var. <i>anfractuosa</i> Hartvig & Strid(Endemik)	11
15	<i>B. hedgeana</i>	10

* Doktora tezi kapsamında çalışılması planlanan *Barbarea* taksonları

Dünyada son zamanlarda doğal ürünler ile tedavi yöntemleri hakkındaki bilimsel araştırmalar artış göstermiştir. Bu konuya ilginin artması dikkate alınarak, yapılan literatür taramalarında biyolojik aktivite ve fitokimyasal içeriğinin daha önce çalışılmadığı tespit edilen ve Brassicaceae ailesinin üyelerinden biri olan *Barbarea* cinsine ait 3 türün doktora tez konusu olarak çalışılması amaçlanmıştır.

Yapılan literatür taramalarında, *Barbarea* türlerinin glukosinolatlar ve hidroliz ürünleri (12-24), flavonoidler (25-27), saponozitler (21, 28-35), fenolik asitler (36), yağ asitleri, protein, şeker ve şeker türevlerini (20) içerdiğine rastlanmaktadır. *Barbarea* türleri üzerinde yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları bu türlerin antitiroit, tirozinaz inhibitör, antifungal, antinörodejeneratif ve anti-inflamatuvar etkili olduklarını göstermektedir (14, 15, 21, 25, 28, 30, 31, 33, 37-42).

Yapılan literatür taramaları sonucunda, ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren ve endemizm oranı yüksek olan *Barbarea* türlerinin biyolojik aktiviteleri ve fitokimyasal içerikleri ile ilgili yeterli çalışmanın olmadığı saptamıştır. Tez kapsamında daha önce çalışılmadığı tespit edilen, 2’si endemik olmak üzere, 3 *Barbarea* türünün (*B.*

auriculata var. *paludosa*, *B. integrifolia* ve *B. plantaginea*) kurutulmuş ve toz edilmiş çiçekli topraküstü kısımların hazırlanan metanol ekstresi ve metanol ekstresinden hareketle elde edilen kloroform, etil asetat ve su alt fraksiyonları üzerinde antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyonu (tirozinaz, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz) ve sitotoksik aktivite testleri ile biyolojik aktivitelerinin incelenmesi; biyolojik aktivite çalışmalarında daha yüksek aktivite gösteren türün metanol ekstresi ve alt fraksiyonları üzerinde çeşitli kromatografik yöntemler yardımıyla izolasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Botanik Bilgiler

4.1.1. Brassicaceae (Cruciferae) Familyası

Bu familyada bulunan bitkiler otsu, nadiren çalı şeklindeki bitkilerdir. Yapraklar altanen nadiren opozit ve stipulasızdır. Çiçekler hermafrodit, hipogin, 2 simetri düzlemine sahiptir. Sepaller 4 parçalı, serbetir. Petaller 4 parçalı, serbest, genellikle turnaklıdır. Stamenler 6 tane, tetradinam, nadiren 4 veya 2 tane, filamentler sıklıkla kanatlı, ekli veya dişlidir. Nektaryumlar stamenlerin tabanında yer alır. Ovaryum sinkarp, 2 karpelli, genellikle bilokülerdir. Meyve tipi kapsüldür, iki çenetle aşağıdan açılır, nadiren lomentuma benzer veya açılmaz. Çekirdekler müsilaıdır.

Bu familyanın meyveleri karakteristik olup, olgunlaşmış meyveler türlerin tanınmasında önemli yer tutar (43).

4.1.2. *Barbarea* Cinsi

İki yıllık veya çok yıllık bitkilerdir, tüysüz veya basit tüylüdür. Sepaller biraz şişkin. Petaller sarı, kurduğunda beyazdır. Filamentler eksizdir. Ovaryum yaklaşık 30 ovüle kadar bulundurabilir. Meyve 4 köşeli veya düz silikvadır. Çekirdekler her hücrede bir sıra şeklindedir. Stilus kısa, stigma baş şeklindedir. Türlerin teşhisi için meyve ve çiçekleri ile birlikte taban yaprakları da bulunmalıdır, toplama sırasında çiçeklerin rengi not edilmelidir.

1. Taban yaprakları 0-1(-2) parçalı yan yapraklı

2. Silikva dik

3. Silikva düz, 2 mm veya daha geniş

8. platycarpa

3. Silikva silindirik, veya 4 açılı, yaklaşık 1 mm genişliğinde

4. Silikva yer yer boğumlu; alt yaprakların kulakçıkları yan yaprakçıklardan daha geniş

5. auriculata

4. Silikva düz, alt yaprakların kulakçıkları yan yaprakçıklardan daha küçük

6. lutea

2. Silikva dik-yayılmış

5. Silikva silindirik, (17-) 20-40 mm; taban yaprakları geniş, düz, kanatlı petiol

7. plantaginea

5. Silikva düz, 10-15(20-) mm; taban yaprakları geniş, düz, kanatlı petiolsüz

6. Tüm yapraklar tam veya çoğunda undulat-krenat, meyveler 2 mm genişliğinde

9. integrifolia

6. Bazı yapraklar dentat veya pinnatifit; meyveler 1 mm genişliğine kadar

10. minor

1. Yan yaprakları 2(-3)-10 parçalı taban yapraklar

7. Üst gövde yaprakları pinnatisekt

8. Gövde aşağı doğru sarkık uzun tüylü; tüm yaprakların segmentleri lineerden lanseolata kadar

4. trichopoda

8. Gövde çıplak; üst yaprakların segmentleri eliptikten orbikulata kadar

9. Silikva dik; taban yaprakları 3-5 parçalı yan yaprakçıklı

3. intermedia

9. Silikva yaygın; taban yaprakları 6-10 parçalı yan yaprakçıklı

2. verna

7. Üst gövde yaprakları loblu veya dentat, pinnatisekt değil

1. vulgaris

4.1.3. *Barbarea auriculata* var. *paludosa*

Çok yıllık, otsu, gövdesi 30 cm, dallanmış, diktir. Taban yaprakları uzun saplı, uç yaprakçıkları orbikulattan ovat şeklindedir. Alt yapraklar geniş uç yaprakçıklı ve 1-2 parçalı yan yaprakçıklı, uzak, semi-ampleksikaul kanatlar, yan yaprakçıklardan daha geniştir. Gövde yaprakları geniş kanatlı tam veya dentatdan loblara ayrılabilir. Gövde aşağıda aşağı sarkık sert tüylü- kılsı tüylüdür. Petaller sarı, 6-8 mm'dir. Silikva dik, boğumlu, 15-20×0.5-1 mm. Stilus 3 mm. Haziran ayı türün çiçeklenme dönemidir (10).

Endemik bir tür olup; nemli yerlerde yetişir.

Bulunduğu yer: **B7 Erzincan:** Tercan'dan Aşkale arasında, 1650 m (Resim 1).



Resim 1. *Barbarea auriculata* var. *paludosa*

4.1.4. *Barbarea plantaginea*

Gür, iki yıllık otsu bitkilerdir. Gövdesi tüysüz, 25-60 cm, sık sık üst kısımda dallanmıştır. Ovat-orbikulat, geniş uç yaprakları olan alt yapraklar, geniş, düz kanatlı bir sap üstündedir, kanatçıklar bazen 1-2 parçalı küçük yan yaprakçıklara genişler. Daha üst gövde yaprakları amplexikaul, krenattan dentata doğrudur. Petaller sarı, 5-7 mm. Silikva yaygın, silindirik, bazen boğumlu, 24-35×1,5-2 mm. Çiçeklenme dönemi Nisan-Haziran aylarıdır. Nemli yerlerde, nehir kenarlarında, 1000-2100 m yükseklikte yetişir (10).

Bulunduğu yerler: **A4 Ankara:** Hacıkadın Vadisi, Keçiören, **A5 Amasya:** Amasya, Akdağ 1890:1896, **A7 Gümüşhane:** Gümüşhane Sorda 1894:5654, **A8 Erzurum:** Pasinler'den Horasan'a giderken, 1650 m, **A9 Çoruh:** Kütül, Ardanuç, **B3 Konya:** Sultan Dağı 1400-1900 m, **B4 Ankara:** İncesu, **B6 Maraş:** Binboğa Dağı, Göksun, 1900 m, **B7 Tunceli:** Pülümür 1550 m, **B8 Erzincan:** Tercan'dan Aşkale'ye giderken, 1650 m, **B9 Van:** Erek Dağı 2100 m, **C7 Denizli:** Honaz Dağı 1000 m, **C3 Antalya:** Bey Dağı, **C5 Seyhan:** Gülek Boğazı, **C6 Hatay:** Hasan Veyli 1000-1600 m (Resim 2).



Resim 2. *Barbarea plantaginifolia*

4.1.5. *Barbarea integrifolia*

Çıplak, çok yıllık, otsudur. Gövdesi 40 cm'e kadar, diktir. Daha alt yapraklar oblong-eliptik veya oblong-spatulat, basit, tamdır. Gövde yaprakları oblong- eliptik, tamdır. Çiçekler sarı, petaller 8-9 mm. Meyveye dönüşen çiçekdurumu yoğundur. Silikva yassı, yaygın, 12-15×2 mm. Çiçeklenme dönemi Haziran ayıdır. Göl kenarlarında yetişir. Endemik bir türdür (10).

Bulunduğu yer: **A7** Gümüşhane (Resim 3).



Resim 3. *Barbarea integrifolia*

4.2. *Barbarea* Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Barbarea türlerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda, glukosinolatlar ve hidroliz ürünleri (12-24), flavonoidler (25-27), saponozitler (21, 28-35), fenolik asitler (36), yağ asitleri, protein, şeker ve şeker türevlerinin (20) bulunduğu gösterilmiştir.

4.2.1. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Glukosinolatlar ve Hidroliz Ürünleri

B. vulgaris'in yaprakları üzerinde yapılan çalışmada 2'si fenolik izomer olmak üzere 3 adet glukosinolat ile birlikte hidroliz ürünlerinin izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen Epiglukobarbarin [(R)-2-hidroksi-2-feniletilglukosinolat] ve *m*-hidroksi Epiglukobarbarin'in hidrolizi sonucu oksazolidin-2-tiyon, *p*-Hidroksi Epiglukobarbarin'in hidrolizi sonucu tiazolidin-2-on ürünlerinin meydana geldiği saptanmıştır (12, 24).

B. vulgaris'in tohumları üzerinde elektrosprey iyonlaştırma ile birleştirilmiş ters faz sıvı kromatografisi-Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonans kütle spektrometresi (RPLC-ESI FTICR MS) ile yapılan analizlerde glukobarbarin, glukonasturtin ve glukobrasisin 6'-izoferul esterlerinin varlığı saptanmıştır (13).

B. vulgaris ve *B. verna* yapraklarında üretilen metabolitlerin incelendiği çalışmada Nasturleksin C, Nasturleksin D ve bunların sülfoksit türevleri izole edilerek spektroskopik yöntemlerle yapıları aydınlatılmıştır (15).

B. verna tohumları üzerinde yapılan çalışmalarda glukonasturtin (2-feniletilglukosinolat) izolasyonu gerçekleştirilmiştir (16, 18, 20).

Fahey ve ark. tarafından yapılan çalışmada *B. intermedia*'nın glukoputranjivin, glukoiiberin, glukonasturtin ve sinigrin; *B. orthoceras*'ın glukonasturtin ve glukobarbarin; *B. praecox*'un neoglukobrasisin; *B. stricta*'nın glukoputranjivin, glukonasturtin ve sinigrin; *B. verna*'nın glukosinalbin ve glukonasturtin; *B. vulgaris*'in glukobarbarin, glukobrasisin, glukoiiberin, neoglukobrasisin ve glukonasturtin içerdiği belirtilmiştir (17).

Matthaus ve ark. tarafından HPLC-UV/ESI-MS-MS ile yapılan çalışmada *B. vulgaris* tohumlarında desülfoglukonasturtin, desülfobarbarin, desülfo-4-hidroksiglukobrasisin ve desülfoglukobrasisin; *B. verna* tohumlarında desülfoglukonasturtin varlığı tespit edilmiştir (19).

Perez ve ark.'nın *Barbareae* türlerinin yaprak yüzeyinde yapmış oldukları çalışmada, preparatif HPLC yardımıyla, *B. rupicola* ve *B. verna*'dan glukonasturtin ve glukobrassisin; *B. vulgaris*'den glukonasturtin, glukobrasisin ve glukobarbarinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (41).

Agerbirk ve ark. tarafından yapılan çalışmada, *B. vulgaris* var. *arcuata* köklerinden yeni bir indol glukosinolat olan 1,4-dimetoksiglukobrassisin (1,4-dimetoksi indol-3-ilmetilglukosinolat) izole edilmiştir (23).

B. vulgaris var. *arcuata*, *B. vulgaris* var. *vulgaris*, *B. intermedia*, *B. verna*, *B. stricta*, *B. bracteosa*, *B. plantaginea* ve *B. australis* türlerinin çekirdekleri üzerinde yapılan çalışmada tüm türlerde glukonasturtin, glukosibarin, glukobarbarin, glukobrassisin ve 6'-izoferulol- glukonasturtin varlığı saptanmıştır. Ayrıca *B. vulgaris* var. *arcuata*, *B. intermedia*, *B. stricta*, *B. bracteosa*, *B. plantaginea* ve *B. australis* türlerinde desülfo glukosibarin ve glukobarbarinin 6'-izoferul türevlerinin varlığı saptanırken; *B. plantaginea*'da 6'-izoferulol- glukobrassisin varlığı saptanmıştır (33, 44).

4.2.2. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Flavonoitler

B. vulgaris'in topraküstü kısımları üzerinde yapılan çalışmada ilk kez Brassicaceae familyasından kersetin 3'-O-metil-3-O- β -D-glukopiranozil- [(1-6)- α -L-ramnopiranozit], kersetin 3-O- β -D-glukopiranozil-7-O- α -L-ramnopiranozit, kersetin 3'-O-metil-7-O- α -L-ramnopiranozit, kersetin 3'-O-metil-3-O- β -D-glukopiranozit, kemferol 3-O- β -D-glukofuranozit, luteolin-6-C- β -D-glukopiranozit, luteolin 3'-O-metil-6-C- β -D-glukopiranozit olmak üzere toplamda 7 adet flavonoit izolasyonu gerçekleştirilmiştir (25).

Yapılan literatür çalışmalarında *B. arcuata*'nın çiçeklerinden izoramnetin, izoramnetin 3- β -D-glukopiranozit, izoramnetin-3-D-glukozil-6- β -D-glukozit, kemferol ve kersetin izole edildiğine rastlanmıştır (26).

B. vulgaris'in P ve G olmak üzere iki kemotipi bulunmaktadır. *B. vulgaris*'in G kemotipinde yapılan çalışmada 2'si yeni olmak üzere 4 adet flavonoit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunlar kemferol-3-O-(2,6-di-O- β -D-glikopiranozil)- β -D-glikopiranozit ve kersetin-3-O-(2,6-di-O- β -D-glukopiranozil)- β -D-glukopiranozit-7-O-R-L-ramnopiranozit'dir (27).

4.2.3. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Saponozitler

B. vulgaris yaprakları üzerinde yapılan izolasyon çalışmasında hederagenin ve oleanolik asit sellobiyozit saflaştırıldığı kaydedilmiştir (28, 30, 34, 41).

Nielsen ve ark. tarafından *B. vulgaris* var. *arcuata* tohumları üzerinde yapılan çalışmada 3-O-sellobiyozil-kokalik asit, 3-O-sellobiyozil-gipsogenin ve 3-O-sellobiyozil-4-epihederagenin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (29).

Shinoda ve ark. tarafından parazitlerin beslenmesini engelleyici aktivite yönlendirmeli olarak yapılan izolasyon çalışmasında *B. vulgaris* yapraklarından 3-O-[O- β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glukopiranozil]-hederagenin elde edildiği bildirilmiştir (31).

B. verna yapraklarının yüzeyinde yapılan çalışmada 3-O- β -sellobiyozil-hederagenin izole edilerek yapı tayini gerçekleştirilmiştir (41).

B. vulgaris üzerinde yapılan çalışmada hederagenin, 4-epihederagenin, oleanolik asit ve gipsogenin sellobiyozit türevlerine rastlanmıştır (33, 34).

4.2.4. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Fenolik Asitler

Fraisse ve ark.'nın yapmış oldukları HPLC çalışmasında, *B. intermedia*'nın içerdiği fenolik bileşiklerin klorojenik asit, 3,5-dikafeilkinik asit ve 1,5-dikafeilkinik asit olduğunu saptanmıştır (36).

4.2.5. *Barbarea* Türlerinde Bulunan Yağ Asitleri, Protein ve Şeker Türevleri

B. vulgaris ve *B. verna* tohumlarının beslenme ve teknolojik kalitesini değerlendirmek için yapılan çalışmada türlerin kimyasal bileşenleri incelenmiştir. Türlerin aminoasit içeriği sistin, metiyonin, aspartik asit, treonin, serin, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, valin, izolösin, lösin, tirozin, fenilalanin, histidin, lizin, arjinin ve amonyum olarak belirlenirken; yağ asitlerinden erusik asit, linoleik asit ve oleik asitin bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Şeker ve şeker türevlerinden ramnoz, fukoz, arabinoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, glukoz ve üronik asit tespit edilmiştir (20).

4.3. *Barbarea* Türlerinin Kullanılışı ve Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Ülkemizde yetişen ve halk arasında “Nicarotu” adı ile bilinen *B. vulgaris* yapraklarının yara iyi edici ve idrar arttırıcı olarak kullanılmakta olduğu, genç

yapraklarının ise salata olarak tüketildiği bilinmektedir (45). Ayrıca *B. vulgaris*'in uyarıcı, diüretik ve balgam söktürücü olarak da kullanıldığı ve yapraklarından elde edilen suyun, tütün yapraklarından nikotini uzaklaştırmak için kullanıldığı bildirilmektedir (25).

4.3.1. Antitiroit Etki

Barbarea ve *Reseda*'nın çeşitli türlerinden elde edilen ve glukosinolat türevi olan barbarin (feniltiyo-oksazolidon)'in antitiroidi etkisinin araştırıldığı çalışmada, sıçan ve insanlarda, iyodun alımını inhibe ederek tiroit hormonunun sentezini baskıladığı bilinen goitrinle karşılaştırılmış ve barbarinin goitrin kadar etkili olduğu bulunmuştur (37).

4.3.2. Tirozinaz İnhibitör Etki

B. orthocerus toprak üstü kısımlarında biyolojik aktivite rehberli izolasyon çalışmaları sırasında elde edilen barbarinin tirozinaz enzimi üzerine inhibitör etkisi incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak kojik asitin kullanıldığı çalışmada, kojik asit mantar ve sıçan tirozinazı üzerine olan inhibitör etkisi IC_{50} değerleri 3.4×10^{-5} M ve 6.0×10^{-5} M olarak bulunurken; barbarinin IC_{50} değerleri 4.2×10^{-5} M ve 4.8×10^{-5} M olarak bulunmuştur. Sonuçlara bakıldığında barbarinin de kojik asit kadar tirozinaz inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir (14).

4.3.3. Antifungal Etki

Bitkilerin çeşitli uyaranlara (mikroorganizmalar, funguslar, fiziksel ajanlar) karşı ürettiği antimikrobiyal ve antifungal etkili bileşikler fitoaleksinler olarak bilinmektedir.

B. vulgaris ve *B. verna* yapraklarından izole edilen glukosinolatların, Nasturleksin C, Nasturleksin D ve bunların sülfoksit türevleri, Crucifer patojenleri olarak bilinen *Alternaria brassicicola*, *Leptosphaeria maculans* ve *Sclerotinia sclerotiorum* üzerinde antifungal etki gösterdiği; bitkilerin patojenlerle savunmasında, diğer bitkilere savunma yollarının aktarılabilmesi bu türlerin tarımsal açıdan önemli birer kaynak haline getirmiş olduğu bildirilmiştir (15).

B. vulgaris yapraklarında bulunan üç saponin ve iki sapogeninin mikroorganizmalara karşı olan potansiyel rolleri beş bit böceği hattı kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmada parazitlerin konak bitkinin besinini kullanabilme yeteneğine olan etkileri değerlendirilmiştir. Bit böceğinin bu bitki üzerinde yaşama

kabiliyeti, dominant R-genleri tarafından kontrol edilmektedir. Duyarlı bir genotip (rr) bitki üzerinde yaşayamazken dirençli genotipler (RR ve Rr) yeni konakçı bitkiyi kullanabilmektedir. Bu türden izole edilen bileşikler arasında hederagenin sellobiyozit beslemeyi inhibe ederken, oleanolik asit sellobiyozitin etkisinin daha zayıf olması aglikonların aktif olmadığını göstermiştir (28).

B. vulgaris var. *arcuata* tohumlarından izole edilen 3-O-sellobiyozil-kokalik asit, 3-O-sellobiyozil-gipsogenin ve 3-O-sellobiyozil-4-epihederageninin türün *Phyllotreta nemorum* direnci ile ilişkili bileşik olduğu bildirilmiştir (29, 33).

B. vulgaris var. *arcuata* yapraklarından izole edilen 3-O- β -sellobiyozil-oleanolik asit ve 3-O-[O- β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glukopiranozil]-hederageninin *Plutella xylostella* larvalarına karşı dirençten sorumlu olduğu ve saponin miktarındaki azalmaya bağlı olarak türün direncinin azaldığı kaydedilmiştir (30, 31).

Bugüne kadar elde edilen bilgiler, *Barbarea* türlerinin böceklerle karşı olan direncinin içerdiği saponinler ile ilgili olduğunu kapsamaktadır. Ancak yapılan bu çalışma ile birlikte böcek direncinde flavonol glikozitlerinin de sorumlu olduğu ve diğer sekonder bileşiklerle birlikte sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir (27).

Brassicaceae üzerinde bulunan *P. xylostella* gibi konakçı türlerin bitkiyi tanımada glukosinolatların rol oynadığı bilinmektedir. *Barbarea* türlerinde glukosinolatlarla birlikte larvaların beslenmesini önleyerek hayatta kalmalarını engelleyen saponinler bulunmaktadır. *Barbarea* türlerinin yapraklarında iki seçenekli yumurtlama testlerinin yapıldığı çalışmada, türlerin glukosinolat ve saponin içeriğindeki değişikliklerin, konakçının hem yapraklar üzerinde yumurtlamasını uyarıcı hem de türlerin parazite karşı gösterdiği direnci etkilediği gösterilmiştir (21, 41).

4.3.4. Antinörodejeneratif Etki

B. orthoceras türünün sülfurafan içeriğine bağlı olarak, çeşitli hücre tiplerinde NO sentezini inhibe ederek anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunun gösterildiği çalışmada, bu bitkiden alınan ekstraktların ve ilgili türün Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi NO'ya bağlı nörodejeneratif hastalıklarda önleyici etkisinin olabileceğini düşündürmüştür (40).

4.3.5. Anti-inflamatuvar Etki

B. verna tohumlarından hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağın 2- Fenil etilizotiyosiyanat (PEITC) açısından zengin olduğu ve bu türün tohumlarından hazırlanan preparatın anti-inflamatuvar etkisinin olduğu *in vivo* olarak deney hayvanlarında karragen ile oluşturulan sıçan pençesi ödemi azaltma, *in vitro* olarak lipopolisakkaritle uyarılmış fare makrofaj hücre dizisinde proinflamatuvar gen ekspresyonunu (COX-2, iNOS ve IL-1 β) baskılama yeteneği ve nitrik oksit üretimi üzerindeki etkinliği bilinen non steroidal anti-inflamatuvar ilaç olan aspirin ile karşılaştırılmış ve anti-inflamatuvar etkinliğinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır (38, 39).

Sekiz türden elde edilen ekstrelerin sülforafan içeriğinin belirlendiği ve bu bileşiğin biyolojik aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, BV-2 hücrelerinde canlılık ve NO inhibisyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için LC-MS/MS ve MTT testleri uygulanmıştır. Deneylerin sonucunda NO üretimini % 52 oranında inhibe ederek en iyi etkiyi gösteren türlerden birinin *B. orthoceras*'e ait ekstre olduğu saptanmıştır (40).

4.4. Serbest Radikal Türleri ve Kaynakları

Dış orbitalinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan molekül ya da atomlar serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Bu moleküllerin, sahip oldukları eşlenmemiş elektronlarından dolayı oldukça reaktif ve kararsız oldukları bilinmektedir (46). Bu sebeple protein, lipit, DNA, nükleotit ve koenzimler gibi çevrelerindeki birçok molekülle reaksiyona girme eğilimleri yüksektir ve zararlı etkiler meydana getirmektedirler (3, 47, 48). Vücutta meydana getirmiş olduğu zararlar sonucunda, başta yaşlanma olmak üzere, kalp damar hastalıkları, katarakt, felç, romatoid artrit, diyabet, çeşitli kanser türleri, bağışıklık sisteminin zayıflaması ve sinir sistemi hastalıkları gibi birçok kronik hastalığın meydana gelmesine neden olmaktadır (49).

Serbest radikaller oksijen, kükürt, klor ve azot kaynaklı olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Tablo 2). Oksijen kaynaklı ise reaktif oksijen türleri (ROS); azot kaynaklı ise reaktif azot türleri (RNS); kükürt kaynaklı ise reaktif kükürt türleri (RST); klor kaynaklı ise reaktif klor türleri (RKT) olarak isimlendirilmektedir (50).

ROS ve RNS'nin bir kısmı serbest radikal iken; bir kısmının patolojik ve fizyolojik durumlar altında canlılar tarafından üretilen ve canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilen nonradikalik molekül türlerine dönüştüğü

bilinmektedir. Bu türler son orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulundurmadığı için radikalik özellik göstermemektedirler (48, 51).

Tablo 2. Radikal-nonradikal oksijen ve azot türleri

Radikal Türleri	Nonradikal Türler
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Nonradikal Oksijen Türleri
- Hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) - Süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$) - Peroksil ($\text{ROO}^\cdot$) - Alkoksil ($\text{RO}^\cdot$) - Hidroperoksil ($\text{HO}_2^\cdot$) - Lipit peroksil ($\text{LOO}^\cdot$)	- Hidrojen peroksit (H_2O_2) - Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) - Ozon (O_3) - Hipokloröz asit (HOCl) - Hipobromöz asit (HOBr)
Reaktif Azot Türleri (RNS)	Nonradikal Azot Türleri
- Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) - Azot dioksit ($\text{NO}_2^\cdot$)	- Nitrik asit (HNO_2) - Azotdioksit (NO_2) - Peroksinitrit ($\text{NOOO}^\cdot$) - Nitroksil katyonu (NO^+) - Nitroksil anyonu (NO^-) - Di azot tetroksid N_2O_4 - Diazot triksid N_2O_3 - Peroksinitrik asit (ONOOH) - Nitronyum katyonu NO_2^+ - Nitril klorid NO_2Cl - Alkil peroksinitrit (ROONO)

Organizmada meydana gelen serbest radikallere endojen veya ekzojen kaynakların sebep olduğu bilinmektedir (52-58).

Serbest radikal üretimine sebep olan endojen kaynaklar şu şekilde özetlenebilir:

- Mitokondride oksijenli solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler tarafından serbest radikallerin yan ürün olarak oluşması,
- Herhangi bir inflamasyon durumunda sitokinlerin nötrofil ve makrofajları uyarmasıyla birlikte serbest radikallerin oluşması,
- Lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynakların serbest radikal oluşturmaları,

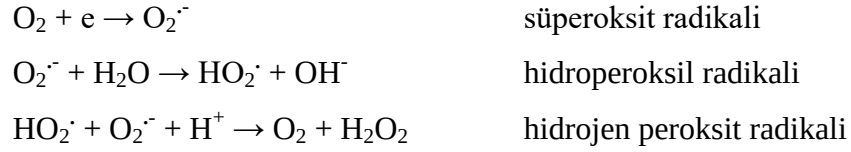
- Düz kas hücrelerinde, trombositler ve araşidonik asit metabolizması sırasında serbest radikallerin üretilmesi,
- Zihinsel stres veya yorgunluğun sebep olduğu serbest radikal üretimi,
- L-DOPA, noradrenalin, adrenalin ve substratları gibi biyomoleküllerin oksidatif hasar oluşturması,
- İmmun sistem hücrelerinin patojenlere cevap olarak ROS ve oksiradikallerin üretilmesi.

Serbest radikaller, UV, gama, mikrodalga ve X ışınları, orman yangınları ve volkanik faaliyetler gibi meydana gelen çevresel felaketler, temizlik ürünleri, sigara ve egzoz dumanı, alkol ve sigara kullanımı gibi sebeplere bağlı olarak da meydana gelmektedir. Serbest radikal üretimine sebep olan bu kaynaklar, ekzojen kaynaklar olarak bilinmektedir (59).

Oksijenin canlıların hücresel faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için kullandıkları enerjinin üretiminde yani yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olduğu bilinmektedir. Bu enerjinin üretimi sırasında, serbest oksijen radikalleri kendiliğinden açığa çıkan doğal yan ürünlerdir ve hücrede yüksek miktarlara ulaştığında zararlı maddelere dönüşebilmektedirler. Üç önemli ROS olarak bilinen süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali, mitokondride sürekli olarak gözlenen normal metabolik ürünlere örnek olarak verilmektedir (3).

Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü olan süperoksit radikali, moleküler oksijenin tek bir elektron indirgenmesiyle oluştuğu, hem oksitleyici hem de indirgeyici özellik gösterdiği ve diğer radikallerle karşılaştırıldığında daha kararlı olduğu bilinmektedir. Süperoksit radikalının vücut için önemi, vücutta hidrojen peroksit oluşumundan ve geçiş metallerinin indirgenmesinden sorumlu olmasından ileri gelmektedir.

Süperoksit radikalının düşük pH'da protonlanarak daha reaktif bir oksidan ajan olan hidroperoksil radikalini oluşturduğu bilinmektedir. Daha sonra bu radikal, süperoksit radikali ile birleşerek birinin oksidasyonu söz konusu iken diğerinin indirgenmesi sonucu moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelmektedir (60, 61).

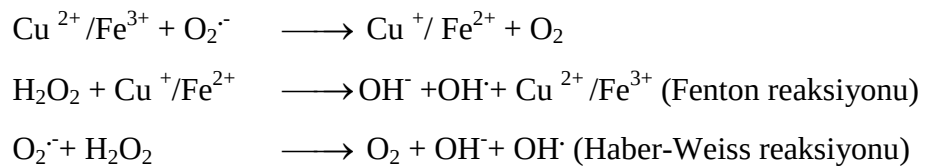


Süperoksit radikali, vücutta başlıca 4 şekilde üretilmektedir:

1. Aktive edilen fagositik hücreler mikroorganizmaların uzaklaştırılması sırasında yüksek miktarda süperoksit üretimine neden olmaktadır (62, 63).
2. Mitokondride solunum sırasında zincir reaksiyonlarından kaçan bazı elektronlar direk oksijenle reaksiyona girerek süperoksit oluşturabilmektedir (64).
3. Tiyoller, hidrokinoonlar, katekolaminler, indirgenmiş nükleotitler, flavinler ve tetrahidrofolat gibi indirgeyici özellik gösteren biyomoleküler aerobik ortamda oksijene elektron transfer ederek kendileri oksitlenirken süperoksit radikalinin oluşmasına sebep olmaktadır (65).
4. Demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi geçiş metal iyonlarının serbest radikal oluşturan etmenlerdendir. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu ile birlikte süperoksit meydana gelmektedir. Fe, oksijen taşınması, ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezi gibi önemli canlılık faaliyetlerinde görev almasına rağmen; serbest halde iken hücrelerde toksik özellik göstererek lipid oksidasyonunu teşvik edebilmekte veya DNA moleküllerine saldırabilmektedir (46).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksitin bir elektron ya da moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucunda oluşan nonradikal oksijen türüdür (66, 67). Hidrojen peroksit, membranları geçerek sitozole difüze olabildiğinden dolayı uzun ömürlü olduğu kabul edilmektedir.

Oksitleyici ve indirgeyici kapasitesi oldukça zayıf olmasına karşın; geçiş metal iyonları varlığında Haber-Weiss reaksiyonu olarak da bilinen ve en reaktif oksidan olan hidroksil radikalini meydana getirmektedir (64, 68).

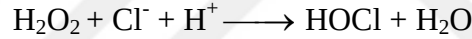


Biyolojik ve kimyasal sistemlerde, hidroksil radikalının oluşumuna farklı kaynakların ve mekanizmaların sebep olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmaardan biri, sulu ortamda iyonize radyasyonla su moleküllerinin iyonlaşması sonucu hidroksil radikalının oluşumu; bir diğeri hidrojen peroksitin metal iyonları (Fe^{2+} , Cu^+ , Mn vb.) varlığında tek bir elektron aracılığıyla indirgenmesi sonucu hidroksil radikalının oluşumudur (69, 70).

Hidroksil radikalının yarılanma ömrünün 10^{-9} sn olması, ona ROS arasında en güçlü radikal olma özelliği kazandırmaktadır (48).

Son derece reaktif olan hidroksil radikali çoğu canlı hücrede oluşmakta ve yüksek derişimlerde aminoasitler, lipidler, karbohidratlar ve nükleik asitler dahil tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasarlar meydana getirebilmektedir (46, 71).

Hipoklorik asit (HOCl), vücutta bağışıklık sistemin aktif olduğu durumda miyeloperoksidaz enzimi tarafından, fagositik hücrelerde (makrofajlar, nötrofil ve eozinofil gibi granülositler) açığa çıkan ve dokularda hasarlar oluşturan güçlü, oksidan bir madde olarak tanınmaktadır (63, 72).



Oksijen alkil radikalleri ile reaksiyona girerek alkil peroksitlerini (ROOH), alkil peroksitleri de parçalanarak peroksil ve alkil radikallerini oluşturduğu bilinmektedir. Bazı peroksil radikalleri süperoksit oluşumu durdurabilir ya da tekrar peroksil radikalleriyle reaksiyona girerek singlet oksijeni üretimine neden olabilmektedir (46, 63).

Yapısında eşleşmemiş elektron bulundurmadığından nonradikal oksijen türleri arasında sayılan singlet oksijen (O_2^1), yüksek enerji durumunda oksijen elektronlarından bir tanesinin başka bir orbitale geçmesi sonucu meydana gelmektedir. Ayrıca hücrelerde, O_2 'li ortamda, pigmentlerin ışığı absorblaması, bazı sitokrom p450 tepkimeleri, hidroperoksitlerin metallerin katalizörlüğünde yıkımı ve spontan olarak oluşan dismutasyon tepkimeleri sırasında oluşabildiği bilinmektedir (60, 61, 73, 74).

Organizmada hücrelerin iletişiminde, kan basıncının düzenlenmesinde, düz kasların gevşemesi ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde biyolojik sinyal molekülü olarak görev aldığı bilinen nitrik oksit (NO), vücutta muskarinik, histamin reseptörleri

gibi bazı reseptörlerin uyarılmasıyla nitrik oksit sentetazlar (NOS) tarafından L-Arjinin ve oksijenden üretilmektedir (75-77). Sulu ortamdaki yarı ömrünün çok kısa olması sebebiyle oldukça reaktif bir radikal olarak tanınmaktadır. NO'nun sebep olduğu toksik etkinin şiddeti, süperoksit anyon ile birleşme yeteneğine bağlı olduğu ileri sürülmektedir (61).

NO, hücre dışında su ve oksijenle reaksiyona girerek, nitrat ve nitrit anyonlarının oluşmasına sebep olmaktadır (48). Tek bir eşlenmemiş elektronu bulunmasına rağmen birçok molekülle reaksiyona girmediği, bazı serbest radikallerle de reaksiyonu sonucu daha az reaktif ürünlerin oluşmasını sağladığı bilinmektedir (61, 78).

İmmün sistem hücrelerinde, inflamasyon varlığında süperoksit ile nitrik oksit oluşmakta ve bu moleküllerin reaksiyonu sonucu çok daha fazla oksidan özelliğe sahip peroksinitrit anyonu (ONOO^-) meydana gelmektedir. Peroksinitrit anyonu potansiyel bir oksidasyon ajanı olarak fizyolojik pH'da azotdioksit ve hidroksil benzeri radikaller meydana getirerek DNA'nın parçalanmasına ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir (61, 79).

4.5. Serbest Radikallerin Yararlı Etkileri

Biyolojik süreçlerde, çoğu hücresel yanıtı karşı fizyolojik bir cevabın karşılığında O_2^- , H_2O_2 ve NO molekülleri üretilmektedir. Organizmada meydana gelen ROS ve RNS'nin düşük miktarlarda yararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu yararlı etkilere enfeksiyon durumunda fagositik cevabın oluşturulması, kanserli hücrelerin sitotoksik lenfositler ve makrofajlar tarafından yok edilmesi, sitokrom p450 tarafından yabancı maddelerin vücuttan uzaklaştırılması, mitokondrilerde enerji üretimi ve hücre büyümesi örnek olarak verilebilir. Hücresel sinyallerin düzenlenmesinde (çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin uyarılması, kalsiyumun intrasellüler depolardan serbest bırakılması, tirozinin fosfatlanmasının uyarılması, tirozin kinaz aktivasyonu, bazı sitokinler ve büyüme faktörü sinyallerinin aktive edilmesi vb.) de rol aldıkları söylenmektedir. Bunlarla birlikte ROS; prostaglandin ve tiroid hormonları gibi biyomoleküllerin sentezinde de görev almaktadırlar.

NO endotel hücrelerinde, lökosit adezyonu, trombosit kümeleşmesi, angiogenesis, pıhtılaşma ve damar düz kaslarında kan basıncını dengelenmesinde önem arz etmektedir. Nöronlarda üretilen NO'nın sinir sisteminin çevresel değişikliklere ve

hasarlanmaya karşı nörofiziksel ve nörokimyasal uyum geliştirme yetisinde (nöral plastisite) anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Makrofajlar tarafından üretilen NO ise immun yanıt oluşturulmasında görev alan önemli bir mediatör olduğu kabul edilmektedir (48, 59, 80-82).

4.6. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

Radikallerin hücrelerdeki miktarı onların neden oldukları etkilerle ilişkilendirilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda yararlı etkilerinden bahsetmek söz konusu iken; yüksek konsantrasyonlarda lipitler, membranlar, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler üzerinde zararlı etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasar başta yaşlanma olmak üzere kanser, diyabet, nörodejeneratif (Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi) bozukluklar, aterogenez, amfizem, bronşit, alkolik karaciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve iskemi gibi birçok sorunun ve hastalıkların komplikasyonlarının etyolojisinde rol alabildiği son yıllarda yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur (83, 84).

Serbest radikaller, deoksiriboz şekeri ve bazlarla çok kolay reaksiyona girebildiğinden DNA üzerinde hasarlar meydana getirmektedir. Aktive olmuş nötrofillerden salınan H₂O₂, hücre zarından geçerek çekirdeğe kadar ulaşır ve meydana getirdiği hidroksil radikali DNA bazlarıyla reaksiyona girmesi sonucu baz modifikasyonlarına yol açtığı bilinmektedir (85). DNA'da meydana gelen hasarlar onarım mekanizmalarıyla düzeltilmesine rağmen; bazı durumlarda bu bozukluklar onarılamamaktadır ve hücrelerde fonksiyon kaybı, mutasyon, yaşlanma ve hücre ölümünün meydana geldiği bildirilmektedir (86)

Serbest radikallerin hasara uğrattığı biyolojik moleküllerin başında lipitler gelmektedir. Serbest radikaller hücre zarında bulunan kolesterol ve doymamış yağ asitleri ile kolay bir şekilde tepkimeye girerek peroksidasyon ürünlerini meydana getirmektedir. Doymamış yağ asitlerinin radikaller tarafından oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak isimlendirilir ve hücrede kendiliğinden devam eden bir süreçtir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonu enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu olarak bilinmektedir.

Lipit peroksidasyonu membranlarda doymamış yağ asitlerinin konjuge çift bağlarından bir hidrojen atomunu uzaklaştırarak lipite radikalik özellik kazandırmasıyla

başladığı, daha sonra oksijen varlığında lipit radikallerinin lipit peroksi radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Lipit peroksi radikalleri, başka bir lipit radikalının oluşması sırasında açığa çıkan hidrojenle birleşerek lipit hidroperoksitlerine ve daha sonra yeniden lipit radikallerine dönüştüğü söylenmektedir.

Hücrede oluşan bu lipit peroksitlerinin yıkımı sonucu, en başta MDA olarak bilinen reaktif aldehit türlerinin açığa çıktığı ve hücrede veya diffüze olarak hücrenin başka bir kısmında hasarlar meydana getirebildikleri bilinmektedir. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelen MDA hücre zarının geçirgenliğini değiştirerek iyon alışverişini bozarak membran yapısında çapraz bağlanmalara ve enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (69, 87)

Serbest radikallerin proteinlerle reaksiyona girme yetenekleri, içerdikleri amino asitlerin yapılarıyla yakından ilişkilendirilmektedir. Yapısında triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi çifte bağ ve kükürt içeren amino asitlerin bulunması, proteinlerin serbest radikallerle olan etkileşimini kolaylaştırmaktadır (59, 88). ROS ve RNS'nin proteinlerde oluşturduğu oksidasyon, kükürt ve karbon merkezli organik radikallerin, kararlı ve son derecede reaktif olan protein hidroperoksitlerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Serbest radikallerin proteinlerle etkileşimi, immünoglobülin G ve albümin gibi disülfid bağı içeren biyomoleküllerin tersiyer yapılarında değişiklikler meydana getirmekte ve fonksiyonlarını bozmaktadır. Hemoglobin gibi hem yapısındaki proteinler serbest radikallerin oksidatif etkisiyle fonksiyonel olarak inaktif formlara dönüştükleri bilinmektedir. Örneğin; oksihemoglobin süperoksit radikali ile tepkimeye girerek oksijen bağlayamadığı form olan methemoglobine dönüşmektedir (60, 75-77).

Hidroksil gibi serbest radikaller, karbonhidratlar ile reaksiyona girer ve karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu çıkararak karbon merkezli radikal üretirler. Bunlar hiyalüronik asit gibi önemli moleküllerde, zincir kırılmalarına yol açar (88).

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde meydana getirdikleri hasarlar sonucunda polisakkarit depolimerizasyonu ve monosakkarit otooksidasyonu gibi karbon merkezli radikal ürünler meydana gelmektedir. Bu ürünler vücutta diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid

artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları gibi patolojik süreçlerde önemli rol oynadıkları ileri sürülmektedir (60, 75-77, 88). Ayrıca oluşan bu okzalaldehitlerin, DNA, RNA ve proteinlerle kolayca reaksiyona girerek antimitotik etki göstermeleri sonucunda kanser ve yaşlanmanın meydana geldiği söylenmektedir (89).

4.7. Canlı Sistemlerinde Bulunan Antioksidan Sistemler

Organizmada meydana gelen serbest radikallerin neden olduğu zararları önlemeye ve onları vücuttan uzaklaştırmaya çalışan savunma sistemlerine "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" adı verilmektedir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur ve bu dengenin radikaller lehine bozulduğu durumda, oksidanların vücuttaki miktarları artarak patolojik olaylar ortaya çıkmaktadır. Vücutta meydana gelen reaktif oksijen türlerinin üretimi ve savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması "oksidatif stres" olarak adlandırılırken; reaktif azot türlerinin üretimi ve savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması nitrozatif stres olarak adlandırılmaktadır. Şiddetli oksidatif stres hücre hasarı, hücre ölümü ve kanser gibi birçok hastalığına sebep olduğu bildirilmektedir. Nitrozatif stres sonucunda ise, nitrolizasyon reaksiyonlarına neden olur, bu reaksiyonlar da, proteinlerin yapısını değiştirerek fonksiyonlarını engeller (60, 75-77).

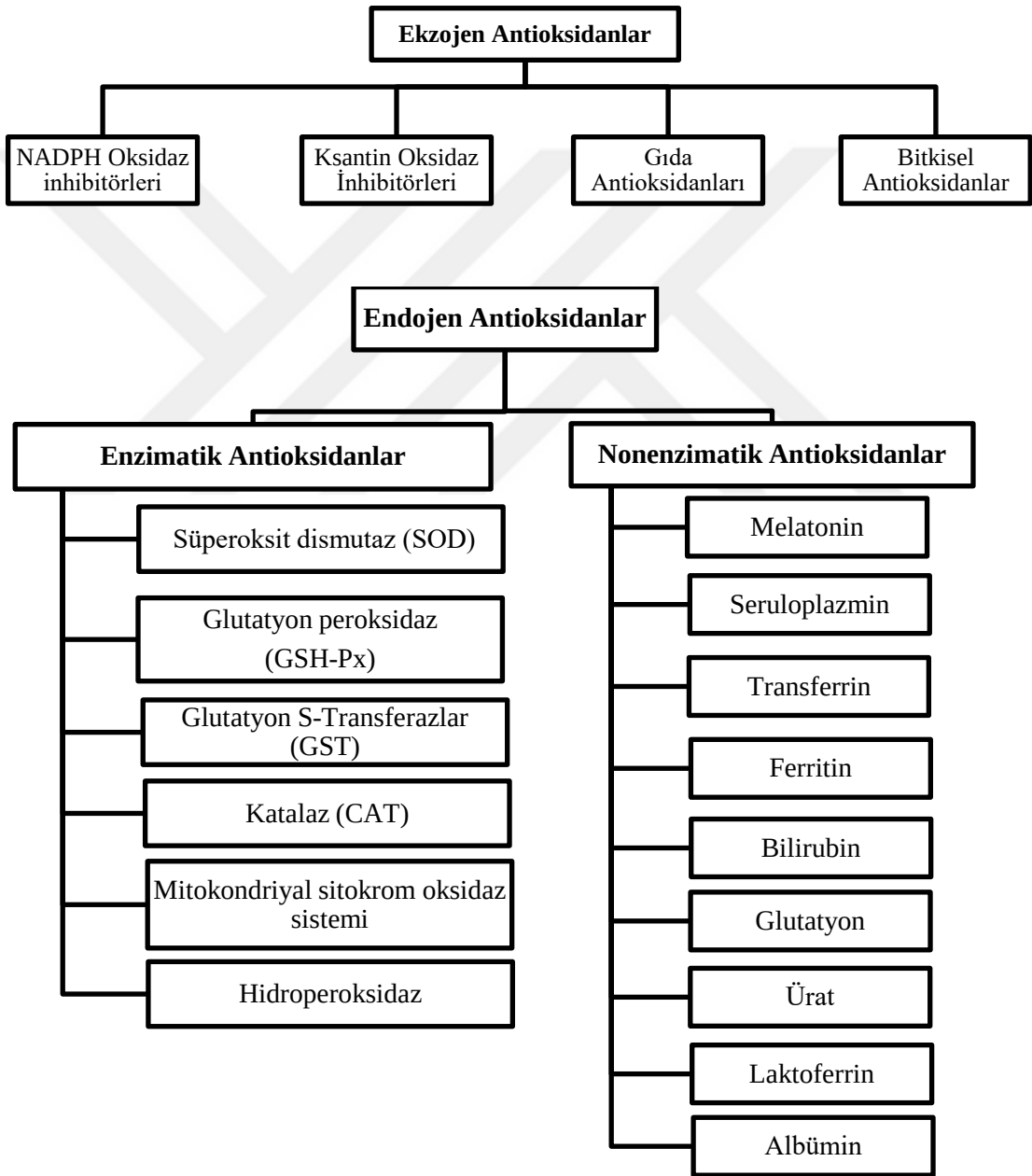
Antioksidanların dört farklı etki mekanizması bulunmaktadır ve etkilerini bir veya birden fazla mekanizmayla gösterebildikleri bilinmektedir. ROS'ları etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirerek gösterdikleri etki, antioksidanların toplayıcı etkisi olarak tanımlanmaktadır. Örneğin; antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller antioksidan etkilerini bu şekilde göstermektedirler (60, 75-77).

ROS'larla reaksiyona girerek onların oksidan özelliklerini azaltarak veya inaktif hale çevirerek gösterdikleri etki, antioksidanların bastırıcı etkisi olarak tanımlanmaktadır. Örneğin; vitaminler, α - tokoferol, metiyonin, ürik asit, β -karoten ve flavonoidler antioksidan etkilerini bu şekilde göstermektedir (60, 75-77).

ROS'ları bağlayıp, onların oksidatif gücünü ortadan kaldırarak gösterdikleri etki, antioksidanların zincir kırıcı etkisi olarak tanımlanmaktadır. Örneğin; hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller antioksidan etkilerini bu şekilde göstermektedir (60, 75-77).

Antioksidanların vücutta serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarmak suretiyle gösterdikleri etki, antioksidanların onarıcı etkisi olarak tanımlanmaktadır. Örneğin; DNA onarım enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz antioksidan etkilerini bu şekilde göstermektedir (60, 75-77).

Vücutta etki gösteren antioksidan sistemler, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (60, 75-77).



Şekil 1. Endojen ve ekzojen antioksidanların sınıflandırılması (Akkuş'tan, 60; Miser'den, 61)

4.7.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılmaktadır (87).

4.7.1.1. Enzimatik antioksidanlar

- **Süperoksit Dismutaz (SOD):** Süperoksit radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene katalizleyerek, ROS'lara karşı, savunmada ilk basamakta rol alan enzimatik bir antioksidan olarak bilinmektedir (58, 90).

İnsanlarda SOD'un üç farklı izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan ilki sitozolde lokalize olduğu bilinen bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD), ikincisi mitokondride olduğu bilinen manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn-SOD), üçüncüsü ekstrasellüler sıvıda bulunan bakır içeren süperoksit dismutaz (Cu-SOD) olarak tanımlanmaktadır (90, 91).

SOD'un oksijen tüketiminin fazla olduğu dokularda aktivitesinin daha fazla olduğu ve ekstrasellüler aktivitesinin düşük olduğu bilinmektedir.

- **Katalaz (CAT):** Her birinde prostetik grup olarak bir hem grubu ve bir NADPH molekülünün bulunduğu 4 protein alt biriminden meydana gelen bir hemoprotein olarak bilinmektedir (91, 92). Hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir (93). Katalaz, peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadır.

- **Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):** Glutasyon peroksidaz'ın, H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korumakta esas görevli olan sitozolik bir enzim olduğu bilinmektedir. Her birinde bir selenyum atomu bulunan dört protein alt biriminden meydana gelmektedir (90). Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 'in, lipit hidroperoksitlerinin ve DNA hidroperoksitlerinin detoksifikasyonu sırasında elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanmaktadır.

Memeli hücrelerinde, aktif bölgesinde selenyum bulunduran selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz (Se-GPx) ve selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz olmak üzere iki ana tipi bulunmaktadır (94-98).

Glutasyon peroksidazın eritrositlerde membran hasarına karşı savunmada rol alan en güçlü antioksidan olduğu bilinmektedir (91).

- **Glutasyon S-Transferazlar (GST):** İki protein alt biriminden oluşan ve lipit hidroperoksitlerinin detoksifikasyonunda selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. Bu görevinin yanında, hücre içinde metabolize edilemeyen lipofilik ya da hidrofilik bileşiklerin bağlanması, depolanması ve taşınmasında da görev almaktadır (60, 75-77, 98).

- **Mitokondriyal sitokrom oksidaz:** Mitokondriyal sitokrom oksidaz, solunum zincirinde son basamakta görev alan ve süperoksit radikalının indirgenmesinde rol oynayan antioksidan bir enzim olarak tanınmaktadır. Organizmada bu reaksiyon fizyolojik olarak süregelen hücre için gerekli enerjinin üretilmesini sağlamaktadır (60, 61, 75-77).

4.7.1.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar

Enzimsel olmayan antioksidanlara glutasyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, ferritin, seruloplazmin, laktoferin ve transferrin örnek olarak verilebilmektedir (87).

Melatonin: Karanlık ortamda triptofandan sentezlenen melatonin (N-asetil-5-metoksi-triptamin), pineal bezden üretilebildiği gibi farklı bölgelerden de üretilmektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltarak proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonunu önlediği bilinmektedir (99).

Seruloplazmin: Beyin dahil dokuların çoğunda bulunan seruloplazmin, kandaki Cu'yu geri dönüşümlü olarak bağlayarak taşınmasını sağlamaktadır. SOD gibi aktivite göstererek eritrosit membranındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun engellediği bilinmektedir (100).

Transferrin, Laktoferrin ve Ferritin: Beyin dahil dokuların çoğunda bulunan Transferrin, Laktoferrin dolaşımdaki serbest Fe^{+3} 'ü bağlayarak hücrelere ulaştırılmasında, ferritin dokulardaki Fe^{+3} 'ün bağlanmasında görev almaktadır. Ferröz demir (Fe^{+2})'in hücredeki miktarının azaltılarak Fenton reaksiyonunun oluşumunun önlenmesinde rol oynadıkları bilinmektedir (56).

Bilirubin: Yaşlı eritrositlerin hemolizi sonucunda hem proteinlerinin yıkımıyla birlikte meydana gelmektedir ve karaciğerde biyotransformasyona sonucu safra veya

idrarla atılmaktadır. Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikallerinin detoksifikasyonunda görev almaktadır (101).

Glutasyon: Glutamikasit-sistein-glisinden oluşmuş bir tripeptid yapısında olan glutasyon, ökaryotik tüm hücrelerde bulunmaktadır. H_2O_2 , disülfidler, askorbik asit ve serbest radikalleri indirgeyerek, hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasında rol oynamaktadır.

Glutasyon hücrede proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmiş durumunu korumada, eikosanoidlerin sentezlenmesinde, sinyal iletiminin düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de görev aldığından söz edilmektedir (102).

Ürik asit: İnsanlarda pürin katabolizmasının son ürünü olan ürik asit, hidroksil, singlet oksijen, süperoksit, peroksinitrit anyonu ve peroksinitrik asitin zararlı etkilerini yok edilmesinde görev almaktadır. Güçlü antiradikalik etkisi ile birlikte Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin şelatlanmasında da rolü olduğu bilinmektedir (87, 103, 104).

Albümin: Plazmada en önemli ve en etkili antioksidanlardan olduğu kabul edilen albuminin, aktive olmuş fagositlerdeki myeloperoksidaz enziminin ürettiği hipokloröz asitin oksidatif gücünün sönümlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (105).

4.7.2. Ekzojen Antioksidanlar

1. Ksantin oksidaz (XOD) inhibitörleri: Organizmada pürin katabolizmasında görevli olan, hipoksantinın sırasıyla ksantine ve ürik aside oksidasyonu sırasında süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikallerinin oluşumuna sebep olan enzim olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda ksantin oksidazın beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi yıkıcı etkilerinin olduğu bildirilmektedir. Hepatit ve beyin tümörü olan kişilerde bu enzimin serumdaki seviyesinin artmış olduğu söylenmektedir (49, 106). Allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten gibi bileşikler XOD enziminin etkisini azalttığı bilinmektedir (60, 75-77).

2. NADPH oksidaz inhibitörleri: Serbest radikal oluşumuna sebep olan diğer bir enzim NADPH oksidaz enzimidir. Bu enzim nötrofillerin plazma zarında yer almaktadır.

Fagositlerde O_2 alımının artması NADPH oksidaz enzimini aktive etmektedir. Aktive olan enzim, oksijeni süperoksit anyonuna dönüştürerek ekstraselüler sıvılardaki

miktarının artmasına sebep olmaktadır (107). Bazı ilaçların (lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, NSAİİ gibi) NADPH oksidaz enzimini inhibe ettiği ve enzimin neden olduğu zararlı etkileri azalttığı bilinmektedir (60).

3. Gıda antioksidanları: Gallik asitin esteri olan ve çoğunlukla gıda endüstrisinde kullanılan Propilgallat (PG)'ın, hidroksil radikallerinin vücuttan uzaklaştırılmasının yanında demir iyonları ile kompleks oluşturabildiği için demir ve bakır katalizörlerini elimine ederek oksidatif etkinin azaltılmasında kullanılan sentetik bir antioksidan madde olduğu bilinmektedir. Bütil hidroksitoluen (BHT), Bütil hidroksianisol (BHA) ve Ter-butilhidrokinon (TBHQ) bilinen diğer gıda antioksidanları arasında yer almaktadırlar (61, 108, 109).

4. Bitkisel Antioksidanlar: Bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar ve çay), hayvansal ürünler, enzimler ve bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan ajanlar olarak bilinmektedirler (110). Yapılan çalışmalarda bu ajanların antioksidan aktivitelerinin flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler (Vitamin A), Vitamin E ve Vitamin C gibi doğal bileşiklerden kaynaklandığı vurgulanmaktadır (61, 86, 111).

E vitamini, yağda çözünebilen ve tüm hücre membranlarında yer alan antioksidan bir ajan olarak kabul edilmektedir. Sekiz izomeri olduğu bilinmesine rağmen; biyoaktif şekli α -tokoferol olduğu bilinmektedir. Lipit peroksidasyonunu engelleyerek hücresel yapıların korunmasında rol oynamaktadır. Antioksidan aktivitesini radikallerin yok edilmesi, zincirin kırılması, baskılama, bozulan yapıların onarılması ve endojen savunma sistemlerinin güçlendirilmesi gibi çeşitli mekanizmaları bir arada kullandığı için güçlü bir ajan olarak bilinmektedir (112).

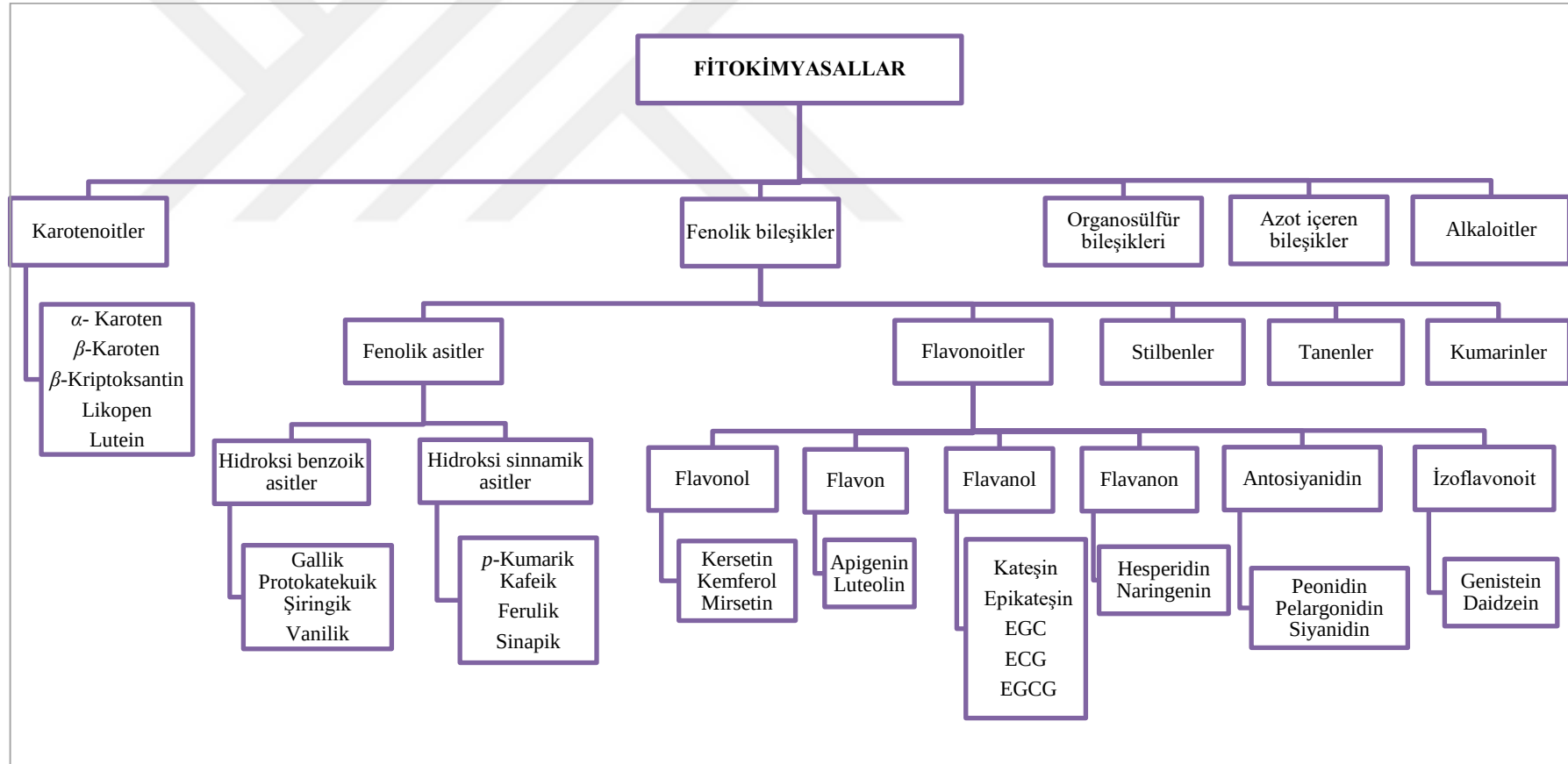
Askorbik asit, hücrede ekstraselüler ortamda bulunan ve suda çözünebilen önemli bir antioksidan ajan olarak bilinmektedir. ROS ve RNS'lerinin vücuttan uzaklaştırılmasında ve lipitlerde çözünen radikallerin temizlenmesi sırasında oluşan α -tokoferoksilin yeniden α -tokoferole dönüşmesinde koantioksidan olarak görev almaktadır (113).

Karotenoidlerin çoklu doymamış yapıları onların kolay okside olmalarını sağlamaktadır. Karotenoidler vücutta A vitaminine dönüşebildikleri için provitamin olarak tanınmaktadır ve singlet oksijenin vücuttan uzaklaştırılmasında en etkili olan

antioksidan olarak bilinmektedir. Likopenin en etkili antioksidan aktiviteye sahip Karotenoit olduğu kaydedilmektedir (114).

Fenolik bileşikler benzen halkasına bağı -OH grubu içeren bileşikler olup, peroksil radikallerinin vücuttan uzaklaştırılmasında görev alarak, lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedirler (115). Flavonoitler bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerden olup, peroksil ve alkoksil radikallerinin uzaklaştırılmasında radikal temizleyici ve zincir kırıcı mekanizmalarla antioksidan etki göstermektedirler (116). Fenolik bileşiklerin diğeri bir üyesi olan antosiyaninler, Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarıyla şelat oluşturarak ve protein bağlama gibi farklı mekanizmalarla antioksidan etki göstermektedirler (117).

Karotenoitler, fenolik bileşikler, alkaloidler, azot içeren bileşikler ve organosülfür bileşikleri olmak üzere sınıflandırılan fitokimyasallardan fenolik bileşikler ve karotenoitler üzerine yapılan çalışmaların daha fazla olduğu bilinmektedir (118).



Şekil 2. Fitokimyasalların sınıflandırılması (Liu'dan, 118; Kaya'dan, 119)

4.7.3. Total Antioksidan Belirleme Yöntemleri

Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitesini değerlendirmek için kullanılan farklı metotlar, elektronun ve hidrojen atomunun transferine dayalı olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

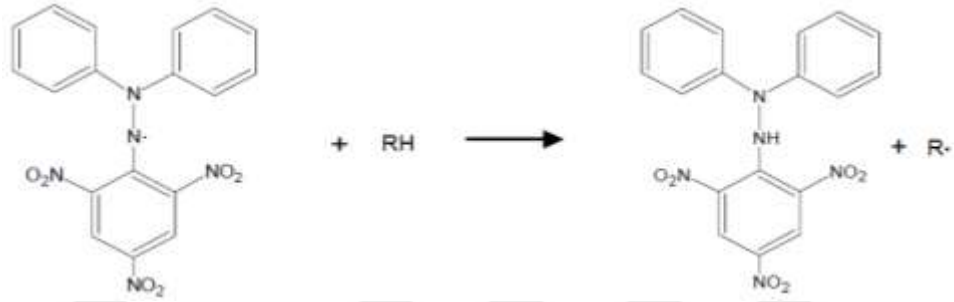
Hidrojen atomunun transferine dayalı (HAT) yöntemler, azo bileşiklerin yıkımı sonucu meydana gelen peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat arasındaki rekabetini temel almaktadır. Burada kullanılan yöntemler çözücü ve pH etkisinden kısmi olarak bağımsızdır ve analiz çok kısa bir sürede gerçekleşmektedir. HAT yöntemler oksijen radikal absorbans kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini kapsamaktadır.

Elektron transfer yöntemleri (ET), antioksidanın radikali indirgeme gücünü kolorimetrik olarak ölçmektedir. Başka bir deyişle, ET yöntemleri antioksidanın indirgeyici yeteneğini, HAT yöntemleri substratın hidrojen verebilme yeteneğini ölçmektedir. ET reaksiyonları; çözücü ve pH'a bağımlı olmasının yanında daha yavaş gerçekleşmektedir (120, 121). Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam Fenolik yöntemi (FCR), Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH yöntemi elektron transferine dayalı yöntemler olarak bilinmektedir. Genellikle hidrojen atomunun transferini ölçen yöntemler, elektron transferini ölçen yöntemlerle kıyaslandığında daha fazla tercih edildiği gözlenmektedir (122).

4.7.3.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemleri, doğal bileşiklerin antioksidan kapasitesini tayin etmek için sıklıkla kullanılmaktadır (123). Brand-Williams ve ark.'ları tarafından ilk olarak 1995 yılında geliştirilen metodun, daha sonra Sanchez ve ark.'ları tarafından 1998 yılında modifiye edildiği bilinmektedir (124). Bu yöntemin temelini antioksidan tarafından DPPH radikale bir protonun aktarılması ve 517 nm'de absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi oluşturmaktadır (122).

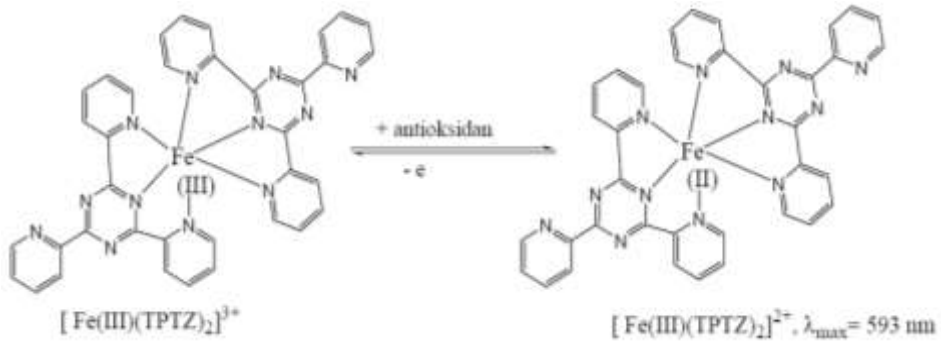
DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemi, basit, hızlı ve farklı örneklerin çözünürlüklerine imkan sağladığından çoğu numunenin antioksidan aktivitesinin tayin edilmesine izin vermektedir. Fakat bu metodun ışık, oksijen ve kirlilikten etkilemesi kullanımını belli oranda sınırlandırmaktadır (123).



Şekil 3. DPPH radikalının indirgenme reaksiyonu (Özkan'dan, 125)

4.7.3.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde Fe^{+3} 'ün indirgenme kapasitesinden yararlanarak antioksidan maddelerin toplam miktar tayini saptanmaktadır. Yöntem, düşük miktarlarda oluşan Fe^{+3} 'ün TPTZ ile tepkimesi sonucu Fe(III)-TPTZ kompleksinin, antioksidan varlığında Fe^{+2} 'ye indirgenerek Fe(II)-TPTZ kompleksini oluşturması esasına dayanmaktadır. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavi olup 593 nm'de maksimum absorbans vermektedir (126). Sonuçlar, E vitamininin suda çözünebilen türevi olarak bilinen ve standart madde olarak kullanılan Troloks eşdeğeri olarak verilmektedir. Yöntem, diğer antioksidan aktivite yöntemlerine göre daha basit, hızlı ve ucuz olması nedeniyle tercih edilmektedir (127).



Şekil 4. FRAP Reaktifi ile antioksidan molekül arasındaki tepkime (Özkan'dan, 125)

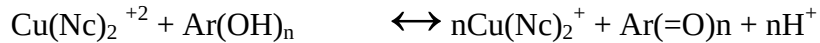
4.7.3.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayin Yöntemi (Folin-Ciocalteu Reaktifi, FCR)

Singleton ve ark.'ları tarafından antioksidanların toplam fenolik madde miktarının tayin edilmesi için geliştirilen yöntem, fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum'a elektron transfer edilmesi ile oluşan mavi renkli kompleksin 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (122, 128). Analiz sonuçları kullanılan standart bileşik eşdeğeri olarak verilmektedir. Örneğin gallik asit kullanılırsa gallik asit eşdeğeri olarak belirlenirken; son yapılan çalışmalarda, tannik asit, klorojenik asit, kafeik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferulik asitin de standart madde olarak kullanıldığına rastlanmaktadır (126).

FCR yöntemi, gıdaların ve bitkisel ekstraktların antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem olarak tercih edilmesine rağmen; uygulama zamanının uzun olması, reaksiyonun sulu ortamda olması lipofilik bileşikler için uygulanamaması ve fenolik bileşenlerin sadece alkali ortamda reaksiyon vermesi, yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır (122, 126, 127).

4.7.3.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

Apak ve ark.'ları tarafından bulunan yöntem, Cu⁺²'nin indirgenerek 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Nc) ile bakır(I)-neokuproin kompleksini oluşturması ve 450 nm'de maksimum absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (76). pH'ın kolay ayarlanabilmesi, analizdeki maddelerin yeniden kullanılabilmesi, stabil olması, basit, düşük maliyetli olması ve lipofilik numunelere uygulanabilmesi yöntemin tercih edilmesini artırmaktadır (128).



4.8. Fitokimyasallar ve Antimikrobiyal Etkileri

Bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı, dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasına ve küresel boyutta antibiyotik direnci sorununa sebep olmaktadır. (129). Bu durum, hastalık, ölüm ve sağlık bakım masrafları ile birlikte tedavi etkinliğini düşürerek halk sağlığını tehdit etmektedir (130). Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi veya mevcut antibiyotiklerin modifikasyonu çalışmalarına rağmen; zamanla bakterilerin bunlara karşı yeniden direnç oluşturmaları

ve direnç faktörlerinin hızlıca yayılma potansiyeli, bilim insanlarını yeni antimikrobiyal kaynaklar keşfetme çalışmalarına yöneltmiştir. Bu kaynaklardan en önemlileri bitki türlerinin yapısında bulunan çeşitli maddelerdir. (131). Yapılan birçok araştırmada, bitkilerin içerdiği fenolik bileşiklerin, terpenik bileşiklerin, esansiyel yağların, alkaloidlerin, lektinlerin, polipeptitlerin ve poliasetilenlerin antimikrobiyal etkili olduğunun tespit edilmesi, bitkileri yeni antibiyotik arayışındaki çalışmaların odağı haline getirmektedir (132-135).

Bitkilerde bulunan bileşiklerin direk ya da dolaylı olarak, hücrelerin biyokimyasal süreçlerinde etkili olduğu ve membranlarda meydana getirdiği değişikliklerle hücrelerin fizikokimyasal yapılarını bozdukları bilinmektedir. Doğal bileşiklerden biri olan terpenler, hidrofobik yapıları sayesinde, hücre membranında bulunan lipidlerle reaksiyona girerek, hücre zarının permabilitesini değiştirmektedir. Bu durum membranda gerçekleşen madde transportunu etkileyerek, normal hücresel işleyişi bozmaktadır. Ayrıca terpenlerin, hücre zarında bulunan proteinlerle de etkileşimleri bildirilmektedir (135).

Bitkilerin ürettiği aromatik bileşiklerin çoğunu fenolik bileşikler ve türevleri oluşturmaktadır. Bu sekonder metabolitlerle ilgili çok sayıda antimikrobiyal araştırmanın yapıldığı bilinmektedir (135, 136). Örneğin; tanenlerin hidrofobik etkileşimlerle, hidrojen bağı oluşturarak veya kovalent olarak amino asit ve proteinler gibi organik bileşiklere bağlanabilen polifenolik bileşiklerden olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda tanenlerin substratlarla, enzimlerle ve metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilme özellikleri sayesinde, bakteriler üzerinde toksik etki gösterebilecekleri vurgulanmaktadır (137, 138).

Flavonoidlerin antimikrobiyal etkileri ile ilgili farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Hipotezlerden birine göre, flavonoidlerin sitoplazmik membranın işlevini bozarak hücre zarının akışkanlığını azalttığı ve böylece mikroorganizmaların inhibisyonunu sağladıkları düşünülmektedir. Başka bir yaklaşımda, flavonoidlerin enerji metabolizmasını inhibe ettiği ve böylece enerji gerektiren molekül sentezi veya madde taşınımı gibi fonksiyonların bozulmasına neden olarak antimikrobiyal aktivite gösterdiği ileri sürülmektedir (139). Flavonoidlerin proteinlere olan afinitesi onların

antiviral etkileriyle ilişkilendirilmekte; metil kersetinin, poliovirusun DNA replikasyonunu ve protein sentezini engellediği bildirilmektedir (140).

Uçucu yağların bakterisidal, virüsidal, fungisidal, antiparazit ve insektisidal etkili oldukları ve bu özellikleri sebebiyle tıp, kozmetik, farmakoloji, tarım ve gıda sanayisinde sıklıkla tercih edildiği bilinmektedir. Bitkilerden hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağların terpenler, terpenoitler, fenolik ve alifatik bileşiklerden oluşan kompleks yapıları, onların bakterilerde çeşitli hücresel yapıları hedef alarak antimikrobiyal etki gösterdikleri düşünülmektedir. Uçucu yağların, sitoplazma koagülasyonu ile lipid ve proteinlerle etkileşerek hücre zar geçirgenliğini değiştirdikleri ve hücrenin lizisine sebep oldukları bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, uçucu yağların bakterilere ve funguslara olan toksik etkisinin, yapısında bulundurduğu fenoller, aldehitler ve alkollerden kaynaklı olduğu da vurgulanmaktadır (141-143).

Alkaloitler, bitkiler tarafından sentezlenen, azot ihtiva eden heterosiklik bileşikler olup, alkaloit ve türevlerinin antimikrobiyal etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (136, 144). Alkaloitlerin antimikrobiyal etki mekanizmaları üzerinde yapılan çalışmalarda, alkaloitin mikroorganizmanın DNA'sına interkalasyonu sonucu antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmektedir (136).

Antimikrobiyal peptitlerin nasıl etki gösterdikleri hakkında yapılan çalışmalarda, peptitlerin antimikrobiyal özelliklerinin, mikroorganizmaların hücre membran proteinleri ve iyon kanallarını etkilemesi sonucu oluşturdukları membran hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (136, 145).

Kinonlar yüksek oranda reaktif özelliğe sahiptir ve yapısında iki keton sübtitüenti taşıyan aromatik halka ihtiva etmektedirler. Kinonların antimikrobiyal etkileri, proteinlerdeki nükleofilik amino asitlerle geri dönüşümsüz olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Mikroorganizmalarda membran proteinleri, yüzey adhezinleri ve membrana bağlı çoğu enzim, kinonların hedeflediği yapılar arasında yer almaktadır (146).

4.9. Enzimler Hakkında Genel Bilgiler

Enzimler, organizmada meydana gelen metabolik reaksiyonların hızlanmasını ve daha uygun şartlarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyolojik katalizörler olarak tanımlanmaktadır (147).

Reaksiyonların hızı artıran başka katalizörler de bulunmaktadır. Ancak bu kimyasal katalizörler ile enzimler arasında belirgin farkların olduğu açıklanmaktadır. Enzimlerin katalitik etkinlikleri, kimyasal katalizörlere kıyasla 10^6 - 10^{16} kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Enzimler substrat özgünlüğü açısından son derece hassastır, bir substrata veya aynı işlevde görevli substrat serisine karşı etkindirler. Bu özellik vücutta aynı anda birden fazla metabolik reaksiyonun meydana gelmesini sağlamaktadır. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH'da ve normal vücut sıcaklığında gerçekleşmektedir (147).

Enzimlerin spesifik ve çok düşük miktarlarda bile reaksiyonları katalizlemeleri gıda ve kimya endüstrisinde; tıpta, eczacılıkta, ziraat gibi alanlarda teşhis ve tedavi amacıyla kullanılmalarını sağlamaktadır (148). İndirgenme ve yükseltgenme olayını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimlerin etkiledikleri substratın sonuna -az eki getirmek suretiyle isimlendirilmeleri karışıklıklara sebebiyet verdiği için, Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından oluşturulan IEC, enzimlerin adlandırılmasında ve sınıflandırılmasında uygulanacak kuralları tespit ederek, enzimleri reaksiyon mekanizmalarına göre altı sınıfa ayırmaktadır. Bunlar:

Oksidoredüktazlar: Oksidoredüktazlar, substratların indirgenme ya da yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlemektedirler. Dehidrojenazlar, sitokromlar, oksidazlar ve oksijenazlar bu gruba dahil olan enzimlerdir. Tirozinaz enzimi de oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olarak bilinmektedir.

Transferazlar: Molekülde bulunan hidrojen dışında, başka grupların (C, N ve fosfor taşıyan gruplar) transferini katalizleyen enzimlerdir. Tek karbonlu gruplarını, aldehit ve keton gruplarını, açıl gruplarını, glikozil gruplarını, fosfat gruplarını, kükürt içeren grupların transferini sağlamaktadırlar.

Hidrolazlar: Su yardımıyla molekülleri oluşturan bağların yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar, glikozil bileşiklerinin, ester, eter, peptit bağlarının, diğer C-N, asetanhidrit, C-C, C-P, C-halojen, C-S, P-N, S-S bağlarının hidrolizini sağlamaktadırlar. Kolinesterazların, hidrolaz enzim ailesine üye olduğu bilinmektedir.

Liyazlar: C-C, C-O, C-N ve C-S bağlarını oksadatif ve hidrolitik dışında farklı bir mekanizma ile kıran reaksiyonları katalizlemektedirler.

İzomerazlar: Molekül içi düzenleme yaparak optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizlemektedirler. Rasemazlar, epimerazlar, cis-trans izomerazlar, intramoleküler oksido redüktazlar, intramoleküler transferazlar, intramoleküler liyazlar ve diğer bu aileye ait enzimler olarak bilinmektedir.

Ligazlar: ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanan enerjiyi kullanarak iki molekülün birleşmesini katalizlemektedirler (147, 149, 150).

4.9.1. Enzim İnhibisyonu

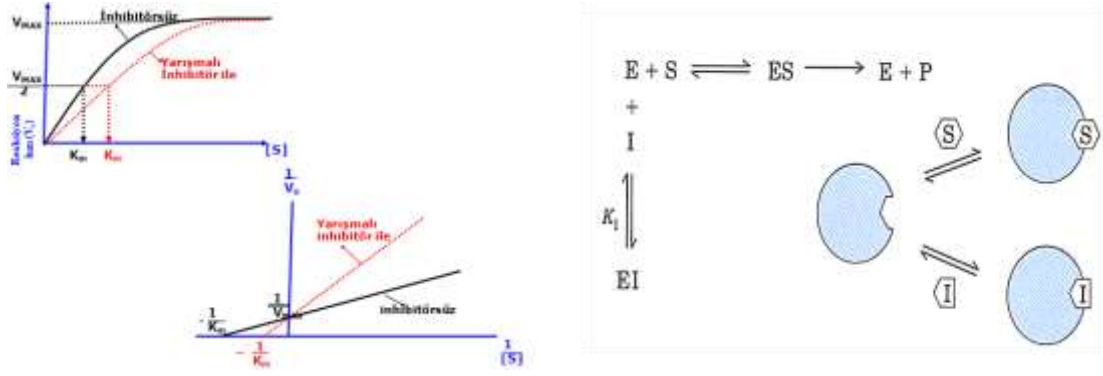
Enzimlerle reaksiyona girmesine rağmen, substrat gibi yeni bir ürüne dönüşmeyen maddeler bulunmaktadır. Bu maddeler enzimle katalizlenen reaksiyonun hızını azaltabilir ya da engelleyebilen maddelere inhibitör, enzim katalizinin engellenmesi olayına ise inhibisyon adı verilmektedir (150, 151).

4.9.1.1. Geri Dönüşümlü (Reversibl) Enzim İnhibisyonu

Geri dönüşümlü enzim inhibisyonlarında substrat ya da enzim konsantrasyonunun değişmesi, enzim ile inhibitör madde arasındaki ilişkiyi etkilemektedir.

Yarışmalı (Kompetatif) Enzim İnhibisyonu: Yarışmalı inhibisyonda, yapısal olarak substrata benzeyen bir madde, enzimin aktif bölgesine bağlanarak, enzim ve substrat arasındaki ilişkiyi önler ve enzimin katalitik etkisini yavaşlatmaktadır. Klasik bir örnek olarak süksinik asitin süksinat dehidrojenaz enzimi ile fumarik aside dönüştürüldüğü sitrik asit döngüsünde, ortamda malonik asidin bulunması yapısal benzerliği nedeni ile bu dönüşümü yavaşlatmaktadır (151, 152).

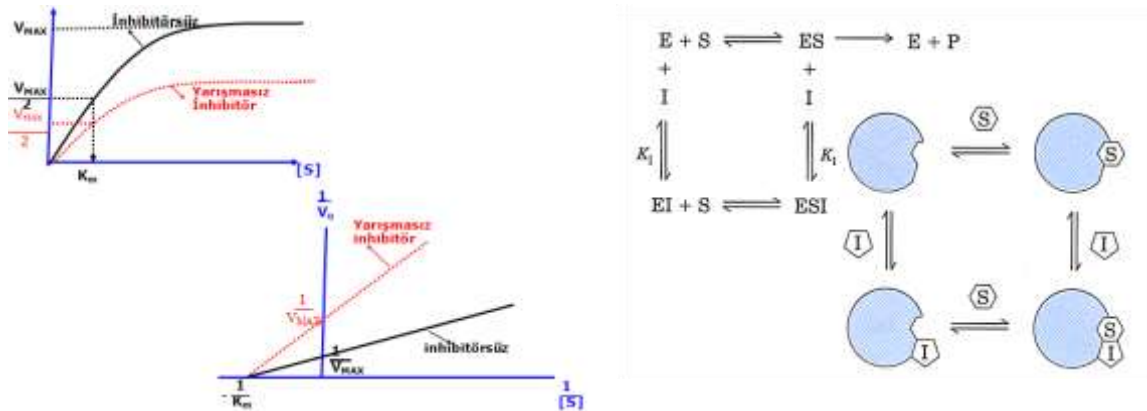
Enzimle katalizlenen bir tepkimede ulaşılması gereken maksimum hızının yarısında substratın eşit olduğu konsantrasyon, K_m değeri olarak ifade edilmektedir ve bu değer artması enzimin substrata olan ilgisinin azaldığını ifade ederken; değer azalması enzimin substrata olan ilgisinin arttığını ifade etmektedir. Yarışmalı enzim inhibisyonunda, inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azalttığı için K_m değeri büyürken, V_{max} değeri değişmemektedir (150).



Şekil 5. Yarışmalı enzim inhibisyonu (Ulakoğlu Zengin'den, 150)

Yarışmalı Olmayan (Nonkompetatif) Enzim İnhibisyonu: Yarışmalı olmayan inhibisyonunda substrat ve inhibitör maddenin yapısal benzerliği söz konusu değildir. İnhibitör madde enzimin aktif bölgesi dışında başka bir yere bağlanarak enzimin substratla reaksiyona girme hızında değişiklik meydana getirmeyen ürün oluşma hızına engel olmaktadır (151). Bu inhibisyonunda K_m değeri değişmez ancak tepkimenin V_{max} değeri azalmaktadır (150)

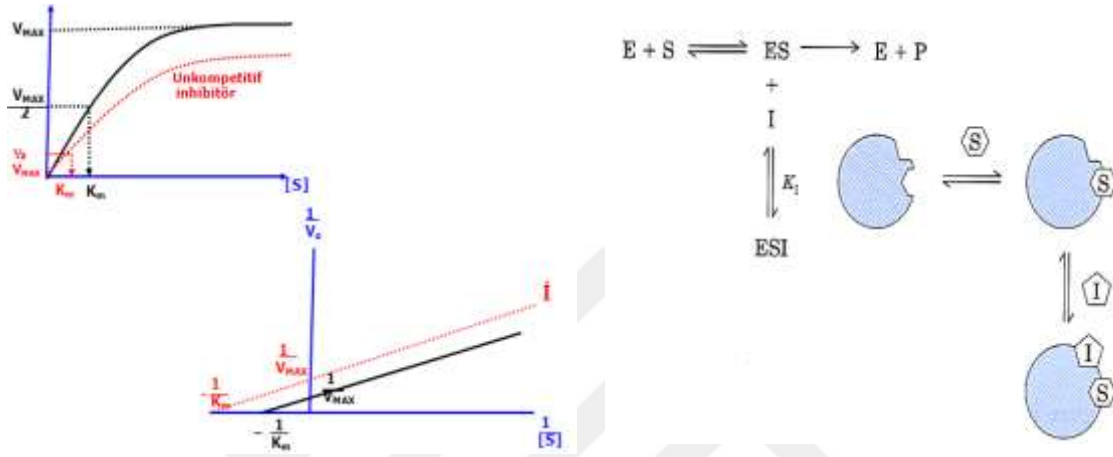
Bazı enzimler, fonksiyonel olarak aktif olabilmesi için yapılarında -SH grupları taşımaktadırlar. Enzimin normal şekilde görev yapabilmesi için bu grupların bozulmadan korunması gerekmektedir. Ag^+ , Hg^+ , ve Pb^{2+} gibi ağır metaller tiyol gruplarına bağlanarak enzim inhibisyonuna neden olmaktadır (151).



Şekil 6. Yarışmalı olmayan enzim inhibisyonu (Ulakoğlu Zengin'den, 150)

Yarışmasız (Ankompetitif) Enzim İnhibisyonu: Bu inhibisyonunda inhibitör, yarışmalı olmayan inhibitörde olduğu gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif

bölgeden farklı bir yere geridönüşümlü olarak bağlanmaktadır. Bu inhibisyonda fark, yarışmalı olmayan inhibitör, serbest enzime veya enzim-substrat kompleksine bağlanmasına rağmen; yarışmasız inhibitör, yalnızca enzim-substrat kompleksi oluşuktan sonra komplekse dahil olmaktadır ve inhibisyon sonucunda hem V_{max} hem K_m değeri azalmaktadır (150).



Şekil 7. Yarışmasız enzim inhibisyonu (Ulakoğlu Zengin'den, 150)

4.9.1.2. Geriye Dönüşümsüz (İrreversibl) Enzim İnhibisyonu

Geriye dönüşümsüz enzim inhibisyonu, inhibitörün enzim üzerinde bulunan ve katalitik aktivitesi için gerekli fonksiyonel grubu koparması ya da ona geriye dönüşümsüz olarak bağlanması sonucu gerçekleşmektedir. İnhibitör, aktif bölgeye kovalent olarak bağlanarak enzimin yapısında değişime sebep olduğu için dönüşüm olmamaktadır (150). Örneğin; sinir gazlarından diizopropil fosfofluoridat (DIPF), asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz enziminin tersinmez olarak inhibe ederek felçlere neden olmaktadır (150, 151).

4.9.2. Tirozinaz Enzimi Hakkında Genel Bilgi

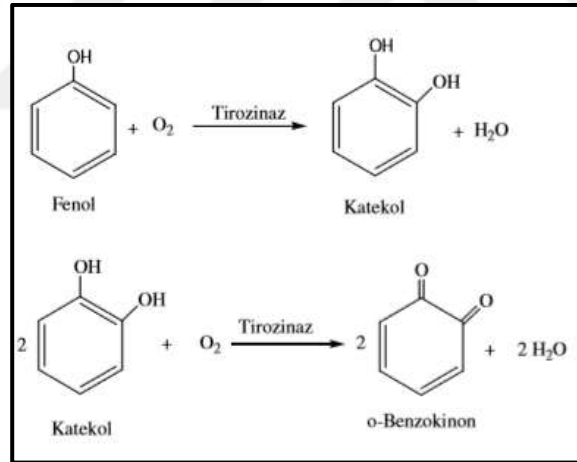
Polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak da anılan bu enzim, substrat olarak mono/di-hidroksifenilalanine seçiciliği sebebiyle tirozinaz olarak isimlendirilmiştir (153).

Bertrand tarafından 1850’li yıllarda bulunan tirozinaz enzimi, afinite kromotografisi ile saflaştırılan ve organik bir molekülün yapısına oksijen transferi yapabildiği tanımlanan enzimlerden ilki olarak bilinmektedir (154-156).

Tirozinaz enziminin elde edildiği kaynağa göre farklı sayıda alt birimlerden oluşan oligomerik bir yapıya sahiptir ve aktif bölgesinde bakır atomunun aktivitesi için gerekli olduğu bildirilmektedir (157).

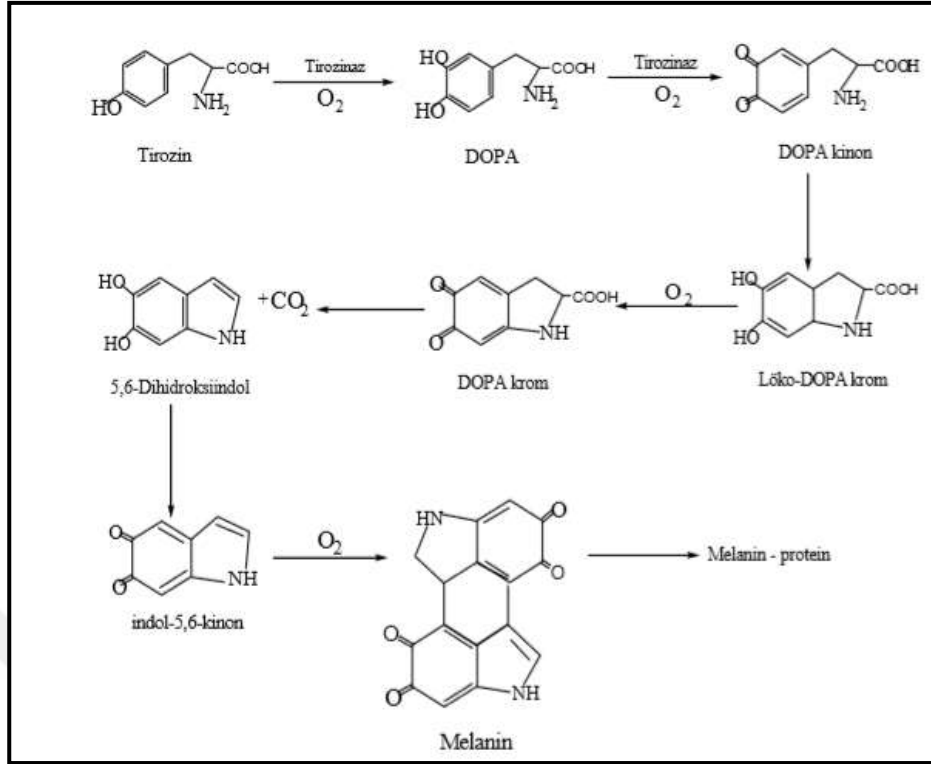
Tirozinaz enzimi, doğada memelilerde, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve mantarlarda bulunmuştuğu kayıtlıdır. Hayvansal organizmaların özellikle deri, saç ve göz pigmentlerinde yer almaktadır (154, 158, 159).

Tirozinaz, moleküler oksijeni kullanarak monofenollerin o-difenollere ve o-difenollerin o-kinona oksidasyonunu içeren ardışık iki farklı reaksiyonu katalizlediği kabul edilmektedir. Tirozinaz enziminin bu reaksiyonlarda katalizlediği aktivitelere sırasıyla kresolaz aktivitesi ve katekolaz aktivitesi adı verilmektedir (153, 160).



Şekil 8. Tirozinaz enziminin kresolaz ve katekolaz aktivitesi (Özçelik’den, 161)

Tirozinaz, vücutta melanin sentezinde rol oynayan enzimlerden en önemlisi olarak bilinmektedir. Şekil 9’da görüldüğü gibi, melaninin biyokimyasal eldesi, tirozinin tirozinaz enzimi tarafından oksidasyonu ile başlayarak devam etmektedir (153).



Şekil 9. Tirozinaz tarafından tirozinden melanin oluşumu (Çörtenlioğlu'ndan, 157)

4.9.2.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Tirozinaz İnhibitörleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, tirozinaz enzim üzerine inhibitör etkisi olduğu kanıtlanan bileşiklerin bitkilerden ve mantarlardan elde edildiği belirtilmektedir (152, 162).

Bitkiler zararlı yan etkileri olmayan, biyolojik ortamda fizyolojik etkileri bulunan bileşikler içermektedirler ve bu konuda çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Tirozinaz enzim üzerine etkili bileşikler, araştırmaları devam eden konulardan biri olduğu vurgulanmaktadır (152).

Yüksek bitkilerden elde edilen tirozinaz inhibitörleri fenoller, aldehitler ve diğer türevleri olmak üzere iki grupta toplanmaktadır (162).

Fenoller: Bitkilerde bulunan bu grup kimyasal bileşikler doğada yaygın oldukları, bitkilerin kabuğunda, kökünde veya yapraklarında kompleks ya da taze meyvalarda, sebzelerde ve çayda basit bileşikler şeklinde bulunabildikleri bilinmektedir.

Doğal kaynaklı inhibitörlerin etkilerinin belirlenmesi hakkında yapılan çalışmalar, flavonoitlerin enzim inhibisyonunu enzimin aktif bölgesinde yer alan bakırla şelat

oluşturma yetenekleri ile ilişkilendirmektedir (163, 164). Bugüne kadar çeşitli bitkilerden, tirozinaz inhibitör etki gösteren kemferol, kesretin, luteolin 4'-O-glukozit ve luteolin 7-O-glukozit gibi farklı flavonoit türlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. (165-168). D-glukozun çapraz esterleşmesiyle oluşan gallik asit ve türevlerinin de güçlü tirozinaz inhibitör etki gösterdikleri bilinmektedir (169-171). Yapılan çalışmalarda gallik asit ve esterlerinin optimum tirozinaz enzimin inhibisyonu, 3-pozisyonundaki galloil kısmı ve zincir uzunluğu ile ilişkilendirilmektedir (172).

Tirozinaz enziminin kresolaz ve katekolaz aktivitesini inhibe eden *p*-Kumarik asit'in para pozisyonunda bulunan hidroksi grubunun kresolaz aktivitesini arttırırken katekolaz aktivitesini dūřürdüęü belirtilmektedir (173).

Oksiresveratrol güçlü tirozinaz inhibitör etki gösteren diğer bir fenolik bileşik olarak bilinmektedir. Bu etkinin yapısında bulundurduğu maksimum hidroksi gruplarının varlığı ile ilgili olduğu bildirilmektedir (174).

Aldehit ve dięer türevleri: Bitkilerden izole edilen aldehit ve türevlerinin biyolojik olarak önemli sūlfidril, amino ve hidroksi grupları gibi nūkleofilik gruplarla reaksiyon verdięi bilinmektedir (175). Bu maddeler, enzimlerin yapısında bulunan amino grupları ile etkileřerek Schiff bazı oluřturması sonucunda tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon özellik gösterdięi söylenmektedir (176).

Kojik asit, Azelaik asit ve Metallotiyonin'in mantar kökenli tirozinaz enzim inhibitörleri olduğu bilinmektedir (175-179). *Aspergillus niger* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen kojik asit, geçiş metal iyonları ile şelat oluşturabilme özelliğine sahiptir ve bu sayede tirozinaz enziminin yapısında yer alan bakır iyonu ile etkileşerek, enzimin aktivitesini inhibe etmektedir (177, 178, 180).

Tablo 3. Doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri ve elde edildiği kaynaklar (Parvez'den, 175).

İnhibitör Bileşik	Kaynak
Arbutin	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>
Aloesin	<i>Aloe barbadensis</i>
Anakardik asit	<i>Anacardium occidentale</i>
Anisik asit	<i>Pimpinella anisum</i>
Anisaldehit	<i>Pimpinella anisum</i>
Kumik asit	<i>Cuminum cyminum</i>
Kuminaldehit	<i>Cuminum cyminum</i>
5-Hidroksimetil-2-furfural	<i>Dictyophora indusiata</i>
9-Hidroksi-4metoksipisoralin	<i>Angelica dahurica</i>
4-Hidroksi-3metoksinnamik asit	<i>Pulsatilla cernua</i>
<i>p</i> -Kumarik asit	<i>Panax ginseng</i>
ECG	<i>Thea ginseng</i>
EGCG	<i>Thea ginseng</i>
3,4-Dihidroksinnamik asit	<i>Pulsatilla cernua</i>
Kemferol	<i>Crocus sativus</i>
Oksiresveratrol	<i>Morus alba</i>
Trans-Sinnamaldehit	<i>Cinnamomum cassia</i>
La, Lb	<i>Agaricus hortensis</i>
Agaritin	<i>Agaricus bisporus</i>
Kojik asit	<i>A.niger, A. penicillum</i>
Azelaik asit	<i>Pityrosporum ovale</i>
Metallotiyonin	<i>Aspergillus niger</i>

4.9.2.2. Tirozinaz İnhibitörlerinin Uygulama Alanları

Tirozinaz, proteinlerin amino ve sülfidril grupları ile etkileşerek sebze ve meyvelerde irreversible olarak kahverengileşme reaksiyonlarını katalizlemektedir. Aktif tirozinaz varlığına, fenolik bileşiklerin konsantrasyonuna, oksijen varlığına, pH ve sıcaklık koşullarına bağlı meydana gelen bu durumun sebep olduğu istenmeyen tat ve renk oluşumunu önlemek için uygulanan geleneksel yöntemlerin, otoklav ve ağartma, yiyeceklerde besin kaybına sebep olduğu bilinmektedir. Günümüzde gıda endüstrisinde meyve ve sebzelerin ekonomik değerlerinin korunmasında tirozinaz inhibitörlerinin kullanımı olmakla birlikte sentetik olanların yerine güvenle kullanılabilen doğal bileşiklere ihtiyaç duyulduğu kabul edilmektedir (152, 175, 181).

Tirozinaz enzim aktivitesinin baskılanması, tarımda haşerelerle mücadelede kullanılan yöntemlerden biridir. Çünkü, tirozinaz enziminin haşerelerde, melanogenezde ve parazitlerin enkapsülasyonunda görevli bir enzim olduğu bilinmektedir (182, 183).

Enzimlerin çevresel atıklarla olan mücadelede kullanımı faydalanılan ekonomik ve verimli yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Atıklarda bulunan zararlı fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında, tirozinaz enziminin kresolaz ve katekolaz aktivitesinden yararlanılabilmektedir (152).

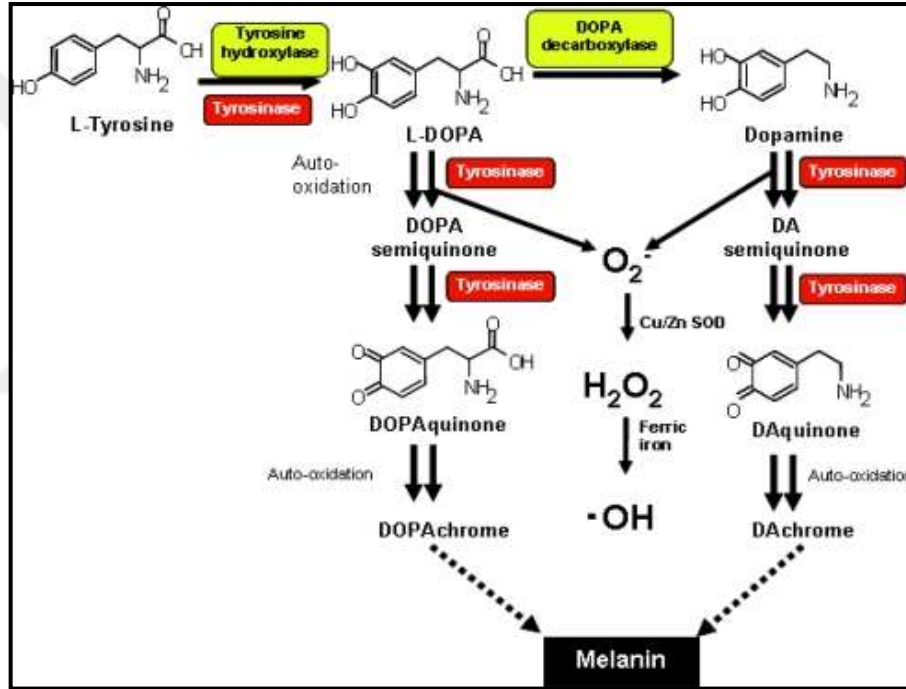
Memelilerin cilt ve saç rengini etkileyen faktörlerden en önemlisi melanin pigmentasyonudur. UV ışınları absorblayarak cildi UV hasarına ve ROS'lara karşı koruyan melanin, vücutta epidermiste melanosit hücrelerinde sentezlenmektedir (16, 184, 185). Hücrelerde bulunan pigmentlerin gelişigüzel dağılımı sonucu hiperpigmentasyon veya hipopigmentasyon, aktinik hasarlar, melazma, çil ve yaşa bağlı lekeler gibi farklı dermatolojik bozukluklar meydana gelmektedir. (186). Tirozinazın melanin pigmentasyonunda görevli en önemli enzimlerden biri olduğu kabul edilmektedir. Bu durum, kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde, doğal kaynaklardan elde edilen ve melanin oluşumunu engelleyen tirozinaz inhibitörlerine olan ilgiyi başlatmıştır (175).

Tirozinaz çeşitli otoimmün bozukluklarda otoantijen olarak tanınmaktadır. Vitiligo hastalarından elde edilen serumlar üzerinde yapılan çalışmalarda, melanosit antijenlerine karşı yönlendirilmiş antikorların varlığı ve sentezinden bahsedilmektedir. Lokal ve yaygın vitiligolu hastalar karşılaştırıldığında, yaygın vitiligolu hastalarda IgG anti-tirozinaz antikorlarının daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu antitirozinaz antikorları diğer otoimmün bozukluklarının otoantijenleriyle herhangi bir çapraz reaksiyona girmedigi veya tirozinaz aktivitesini baskılamadığı belirlenmiştir. Bu durum, tirozinazın vitiligonun tanısında kullanılabilecek bir otoantijen olabileceğini açıklamaktadır (187).

Yapılan bir çalışmada, beyin hücrelerinde L-DOPA'nın glutatyonun hücre içi seviyesini artırarak hücresel antioksidan savunma mekanizmasını düzenlediği gösterilmektedir (175).

Tirozin, sinir hücrelerinde hidroksilasyonla L-DOPA'ya; L-DOPA da dekarboksilasyon tepkimesi ile dopamin'e dönüşmektedir. L-DOPA, katekolaminler

olarak isimlendirilen türlerdendir ve nörotransmitter bir madde olan Dopamin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır (157). Tirozinaz, beyinde dopaminerjik nöronların tahrip olması vs bazı durumlarda katekolamin sentezinin devamını sağlamaktadır. Dopaminin oksidasyonu sonucu meydana gelen okside dopamin türevleri dopamin kinon olarak bilinir ve bu ürünlerin Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilen nörotoksisiteye sebep olduğu bildirilmiştir. Tirozinin dopakinona dönüşümü tirozinaz tarafından sağlanması, enzim inhibitörlerinin parkinson tedavisinde kullanılabilecek yeni yöntemlerden biri olabileceği düşüncesini oluşturmuştur (188, 189, 190).



Şekil 10. Tirozinaz tarafından katekol o-kinonların ve diğer ROS'ların üretilmesi Hasegawa'dan, 189)

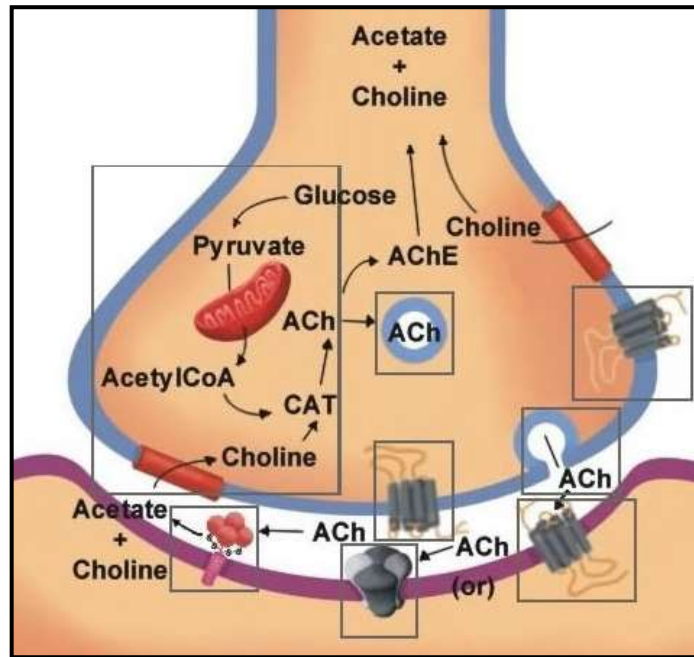
4.9.3. Asetilkolin ve Metabolizması

Asetilkolin (ACh), Henry Hallet Dale tarafından 1914 yılında tanımlanan ilk nörotransmitter olarak bilinmektedir. ACh, merkezi sinir sistemi ile birlikte parasempatik sinir sisteminde impulsların iletilmesini ve sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasını sağlayan ester yapısında önemli bir biyomoleküldür (191-193). Bunlarla beraber, ACh'nin iskelet kaslarının kasılmasında, parasempatik

sinir sistemini uyarak kalp atışının yavaşlaması, tükürük salgısının artması gibi etkilerin gerçekleşmesinde görev aldığı bilinmektedir (194).

ACh, kolinerjik sinir hücrelerinde kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimiyle sentezlenmektedir. Sentezi sırasında kullanılan asetil ve kolin (Ch), asetilkoenzim A (Asetil-KoA)'nın hidrolizi ile meydana gelmektedir (194). Reaksiyonda kullanılan asetil-KoA'nın çoğu, mitokondri iç membranında, glikoliz sırasında, pürivat dehidrojenaz enzimi tarafından sentezlenerek ChAT'ın bulunduğu sitoplazmaya taşınmaktadır. Sentezde kullanılan Ch'in kaynağını ise; besinler ve hücre membranındaki fosfolipitlerle birlikte ACh hidrolizi ile salınan kolin oluşturmaktadır (194).

Sentezlenen ACh, presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanmaktadır. Nöron, uyarıldığında veziküller sinaptik boşluğa dökülür ve açığa çıkan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik nöronlarda bulunan reseptörlerine bağlanarak impulsun postsinaptik nörona iletilmesini sağlamaktadır. Sinir uyarısının iletilmesinin ardından reseptörden ayrılan ve reseptörlere bağlanmayan ACh, asetilkolinesteraz (AChE) tarafından hidroliz edilmektedir. Açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona taşınmaktadır (195).



Şekil 11. ACh metabolizması (Jack'dan, 195)

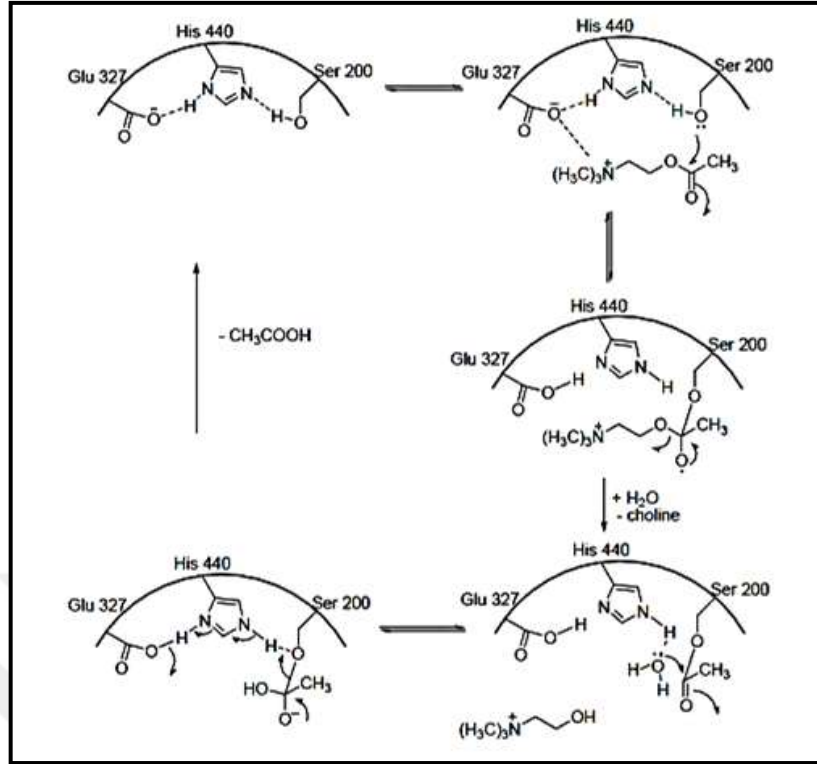
4.9.3.1. Kolinesterazlar Hakkında Genel Bilgi

Kolinesterazlar; ACh, bütirilkolin ve asetiltiyokolin (ATCh) gibi kolin türlerinin yıkımını sağladığı ve hidrolaz ailesinin bir üyesi olduğu bilinmektedir (196, 197). Kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda bulunan kolinesterazlar substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre, gerçek kolinesteraz ve spesifik olmayan kolinesteraz (psödokolinesteraz) olarak iki sınıfta incelenmektedir (194).

Gerçek kolinesteraz, ACh'i hidrolizini katalizleyen asetilkolinesteraz (AChE; E.C 3.1.1.7); psödokolinesteraz ise ACh ve diğer kolin esterlerinin hidrolizini katalizleyen bütirilkolinesteraz (BChE; E.C 3.1.1.8)'dir (194, 198, 199). AChE, beyin ve eritrositlerde; BChE serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde daha fazla bulunduğu bildirilmektedir (194, 198).

AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik sinir iletimini sonlandırmak olmasına rağmen BuChE'nin fizyolojik önemi tam olarak bilinmemektedir (194, 201). Kolinesterazlar aynı zamanda hücre yenilenmesi, farklılaşması, farklı etkenler sonucunda oluşan strese yanıt ve amiloid (beyin v.b. dokularda sentezlenen ancak düzensiz plaklar şeklinde birikmesi sonucu birçok ciddi rahatsızlığa sebep olabilen bir protein) oluşumunda da rol oynamaktadırlar (194).

AChE'nin aktif bölgesi "Katalitik anyonik site (CAS)" ve "Periferik anyonik site (PAS)" olmak üzere iki adet bağlanma alt ünitesinden oluşmaktadır. CAS olarak adlandırılan birim, katalitik üçlü adıyla bahsedilen histidin, serin ve glutamik asit aminoasitlerini içermektedir ve ACh'deki ester bağlarının hidrolizinden sorumlu olduğu söylenmektedir. α -anyonik ve β -anyonik bölge olmak üzere iki alt birimden oluşan ikinci bağlanma bölgesi olan PAS, triptofanca zengindir ve ACh kuaterner anyonyum atomu ile etkileştiği bilinmektedir (201, 202). AChE aktivitesinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, ACh'nin iki aşamada hidroliz olduğu belirlenmiştir. Öncelikle, Histidin ve Serin kalıntılarından bir proton uzaklaşması enzime nükleofilik bir özellik kazanır; sonra özgül Ser-O- kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu ACh'le tepkimeye girerek hidrolizi sağlanır (201) .



Şekil 12. ACh'nin AChE tarafından parçalanması (Koçancı'dan, 201)

4.9.3.2. Alzheimer (AH) ve AChE enzim ilişkisi

Halk arasında “bunama” olarak bilinen ve 1906’da Dr. Alois Alzheimer tarafından adlandırılan Alzheimer, merkezi sinir sisteminin (MSS) bazı bölgelerindeki hücrelerin ve sinapsların yok olmasına bağlı olarak; bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir durum olarak açıklanmaktadır (203-205). Alzheimer hastalığında görülen beyin hücrelerindeki kaybolmanın sebebi tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen; ölüm sonrası Alzheimer hastalarının beyinleri üzerinde yapılan çalışmalara göre genetik faktörler, anormal proteinler (amiloidler) veya otoimmün reaksiyonlar gibi çeşitli faktörlerin sebep olabileceği ileri sürülmektedir (206). “Kolinerjik hipotez” olarak tanımlanan kolinerjik sistemdeki değişimler bu nedenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan araştırmalarda, AChE seviyesinin Alzheimer hastalarında arttığı belirlenmiştir. Artan AChE aktivitesi glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)’ü harekete geçirdiği ve böylece apoptozla ilişkili proteinlerin (kaspaz3 ve kaspaz 9) artışına sebep olarak hücreleri apoptoza sürüklediği ileri sürülmektedir GSK3, periferik ve merkezi sinir sisteminde bulunan, hücre çoğalması, hücre içi sinyal

iletimini değiştirerek glukoz regülasyonu ve apoptoz başta olmak üzere proinflatuar sitokin ve interlökin üretimi, çeşitli protein kinazların aktivasyonu gibi süreçlerde rol oynamaktadır (201).

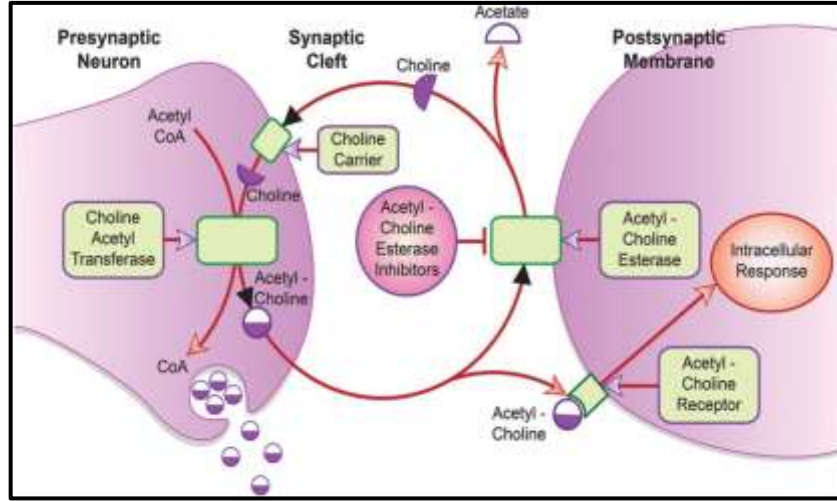
Ayrıca proapoptotik (Bax, Bac, Bad) ve antiapoptotik (Bcl-2 ve Bcl-xL) proteinler gibi bazı apoptotik belirteçlerin miktarlarının farklı olması, öncül kaspaz 8, 9 ve efektör kaspaz 3, 6'nın varlığı, AChE seviyesinin arttığı kolinerjik nöronlarda meydana gelen apoptozisin açıklanmasına olanak tanımaktadır (206).

Amiloid prekürsör proteini (APP), 21. Kromozom üzerinden kodlanan bir transmembran proteinidir ve amiloid β ($A\beta$)'nin AChE ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (211). APP sentezi sırasında β ve γ sekretazların aktivitelerinin artması bölgesel nörotoksik etkilere sebep olan β kıvrımlı plakların ($A\beta$ -42) oluşmasını tetiklemektedir. Beyin dokusunda $A\beta$ -42'nin birikimi amiloid plak oluşumunu ve AChE miktarını artırdığı söylenmektedir (207). Artan AChE bazı protein sentezlerini değiştirerek APP üretimini ve dolayısıyla $A\beta$ üretimini etkilediği belirtilmektedir (208).

ACh'nin anti-inflatuar etkili olduğu bilinmektedir ve AChE miktarındaki artışa bağlı olarak ACh hidrolizindeki artış nöronal faaliyetlerin eksikliğine sebep olmaktadır. Anti-inflatuar aktivitenin azalması ve buna bağlı olarak da inflamatuvar aktivitenin artması (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α), hastalığın seyrinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (209).

4.9.3.3. Alzheimer Hastalığında AChE İnhibitörlerinin Kullanılması

Yapılan araştırmalar, Alzheimer hastalığında, AChE'nin artışına bağlı olarak ACh miktarındaki azalmanın hafızanın kötüleşmesine sebep olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca bu enzimin Alzheimer hastalığın diğer bulgularıyla da ilişkili olduğunun keşfedilmesiyle birlikte, kolinesteraz inhibitörü olan ilaçların (antikolinesterazlar) keşfi başlamıştır ve kullanılan en etkili ilaç grubunu oluştırmaktadırlar. Antikolinesteraz ilaçlar, AChE'yi geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek asetilkolinin hidrolizini engelleyerek asetilkolinin reseptörler düzeyinde aktivitesinin artmasını sağlamaktadır (210).



Şekil 13. AChE inhibitörlerinin etki mekanizması (Jeger'den, 210)

Huperzin B, hopeahainol A, salvianolik asit, birulokinon ve asetil şikonin gibi AChE inhibitörü olduğu bilinen maddelerin, nöron model hücrelerinde yapılan çalışmalarda, H_2O_2 'in hücrelerde oluşturduğu sitotoksik etkilere karşı koruyucu olduğu ve hücrelerdeki apoptoz oranını azattığı bildirilmektedir (211-213).

Günümüze kadarki çalışmalarda elde edilen AChE inhibitörleri ile hastalığın tam anlamıyla tedavisi mümkün olmamaktadır; fakat semptomların yavaşlamasını sağlayarak hastalığın ilerleyişini yavaşlatmaktadır. Bu sebeple, son yıllarda, yeni ve doğal kaynaklı koruyucu ve tedavi edici potansiyeli olan antikolinesteraz ajanların bulunması ile ilgili araştırmaların arttığı belirtilmektedir (201).

4.9.3.4. Bitkilerden AChE inhibitörleri

AChE enziminin inhibisyonu, Alzheimer hastalığı, yaşlılık demansı, ataksi ve myastenia gravis gibi nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılabilecek hedef yöntemlerden biri olduğu düşünülmektedir. Bitkiler, AChE inhibitörlerinin keşfinde potansiyel kaynak olarak görülmektedir (214).

Nörodejeneratif hastalıklar ve farklı nörofarmakolojik rahatsızlıklar gibi kognitif bozuklukların tedavisinde birçok bitkinin geleneksel olarak kullanıldığı bildirilmektedir (214). Kore tıbbında hafıza ve bilincin geliştirilmesi için kullanılan *Acorus calamus*, *Acorus gramineus*, *Bupleurum falcatum*, *Dioscorea batatas*, *Epimedium koreanum*, *Poria cocos* ve *Zizyphi jujube* türlerinden elde edilen metanol ekstraktları, kolinesteraz inhibitor etkinlikleri açısından araştırılmış ve *A. calamus* ve *E. koreanum*'a ait

örneklerin sonuçlarının anlamlı olduğu bildirilmiştir (215). Ayrıca farklı araştırmalarda *Stephania suberosa*, *Tabernaemontana divaricata*, *Rhododendron ponticum*, *Rhododendron luteum*, *Corydalis solida*, *Glaucium corniculatum* ve *Buxus sempervirens* türlerinin de antikolinesteraz inhibitör etkinliklerinin olduğu belirtilmektedir (216-219).

Tablo 4. AChE inhibitör etkinliğine sahip olduğu bilinen bitkiler (Mukherjee'den, 214)

Tür adı	Familyası	Etkili kısmı	Referans
<i>Abutilon indicum</i>	Malvaceae	Tamamı	217
<i>Acanthus ebracteatus</i>	Acanthaceae	Toprak üstü	217
<i>Aegle marmelos</i>	Rutaceae	Meyve posası	217
<i>Albizia procera</i>	Leguminosae	Kabuğu	217
<i>Bacopa monniera</i>	Scrophulariaceae	Tamamı	219
<i>Butea superba</i>	Leguminosae	Kök kabukları	217
<i>Buxus sempervirens</i>	Buxaceae	Tamamı	217
<i>Carthamus tinctorius</i>	Compositae	Çiçek	217
<i>Cassia fistula</i>	Leguminosae	Kök	218
<i>Corydalis solida</i>	Papaveraceae	Tamamı	217
<i>Cyperus rotundus</i>	Cyperaceae	Tamamı	217
<i>Fumaria capreolata</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Euphorbia antiquorum</i>	Euphorbiaceae	Kök	218
<i>Fumaria vaillantii</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria kralikii</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria asepala</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria densiflora</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria flabellate</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria petteri</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria macrocarpa</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria cilicica</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria parviflora</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Fumaria judaica</i>	Fumariaceae	Kök	218
<i>Ginkgo biloba</i>	Coniferae	Kök	219, 220
<i>Glaucium corniculatum</i>	Papaveraceae	Kök	218
<i>Lycopodium clavatum</i>	Lycopodiaceae	Kök	218
<i>Mammea harmandii</i>	Guttiferae	Çiçek	217
<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	Toprak üstü	220
<i>Michelia champaca</i>	Magnoliaceae	Yaprakları	217

Tablo 4. (Devam)

Tür adı	Familyası	Etkili kısmı	Referans
<i>Mimosa pudica</i>	Leguminosae	Tamamı	217
<i>Mimusops elengi</i>	Sapotaceae	Çiçek	217
<i>Musa sapientum</i>	Musaceae	Meyvesi	217
<i>Myricaria elegans</i>	Tamaricaceae	Topraküstü	221
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nelumbonaceae	Stamenleri	217
<i>Paederia linearis</i>	Rubiaceae	Tamamı	217
<i>Piper interruptum</i>	Piperaceae	Kök	217
<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	Çekirdekleri	217
<i>Plumbago indica</i>	Plumbagineaceae	Kök	217
<i>Ptychopetalum olacoides</i>	Olacaceae	Kök	222
<i>Rhododendron luteum</i>	Ericaceae	Tamamı	217
<i>Rhododendron ponticum</i> var. <i>ponticum</i>	Ericaceae	Tamamı	221
<i>Rhodiola rosea</i>	Crassulaceae	Kök	223
<i>Salvia lavandulaefolia</i>	Lamiaceae	Tamamı	224-226
<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Tamamı	224-226
<i>Stephania suberosa</i>	Menispermaceae	Kökü	217
<i>Streblus asper</i>	Moraceae	Çekirdekleri	217
<i>Tabernaemontana divaricata</i>	Apocynacea	Kökü	217
<i>Terminalia bellirica</i>	Combretaceae	Meyvesi	217
<i>Tiliacora triandra</i>	Menispermaceae	Kökü	217
<i>Vicia faba</i>	Fabaceae	Tamamı	218

Etnofarmakolojik araştırmalar ve biyolojik aktivite rehberli izolasyon çalışmaları, AChE inhibitörlerinin bitkisel kaynaklardan elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır ve Tablo 5’de bitkisel kaynaklardan elde edilen AChE İnhibitörleri yer almaktadır (214).

Tablo 5. AChE inhibitör etkinliği olan fitokimyasallar (Mukherjee'den, 214)

Bileşik ismi	Sınıf	Kaynak	Referans
Assoanin	Steroidalkaloit	<i>Narcissus assoanus</i>	227
Buksamin B	Steroidalkaloit	<i>Bucus hyrcana</i> <i>Bucus papillosa</i>	228
Koronaridin	İndolalkaloit	<i>Tabernaemontana australis</i>	229
Korinolin	İzokinolinalkaloit	<i>Corydalis incisa</i>	230
N,N-dimetilbuksapapin	Steroidalkaloit	<i>Bucus papillosa</i>	228
Epinorgalantamin	Steroidalkaloit	<i>Narcissus confuses</i> <i>N. perezchiscanoi</i> <i>Narcissus leonensis</i> <i>N. legionensis</i> <i>Narcissus poeticus</i>	227
Galantamin	Steroidalkaloit	<i>Galanthus nivalis</i> <i>Narcissus confuses</i> <i>Lycorus radiate</i>	217, 227, 231, 232
(-)-Huperzin A	Kinolizidinalkaloit	<i>Huperzia serrata</i> <i>Huperzia dalhousieana</i>	218, 233, 234
11-Hidroksigalantamin	Steroidalkaloit	<i>Narcissus poeticus</i>	227
Oksoassoanin	Steroidalkaloit	<i>Narcissus assoanus</i>	227
Palmatin	İzokinolinalkaloit	<i>Corydalis speciosa</i>	235
Fizostigmin	İndolalkaloit	<i>Physostigma venenosum</i>	236
Protopin	İzokinolinalkaloit	<i>Corydalis speciosa</i>	235
Rupikolin	İndolalkaloit	<i>Tabernaemontana australis</i>	229
Sanguinin	Steroidalkaloit	<i>Eucharis grandiflora</i>	227
Sarsalignon	Steroidalkaloit	<i>Sarcococca saligna</i>	228
α -Solanine	Glikoalkaloit	<i>Solanum tuberosum</i>	237
Vaganin	Steroidalkaloit	<i>Sarcococca saligna</i>	228
Voakangin	İndolalkaloit	<i>Tabernaemontana australis</i>	229
Voakangin hidroksindolenin	İndolalkaloit	<i>Tabernaemontana australis</i>	229
Sinatrozit A	Pregnan glukoizit	<i>Cynanchum atratum</i>	228
Sinatrozit B	Pregnan glukoizit	<i>Cynanchum atratum</i>	228
Norswertianolin	Bellidin 8-O- β -glukopiranoizit	<i>Gentiana cambpestris</i>	239
Swertianolin	Bellidin 8-O- β -glukopiranoizit	<i>Gentiana cambpestris</i>	239
(+)- α -Viniferin	Stilben oligomeri	<i>Caragana chamlaque</i>	240
Bellidin	Ksanton	<i>Gentiana cambpestris</i>	239
Bellidifolin	Ksanton	<i>Gentiana cambpestris</i>	239
Ursolik asit	Hidroksi-heptametil İkosahidropiken karboksilik asit	<i>Origanum majorana</i>	241

4.10. Sitotoksosite ve Belirleme Yöntemleri

Sitotoksosite, fiziksel, kimyasal veya biyolojik faktörlerin, hücrelerde bazı makromoleküllerin sentezlerini engelleyerek hücresel fonksiyonların ve hücre yapısının zarar görmesine sebep olması olarak ifade edilebilmektedir (242, 243). Sitotoksitenin hücrede oluşturduğu etki (apoptoz, otofaji, nekroz, sitostazis), sitotoksik maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak değişmektedir (244, 245). Kimyasal maddelerin sitotoksitesini ile ilgili yapılan çalışmalar, bu maddelerin hücre ve dokular üzerindeki etki mekanizmaları hakkında bilgi vermesi açısından önem arz etmektedir. Bunun yanında kanser ve enflamasyon başta olmak üzere çoğu patolojik durumun etyolojisinde sitotoksosite bulunmaktadır (246).

Bitkilerde bulunan fizyolojik ve morfolojik olarak önemi olan çeşitli sekonder metabolitlerin insan sağlığındaki etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler, glukosinolatlar, tokoferoller ve karatenoitler gibi sekonder metabolitlerin antikanser etkilerinin olduğu bildirilmektedir (247-251).

Sitotoksosite çalışmalarında hücrenin canlılığı, yaşamı, proliferasyonu ve metabolik sitotoksitesinin belirlenmesine dayalı yöntemlerin kullanıldığı bilinmektedir (243, 252, 253):

1. Canlılık (viability) değerlendiren testler: Sitotoksik ajana maruz kalan hücrede, kısa vadede meydana gelen toksik reaksiyonların oluşturduğu etkilerin belirlenmesi söz konusudur. Membran yapısı zarar görmüş hücreler tripan mavisi, eritrosin, naftalen siyahı ve propidyum iyodür gibi bu hücrelerin içerisine alınabilen özel boyalar ile membran bütünlüğü bozulmamış hücreler ise diasetil floressein ve nötral kırmızısı gibi vital boyalar kullanılarak belirlenmektedir.

2. Yaşam (survival) değerlendiren testler: Sitotoksik ajana maruz kalan hücrede uzun vadede meydana gelen toksik reaksiyonların oluşturduğu etkilerin belirlenmesi söz konusudur. Dilüe tek tip hücre süspansiyonundan izole edilmiş hücrelerin, yeniden koloni oluşturabilme yeteneği hücre yaşamı olarak adlandırılmaktadır.

3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler: Sitotoksik ajana maruz kalan hücrede meydana gelen toksik reaksiyonların oluşturduğu etkiler, canlı hücrelerdeki yeni DNA sentezinin belirlenmesine bağlı olarak değerlendirilmektedir. 3H-timidin

veya Bromodeoksiuridin (BrdU) gibi hücre içine alınarak DNA sentezinde kullanılan ajanlar kullanılmaktadır.

4. Metabolik sitotoksikite değerlendirme testleri: Sitotoksik ajana maruz kalan hücrede, uzun vadede meydana gelen toksik etkiler, hücrelerin metabolik özellikleri veya proliferasyonunun takibi kolorimetrik, lüminesans veya enzimatik yöntemlerle belirlenmektedir (243, 254-257).

Metabolik aktivitenin belirlendiği testlere tetrazolyum tuzunun formazon kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanan MTT, XTT ve WST testleri örnek olarak verilmektedir. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanıp tetrazolyum halkasına elektron transfer edilerek renkli formazan kristalleri meydana gelmektedir ve bu işlemin canlı hücreler tarafından gerçekleştirilmesi ölü-canlı hücre sayısının belirlenmesini sağlamaktadır (245, 258).

4.10.1. Doğal Kaynaklı Antikanser Ajanlar

Tümörler bazı kemoterapötik ajanların sitotoksik aktivitesine karşı hücrel direnç mekanizmaları geliştirmektedirler. Bu durum, kanserin klinik tedavisinde gözlenen en önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. Ayrıca kullanılan antikanser ilaçların sağlıklı hücreler üzerinde zararlı etkiler oluşturması, daha seçici ve güçlü etkiye sahip bileşiklerin keşfini ihtiyaç haline getirmektedir (259).

Kemoterapide önemli rolü bulunan doğal ürünlerin çok fazla biyolojik aktiviteye ve kimyasal yapıya sahip olduğu; bu sayede araştırmacılara çok sayıda prototip sunduğu belirtilmektedir (259). Ayrıca doğada karşılaşılan biyoçeşitlilik ve kimyasal çeşitlilik, yeni kimyasal bileşik sınıflarının keşfini ve aynı zamanda daha önce bilinmeyen antikanser ajanlarının ortaya çıkma imkânını artırdığı vurgulanmaktadır (259, 260).

Bitkilerde bulunan karotenoidlerin, alkaloidlerin, organosülfür bileşiklerinin (izotiyosiyanatlar, indoller, allil sülfür bileşikleri) ve polifenolik bileşiklerin (flavonoidler, tanenler, stilbenler, kumarinler, kurkumin, resveratrol ve tanenler) antikanser etkilerinin olduğu bilinmektedir (261-265). Brasinosteroidler, bitkilerde hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını, hastalık ve strese karşı direnç ve tolerans geliştirmesi gibi hormonal olayların düzenlenmesinde rol oynayan doğal bileşikler olarak bilinmektedir. Bu bitkisel steroidlerden 28-homosastasteron ve 24-epibrasinolit'in

çeşitli kanser hücrelerinde çok düşük miktarlarda bile etkili olduğu kanıtlayan çalışmalar mevcuttur (266-268).

Günümüzde klinik kullanımda olan, doğal kaynaklardan elde edilen antikanser ajanları vinka alkaloidleri, podofilotoksinler, taksanlar ve kamptotesinler olmak üzere dört ana bileşik grubu olarak bilinmektedir. Bu kaynaklardan türetilen yarı sentetik antikanser ajanları da bulunmaktadır (260, 269, 270).

Tablo 6. Antikanser etkinliği olan bazı fitokimyasallar

Bileşik ismi	Sınıf	Kaynak	Referans
Vinblastin vinkristin	Vinka alkaloidleri	<i>Catharanthus roseus</i>	271
Kampotesin	İndol alkaloid	<i>Camptotheca acuminata</i>	272
Epipodofilotoksin	Lignan	<i>Podophyllum peltatum</i> <i>Podophyllum emodi</i>	273
Paklitaksel	Alkaloid	<i>Taxus brevifolia</i>	274
Homoharringtonin	Alkaloid	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	275, 276
Elliptisin	İndol alkaloid	<i>Bleekeria vitensis</i>	277
Kombretastatin	Stilben	<i>Combretum caffrum</i>	278

4.11. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, 1900'lü yılların başlarında Mikhail Tswett'in klorofil gibi bitki pigmentlerini ayırmak için kullandığı bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Kromatografi, bir karışımı oluşturan bileşenlerin, biri hareketli diğeri sabit olmak üzere iki fazlı bir ortamda farklı tutunma özelliklerinden yararlanarak gerçekleştirilen ayırma işlemi olarak bilinmektedir (279).

Kromatografik yöntemler ayırma mekanizmalarına, faz tiplerine ve uygulama şekline bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (279).

Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması:

Ayırma Mekanizmasına Göre

- Adsorpsiyon Kromatografisi
- Dağılma (Partisyon) Kromatografisi
- İyon Değişimi Kromatografisi
- Jel Filtrasyon Kromatografisi
- Afinite Kromatografisi

- İyon Çifti Kromatografisi

Faz Tiplerine Göre

- Sıvı Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi

Uygulama Şekline Göre

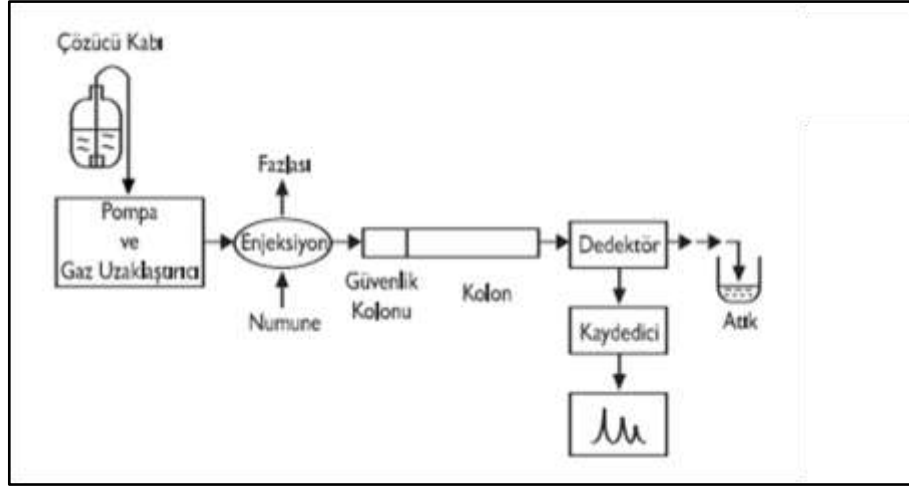
- Düzlemsel Kromatografi
- Kolon Kromatografisi

4.12. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi (HPLC)

Kromatografik analizlerde, sabit fazın bulunduğu kolonun boyu arttıkça ve partikül boyutları küçüldükçe bileşenlerin ayırımları artmaktadır. Partikül boyutu ne kadar küçük olursa, hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı arttığından hareketli fazın kolondan geçişi de o kadar zor olmaktadır ve daha yüksek basınç uygulaması gerektirmektedir. Bu durum yüksek basınçlı sıvı kromatografisini meydana getirmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi uçucu olmayan veya sıcaklıkla bozunmayan, sıvı fazda çözünebilen kimyasal ve biyolojik numunelerin, kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça duyarlı bir yöntem olarak bilinmektedir. Karışımı oluşturan bileşenler, kolonda sabit faz tarafından tutunurlar ve yüksek basınç altında kolondan geçirilen hareketli fazın akışı ile birlikte bileşenlerine ayrılmaktadırlar. Karışımı oluşturan bileşenlerin kolona olan tutunma güçleri de farklıdır ve böylece bileşenler kolonu farklı sürelerde terk etmektedirler. Kolonu terk eden bileşenler, dedektör aracılığıyla algılanır ve kolondan çıkış zamanının karşı dedektör sinyali kaydedilerek kromatogramlar elde edilmektedir (280).

HPLC cihazı genel olarak pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşmaktadır.



Şekil 14. Bir HPLC cihazının şematik gösterimi (281)

Pompanın görevi analiz boyunca kararlı bir akış sağlayarak, sabit bir basınçta hareketli fazın kolon ve dedektörden geçmesini sağlamaktadır (282, 283).

Kolon HPLC sistemin performansını belirleyen parçalardan biridir ve kolondaki ayırım kullanılan kolon dolgu maddesinin yapısına, parçacık boyutuna ve uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (283). HPLC kolonları polaritelerine göre normal faz ve ters faz olarak tercih edilmektedir. Kolon dolgu maddesini oluşturan sabit faz, silikajel gibi polar bir madde ise normal faz; silikajelin içerdiği SiOH gruplarının alkil zincirleriyle bağlanması sonucu elde edilen daha apolar bir madde ise ters faz olarak bilinmektedir. Normal fazda daha apolar organik çözücüler hareketli faz olarak seçilirken; ters fazda daha polar çözücüler kullanılmaktadır (283, 285).

Polifenolik bileşikler içerdikleri hidroksil gruplarından dolayı polar yapıdadırlar ve ters faz kolonlar yardımıyla ayrımları sağlanmaktadır. HPLC ile yapılan fenolik bileşiklerin analizlerinde çoğunlukla hareketli faz olarak asetonitril, metanol ve su kullanılmakla birlikte zayıf asidik özellik gösteren asetik asit ve formik asitin düşük miktarlarda bulunduğu çözeltileri de tercih edilmektedir. Fenolik bileşikler UV-Görünür bölgedeki (200-800 nm) dalga boylarında absorbands verdiğinden HPLC analizlerinde dedektör olarak UV-Vis dedektörlerinden yararlanılmaktadır. Fenolik maddelerin yapılarına bağlı olarak farklı dalga boylarında maksimum absorbandsa sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin; fenolik asitlerden benzoik asit türevleri 270 nm’de maksimum absorbands verirken, sinamik asit türevleri 315 nm’de maksimum absorbands vermektedir (283, 286).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Bitki Örneklerinin Toplanması, Teşhisi, Kurutulması ve Öğütülmesi:

B. auriculata var. *paludosa* Erzincan yöresi Pöske Dağı'ndan (2100 m), *B. plantaginea* Kelkit (Gümüşhane), Çimen Köyü'nden (1750 m) ve *B. integrifolia* Kelkit (Gümüşhane), Uzunkol Köyü'nden (1900 m) toplanmıştır. Toplanan türlerin tayinleri Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından yapılmıştır. Bitkilere ait herbaryum örnekleri Erzincan Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda saklanmaktadır (Kandemir 10863, 10864, 10865).

Tez çalışmalarında bitkilerin gölgede ve hava akımı bulunan serin bir alanda kurutulmuş çiçekli topraküstü kısımları kullanılmıştır. Çalışma materyalleri öğütücü değirmen yardımıyla toz edilmiştir.

5.2. Türlerin Ekstraksiyonu

Türlerin metanolle yapılan ekstraksiyonu sonucu elde edilen ham ekstrenin kısmi fraksiyonlandırılması, artan polarite derecesine göre, kloroform, etil asetat ve su ile yapılmıştır.

Bitkilerin toz edilmiş topraküstü kısımları (en az 250'şer g) 1000 mL metanolde, oda sıcaklığında çalkalayıcıda ekstre edilmiş, süzölmüş ve süzöntü 30 °C'de, evaporatörde yoğunlaştırılmıştır. Bu işlem her bir tür için iki defa yapılmış ve elde edilen ekstreler birleştirilmiştir.

Yoğunlaştırılmış ekstrenin 3/4'ü, su:metanol (9:1) karışımının 300 mL'sinde süspande edilerek ayırma hunisinde 300 mL kloroform eklenip çalkalanarak 2 tekrarlı partitasyon gerçekleştirilmiştir. Kloroformlu faz alındıktan sonra evaporatörde yoğunlaştırılmış ve böylece kloroform ekstresi elde edilmiştir. Ayırma hunisinde arda kalan sulu çözeltiye 300 mL etil asetat eklenip çalkalayarak 2 tekrarlı partitasyon gerçekleştirilmiş, etil asetat fazı ayrılıp, evaporatörde yoğunlaştırılarak etil asetat ekstresi elde edilmiştir. Ayırma hunisinde arda kalan sulu çözelti yoğunlaştırılarak su ekstresi elde edilmiştir.

Elde edilen metanol ekstreleri ve bu ekstrelerden hareketle hazırlanan kloroform, etil asetat ve su alt fraksiyonları biyolojik aktivite ve fitokimyasal çalışmalarında kullanılmıştır.

5.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Türlerden elde edilen metanol ekstralarında ve bu ekstralardan hareketle fraksiyonlanan kloroform, etil asetat ve arta kalan su ekstralarında antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite ile enzim inhibisyonu (tirozinaz, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz) tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.3.1. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında çalışılan biyolojik aktivite çalışmaları sırasında kullanılan cihazlar marka/model olarak aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model
pH metre	Starter 3000, OHARUS
Hassas Terazı	OHAUS Pioneer
Saf Su Cihazı	Thermo Scientific
Vorteks karıştırıcı	Heidolph Reax Top Vortex Mixer
Etüv	Ecocell
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR
Rotary evaporatör	Heidolph Hei-VAP Precision
Vakum Pompası	Millipore
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf
İnkübatör	Memmert
Mikro plate okuyucu	BMG Labtech Spectrostar Nano
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Memmert

5.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında çalışılan biyolojik aktivite çalışmaları sırasında kullanılan kimyasal madde ve malzemeler aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 8. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Marka
Asetonitril-LC Saflıkta	Merck
Asetik Asit	Merck
HCl	Merck
MFerland Çözeltisi	Merck
Metanol-LC Saflıkta	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
Etil asetat	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
DPPH	Sigma-Aldrich
Gallik asit	Sigma-Aldrich
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich
Troloks	Sigma-Aldrich
BHT	Sigma-Aldrich
α -Kojik asit	Sigma-Aldrich
Tirozinaz	Sigma-Aldrich
NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich
L-DOPA	Sigma-Aldrich
Asetilkolinesteraz	Sigma-Aldrich
Bütirilkolinesteraz	Sigma-Aldrich
Asetiltiyokolin iyodür	Sigma-Aldrich
Bütiriltiyokolin iyodür	Sigma-Aldrich
DTNB	Sigma-Aldrich
DMEM	Thermo Fisher
HI-FBS	Capricorn
Penisilin-Streptomisin (10000 U/ml /10000 $\mu\text{g/ml}$)	Wisent
L-Glutamine	Thermo Fisher
Trypsin/EDTA	Bionest
MTT cell proliferation kit	Roche

5.3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Tez kapsamında çalışılan biyolojik aktivite çalışmaları sırasında kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 9. Kullanılan çözeltiler

Çözelti	Hazırlanışı
Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin Kullanılan Çözeltiler	
0.2 N Folin-Ciocalteu	2 N'lik hazır olarak satın alınmış çözeltiden 1:10 oranında saf suyla seyreltilerek hazırlanmıştır.
% 7.5'luk Na ₂ CO ₃	7.5 g Na ₂ CO ₃ 90 mL suda çözölmüştür ve 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
Gallik Asit (1 mg/mL)	1 mg gallik asit 1 mL metanolde çözölmüştür stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 0.5-0.25- 0.125- 0.0625- 0.03125 mg/mL olacak şekilde metanolle seyreltilerek dilüe örnekleri hazırlanmıştır.
FRAP Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
HCl (100 mM)	25 mL saf suyun üzerine % 37'lik HCl'den 205 µL ilave edilerek hazırlanmıştır.
TPTZ (10 mM)	46.8 mg TPTZ stok maddeden tartılmıştır, 6 mL 100 mM'lık HCl içinde çözölmüştür ve üzerine 9 mL metanol ilave edilmiştir
FeCl ₃ (20 mM)	48.6 mg FeCl ₃ 6 mL saf suyla çözölmüştür, üzerine 9 mL metanol ilave edilerek hazırlanmıştır.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2.325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edilmiştir.750 mL'ye saf suyla tamamlanmıştır.
FRAP Reaktifi	300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlanmıştır.
Troloks (0.25 mg/mL)	2.5 mg troloks 10 mL etanolde çözölmüştür stok çözeltisi hazırlanmıştır.
DPPH' Radikal Temizleme Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler	
DPPH' Reaktifi (100 mM)	100 mL'si için; 3,94 mg DPPH' tartıldı, 90 mL metanolle çözölmüştür ve 100 mL'ye tamamlanmıştır.
BHT (0.01 mg/mL)	0.1 mg BHT tartılmıştır, 10 mL metanolde çözölmüştür stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti metanolle 1:1 oranında seyreltilerek 10-5-2.5-1.25-0.625µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır.
CUPRAC Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
Troloks (0.25 mg/mL)	25 mg Troloks 100 mL metanolde çözölmüştür stok çözeltisi hazırlanmıştır.
7.5 mM Nc Çözeltisi	78 mg Neokuproin 50 mLmetanol ile çözölmüştür hazırlanmıştır.
10 mM CuCl ₂ .2H ₂ O	92.4 mg CuCl ₂ .2H ₂ O 50 mL distile su ile çözölmüştür hazırlanmıştır (NaOH ile pH 7 olacak şekilde ayarlandı.).
1 M NH ₄ CH ₃ COO ⁻	3.8 g NH ₄ CH ₃ COO ⁻ 50 mL distile su ile çözölmüştür hazırlanmıştır (NaOH ile pH 7 olacak şekilde ayarlanır.).
Antimikrobiyal Aktivite Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
Mc Farland 0.5 bulanıklık standardı	0.5 ml BaCl ₂ (%1.175) ve 99.5 ml H ₂ SO ₄ çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.
BaCl ₂ (%1.175)	1.175 g BaCl ₂ tartıldı ve 100 ml saf suda çözölmüştür.
Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
L- DOPA çözeltisi (2.5 mM)	0.004925g L-DOPA 10 mL (pH 6.8) fosfat tampon içinde çözölmüştür hazırlanmıştır.
Kojik asit standardı (500, 100, 50,25 mg/mL)	2.5 mg kojik asit 5 mL fosfat tamponu çözeltisinde çözölmüştür ve elde edilen 500 (500, 100, 50,25 mg/mL konsantrasyonundaki kojik asit çözeltisinden, tampon çözelti ile dilüe örnekleri hazırlanmıştır.
Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
Asetiltiyokolin iyodür	32.8 mg asetiltiyokolin iyodür 8 mL distile suda çözölmüştür ve kullanmadan hemen önce 8 mL fosfat tamponu (pH 8) ilave edilmiştir.
Bütiriltiyokolin iyodür	4 mg asetiltiyokolin iyodür 8 mL distile suda çözölmüştür ve kullanmadan hemen önce 8 mL fosfat tamponu (pH 8) ilave edilmiştir.
Asetilkolinesteraz	0.2 mg enzim tartılmıştır, 3 mL fosfat tamponu (pH 8) ilave edilerek hazırlanmıştır.
Bütirilkolinesteraz	0.2 mg enzim tartıldı, 1.8 mL fosfat tamponu (pH 8) ilave edilerek hazırlandı.
DTNB çözeltisi	16 g DTNB ve 7.5 g NaHCO ₃ 4 mL fosfat tamponunda (pH 7) çözölmüştür ve kullanmadan hemen önce 4 mL fosfat tamponu (pH 8) ilave edilmiştir.
Fosfat Tamponu (pH 8)	8.75 g sodyum fosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O) 950 mL distile suda çözöldükten sonra 1N NaOH çözeltisiyle pH 8 olacak şekilde ayarlanmıştır ve son hacmi 1 L'ye distile suyla tamamlanmıştır.

5.3.4. *Barbarea* Türlerinde Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Türlerin oksidasyonu engelleme kapasiteleri Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini, Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Ölçümü, Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini ve DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini ile test edilmiştir.

5.3.4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Toplam fenolik madde miktarı tayini, suda ve organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin, alkali ortamda FCR ile renkli kompleksler oluşturması esasına dayanan Singleton ve Rossi'nin modifiye ettiği yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir (287).

Çalışmada, standart madde olarak fenolik bir bileşik olarak bilinen gallik asit kullanılmıştır. Çalışmada 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış bitki ekstralarına ait numuneler ve farklı konsantrasyonlarda (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.63 µg/mL) gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. Deneyde kör olarak numunelerin kendi çözücülerini kullanılmıştır. Gallik asit ve numune çözeltilerinden 50'şer µL alınıp, üzerine sırasıyla 2,5 mL distile su ve 250 µL FCR ilave edilmiştir. Vortekslenen karışımlar oda ısısında 3 dk bekletildikten sonra üzerine 750 µL % 20'lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenmiştir. Tüm tüpler vorteksledikten sonra 2 saat oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansları 765 nm dalga boyunda spektrofotometre aracılığıyla ölçülmüştür.

Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerine karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak standarda ait grafik elde edilmiştir. Çizilen grafiğe göre bitki ekstralarının toplam fenolik madde miktarı mg GAE/g cinsinden hesaplanarak mg/g ekstre ± standart sapma olarak verilmiştir. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmıştır.

5.3.4.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

FRAP metodunda Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazin) kompleksinin antioksidan madde varlığında indirgenmesi ile oluşan mavi renkli Fe(II)-TPTZ kompleksinin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esas alınmıştır (288). Kalibrasyon için Troloks'un değişen konsantrasyonlarda (62.5, 125, 250, 500, 1000 µM) hazırlanmış etanolük çözeltileri kullanılmıştır. Bitki ekstralarına ait

numuneler 10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. FRAP reaktifi kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanmış ve çalışma boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Deneyde kör olarak numunelerin kendi çözücülerini kullanılmıştır. Gallik asit ve numune çözeltilerinden 50'şer μL alınıp, üzerine 1,5 mL FRAP reaktifi pipetlenmiştir. Tüpler vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansları 565 nm dalga boyunda spektrofotometre yardımıyla belirlenmiştir. Numunelerin FRAP değerleri standart madde olarak kullanılan Troloks ile karşılaştırılarak TEAC (μM) olarak ifade edilmiştir.

5.3.4.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

DPPH radikali ticari olarak satın alınabilen bir radikaldir ve deney sırasında bu radikalin metanol ile hazırlanan 100 μM 'lık çözeltisi kullanılmıştır. Antioksidan bileşiklerin varlığında mor menekşe renkli DPPH $\cdot$ radikalinin rengi açılır ve 517 nm dalgaboyunda maksimum absorbansındaki azalış tespit edilir. Standart madde olarak metanol kullanılarak 0.01 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış olan BHT kullanılmıştır (122).

Öncelikli olarak analizi yapılacak numunelerin çalışma için uygun konsantrasyonları belirlenmiştir. Ön denemelerde hazırlanan numune ve DPPH çözeltisinden 1:1 oranında pipetlenerek 40 dk beklenmiştir. Süre sonunda radikalin mor menekşe rengi kalıcı ise konsantrasyonun numune için uygun olduğu belirlenmiş, rengin kaybolması durumunda numune konsantrasyonu seyreltilerek aynı şekilde ön denemeye devam edilmiştir. Numunelerin belirlenen konsantrasyonları kendi çözücülerini ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanırken; BHT stok çözeltisinin de yarıyarıya seyreltilmiş 5 farklı dilüsyonu hazırlanmıştır. Eşit hacimde (750 μL) DPPH $\cdot$ çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında, karanlık ortamda, ilk pipetlemeden sonra 55 dakika olacak şekilde bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansı, 517 nm dalga boyunda, köre karşı spektrofotometre yardımıyla okunarak belirlenmiştir. Kör olarak DPPH $\cdot$ çözeltisi ve numunelerin çözüldüğü çözücüler kullanılmıştır. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Tüm numuneler 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

5.3.4.4. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

Cuprac metodunda 2,9- dimetil-1,10-fenantrolin (Nc)'in Cu(II) ile oluşturmuş olduğu Cu(II)-Nc'nin, antioksidan madde varlığında oluşturduğu şelatın [bakır(I)-neokuproin (Cu(I)-Nc)] 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esas alınarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (120).

Kalibrasyon için Troloks'un değişen konsantrasyonlarda (62.5, 125, 250, 500, 1000 µM) hazırlanmış metanolük çözeltileri kullanılmıştır. Bitki ekstralarına ait numuneler 10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Deneyde kör olarak numunelerin kendi çözücülerini kullanılmıştır. Numune çözeltilerinden 500'şer µL alınıp, üzerine 1000 µL NH₄CH₃COO⁻ ve 1000 µL CuCl₂.2H₂O pipetlenmiştir. Daha sonra test çözeltilerine 1000 µL Nc reaktifi pipetlenirken numune körü için 1000 µL reaktif çözücüsü (metanol) 20 sn arayla pipetlenmiştir. Tüpler vortekslelendikten sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansları 450 nm dalga boyunda spektrofotometre yardımıyla belirlenmiştir. Numunelerin antioksidan kapasitesi standart madde olarak kullanılan Troloks ile karşılaştırılarak TEAC (µM) olarak ifade edilmiştir.

5.3.5. *Barbarea* Türlerinde Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Tez kapsamında çalışılan türlerden elde ekstraların antimikrobiyal aktivitelerinin tayin edilmesinde Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ve Minimal İnhibisyon Yöntemi kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılan test mikroorganizmaları Gram (+) koklar [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 43251)], Gram (+) sporlu basiller [*Bacillus cereus* (702 Roma), Sporsuz basil [*Mycobacterium smegmatis* (ATCC607)], Gram (-) enterik basil [*Escherichia coli* (ATCC 25922)], Gram (-) non fermentatif bakteri [*Yersinia pseudotuberculosis* (ATCC 911), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)], Maya mantarı [*Candida albicans* (ATCC 60193), *Saccharomyces cerevisiae* (RSKK 251)] olarak belirlenmiştir.

5.3.5.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

Türlerden elde edilen ekstre ve alt fraksiyonların antimikrobiyal aktivitelerinin olup olmadığının belirlenmesinde ilk olarak agar kuyucuk difüzyon metodu kullanılmıştır (289).

Gram (+) ve gram (-) bakteriler için Mueller Hinton Agar ve broth, mantarlar için maya ekstreli sıvı besiyeri (YEG) (Difco, Detroit, MI) ve Potato Dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, MI), *M. smegmatis* için Brain Heart Infusion (BHI) agar ve broth (Merck, ABD) kullanılmıştır. Test edilecek bakteriler bir gece inkübe edildikten sonra kültür bakterilerinden sıvı besiyeri içinde yaklaşık olarak 10^6 kob/ml (koloni oluşturan birim=colony forming unit) olacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır. Önceden hazırlanmış katı besiyerlerine yaygın ekimleri yapılarak besiyerleri üzerinde steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Türler ait ekstre ve alt fraksiyonların çözücülerini uzaklaştırıldıktan sonra, DMSO ile her bir örneğin konsantrasyonu 10.000 ($\mu\text{g/mL}$) olacak şekilde yeniden çözülmüştür. Her bir kuyucuğa 50 μL test edilecek örneklerden ilave edilmiştir. Bakteri ihtiva eden petriler 24 saat, maya ihtiva eden petriler 48 saat, *M. smegmatis* kültürü yapılan petriler ise 3 gün 36 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (290). Süre sonunda bir cetvel yardımıyla inhibisyon zonları ölçülmüştür. Analizde standart madde olarak bakteriler için Ampisilin (10 μg), Streptomisin (10 μg) ve mayalar için Flukonazol (5 μg) kullanılmıştır. Tüm testler iki tekrarlı olarak çalışılmıştır ve ayrıca çözücü kontrol numunesi olarak DMSO kullanılmıştır.

5.3.5.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi

Agar kuyucuk metodunda türlerden elde edilen ekstre ve alt fraksiyonlarının etkinliğini kantitatif olarak belirleyebilmek için sıvı besiyerlerinde mikrodilüsyon sıvı yöntemi uygulanarak, MİK ($\mu\text{g/mL}$) olarak belirlenmiştir (290).

MİK yöntemi, “National Committee for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS) standartlarının belirlediği kriterler göz önüne alınarak yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan besiyerleri; bakteriler için Müller Hinton agar (MHA) ve sıvı (MHB) (H.7.3) (Difco, Detroit, MI), maya mantarları için Yeast Nitrogen Base sıvı (YNBB, pH 7.0) (Difco, Detroit, MI) ve PDA (Difco, Detroit, MI), *M. smegmatis* için Brain Heart Infusion (pH 7.2) besiyerleri kullanılmıştır. Kültürler 3–5 gün 35°C’de aerobik koşullarda inkübe edilmiştir (291).

Mikrodilüsyon test için ELISA pleytleri kullanılmıştır. Ekstrelerin 0.1 mL’si sıvı besiyerleri ile seri sulandırılmaları yapılarak inoküle edilen mikroorganizmaların bir gecelik kültürlerinden McFarland 0.5 bulanıklılığında (1×10^8 kob/ml) süapansiyonları

hazırlanmıştır. Süspansiyonlar 1:10 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa final test konsantrasyonu 5×10^4 kob/kuyucuk olacak şekilde 0.005 mL mikroorganizma konulmuştur. Pleytler 35 °C’de 16-72 saat süre ile aerobik koşullarda etüvde beklemeye bırakılmıştır. Standart çözücü kontrolü yanında kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), Streptomisin (10 µg) ve mayalar için Flukonazol (5 µg) kullanılmıştır.

5.3.6. *Barbarea* Türlerinde Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini

B. auriculata var. *paludosa*, *B. plantaginea* ve *B. integrifolia*’nın toz edilmiş çiçekli topraküstü kısımlarından, 10 mg/mL olarak hazırlanan metanol ekstraktları ve alt fraksiyonları (kloroform, etil asetat ve arta kalan su) potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) ile 25, 50, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde dilüe edilmiştir. Örneklerin tirozinaz inhibisyon kapasitesi, substrat olarak L-DOPA’nın kullanıldığı modifiye edilmiş metot yardımıyla spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (4). Fungal bir metabolik ürün olan ve bakır ile şelasyon sonucu güçlü tirozinaz inhibitör özellik gösteren α -Kojik asit pozitif kontrol için kullanılmıştır. α -Kojik asitin farklı konsantrasyonları (25, 50, 100 ve 500 µg/mL) hazırlanmıştır (292). Örneklerin ölçümleri 96-kuyucuklu mikropalak kullanılarak, ELISA okuyucu yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Deney protokolü A, B, C ve D olmak üzere kodlanarak oluşturulmuştur. A, 120 µL fosfat tamponu (pH=6.8), 40 µL tirozinaz solüsyonu (46 ünite/ mL); B, 160 µL fosfat tamponu (pH 6.8); C, 80 µL fosfat tamponu (pH 6.8), 40 µL tirozinaz solüsyonu (46 ünite/ mL), 40 µL örnek solüsyonu; D, 120 µL fosfat tamponu (pH 6.8), 40 µL örnek solüsyonu eklenerek ve karışımlar 23 °C’de 10 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir karışıma 40 µL L-DOPA çözeltisi konularak tekrar 23 °C’de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra mikropalaklar ELISA cihazına yerleştirilerek, örnekler ve kontrol numunesinin absorbansları 490 nm dalga boyunda okunmuştur. Absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerlerine yazılarak örneklerin tirozinaz enzim inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmıştır .

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A-B) - (C-D)] / (A-B) \times 100$$

Elde edilen sonuçlar madde miktarının logaritması - % enzim inhibisyon (absis-ordinat) olacak şekilde grafiğe geçirilmiş ve elde edilen denklemden ekstraktların enzim üzerine olan IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

5.3.7. *Barbarea* Türlerinde Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini

Asetil ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu tayini, Ellman tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem yardımıyla belirlenmiştir (293). Deney sırasında enzim olarak elektrik balığından elde edilen Asetilkolinesteraz (AChE) ve at serumundan elde edilen Bütirilkolinesteraz (BChE) kullanılmıştır. Kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesinde asetiltiyokolin iyodür (Sigma, ABD) ve bütiriltiyokolin iyodür substrat olarak kullanılırken; DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit) renklendirici madde olarak kullanılmıştır. Kontrol ve test bileşikleri sodyum fosfat tamponu (pH 8) ile çözülerek son konsantrasyonları 25-200 µg/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir. Çalışılan mikrolaktaki tüm kuyucuklara 130 µL sodyum fosfat tamponu (pH 8) pipetlendikten sonra kör olarak ayrılan kuyucuklar belirlenmiş ve diğer kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda 10 µL örnek çözeltileri ilave edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklara 20 µL enzim çözeltisinden pipetlenerek 25 °C de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara 20 µL DTNB ve hemen arkasından 20 µL substrat (asetiltiyokolin iyodür veya bütiriltiyokolin iyodür) eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Substratların hidrolizi ile meydana gelen tiyokolin, DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu meydana getirmiştir. Ölçümler 412 nm dalga boyunda, ELISA cihazında spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin AChE ve BChE inhibisyon yüzdeleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve standart olarak kullanılan galantamin ile karşılaştırılmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - [(A1 / A2) \times 100]$$

A1= Örnek çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki absorbansı

A2= Kontrol çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Elde edilen sonuçlar madde miktarının logaritması - % enzim inhibisyon (absis-ordinat) olacak şekilde grafiğe geçirilmiş ve elde edilen denklemden örneklerin enzim üzerine olan IC₅₀ değerleri hesaplanarak sonuçlar IC₅₀ ± standart sapma olarak verilmiştir.

5.3.8. *Barbarea* Türlerinde Sitotoksite Tayini

Barbarea türlerinden elde edilen metanol, etil asetat, kloroform ve su ekstraktlarının sitotoksik özellikleri ve antikanser aktiviteleri MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testi,

biyolojik aktivite için marker olarak dehidrogenaz enzim aktivitesi ölçülerek hücre canlılığının belirlenmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Bu çalışmada, insan meme kanser (MDA-MB-231 ve MCF-7), insan hepatoselüler karsinom (Hep3B), insan prostat kanser (PC-3), insan akciğer kanser (A549) ve insan kolon karsinom (HCT116) olmak üzere 6 farklı kanser hücre hattı ve sağlıklı normal fare fibroblast (L-929) hücre hattı kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak hücre hatlarına herhangi bir muamelede bulunulmamış sadece medium eklenmiştir. Pozitif kontrol ajanı olarak Vinkristin kullanılmıştır.

Hücre hatları ticari olarak temin edilmiştir ve sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının gelişimi %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde, 37 °C’de, %10 FBS, 100 mM L-glutamin ve 100 mM antibiyotik çözeltisi içeren DMEM doku kültürü besiyerinde ve T-25 ve T-75 cm² hücre kültürü flasklarında gerçekleştirilmiştir. Doku kültürü besiyeri gün aşırı değiştirilerek hücrelerin gelişimleri gözlenmiştir. Canlı hücre sayımı için 50 µL hücre süspansiyonu alınarak thoma lamı üzerine aktararak İnverted mikroskop kullanılarak yapılmıştır. Hücre hatlarının pasajlanması hücrelerin yoğunluğuna ve çalışma planına bağlı olarak 3-4 günde bir yapılmıştır.

Flasklarda %80-90 yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA ile kaldırılarak sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu platelere 5x10³ hücre/kuyu olacak şekilde aktarılmıştır. Numuneler uygulanmadan önce tutunmaları için 24 saat inkübe edilmiştir. Bitki ekstraktlarının son konsantrasyonunda % 0.1 olan DMSO ile çözülmüştür. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, doku kültürü besiyeri 25, 50, 100 µg/ml konsantrasyonlarında örnekleri içeren taze besiyeri ile değiştirilmiştir.

Numunelerin uygulandığı hücre plâterleri 37 °C’de ve %5 CO₂’li inkübatörde 48 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda hücrelerin üzerine 10 µL MTT labeling ajanı ilave edilerek 37 °C’de 4-6 saat inkübe edilerek formazon kristallerinin oluşumu sağlanmıştır ve süre sonunda kuyucuklara 100 µL solubilizasyon tamponu ilave edilerek kristallerin çözünmesi için plâterler bir gece boyunca inkübatörde tutulmuştur. Sürenin sonunda her bir kuyucukta oluşan mor rengin absorbans değerleri 550 ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilmiştir. Örneklerin tüm konsantrasyonları için elde edilen absorbans değerlerinin, negatif kontrol grubunun

absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak, her örneğin tüm konsantrasyonları için % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. Her bir örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmış ve sonuçlar ortalama % canlılık değeri $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

5.4. Fitokimyasal Çalışmalar

Tez kapsamında fitokimyasal çalışma olarak, türlerden elde edilen metanol ekstraktları üzerinde HPLC ile fenolik bileşiklerin analizi ve *B. integrifolia*'da bulunan majör bileşiklerin saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.4.1. Fitokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan cihazlar cihazlar marka/model olarak Tablo 10'da belirtilmiştir.

Tablo 10. Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Model
Hassas Terazı	OHAUS Pioneer
Etüv	Ecocell
Rotary evaporatör	Heidolph Hei-VAP Precision
UV Lambası	Mineralight UVGL -58
Vakum Pompası	Millipore Model No: WP6122050
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex RK 255 H
Kolon	C18 kolonu (RP-C18, Waters Spherisorb, Milfort)
HPLC Cihazı	Shimadzu Corporation, LC 20 AT
NMR Spektrometresi	Agilent 400 MHz (^1H -NMR), 400 MHz (^{13}C -NMR)

5.4.2. Fitokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler, adsorbanlar ve çözücü sistemleri aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 11. Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Maddeler	Markası
Etil Asetat	Sigma-Aldrich
Formik Asit	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Sülfürik Asit (H_2SO_4)	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Hegzan	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
Vanilin	Sigma-Aldrich
Toluen	Riedel-Dehaen

Tablo 12. Fitokimyasal çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Yöntem	Adsorban
İTK	Normal faz silika jel (Hazır alüminyum plak, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.2 mm, 20x20 cm, Merck 5554)
	Ters faz silika jel (Hazır alüminyum plak, RP-18 F₂₅₄, 20x20 cm, Merck 5559)
Kolon Kromatografisi	Normal faz silika jel (Kieselgel 60, 0.040-0.063 mm Merck 9385 ve Kieselgel 60, 0.063-0.2 mm, Merck 7734)
	Sefadeks (Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich, LH-20-100)
	Ters faz silika jel (LiChroprep RP-18, 25-40 µm, Merck 9303)

Tablo 13. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri

Çözücü sistemi	Yöntem
CHCl ₃ :MeOH (80:20)	Silika jel kolon kromatografisi İTK
CHCl ₃ :MeOH (70:30)	
CHCl ₃ :MeOH (60:40)	
CHCl ₃ :MeOH (50:50)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (95:5)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (90:10)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (80:20)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (85:15)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (75:25)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (70:30)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (60:40)	
<i>n</i> -Hekzan:EtOAc (50:50)	
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (90:10:1)	
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (80:20:2)	
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (70:30:3)	
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (50:50:5)	
Etil asetat	Ters faz silika jel kolon kromatografisi
H ₂ O:MeOH (100:0-0:100)	
Asetik asit: Formik Asit: (25:2:2:4)	
Toluen: EtOAc: Formik Asit (5:4:1)	
EtOAc: MeOH: Su (7:2:1)	İTK
MeOH	
Kloroform: MeOH (1:1)	Sefadeks kolon kromatografisi

5.4.3. *Barbarea* Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC ile Belirlenmesi

Barbarea türlerinin metanol ekstralarının içerdği fenolik bileşiklerin analizi kurutulmuş ve toz edilmiş çiçekli topraküstü kısımlarından elde edilen ham metanol ekstralarından hareketle yapılmıştır. Kuru ekstralardan alınan numuneler konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde HPLC saflıkta metanolde yeniden çözüldükten sonra 0.45 µm membran filtreden geçirilerek analiz örnekleri hazırlanmıştır.

HPLC çalışmalarında *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin olmak üzere 7 fenolik bileşik standart olarak kullanılmıştır. HPLC saflıkta metanolle her bir standartın konsantrasyonunun 100 µg/mL olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmış ve 0.45 µm membran filtreden geçirilmiştir. Daha sonra kalibrasyon eğrisi oluşturulması için standartları içeren stok çözeltiden hareketle 5-10-25-50-100 µg/mL konsantrasyonlarındaki dilüsyonları hazırlanmıştır.

Fenolik bileşiklerin analizinde DAD dedektörü kullanılmıştır ve analiz 270 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin tespitinde C18 (RP-C18, 150 mm×4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Ayırım A çözeltisi %100 metanol, B çözeltisi %2'lik sulu asetik asit (pH 2.8) olduğu ikili çözücü sistemiyle gradient program uygulanarak 16 dk.'da gerçekleştirilmiştir. Gradient program bittikten sonra kolonu dengeye getirmek amacıyla kolondan 16 dakika boyunca mobil faz geçirilmiştir (295).

Fenolik bileşiklerin analizinde kullanılan HPLC şartları:

Kolon	: C18 kolonu (RP-C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm),
Akış hızı	: 1.5 mL/dk,
Enjeksiyon hacmi	: 20 µL,
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dalga boyu	: 270 nm,
Dedektör	: DiodeArrayDetector (DAD)
Yöntem	: Gradient elüsyon
Hareketli faz	: A: %100 metanol B: %2 sulu asetik asit çözeltisi (pH 2.8)
Süre	: 16 dk

Tablo 14. Gradient elüsyonda kullanılan çözücü oranları ve zaman

Zaman (dk)	Solvent A %	Solvent B %
0.01	20	80
4.00	30	70
7.00	40	60
8.00	40	60
10.00	45	55
11.00	45	55
12.00	50	50
13.00	50	50
14.00	60	40
15.45	80	20
16.00	Stop	

5.4.4. İzolasyon Çalışmalarında Kullanılan Kromatografik Yöntemler

5.4.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İzolasyon çalışmalarında kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların izlenmesi için, normal faz ve ters faz silika jel kaplı hazır alüminyum plaklar kullanılmıştır.

Örnekler, pastör pipeti yardımıyla, plağın alt ucunun 1 cm yukarısında ve 0.5-0.7 cm aralıklarla olacak şekilde tatbik edilmiştir. Daha sonra İTK plakları mobil faz olarak kullanılan çözücü tankına konularak oda sıcaklığında 7-10 cm yürütülmüştür. Plaklar tanka konulmadan önce, tank atmosferinin çözücü buharıyla doymuş olmasına dikkat edilmiştir. Plaklar tanktan çıkarıldıktan sonra kurutulmuştur. Lekeler UV_{254} / UV_{366} nm dalga boyunda UV lambası altında ve/veya revelatör kullanılarak belirlenmiştir.

5.4.4.2. Açık Kolon Kromatografisi (KK)

Ön saflaştırılma çalışmalarında kullanılan yöntemlerden biri de kolon kromatografisidir. Kolon kromatografisinde, selüloz, iyon değiştirici reçineler, silika jel, poliamid ve sefadeks gibi adsorbanlar kullanılmaktadır. Çalışmalarımızda adsorban olarak normal faz silika jel, ters faz silika jel ve sefadeksten yararlanılmıştır. Fraksiyonlar toplandıktan sonra kontrolleri İTK plakları ile gerçekleştirilmiştir. Plak üzerinde R_f değerleri aynı olan maddelerin bulunduğu fraksiyonlar birleştirilerek kuruluğa kadar uçurulmuştur.

5.4.4.3. Kullanılan Kolonların Hazırlanması

- Normal faz silika jel kolon kromatografisi

İstenilen miktarda tartılan silika jel, yeterli miktarda çözücü sistemi ile süspande edilerek, uygun boyutlara sahip, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Kolondan yeterli miktar uygun çözücü sistemi geçirilerek, adsorbanın kolon içinde hava boşlukları kalmayacak şekilde yerleşmesi sağlanmıştır. Kolondaki adsorban tam olarak yerleştiğinde kolona numune tatbik edilmiştir.

- Sefadeks kolon kromatografisi

İstenilen miktarda sefadeks, yeterli miktarda çözücü (metanol, kloroform:metanol) ile karıştırılarak alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona doldurulmuştur. Adsorban kolona iyice yerleşinceye kadar kolondan çözücü geçirilmeye devam edilmiştir. Çözücü adsorbanın üzerinde 1-2 mm kalıncaya kadar akıtıldıktan sonra, kolona numune tatbik edilmiştir.

- Vakum likit kromatografisi (Ters faz silika jel kolon kromatografisi)

İstenilen miktarda ters faz silika jel, yeterli miktarda metanol ile karıştırılarak alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona doldurulmuştur. Adsorban iyice yerleşene kadar su kolondan negatif basınç uygulayarak geçirilmiştir. Kolon dengeye ulaştığında numune tatbik edilmiştir.

5.4.4.4. Numunenin Kolona Tatbik Edilmesi

Numuneler kolona çözücü yardımı veya kuru tatbik yöntemi ile yüklenmiştir.

Çözücü yardımı ile tatbik: Numune az miktardaki uygun çözücü/çözücü sisteminde çözüldükten sonra pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edilmiştir. Adsorbanın üst yüzeyinin bozulmamasına dikkat edilerek, yavaş yavaş mobil faz olarak kullanılacak çözücü ilave edilmiş ve elüsyona başlanmıştır.

Kuru tatbik: Silika jel ile hazırlanan kolonlara tatbik edilen numuneler için bu yöntem kullanılmıştır. Numune iyi çözündüğü çözücü ile çözüldükten sonra yeterli miktardaki silika jel ile karıştırılmıştır. Çözücü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kuru haldeki numune silika jelle önceden hazırlanmış kolona ilave edilerek uygun çözücü sistemi ile elüsyona başlanmıştır.

5.4.5. Kloroform Ekstresi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

Kloroform ekstresi (9.5 g), ön ayırım için silika jel (100 g, 0.063-0.2 μm) ile hazırlanmış kolon kromatografisine uygulanmıştır. Bu işlem için, 9.5 g kloroform ekstresi kloroformda çözüldükten sonra 10 g silika jel (0.063-0.2 μm) ile karıştırılmış ve kloroform tamamen uzaklaşana kadar kurutulmuştur. Kuru haldeki numune kolona tatbik edilerek artan polaritedeki *n*-hekzan:etil asetat (100:0, 95:5, 90:10, 85:5, 80:20, 50:50, 0:100) çözücü sistemleriyle elüsyon gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlar 50 mL şeklinde toplanmıştır ve toplam olarak 39 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlar İTK ile etil *n*-hekzan:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3) ve toluen:etil asetat:formik asit (5:4:1) çözücü sistemlerinde kontrol edilmiştir. Benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir.

13-23. fraksiyonlar birleştirilerek uçurulmuş ve 1.2 g olarak belirlenmiştir. Ekstre kloroform ile yeniden çözülerek 10 g silika jel (0.04-0.063 μm) ile karıştırılmış ve çözücüsü tamamen uzaklaşana kadar kurutulmuştur. Cam kolona kloroform:metanol:su (90:10:1) ile karıştırılan silika jel (40 g, 0.04-0.063 μm) alınarak kolon hazırlanmıştır. Kurutulan numune kolona ilave edilerek artan polaritedeki kloroform:metanol:su (90:10:1, 80:20:2, 73:30:3, 50:50:5) çözücü sistemleriyle elüsyon gerçekleştirilmiştir. Yapılan İTK analizleri sonunda 5-6. fraksiyonlar birleştirilmesine karar verilmiştir.

5-6. fraksiyonlar birleştirilerek uçurulmuş ve 192.6 mg olarak belirlenmiştir. Kloroform: metanol (1:1) ile çözülerek sefadeks kolona tatbik edilmiş ve elüsyon kloroform: metanol (1:1) çözücü sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Toplam 14 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonlar İTK plağa tatbik edilerek kloroform: metanol: su (90:10:1) çözücü sisteminde sürüklenmiş ve 7-8. fraksiyonlar birleştirilerek uçurulduktan sonra (147.1 mg) tekrar sefadeks kolona tatbik edilmiştir. Elüsyon kloroform: metanol (1:1) çözücü sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Toplam olarak 12 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonlar İTK plağa tatbik edilerek kloroform: metanol: su (90:10:1) ve *n*-hekzan: etil asetat (8:2) çözücü sistemlerinde sürüklenmiştir. Toplanan fraksiyonlardan 3-7. fraksiyonlar birleştirilerek uçurulmuştur ve 116.8 mg (Bİ-1) olarak elde edilmiştir.

5.4.6. Etil Asetat Ekstresi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

Etil asetat ekstresi (1.2 g) metanol ile az miktarda çözülmüş, 10 g silika jel ile karıştırılmış ve çözücüsü tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonra silika jel (30 g, 0.063-0.2 μm) kloroform: metanol: su (90:10:1) ile karıştırılarak uygun boyutlardaki cam

kolona alınmıştır ve kuru numune hazırlanan kolona tatbik edilmiştir. Elüsyona kloroform: metanol: su (90:10:1) ile başlanmış ve artan polaritedeki kloroform: metanol: su (80:20:2, 70:30:3, 50:50:5) çözücü sistemleriyle devam edilmiştir. Fraksiyonlar 10 mL olacak şekilde toplanmıştır ve toplamda 67 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlar İTK ile etil asetat: metanol: su (90:10:1, 80:20:2, 70:30:3) çözücü sistemleriyle kontrol edildikten sonra 21-24 nolu fraksiyonların birleştirilmesine karar verilmiştir. Yoğunlaştırılan 21-24 nolu fraksiyon (167.8 mg) az miktarda metanol ile çözülerek sefadeks kolona tatbik edilmiştir. Elüsyon %100 metanol ile gerçekleştirilmiştir. Toplam olarak 13 fraksiyon alınmıştır. Fraksiyonlar İTK plağa tatbik edilerek etil asetat: metanol: su (7:2:1) çözücü sisteminde sürüklenmiştir. 17-19. Fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırılmıştır (60.1 mg, Bİ-2).

5.4.7. Arta Kalan Su Fraksiyonu Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

Arta kala su fraksiyonundan 5 g alınarak az miktarda suda süspande edilmiş ve ters faz silika jel (LiChroprep RP-18, 25-40 µm) ile hazırlanmış kolona (2x27 cm) uygulanmıştır. Elüsyona 50 mL su ile başlanmış, daha sonra metanolün artan oranlarında (su: metanol 99:1→ 0:100) elüsyona devam edilmiştir. 20'şer mL halinde toplanan 122 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlar İTK plağına tatbik edilerek etil asetat: metanol: su (7:2:1) çözücü sisteminde sürüklendikten sonra benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir.

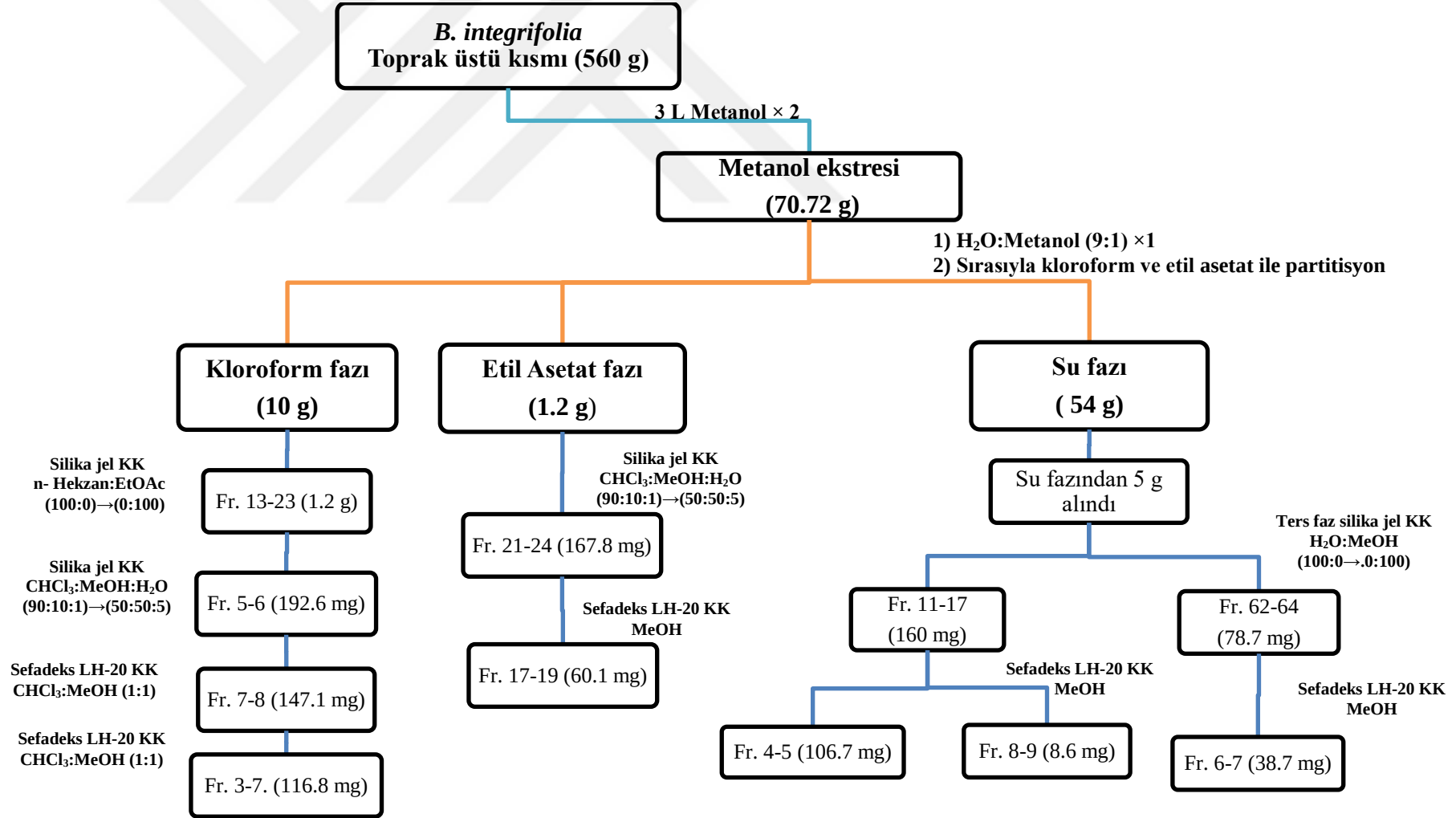
11-17. fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırılmış (160 mg) ve az miktarda metanolle çözülerek sefadeks kolona tatbik edilmiştir. Elüsyon %100 metanolle yapılmış ve 12 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonlar İTK plağına tatbik edilerek etil asetat: metanol: su (7:2:1) çözücü sisteminde sürüklenmiştir. 4-5. fraksiyonlar ile 8-9. fraksiyonlar yoğunlaştırılmıştır (sırasıyla 106.7 mg, Bİ-3; 8.6 mg, Bİ-4).

62-64. fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırılmış (78.7 mg) ve az miktarda metanolle çözülerek sefadeks kolona tatbik edilmiştir. Elüsyon %100 metanolle yapılmış ve 11 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonlar İTK plağına tatbik edilerek etil asetat: metanol: su (7:2:1) çözücü sisteminde sürüklenmiştir. 6-7. Fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırılmıştır (38.7 mg, Bİ-5).

5.5. İstatistiksel Olarak Verilerin Değerlendirilmesi

Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması ve standart sapma alınarak hesaplanmıştır. Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) 20 istatistik programına yüklenerek normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi, Shapiro Wilk testi, Basıklık ve çarpıklık değerleri ile kontrol edilmiştir (294). Normal dağılıma uygun oldukları görüldükten sonra analizi yapılan her bir örnek için elde edilen sonuçların kendi arasındaki ilişkileri T-testi ile değerlendirilmiştir ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$).





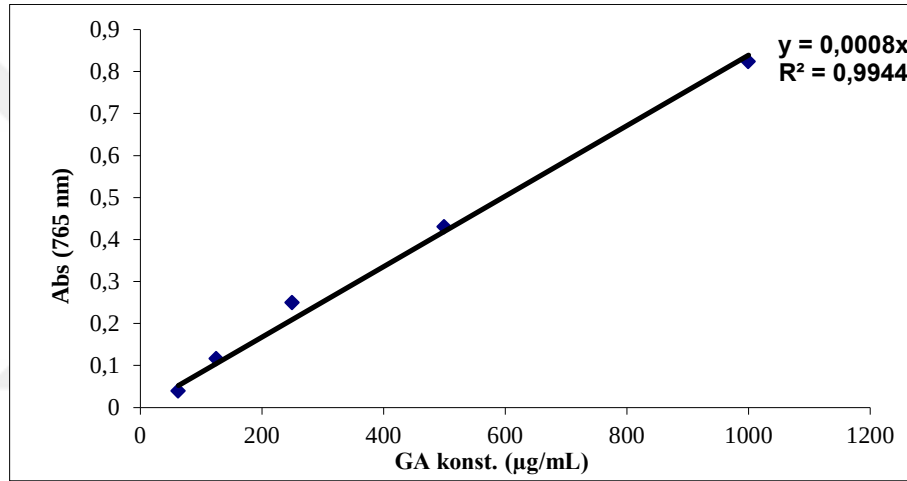
Şekil 15. *B. integrifolia* izolasyon şeması

6. BULGULAR

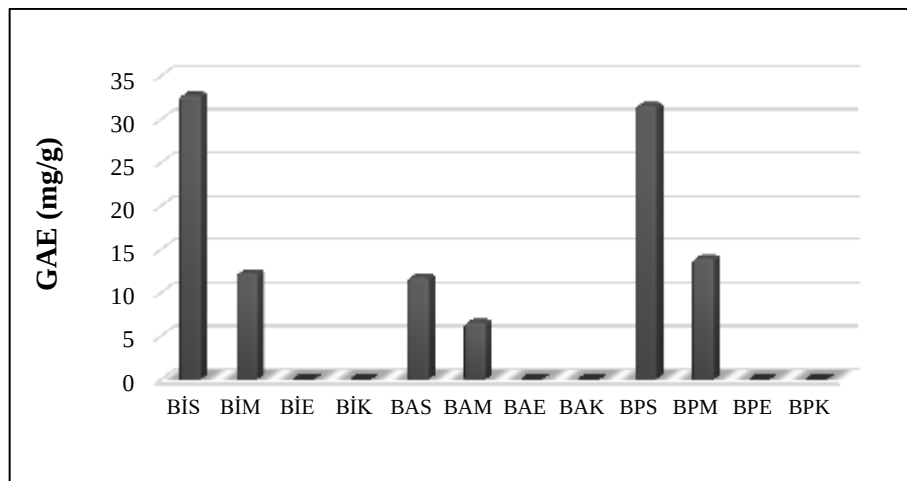
6.1. *Barbarea* Türlerinde Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

6.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Sonuçları

Tez kapsamında çalışılan *Barbarea* türlerinden elde edilen ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı tayinleri, standart madde olarak kullanılan gallik asit için hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bulunmuştur. Gallik asit için hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 16’da verilmiştir. 1 g bitkinin içerdiği toplam fenolik madde miktarı GAE (mg/g) olarak Şekil 17’de ve Tablo 15’de belirtilmiştir.



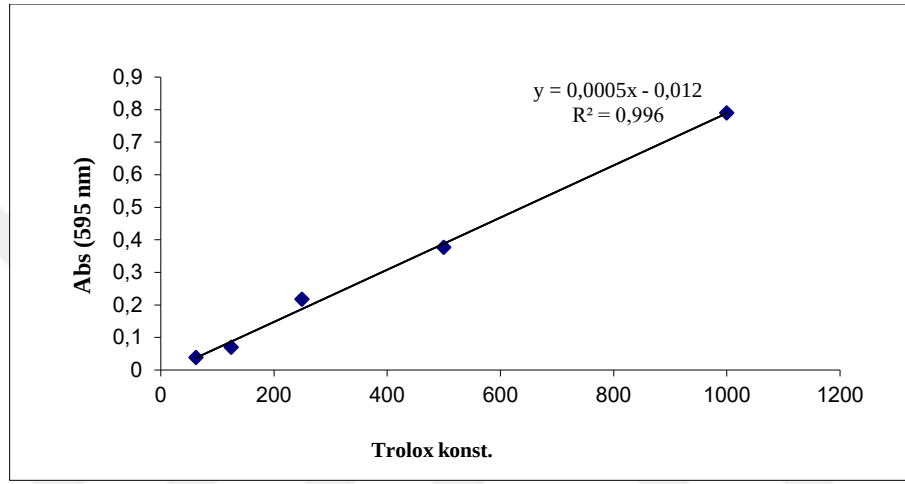
Şekil 16. Fenolik madde miktar tayininde kullanılan gallik asit’e ait grafik



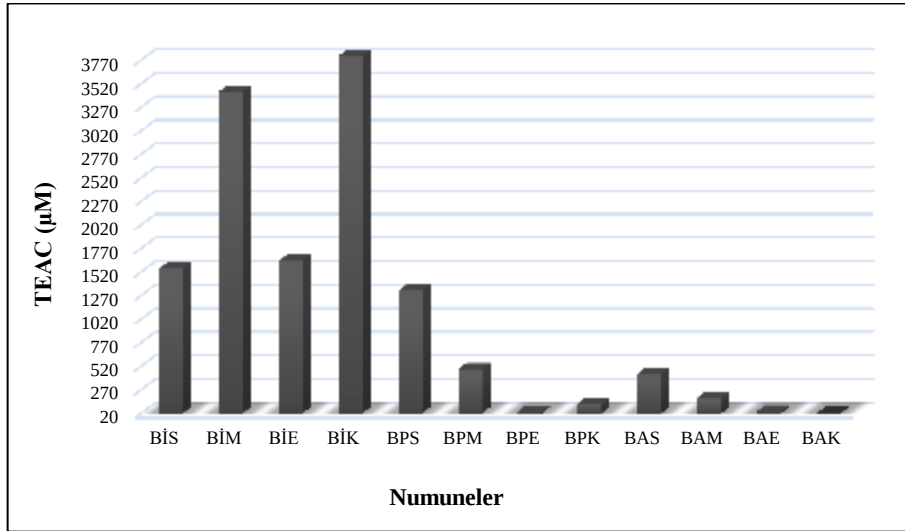
Şekil 17. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin fenolik madde miktar tayini sonuçlarının karşılaştırılması

6.1.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları

Tez kapsamında çalışılan *Barbarea* türlerinden elde edilen ekstrelerin FRAP tayinleri standart madde olarak kullanılan troloks için hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bulunmuştur. Troloks için hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 18’de verilmiştir. Numunelerin FRAP değerleri Troloks ile karşılaştırılarak, TEAC (μM) olarak Şekil 19’da ve Tablo 15’de gösterilmiştir.



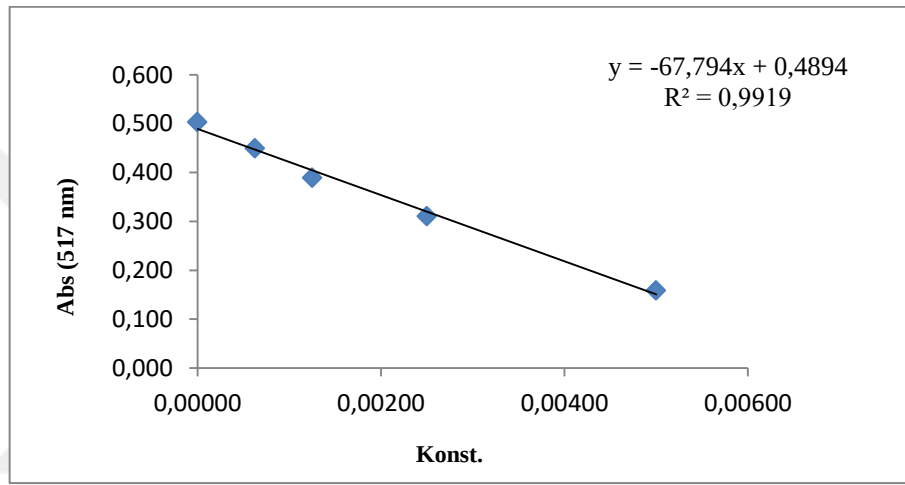
Şekil 18. FRAP tayininde kullanılan troloks’a ait grafik



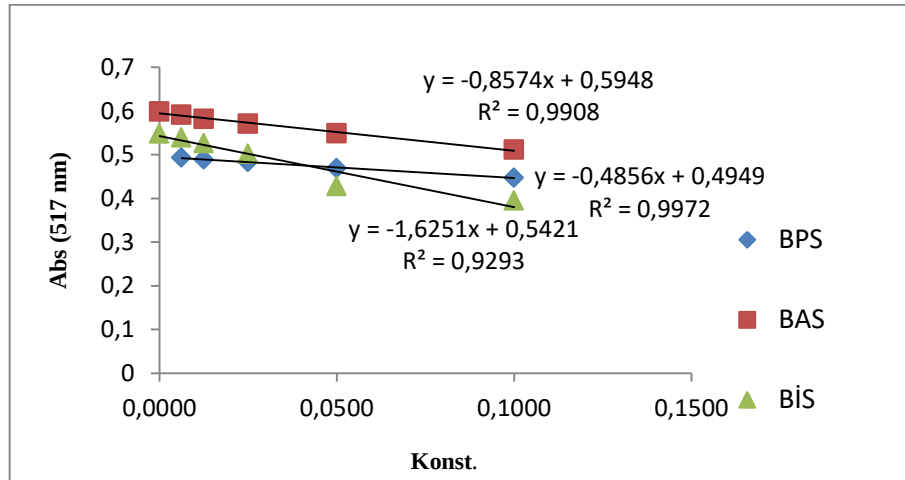
Şekil 19. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin FRAP tayini sonuçlarının karşılaştırılması

6.1.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları

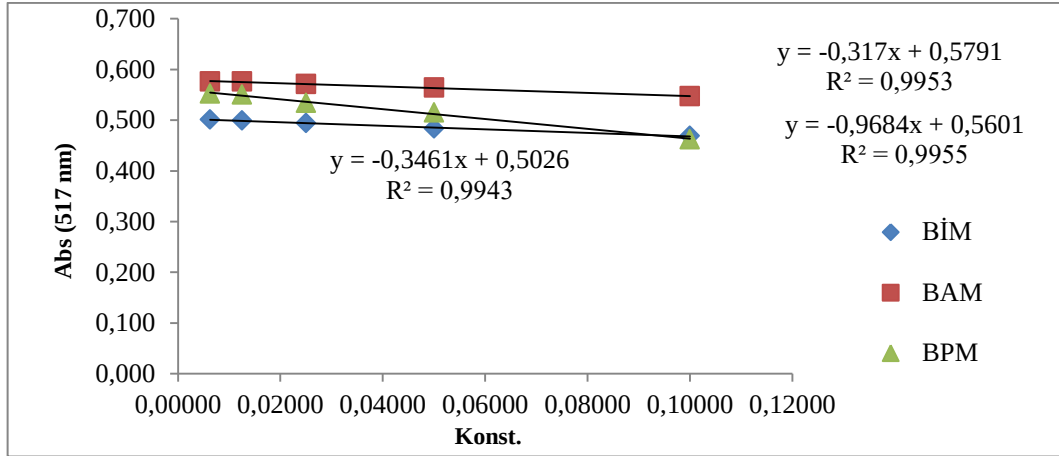
Tez kapsamında çalışılan türlerden elde edilen ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi tayinleri sonucunda elde edilen veriler, standart madde olarak kullanılan BHT'nin verileri ile karşılaştırılmıştır. Örneklerim 517 nm dalga boyunda elde edilen konsantrasyon-absorbans değerlerine ait grafikler Şekil 20-24'de gösterilmiştir. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek,ekstrele ait hesaplanan IC₅₀ değerleri Şekil 25'de ve Tablo 15'de belirtilmiştir.



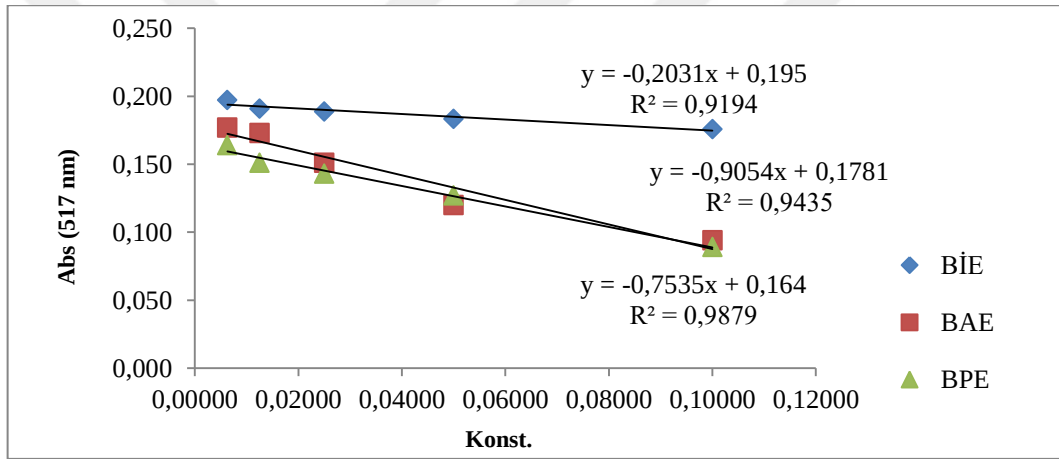
Şekil 20. DPPH radikali giderme aktivitesi tayininde kullanılan BHT'a ait grafik



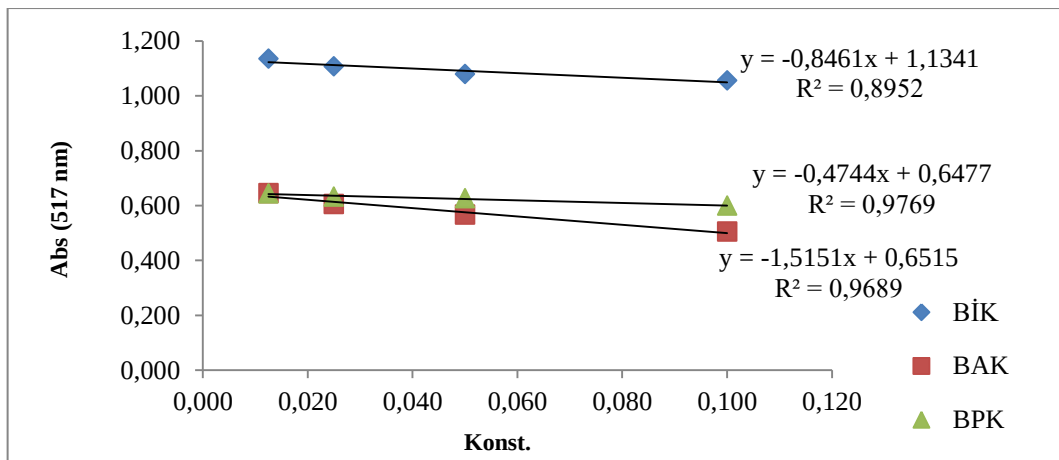
Şekil 21. Türlerin su ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları



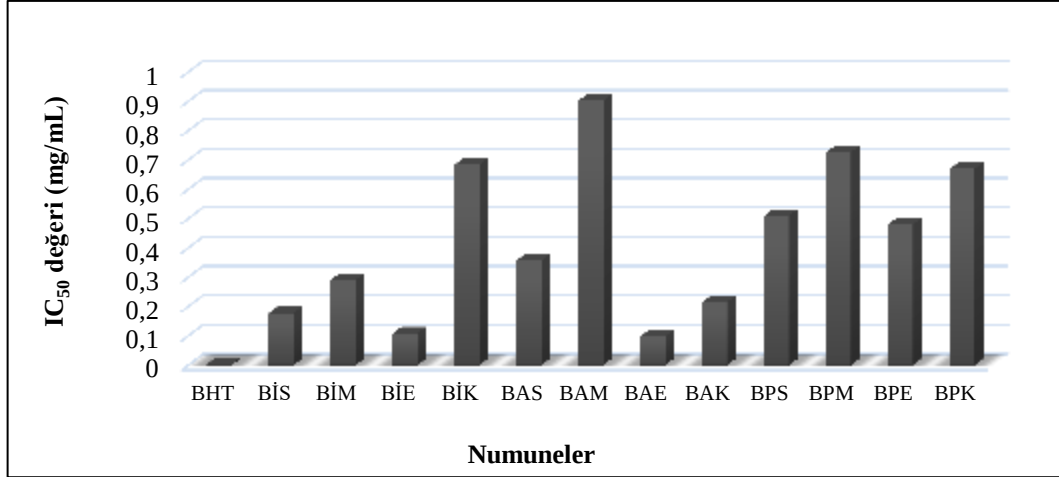
Şekil 22. Türlerin metanol ekstralarının DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları



Şekil 23. Türlerin etil asetat ekstralarının DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları



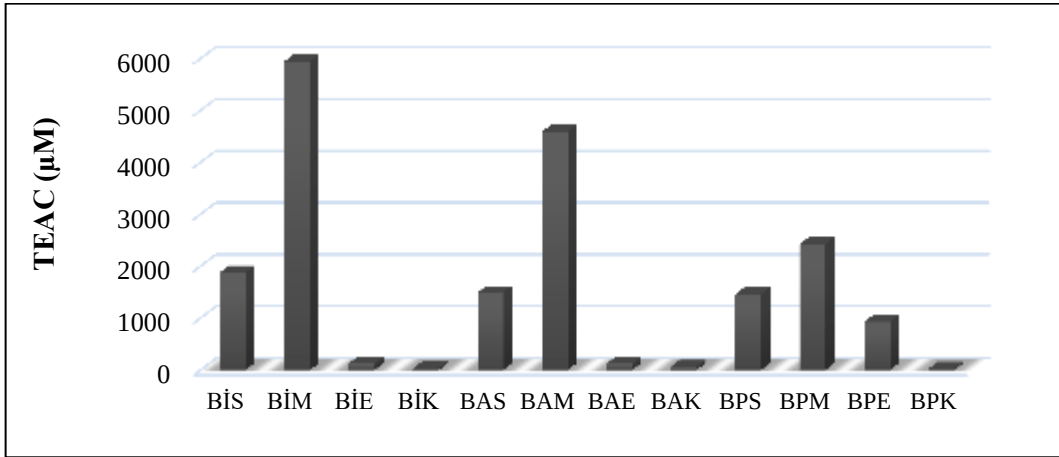
Şekil 24. Türlerin kloroform ekstralarının DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçları



Şekil 25. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi tayini sonuçlarının karşılaştırılması

6.1.4. CUPRAC Tayini Sonuçları

Tez kapsamında çalışılan *Barbarea* türlerinden elde edilen ekstrelerin Cuprac tayinleri standart madde olarak kullanılan troloks için hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bulunmuştur. Numunelerin CUPRAC değerleri Troloks ile karşılaştırılarak TEAC (μ M) olarak Şekil 26’da ve Tablo 15’de ifade edilmiştir.



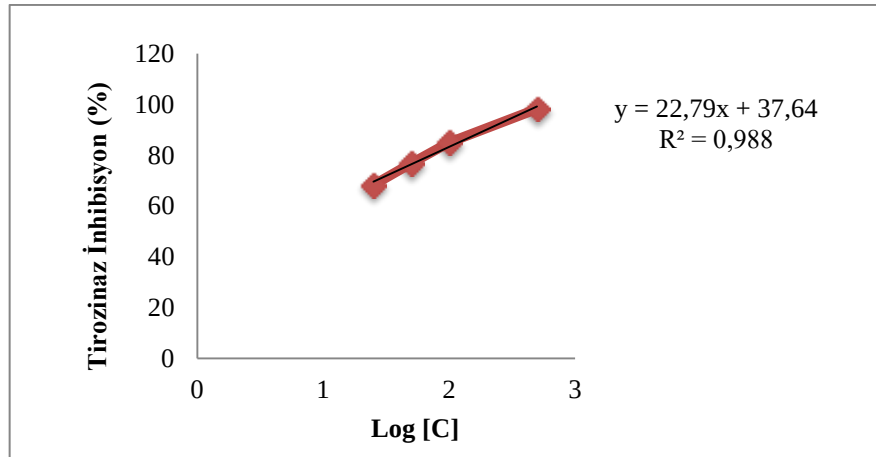
Şekil 26. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin CUPRAC tayini sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo 15. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin antioksidan aktivite tayini sonuçları

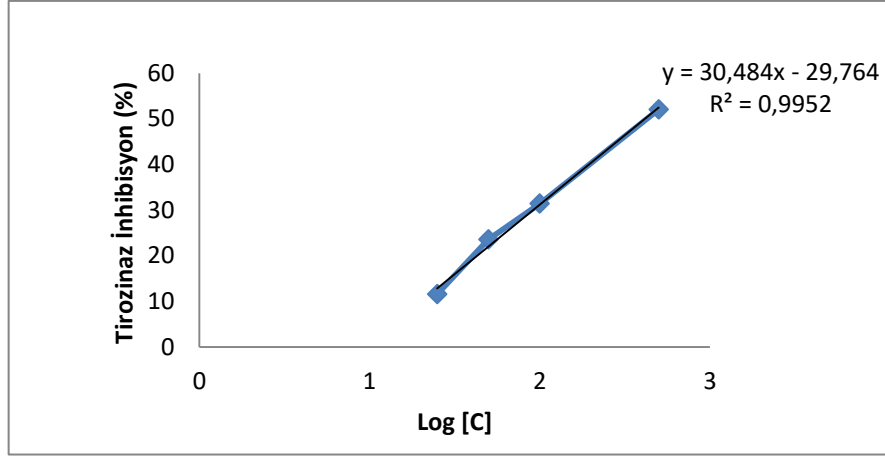
ÖRNEKLER	Toplam polifenol GAE (mg/g)	FRAP TEAC(μM)	CUPRAC TEAC(μM)	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)
BİS	32.8±1.02	1556±7.86	1878.667 ± 0.05	0.1775±0.01
BİM	12.3±0.98	3436±2.14	5946.533 ±7.33	0.2907±0.06
BİE	-	1638±1.46	127.067± 1.37	0.1083±0.01
BİK	-	3816±7.55	33.400 ±1.09	0.6837±0.02
BAS	11.8±0.96	441±6.35	1491,400 ± 3.21	0.3571±0.01
BAM	6.6±0.15	187±2.45	4593,467 ±2.78	0.9021±0.01
BAE	-	41±1.25	120,667 ± 5.32	0.0983±0.01
BAK	-	22±2.34	65,600 ± 2.45	0.2151±0.02
BPS	31.6±0.42	1321±4.02	1460.533 ± 4.93	0.5096±0.06
BPM	14±1.23	488±8.79	2426.800± 2.16	0.7261±0.01
BPE	-	40±2.57	927.533 ± 3.98	0.4801±0.03
BPK	-	123±3.24	26.133 ± 2.32	0.6702±0.05
BHT				0.0036±0.01

6.2. *Barbarea* Türlerinde Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları

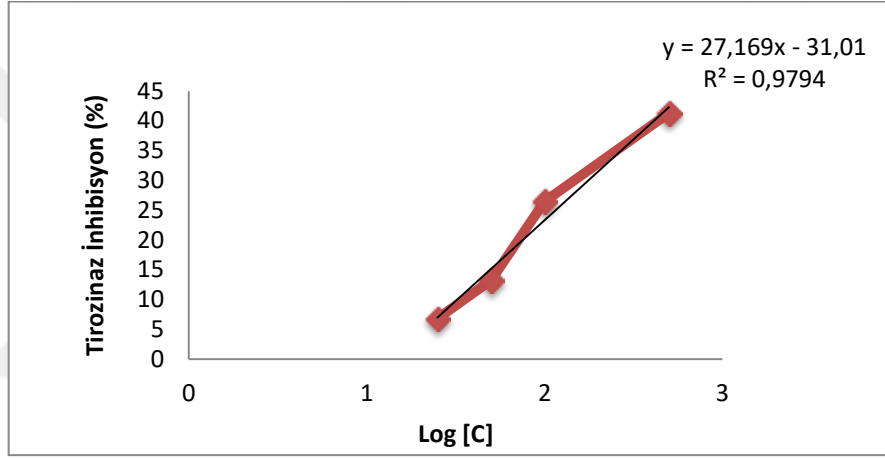
Tez kapsamında çalışılan *Barbarea* türlerinden elde edilen ekstrelerin tirozinaz enzim inhibisyonuna ait sonuçlar Şekil 27-39 'da ifade edilmiştir.



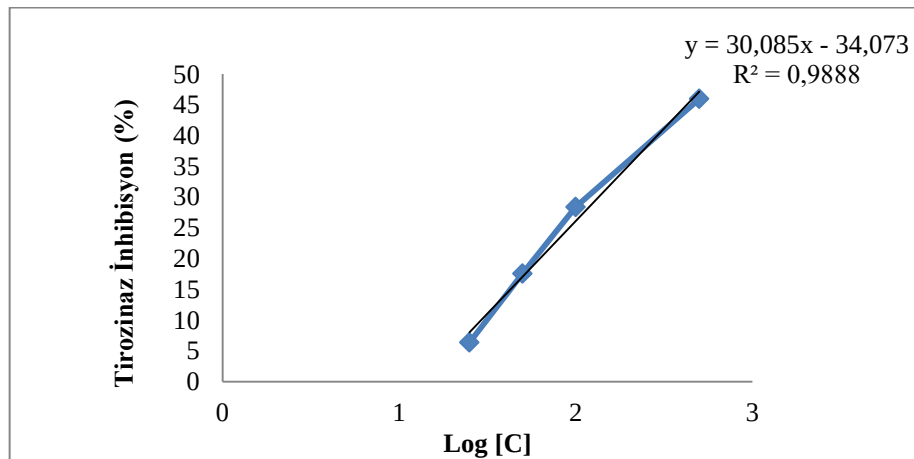
Şekil 27. α-Kojik asit'e ait tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



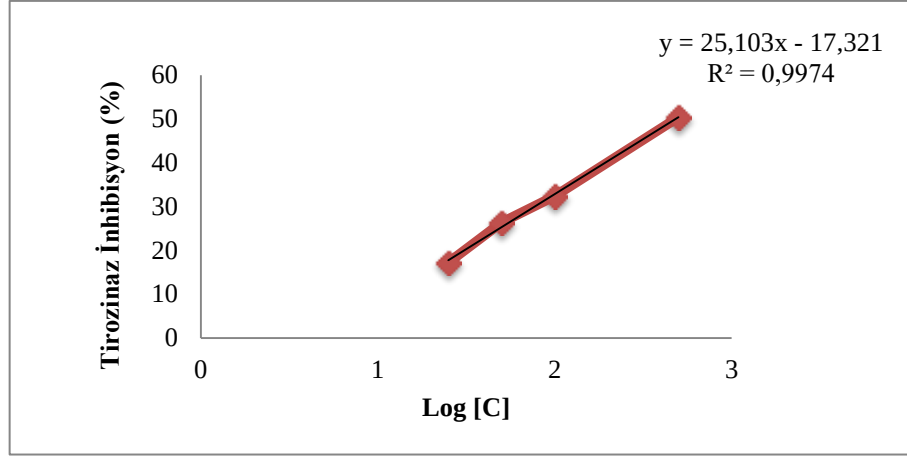
Şekil 28. *B. integrifolia*'nın metanol ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



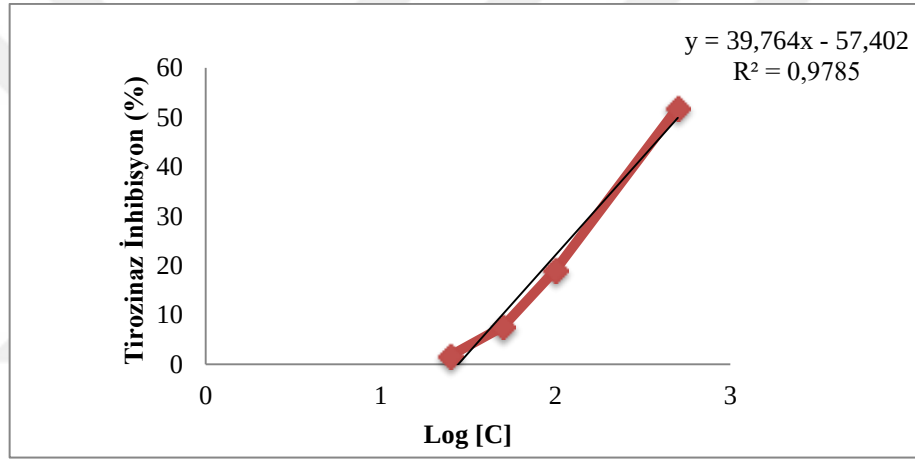
Şekil 29. *B. integrifolia*'nın etil asetat ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



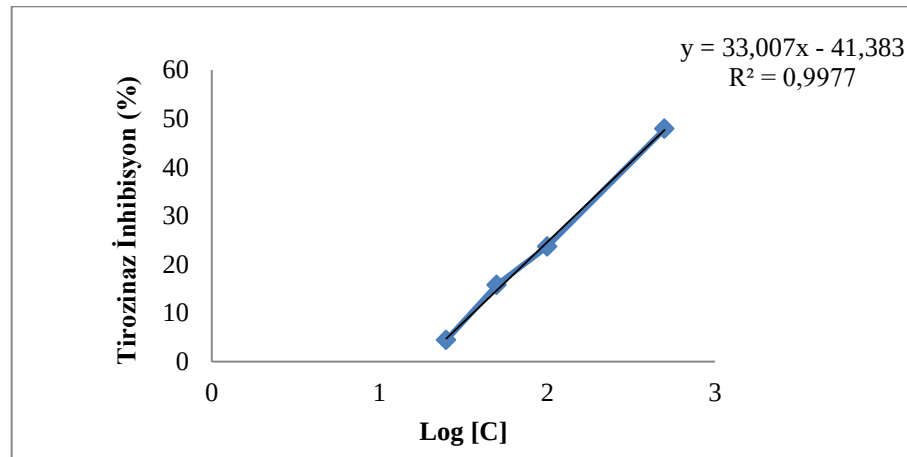
Şekil 30. *B. integrifolia*'nın kloroform ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



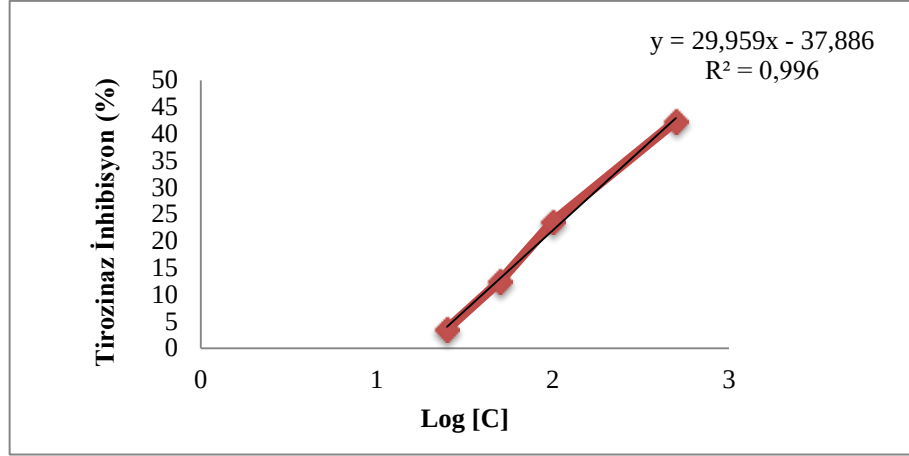
Şekil 31. *B. integrifolia*'nın su ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



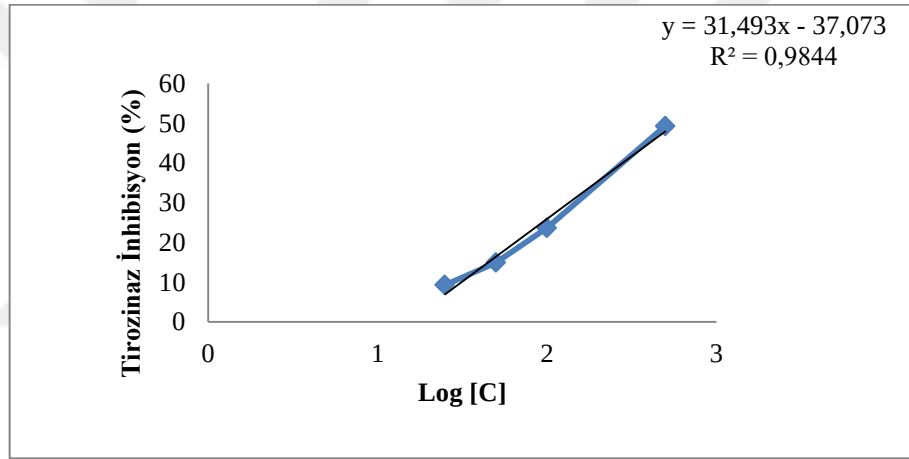
Şekil 32. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın metanol ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



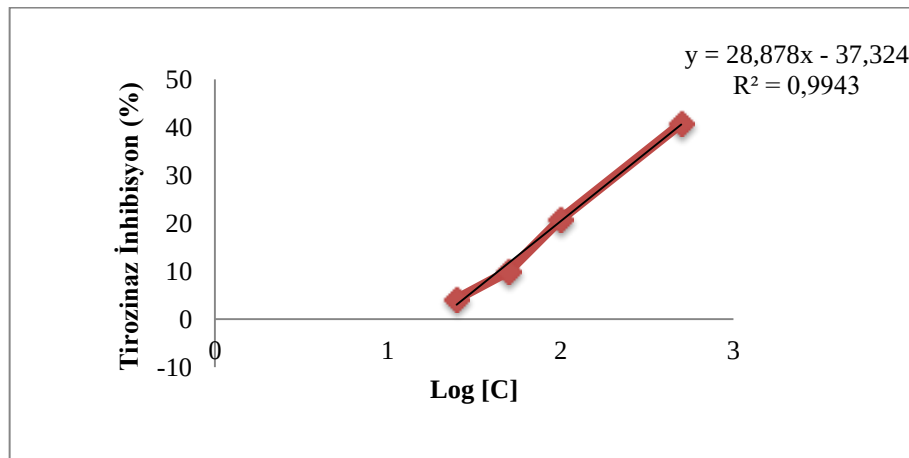
Şekil 33. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın etil asetat ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



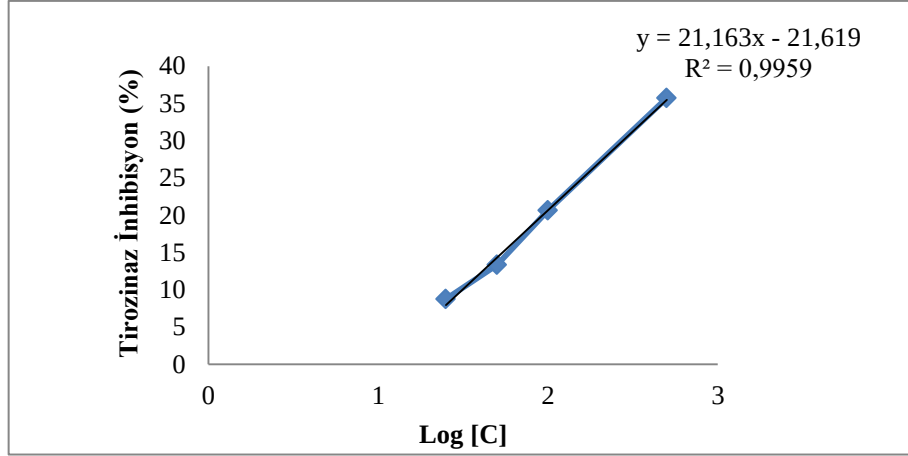
Şekil 34. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın kloroform ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



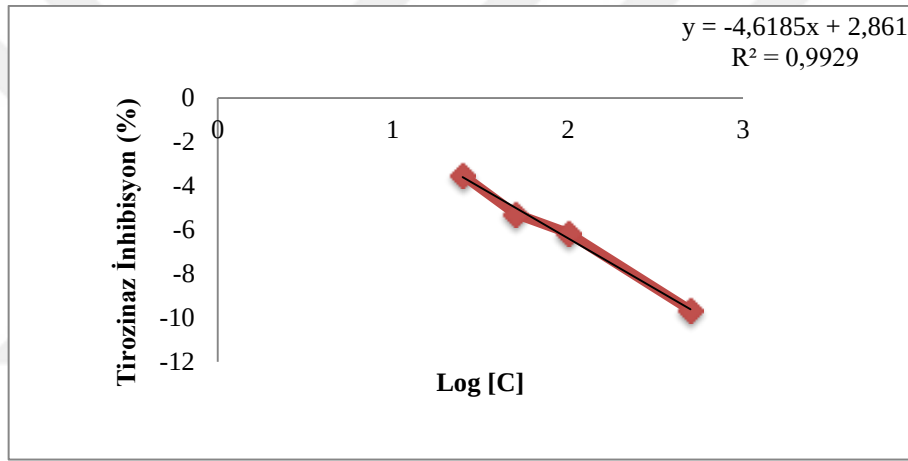
Şekil 35. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın su ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



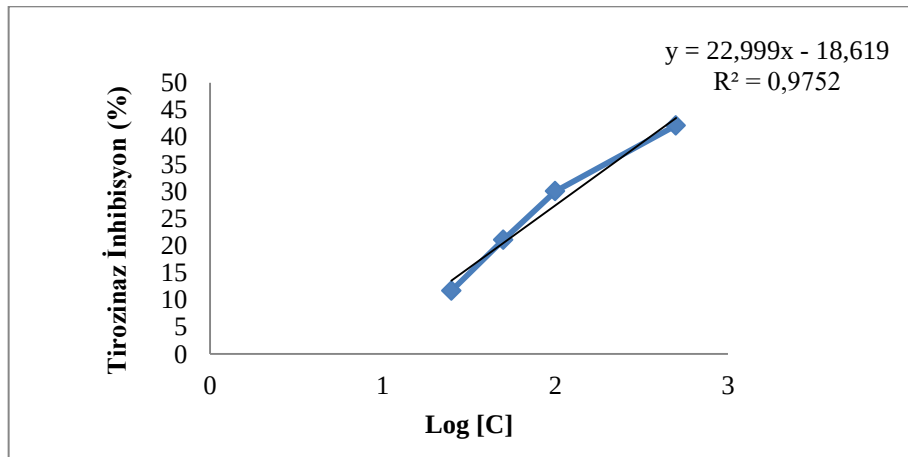
Şekil 36. *B. plantaginea*'nın metanol ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 37. *B. plantaginea*'nın etil asetat ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 38. *B. plantaginea*'nın kloroform ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



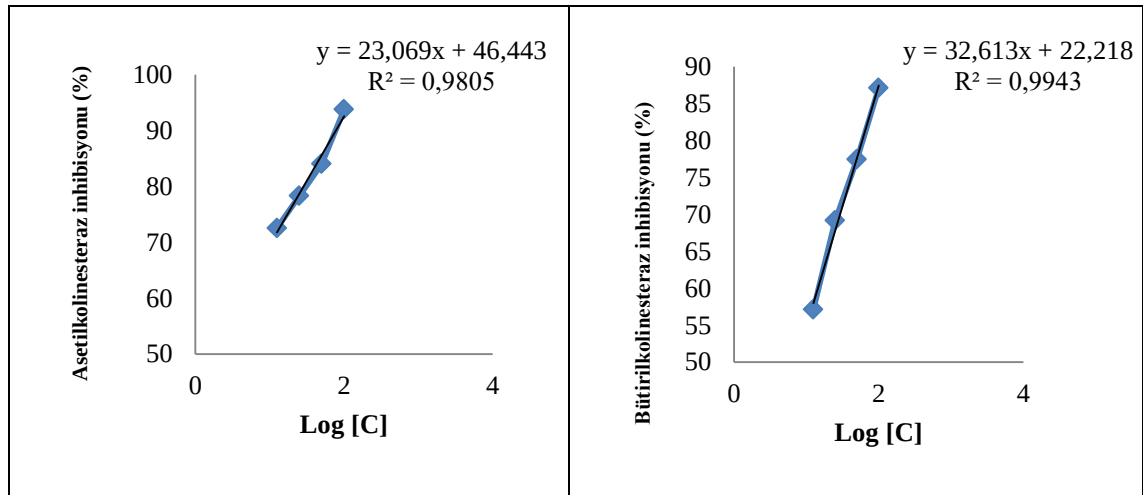
Şekil 39. *B. plantaginea*'nın su ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği

Tablo 16. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları

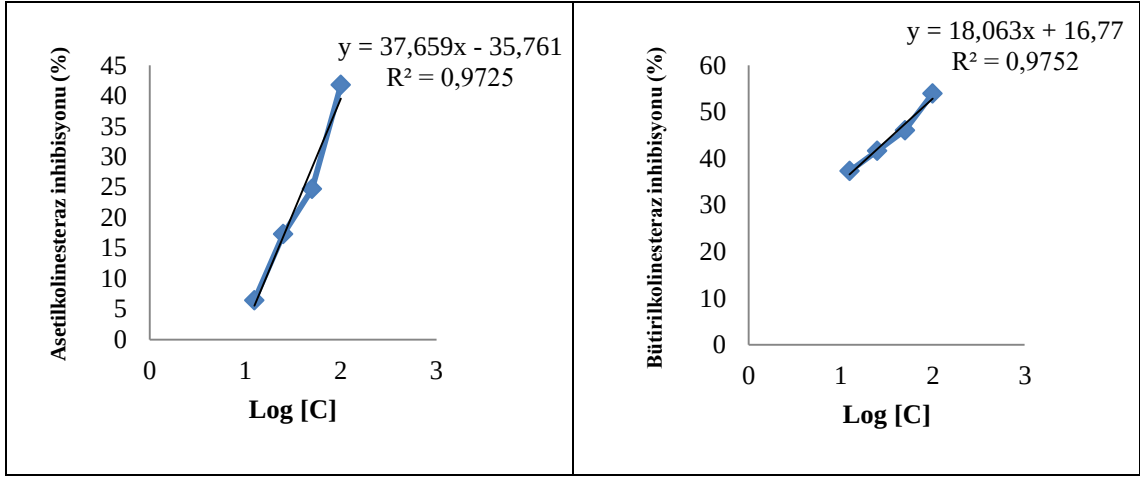
ÖRNEKLER	Tirozinaz inh. IC ₅₀ değeri (µg/mL)
BİS	480.9188±1.02
BİM	413.8071±1.13
BİE	623.563±0.95
BİK	960.9375±2.03
BAS	587.1096±0.32
BAM	502.5824±3.68
BAE	582.6123±3.26
BAK	859.456±1.67
BPS	964.5861±2.32
BPM	10 ^{3.2} ±3.65
BPE	10 ^{3.3} ±6.41
BPK	10 ^{11.44} ±0.96
α -Kojik asit	3.4819±1.19

6.3. *Barbarea* Türlerinde Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini Sonuçları

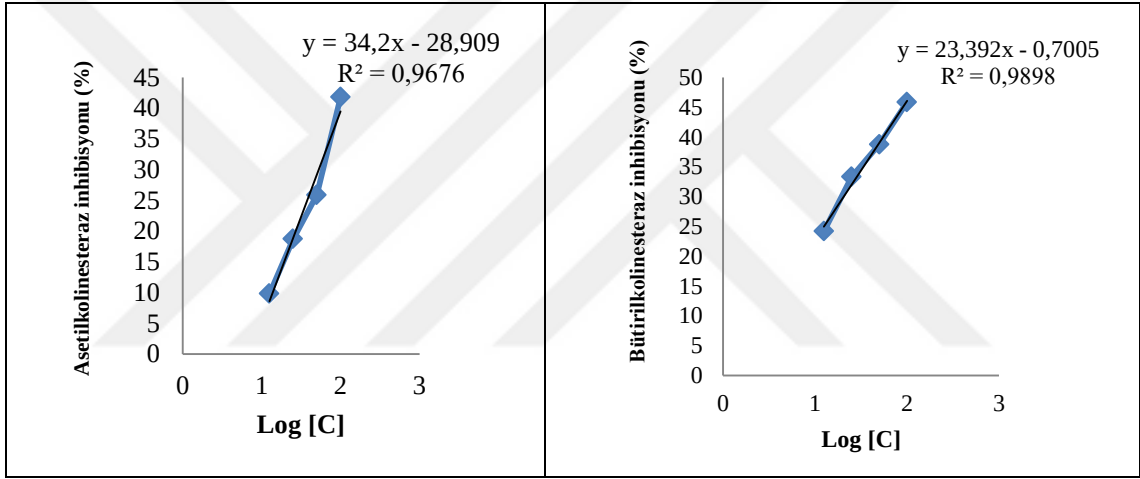
Tez kapsamında çalışılan *Barbarea* türlerinden elde edilen ekstrelerin kolinesteraz enzim inhibisyonuna ait sonuçlar Şekil 40-52’de ifade edilmiştir.



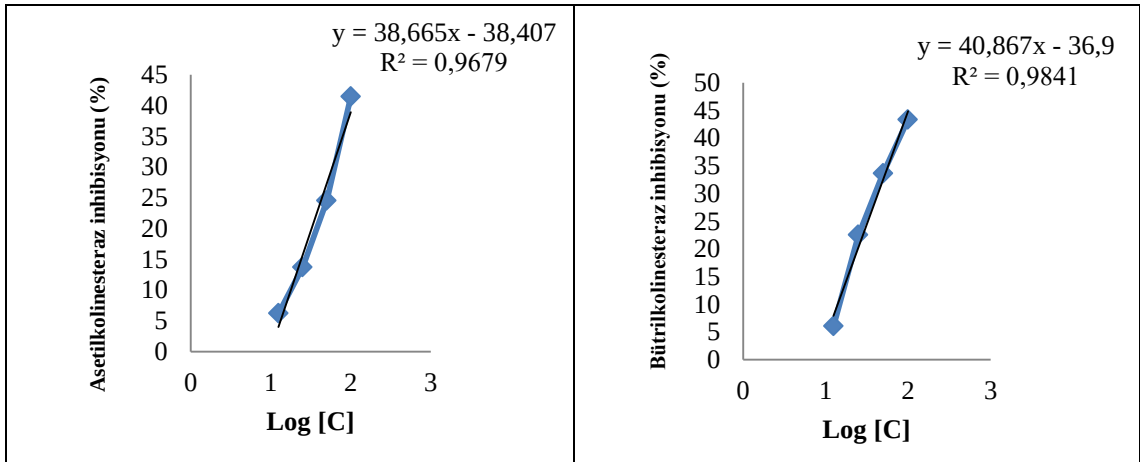
Şekil 40. Galantamin’in kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



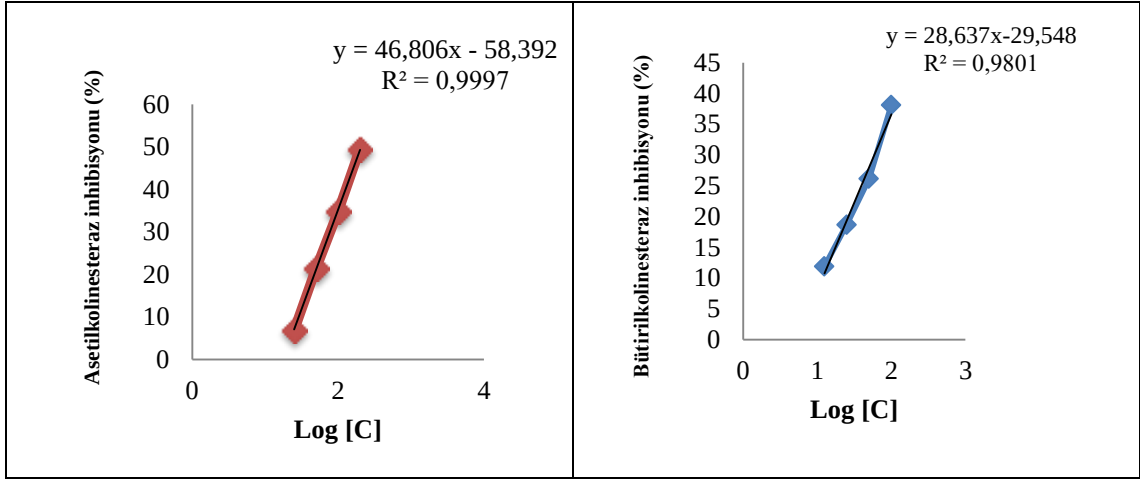
Şekil 41. *B. integrifolia*'nın su ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



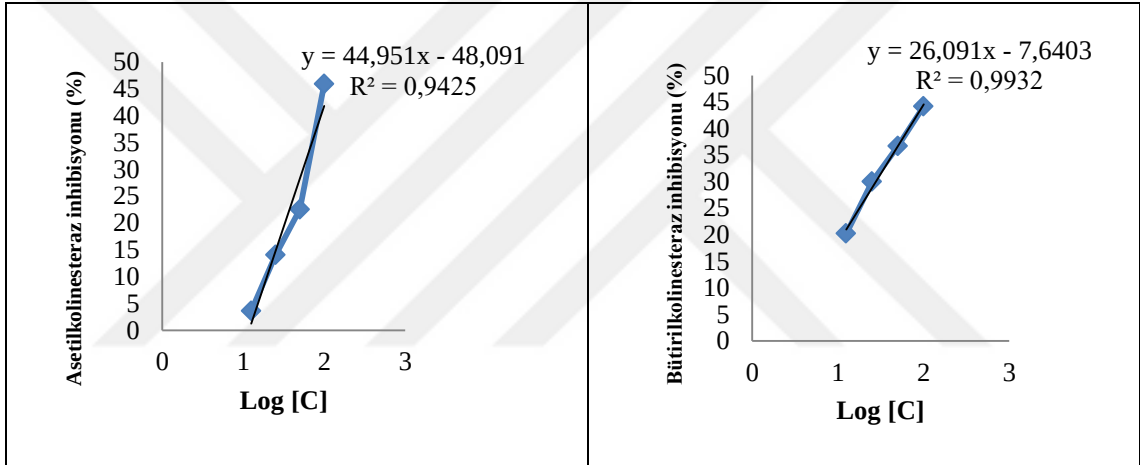
Şekil 42. *B. integrifolia*'nın etil asetat ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



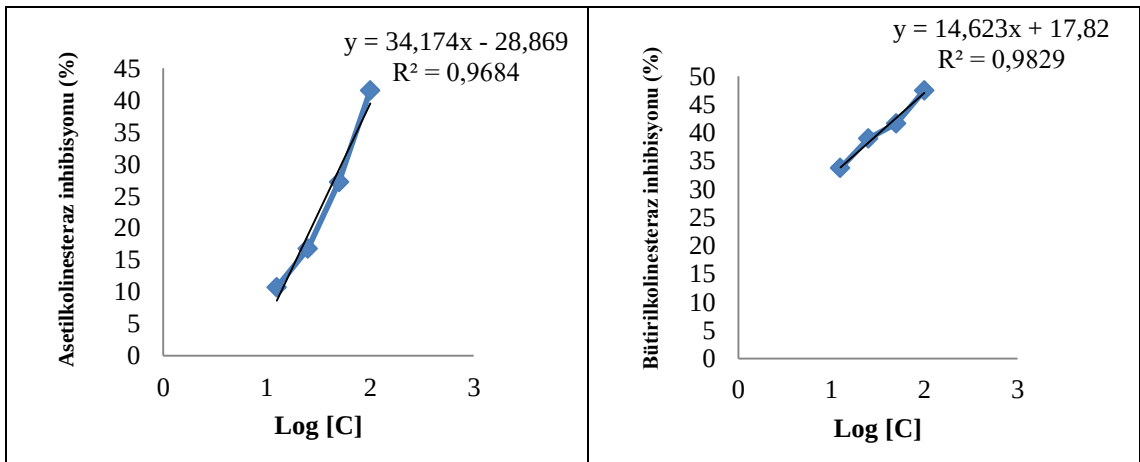
Şekil 43. *B. integrifolia*'nın kloroform ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



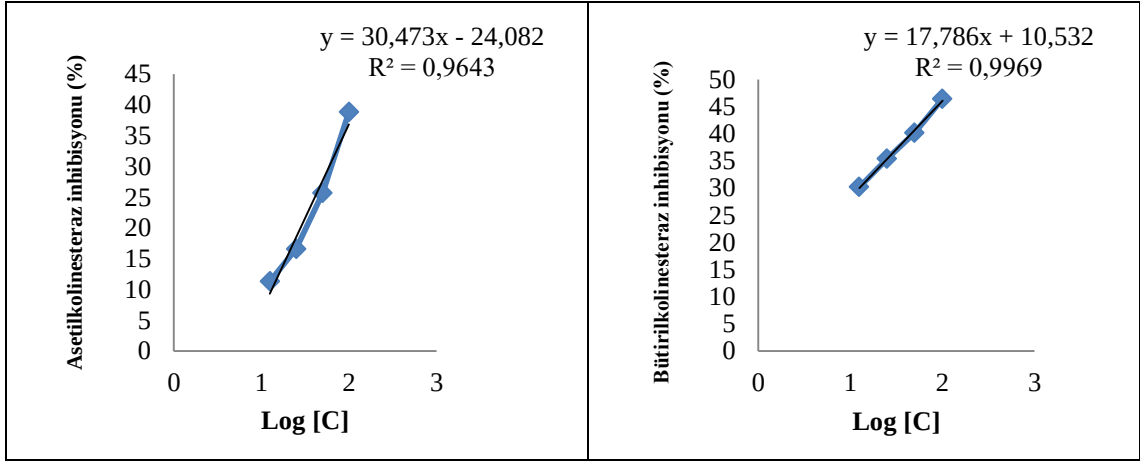
Şekil 44. *B. integrifolia*'nın metanol ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



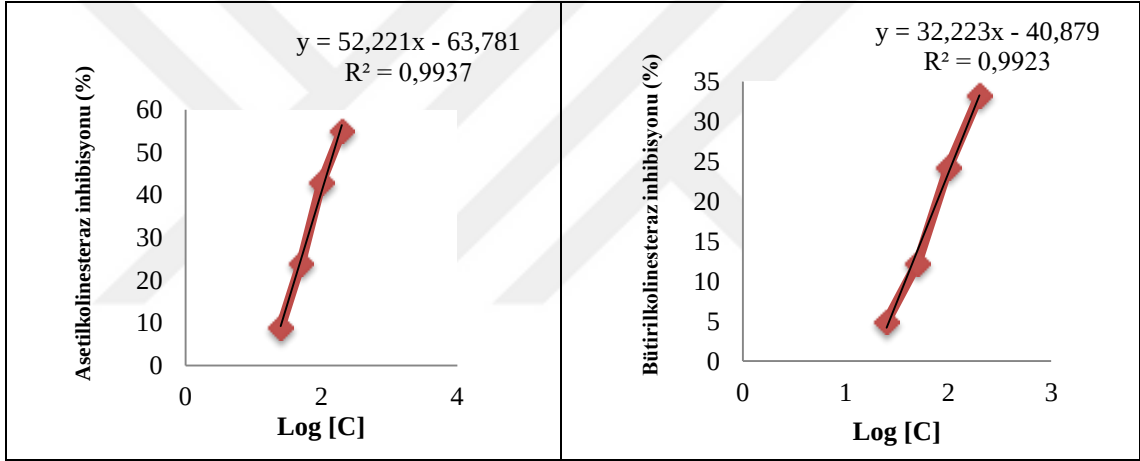
Şekil 45. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın su ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



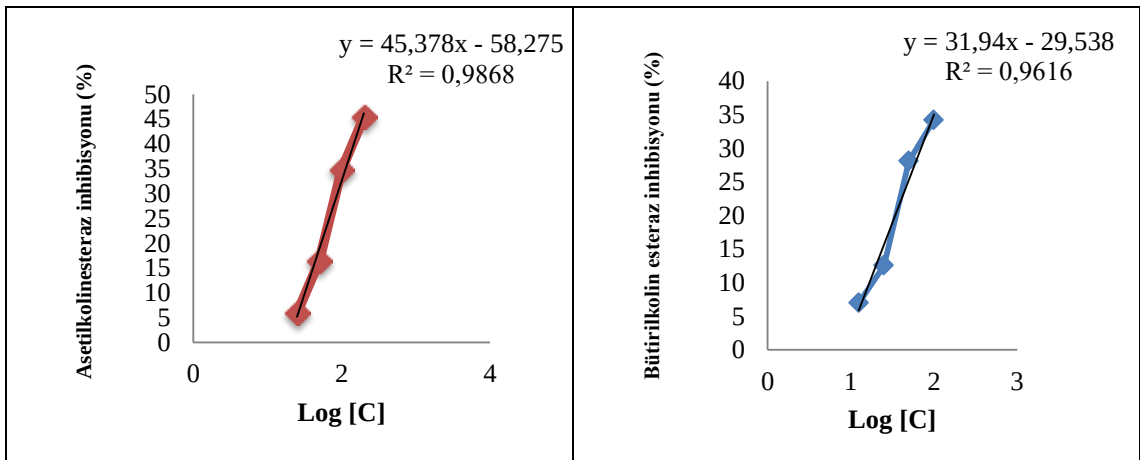
Şekil 46. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın etil asetat ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



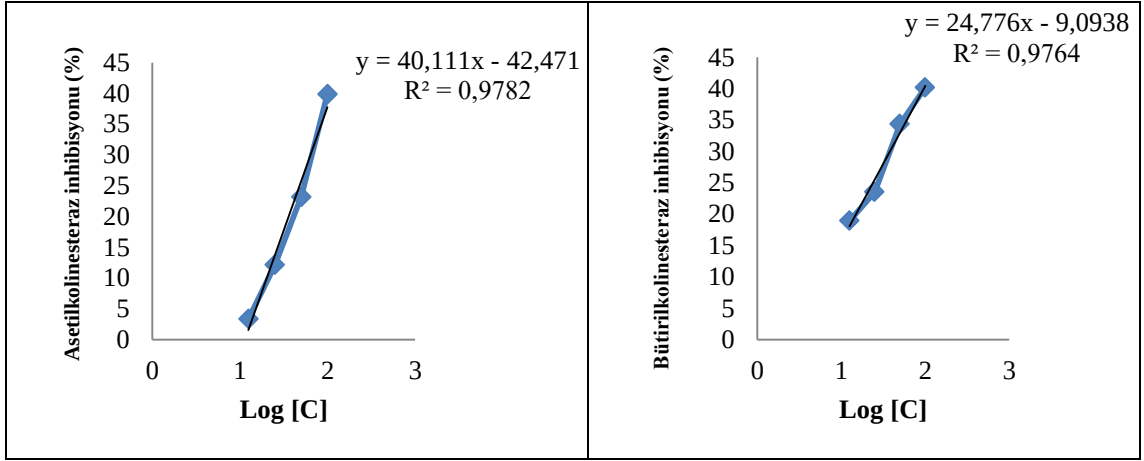
Şekil 47. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın kloroform ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



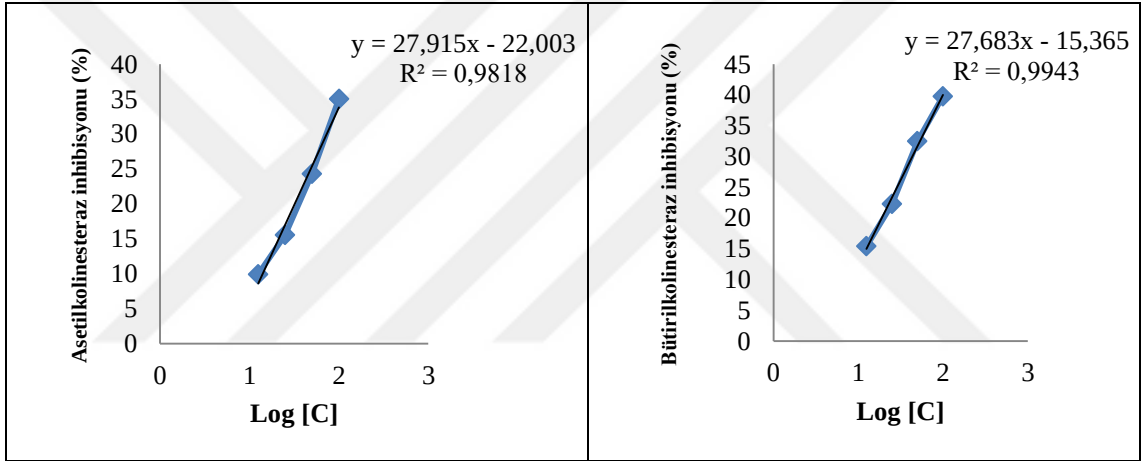
Şekil 48. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın metanol ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



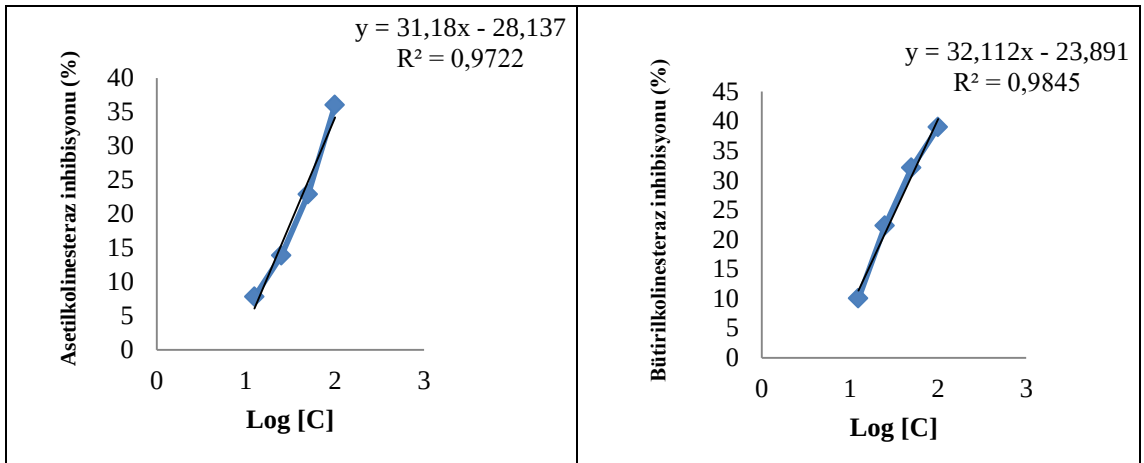
Şekil 49. *B. plantaginea*'nın metanol ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 50. *B. plantaginea*'nın su ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 51. *B. plantaginea*'nın etil asetat ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 52. *B. plantaginea*'nın kloroform ekstresinin kolinesteraz enzim inhibisyonu grafiği

Tablo 17. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin ChE enzim inhibisyonu sonuçları

Örnekler	AChE	BuChE
	IC ₅₀ değeri (µg/mL)	IC ₅₀ değeri (µg/mL)
BİS	189.5929±2.18	69.17957±2.25
BİM	206.9±4.48	247.68±3.89
BİE	202.7765±1.23	147.0933±1.79
BİK	193.4644±1.25	133.8981±1.79
BAS	152.1257±2.81	161.9107±2.03
BAM	150.95±2.65	679.04±9.36
BAE	203.176±6.02	158.8892±4.31
BAK	269.9255±0.86	165.9243±1.61
BPS	202.0273±2.08	243.0346±1.15
BPM	243.26±4.18	308.14±5.21
BPE	379.94±1.38	229.7585±1.02
BPK	320.4593±1.25	200.0563±1.16
Galantamin	1.4454±0.06	7.1154±0.21

6.4. *Barbarea* Türlerinde Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Türlerden elde edilen ekstre ve alt fraksiyonların antimikrobiyal aktiviteleri, patojen özelliğe sahip 8 bakteri ve iki maya üzerinde çalışılmıştır.

6.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Sonuçları

Türlerden elde edilen ekstre ve alt fraksiyonlara ait inhibisyon zon çapları cetvel yardımıyla ölçülerek mm olarak belirlenmiştir. Standart çözücü olarak her bir örneğin kendi çözücüsü kullanılmıştır. Kontrol ilaç olarak, bakteriler için Ampisilin (10 µg), mayalar için flukonazol (5 µg) kullanılmıştır. Sonuçlar standart olarak kullanılan ilaçlar ile karşılaştırılarak Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin inhibisyon zon çapları

Örnek	Mikroorganizma ve Zon Çapları (mm)									
	Gram (-)				Gram (+)				Maya mantarı	
	Ec	Yp	Pa	Sa	Ef	Lm	Bc	Ms	Ca	Sc
BAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BİS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPS	-	12	-	6	-	-	-	-	-	7
BAM	10	6	10	6	-	6	-	12	-	-
BPM	15	6	12	10	8	8	-	15	6	6
BİM	16	6	10	10	10	8	-	15	-	-
BAK	12	10	-	12	6	8	-	12	-	8
BPK	15	12	-	12	6	8	-	12	-	8
BİK	15	10	-	12	12	12	-	>20	6	8
BAE	15	12	15	12	15	14	15	15	18	12
BPE	15	12	12	12	15	14	15	15	18	12
BİE	16	10	12	10	15	6	12	15	12	10
Amp	10	10	10	18	35	10	10	15		
Str	10							35		
Flu	5								25	25

Ec: *Escherichia coli*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Lm: *Listeria monocytogenes*, Bc: *Bacillus cereus*, Ms: *Mycobacterium smegmatis*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Amp.: Ampisilin, Str.: Streptomisin, Flu.: Flukonazole

6.4.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi Sonuçları

Türlerden elde edilen ekstre ve alt fraksiyonların MİK değeri, mikrodilüsyon kuyucuklarındaki mikroorganizmanın üremesi tamamen engellemiş ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobik madde konsantrasyonu, cinsinden ifade edilmiştir. Standart çözücü kontrolü yanında kontrol ilaç olarak, bakteriler için Ampisilin (10 µg), mayalar için Flukonazol (5 µg) kullanılmıştır. Sonuçlar standart olarak kullanılan ilaçlar ile karşılaştırılarak Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 19. *Barbarea* türlerine ait ekstrelerin MİK değerleri

Örnek	MİK Değerleri (µg/mL)									
	Gram (-)				Gram (+)				Maya mantarı	
	Ec	Yp	Pa	Sa	Ef	Lm	Bc	Ms	Ca	Sc
BAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BİS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPS	-	125	-	700	-	-	-	-	-	700
BAM	125	700	125	700	-	700	-	62,25	-	-
BPM	125	700	125	125	350	350	-	62,25	700	700
BİM	16	700	125	125	125	350	-	62,25	-	-
BAK	441	882	-	441	1260	882	-	441	-	882
BPK	343	686	-	686	2744	1372	-	686	-	1372
BİK	62,5	125	-	125	125	125	-	125	500	250
BAE	353	707	353	707	353	353	353	353	353	12
BPE	218	437	437	437	218	218	218	109	54	437
BİE	62	125	125	125	62	500	125	125	125	125
Amp	10	10	18	>128	35	10	10	15		
Str	10								4	
Flu	5								<8	<8

Ec: *Escherichia coli*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Lm: *Listeria monocytogenes*, Bc: *Bacillus cereus*, Ms: *Mycobacterium smegmatis*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Amp.: Ampisilin, Str.: Streptomisin, Flu.: Flukonazole

6.5. *Barbarea* Türlerinin Sitotoksisite Tayinine Ait Bulgular

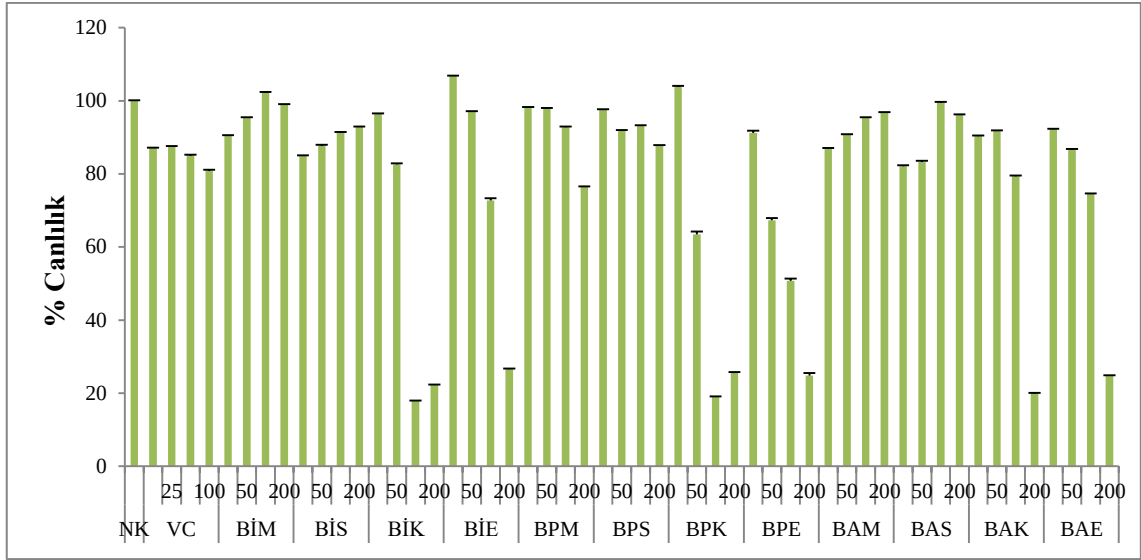
Tez kapsamında yer alan *Barbarea* türlerinden elde edilen metanol, kloroform, etil asetat ve su ekstralarının L929, Hep3B, MCF-7, HCT116, MDA-MB-231, A549 ve PC-3 hücre hatları üzerinde gösterdiği sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçlar üç çalışmadan elde edilen ortalama absorbans değerleri esas alınarak hesaplanmıştır.

6.5.1. *Barbarea* Türlerinin L929 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksisite Sonuçları

Çalışmada, 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan türlere ait örneklerin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, Vinkristin ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deney sonuçlarına göre, sağlıklı fibroblast hücresi üzerinde en güçlü sitotoksik etkiyi *B. integrifolia* ve *B. plantaginea*'nın kloroform ekstresi göstermiştir (Tablo 20) (Şekil 53).

Tablo 20. *Barbarea* türlerinin L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	% canlılık	IC ₅₀ (µg/mL)
NK	-	100±0.12	
VC	10	87.06±0.094	>200
	25	87.56±0.048	
	50	85.07±0.18	
	100	81.00±0.16	
BİM	25	90.47±0.11	>200
	50	95.52±0.02	
	100	102.36±0.03	
	200	99.10±0.03	
BİS	25	84.89±0.17	>200
	50	87.83±0.16	
	100	91.35±0.16	
	200	92.89±0.12	
BİK	25	96.43±0.13	62.47
	50	82.63±0.25	
	100	17.93±0.022	
	200	22.31±0.02	
BİE	25	106.81±0.12	125.30
	50	96.96±0.25	
	100	72.70±0.62	
	200	26.56±0.16	
BPM	25	98.11±0.18	>200
	50	97.90±0.15	
	100	92.80±0.17	
	200	76.46±0.11	
BPS	25	97.56±0.11	>200
	50	91.73±0.25	
	100	93.23±0.07	
	200	87.83±0.09	
BPK	25	103.92±0.15	62.37
	50	63.45±0.78	
	100	19.09±0.02	
	200	25.79±0.03	
BPE	25	91.20±0.6	97.31
	50	67.31±0.59	
	100	50.73±0.66	
	200	24.85±0.63	
BAM	25	87.14±0.01	>200
	50	90.75±0.12	
	100	95.40±0.11	
	200	96.83±0.10	
BAS	25	82.07±0.31	>200
	50	83.29±0.27	
	100	99.63±0.11	
	200	96.11±0.19	
BAK	25	90.34±0.16	109.50
	50	91.85±0.05	
	100	79.37±0.22	
	200	20.03±0.02	
BAE	25	92.31±0.05	115.79
	50	86.73±0.10	
	100	74.55±0.08	
	200	24.85±0.04	



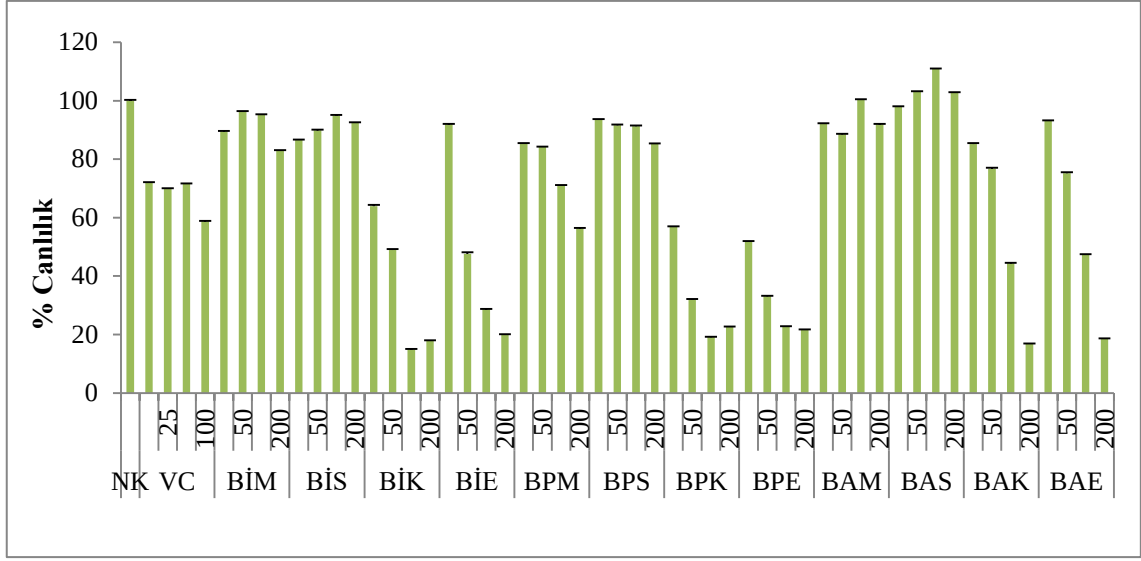
Şekil 53. *Barbarea* türlerinin L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

6.5.2. *Barbarea* Türlerinin Hep3B Hücreleri Üzerindeki Sitotoksikite Sonuçları

Çalışmada, 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan türlere ait örneklerin Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, Vinkristin ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deneyine ait sonuçlara bakıldığında, kanser hücresinde *Barbarea* türlerinden elde edilen su ve metanol ekstrelerinin önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenirken; en güçlü sitotoksik etki *B. integrifolia*'nın etil asetat ekstresinde görülmüştür (Tablo 21) (Şekil 54).

Tablo 21. *Barbarea* türlerinin Hep3B hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	% canlılık	IC ₅₀ (µg/mL)
NK	-	100 ±0.26	
VC	10	71.92 ±0.20	>100
	25	69.95 ±0.06	
	50	71.64 ±0.07	
	100	58.78 ±0.14	
BİM	25	89.55 ±0.08	>200
	50	96.46 ±0.02	
	100	95.37 ±0.02	
	200	82.84 ±0.27	
BİS	25	86.64 ±0.04	>200
	50	89.93 ±0.16	
	100	94.98 ±0.14	
	200	92.61 ±0.06	
BİK	25	63.89 ±0.45	41.08
	50	48.91 ±0.29	
	100	14.99 ±0.02	
	200	18.01 ±0.03	
BİE	25	91.99 ±0.08	26.45
	50	47.60 ±0.57	
	100	28.68 ±0.07	
	200	20.07 ±0.01	
BPM	25	85.28 ±0.19	>200
	50	84.27 ±0.04	
	100	70.98 ±0.13	
	200	56.34 ±0.08	
BPS	25	93.49 ±0.27	>200
	50	91.64 ±0.23	
	100	91.37 ±0.15	
	200	85.25 ±0.13	
BPK	25	56.90 ±0.10	49.96
	50	32.08 ±0.11	
	100	19.13 ±0.07	
	200	22.68 ±0.03	
BPE	25	51.94 ±0.05	29.67
	50	33.10 ±0.13	
	100	22.76 ±0.11	
	200	21.76 ±0.04	
BAM	25	92.17 ±0.10	>200
	50	88.61 ±0.07	
	100	100.42 ±0.13	
	200	91.95 ±0.12	
BAS	25	98.10 ±0.06	>200
	50	103.19 ±0.05	
	100	110.96 ±0.12	
	200	102.70 ±0.19	
BAK	25	85.19 ±0.30	84.57
	50	76.73 ±0.34	
	100	44.46 ±0.12	
	200	16.93 ±0.05	
BAE	25	93.30 ±0.04	90.49
	50	75.25 ±0.28	
	100	47.24 ±0.25	
	200	18.63 ±0.01	



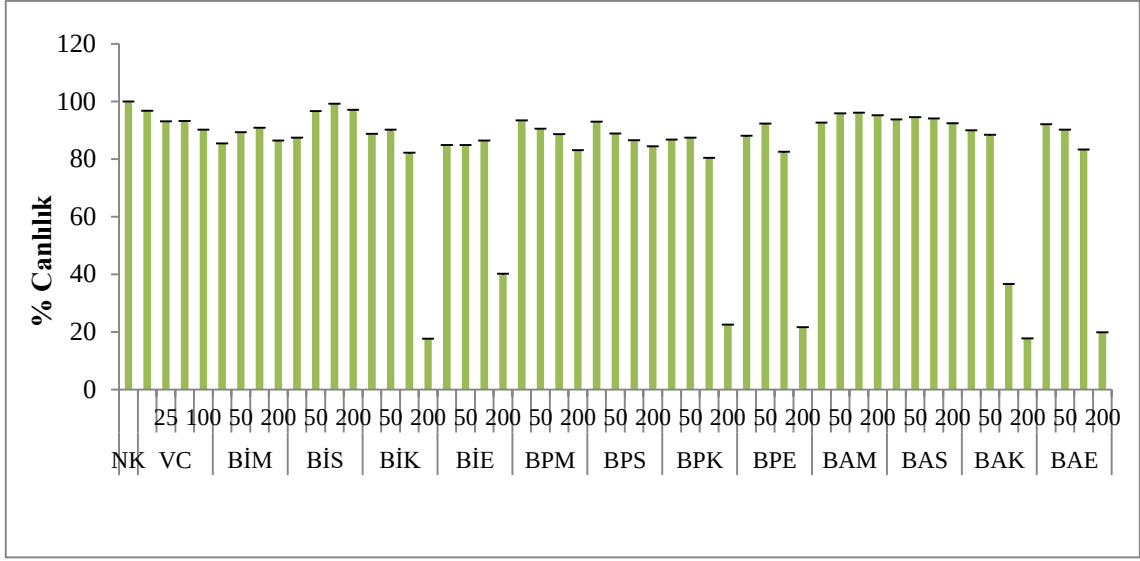
Şekil 54. *Barbarea* türlerinin Hep3B hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

6.5.3. *Barbarea* Türlerinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksikite Sonuçları

Çalışmada, 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan türlere ait örneklerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, Vinkristin ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deneyine ait sonuçlara bakıldığında, kanser hücresinde *Barbarea* türlerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenirken; en güçlü sitotoksik etki *B. auriculata* var. *paludosa*'nın kloroform ekstresinde görülmüştür (Tablo 22) (Şekil 55).

Tablo 22. *Barbarea* türlerinin MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	% canlılık	IC ₅₀ (µg/mL)
NK	-	100±0.02	
VC	10	96.78±0.03	>200
	25	93.02±0.07	
	50	93.17±0.02	
	100	90.18±0.01	
BİM	25	85.39±0.10	>200
	50	89.14±0.20	
	100	90.74±0.15	
	200	86.20±0.26	
BİS	25	87.30±0.14	>200
	50	96.64±0.02	
	100	99.22±0.03	
	200	97.07±0.01	
BİK	25	88.74±0.07	105.10
	50	90.04±0.18	
	100	81.92±0.32	
	200	17.63±0.01	
BİE	25	84.60±0.24	158.41
	50	84.90±0.03	
	100	86.32±0.12	
	200	39.94±0.22	
BPM	25	93.43±0.06	>200
	50	90.52±0.06	
	100	88.65±0.04	
	200	83.03±0.04	
BPS	25	93.01±0.02	>200
	50	88.88±0.03	
	100	86.55±0.05	
	200	84.44±0.01	
BPK	25	86.72±0.11	111.62
	50	87.38±0.12	
	100	80.32±0.14	
	200	22.44±0.04	
BPE	25	87.91±0.23	122.38
	50	92.09±0.23	
	100	82.25±0.31	
	200	21.64±0.04	
BAM	25	92.58±0.09	>200
	50	95.84±0.09	
	100	95.99±0.16	
	200	95.15±0.13	
BAS	25	93.72±0.05	>200
	50	94.51±0.04	
	100	94.03±0.06	
	200	92.38±0.11	
BAK	25	89.80±0.20	86.06
	50	88.13±0.28	
	100	36.38±0.28	
	200	17.67±0.06	
BAE	25	92.00±0.12	138.06
	50	90.20±0.06	
	100	83.16±0.13	
	200	19.82±0.02	



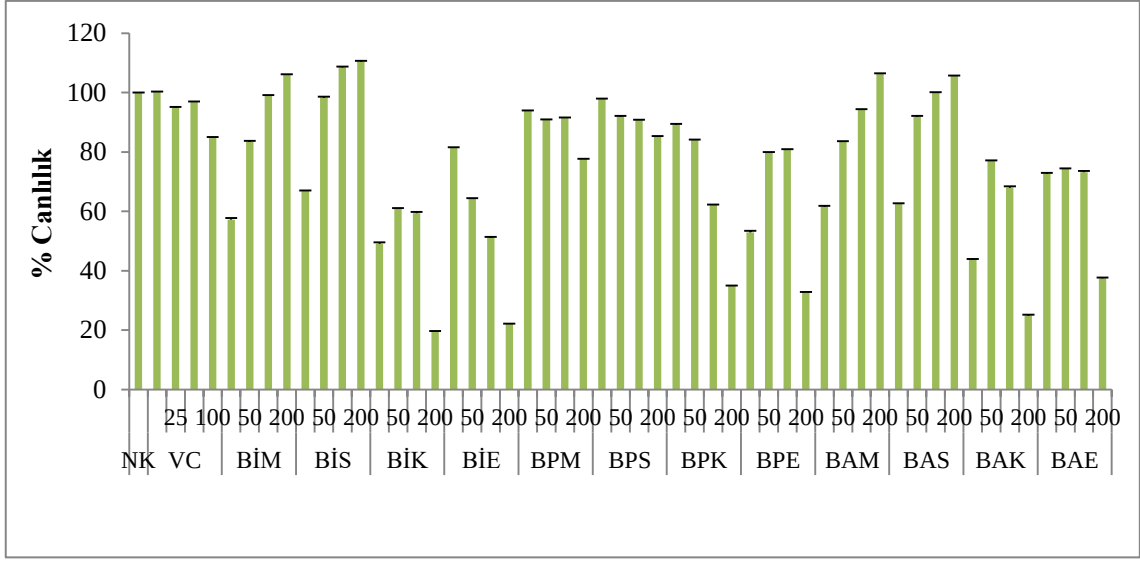
Şekil 55. *Barbarea* türlerinin MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

6.5.4. *Barbarea* Türlerinin HCT116 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksikite Sonuçları

Çalışmada, 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan türlere ait örneklerin HCT116 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, Vinkristin ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deneyine ait sonuçlara bakıldığında, *Barbarea* türlerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının kanser hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenirken; en güçlü sitotoksik etki *B. integrifolia*'nın kloroform ekstresinde görülmüştür (Tablo 23) (Şekil 56).

Tablo 23. *Barbarea* türlerinin HCT116 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	% canlılık	IC ₅₀ (µg/mL)
NK	-	100±0.06	
VC	10	100.27±0.07	>200
	25	95.09±0.05	
	50	96.93±0.03	
	100	84.96±0.13	
BİM	25	52.21±0.52	>200
	50	83.38±0.38	
	100	98.90±0.28	
	200	106.03±0.18	
BİS	25	66.90±0.09	>200
	50	98.41±0.19	
	100	108.54±0.18	
	200	110.57±0.18	
BİK	25	69.12±0.47	92.44
	50	61.05±0.08	
	100	49.34±0.51	
	200	19.64±0.03	
BİE	25	81.38±0.24	100.8
	50	64.31±0.16	
	100	51.27±0.12	
	200	22.18±0.03	
BPM	25	93.90±0.12	>200
	50	90.89±0.08	
	100	91.58±0.02	
	200	77.70±0.06	
BPS	25	97.93±0.09	>200
	50	92.07±0.05	
	100	90.87±0.04	
	200	85.28±0.08	
BPK	25	89.31±0.17	131.61
	50	84.04±0.15	
	100	62.14±0.16	
	200	34.94±0.07	
BPE	25	52.93±0.54	137.37
	50	79.90±0.05	
	100	80.73±0.18	
	200	32.85±0.06	
BAM	25	61.75±0.05	>200
	50	83.45±0.23	
	100	94.36±0.11	
	200	106.36±0.16	
BAS	25	62.58±0.10	>200
	50	91.92±0.21	
	100	100.06±0.07	
	200	105.60±0.15	
BAK	25	43.59±0.41	115.15
	50	77.05±0.10	
	100	68.04±0.37	
	200	24.97±0.26	
BAE	25	72.82±0.15	141.61
	50	74.31±0.17	
	100	73.18±0.41	
	200	37.44±0.21	



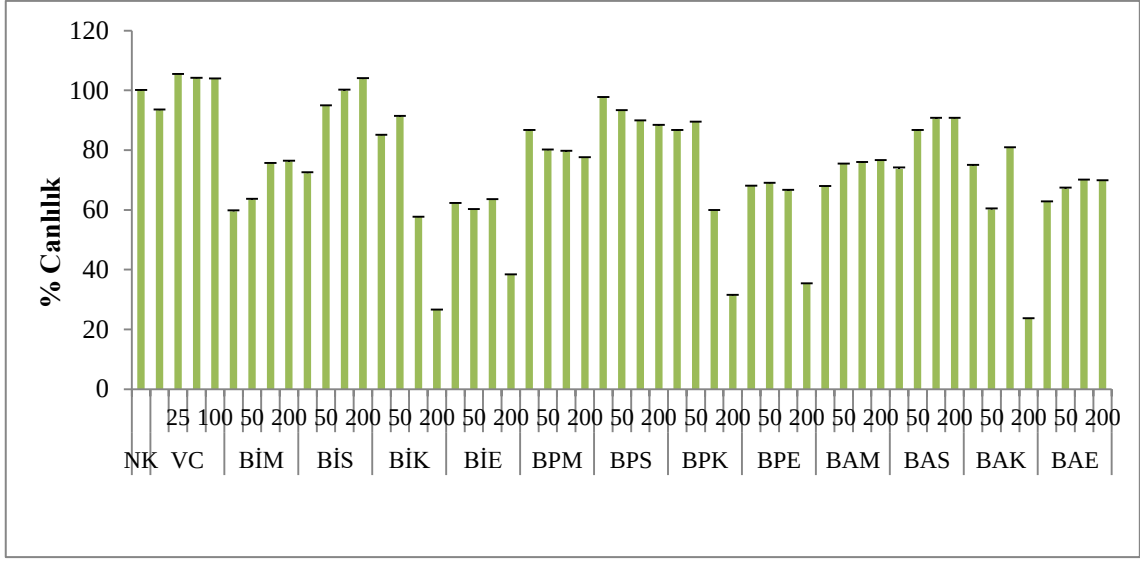
Şekil 56. *Barbarea* türlerinin HCT116 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

6.5.5. *Barbarea* Türlerinin MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksikite Sonuçları

Çalışmada, 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan türlere ait örneklerin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, Vinkristin ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deneyine ait sonuçlara bakıldığında, *Barbarea* türlerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının kanser hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenirken; diğer örneklerin Vinkristin'den daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. En güçlü sitotoksik etki *B. auriculata* var. *paludosa*'nın kloroform ekstresinde görülmüştür (Tablo 24) (Şekil 57).

Tablo 24. *Barbarea* türlerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	% canlılık	IC ₅₀ (µg/mL)
NK	-	100±0.17	
VC	10	93.39±0.18	>200
	25	105.50±0.02	
	50	104.15±0.06	
	100	103.99±0.05	
BİM	25	59.59±0.28	>200
	50	63.48±0.23	
	100	75.67±0.07	
	200	76.24±0.20	
BİS	25	72.27±0.31	>200
	50	94.77±0.20	
	100	99.96±0.27	
	200	103.81±0.24	
BİK	25	85.07±0.05	117.79
	50	91.29±0.14	
	100	57.59±0.08	
	200	26.61±0.05	
BİE	25	62.31±0.03	104.7
	50	60.15±0.14	
	100	63.48±0.11	
	200	38.40±0.06	
BPM	25	86.53±0.16	>200
	50	80.04±0.15	
	100	79.59±0.15	
	200	77.44±0.15	
BPS	25	97.67±0.07	>200
	50	93.32±0.03	
	100	89.88±0.13	
	200	88.40±0.09	
BPK	25	86.61±0.08	123.02
	50	89.39±0.17	
	100	59.91±0.10	
	200	31.53±0.02	
BPE	25	68.00±0.10	127.94
	50	68.92±0.15	
	100	66.53±0.18	
	200	35.29±0.14	
BAM	25	67.81±0.14	>200
	50	75.42±0.06	
	100	75.97±0.05	
	200	76.58±0.11	
BAS	25	73.72±0.45	>200
	50	86.59±0.16	
	100	90.53±0.24	
	200	90.67±0.17	
BAK	25	74.98±0.13	84.06
	50	60.13±0.32	
	100	50.70±0.28	
	200	23.70±0.05	
BAE	25	62.86±0.04	>200
	50	67.16±0.32	
	100	69.99±0.18	
	200	69.79±0.16	



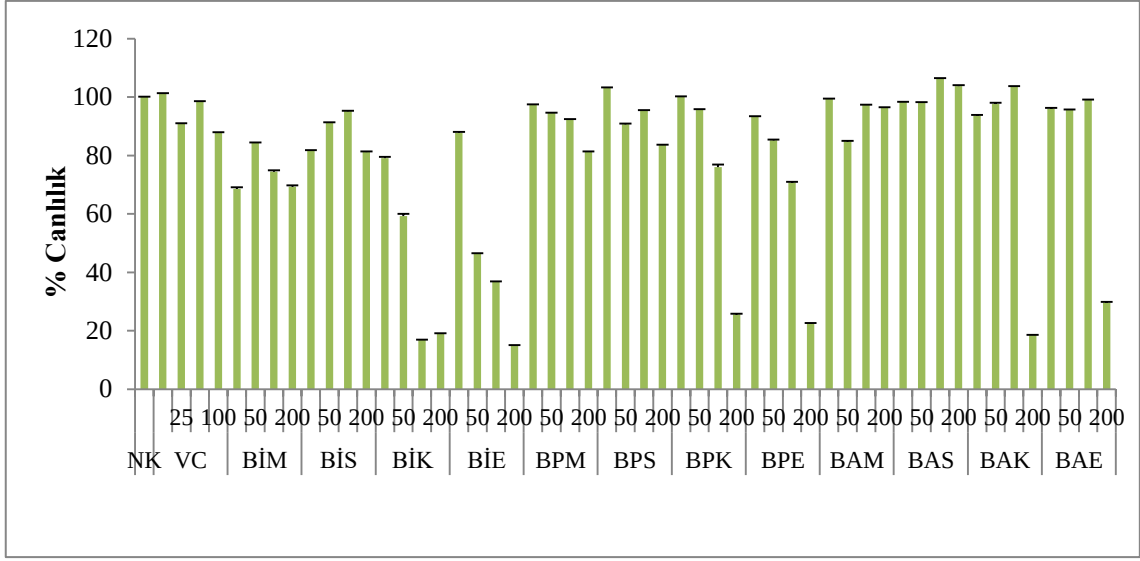
Şekil 57. *Barbarea* türlerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

6.5.6. *Barbarea* Türlerinin A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksikite Sonuçları

Çalışmada, 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan türlere ait örneklerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, Vinkristin ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deneyine ait sonuçlara bakıldığında, *Barbarea* türlerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının hücrelerde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenirken; diğer örneklerin kanser hücresinde, Vinkristin'den daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. En güçlü sitotoksik etki *B. integrifolia*'nın etil asetat ekstresinde görülmüştür (Tablo 25) (Şekil 58).

Tablo 25. *Barbarea* türlerinin A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	% canlılık	IC ₅₀ (µg/mL)
NK	-	100±0.07	
VC	10	101.33±0.01	>200
	25	90.79±0.25	
	50	98.44±0.10	
	100	87.86±0.10	
BİM	25	68.57±0.58	>200
	50	84.33±0.14	
	100	74.46±0.49	
	200	69.34±0.48	
BİS	25	81.72±0.05	>200
	50	91.20±0.12	
	100	95.19±0.12	
	200	81.22±0.17	
BİK	25	79.08±0.39	74.17
	50	59.25±0.72	
	100	16.90±0.03	
	200	19.12±0.03	
BİE	25	87.76±0.28	45.99
	50	46.29±0.28	
	100	36.87±0.07	
	200	15.05±0.02	
BPM	25	97.30±0.19	>200
	50	94.49±0.09	
	100	92.18±0.24	
	200	81.32±0.09	
BPS	25	103.24±0.04	>200
	50	90.71±0.18	
	100	95.49±0.04	
	200	83.57±0.14	
BPK	25	100.11±0.09	122.78
	50	95.74±0.11	
	100	76.02±0.85	
	200	25.65±0.13	
BPE	25	93.40±0.08	110.79
	50	85.20±0.18	
	100	70.75±0.21	
	200	22.60±0.02	
BAM	25	99.43±0.06	>200
	50	84.94±0.09	
	100	97.29±0.09	
	200	96.46±0.07	
BAS	25	98.32±0.04	>200
	50	98.08±0.12	
	100	106.36±0.10	
	200	103.76±0.33	
BAK	25	93.56±0.35	112.86
	50	97.60±0.42	
	100	103.67±0.03	
	200	18.57±0.02	
BAE	25	95.99±0.25	123.49
	50	95.76±0.03	
	100	99.04±0.08	
	200	29.57±0.30	



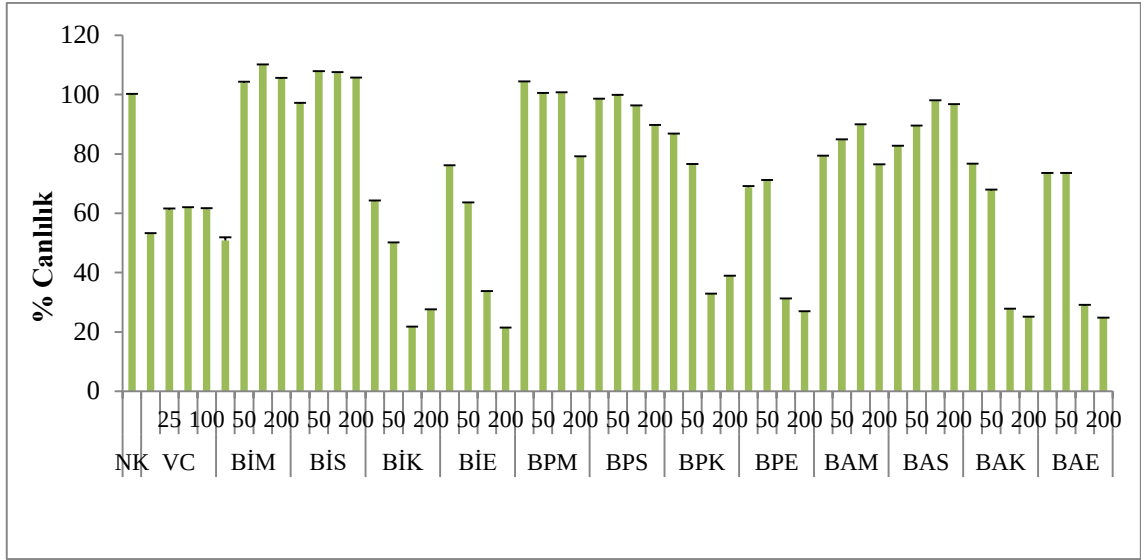
Şekil 58. *Barbarea* türlerinin A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

6.5.7. *Barbarea* Türlerinin PC-3 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksikite Sonuçları

Çalışmada, 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan türlere ait örneklerin PC-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri Vinkristin ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deneyine ait sonuçlara bakıldığında *Barbarea* türlerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının kanser hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenirken; en güçlü sitotoksik etki *B. integrifolia*'nın kloroform ekstresinde gözlenmiştir (Tablo 26) (Şekil 59).

Tablo 26. *Barbarea* türlerinin PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	% canlılık	IC ₅₀ (µg/mL)
NK	-	100±0.27	
VC	10	53.03±0.21	>100
	25	61.33±0.32	
	50	61.80±0.21	
	100	61.42±0.28	
BİM	25	50.85±1.05	>200
	50	104.04±0.30	
	100	110.10±0.11	
	200	105.52±0.14	
BİS	25	97.16±0.04	>200
	50	107.90±0.04	
	100	107.20±0.41	
	200	105.66±0.11	
BİK	25	64.08±0.187	60.83
	50	50.14±0.03	
	100	21.80±0.09	
	200	27.57±0.03	
BİE	25	75.98±0.23	71.25
	50	63.59±0.05	
	100	33.65±0.11	
	200	21.42±0.02	
BPM	25	104.40±0.04	>200
	50	100.46±0.06	
	100	100.68±0.11	
	200	79.03±0.16	
BPS	25	98.50±0.09	>200
	50	99.80±0.14	
	100	96.20±0.11	
	200	89.66±0.12	
BPK	25	86.58±0.30	69.43
	50	76.38±0.23	
	100	32.87±0.04	
	200	38.88±0.02	
BPE	25	68.74±0.40	75.79
	50	71.17±0.039	
	100	31.23±0.02	
	200	26.99±0.02	
BAM	25	79.34±0.12	>200
	50	84.88±0.09	
	100	89.84±0.12	
	200	76.31±0.21	
BAS	25	82.70±0.05	>200
	50	89.44±0.14	
	100	97.91±0.16	
	200	96.79±0.04	
BAK	25	76.56±0.12	89.47
	50	67.79±0.23	
	100	27.84±0.02	
	200	25.08±0.05	
BAE	25	73.52±0.09	90.90
	50	73.39±0.21	
	100	28.85±0.27	
	200	24.82±0.008	



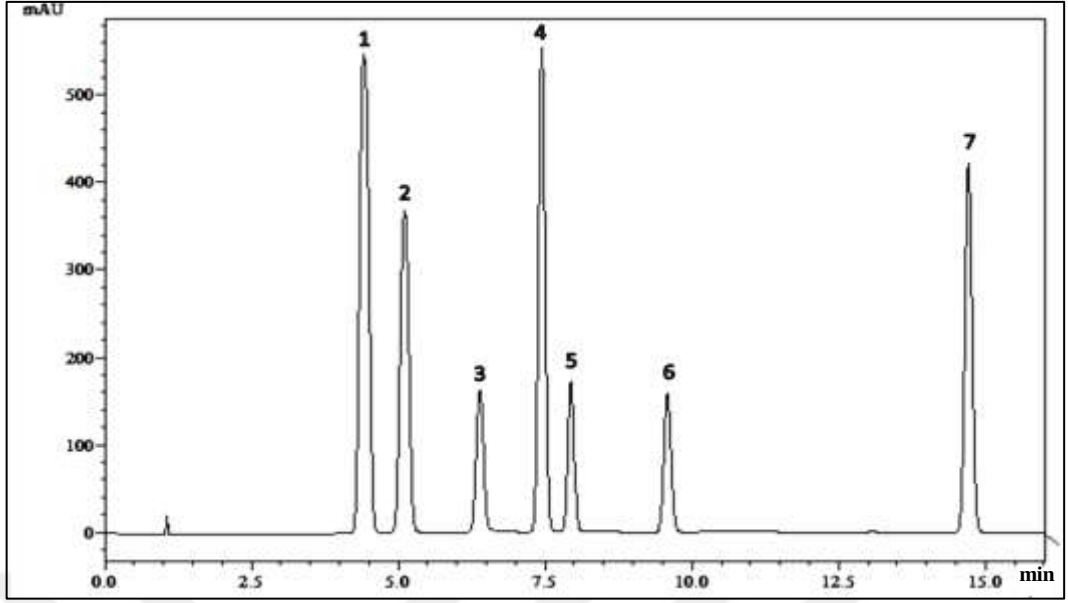
Şekil 59. *Barbarea* türlerinin PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

6.6. *Barbarea* Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC Analiz Sonuçları

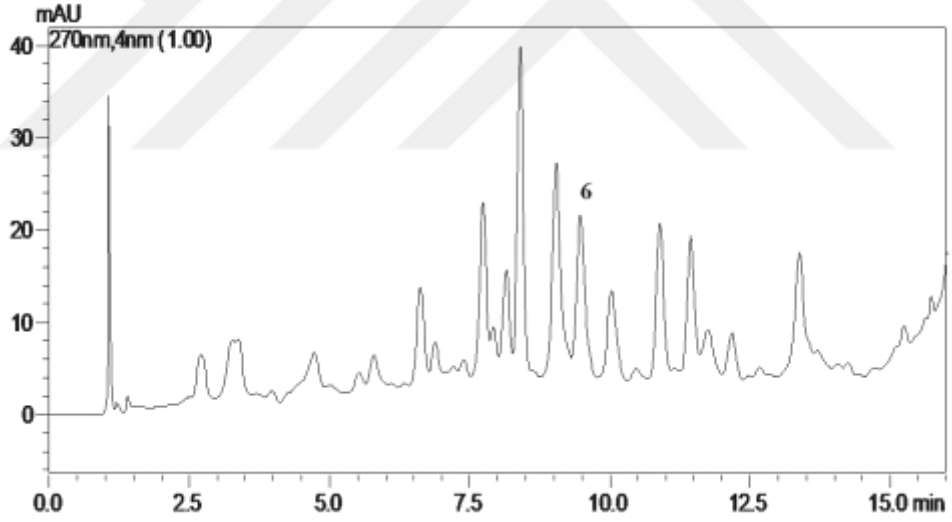
10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanan her bir analiz örneği 3 kez yukarıda koşulları belirtilen HPLC yöntemiyle sürüklenmiştir. Bitki numunelerinin fenolik içeriği, 7 farklı fenolik bileşiğin alıkonma zamanlarıyla karşılaştırılarak ve dedektör sinyalleri değerlendirilerek belirlenmiştir. 5-100 µg/mL konsantrasyonundaki standart çözeltisi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla türlerin içerdiği fenolik bileşiklerin miktarları (mg/g) hesaplanmıştır.

Tablo 27. Türlerin içerdiği fenolik bileşiklerin miktarları

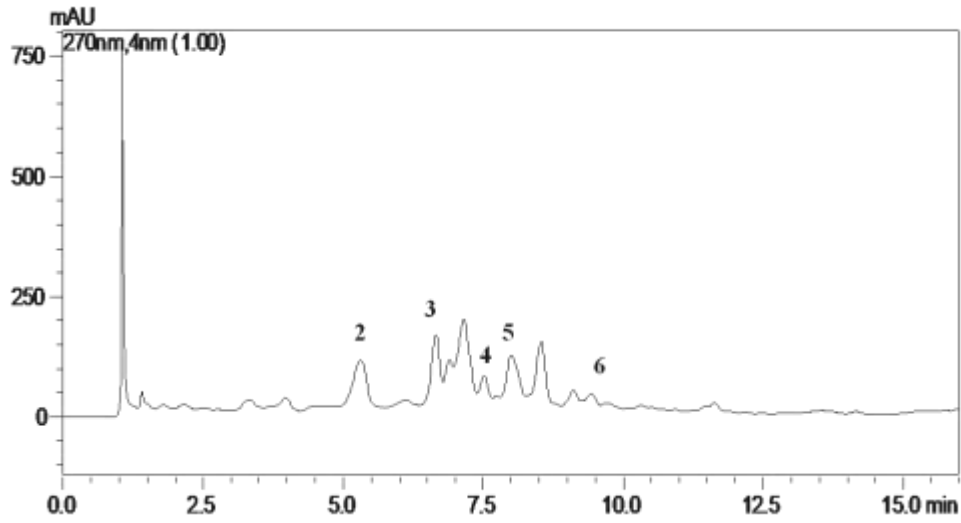
TürAdı	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	Vanilik Asit	Şiringaldehit	Kumarik Asit	Sinapik Asit	Benzoik Asit	Kersetin
<i>B. integrifolia</i>	12.535	9.245	19.543	76.180	97.261	90.589	-
<i>B. auriculata</i> var. <i>paluosa</i>	-	66.445	60.553	22.342	170.443	48.754	-
<i>B. plantaginea</i>	-	-	-	-	-	16.784	-



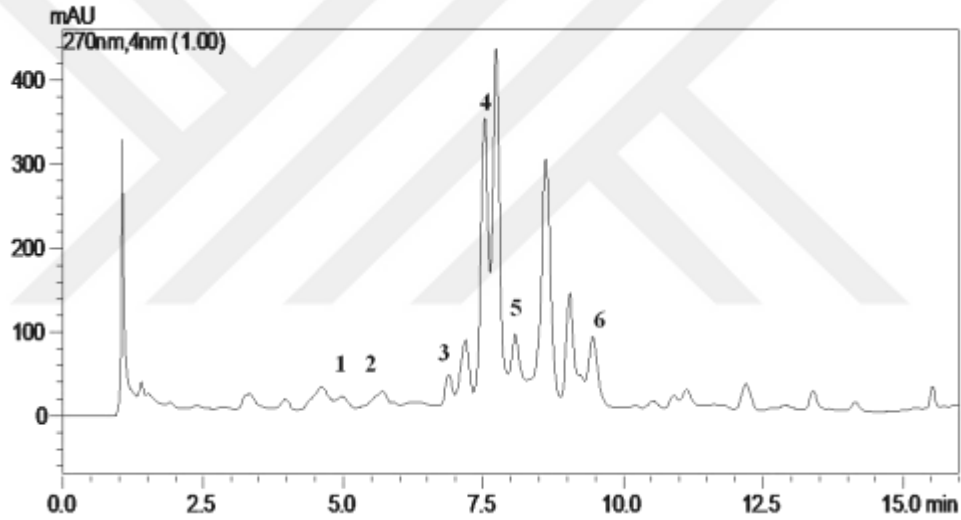
Şekil 60. Fenolik bileşiklerin standartlarının HPLC kromatogramı, piklerin tanımlanması: 1. *p*-OH benzoik asit, 2. vanilik asit, 3. şiringaldehit, 4. kumarik asit, 5. sinapik asit, 6. benzoik asit, 7. kersetin.



Şekil 61. *B. plantaginea*'nın metanol ekstresine ait HPLC kromatogramı



Şekil 62. *B. auriculata* var. *paludosa*'nın metanol ekstresine ait HPLC kromatogramı

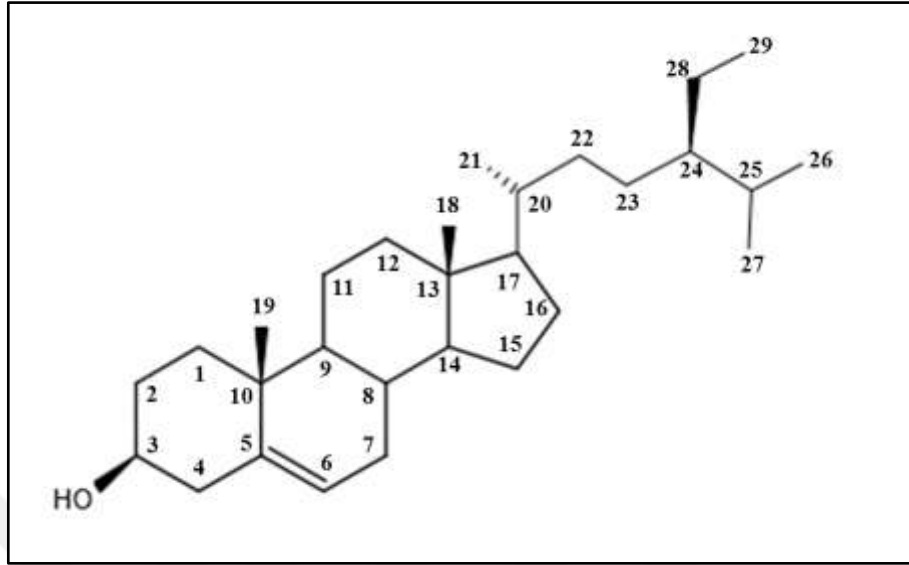


Şekil 63. *B. integrifolia*'nın metanol ekstresine ait HPLC kromatogramı

6.7. İzolasyon Çalışmasına Ait Sonuçlar

B. integrifolia'dan elde edilen su fazı üzerinde yürütülen izolasyon çalışmalarında 3 adet, etil asetat fazı üzerinde yürütülen izolasyon çalışmalarında 1 adet ve kloroform fazı üzerinde yürütülen izolasyon çalışmalarında 1 adet olmak üzere toplamda 5 adet ana bileşik izole edilmiştir. Bileşiklerin kimyasal yapıları çeşitli spektroskopik [^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-NMR (COSY, HMQC, HMBC) ve MS] yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ana bileşiklerin ait olduğu kimyasal gruplar fenolik asit, steroid, flavonol glikozit ve glukosinolat olarak belirlenmiştir.

6.7.1. β -Sitosterol



$C_{29}H_{50}O$ (Molekül Ağırlığı: 414)

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) Spektrumu: Şekil 64, 65; Tablo 28

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) Spektrumu: Şekil 66-68; Tablo 29

Tablo 28. β -Sitosterol (Bİ-1) bileşiğinin 1H -NMR spektral değerleri

H	δ_H (ppm)
H-3	3.52 (1H, m)
H-4	2.27 (2H, m)
H-6	5.35 (1H, d, $J= 5.2$ Hz)
H-12	1.99 (2H, m)
H-18	0.68 (3H, s)

Tablo 29. β -Sitosterol (Bİ-1) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri

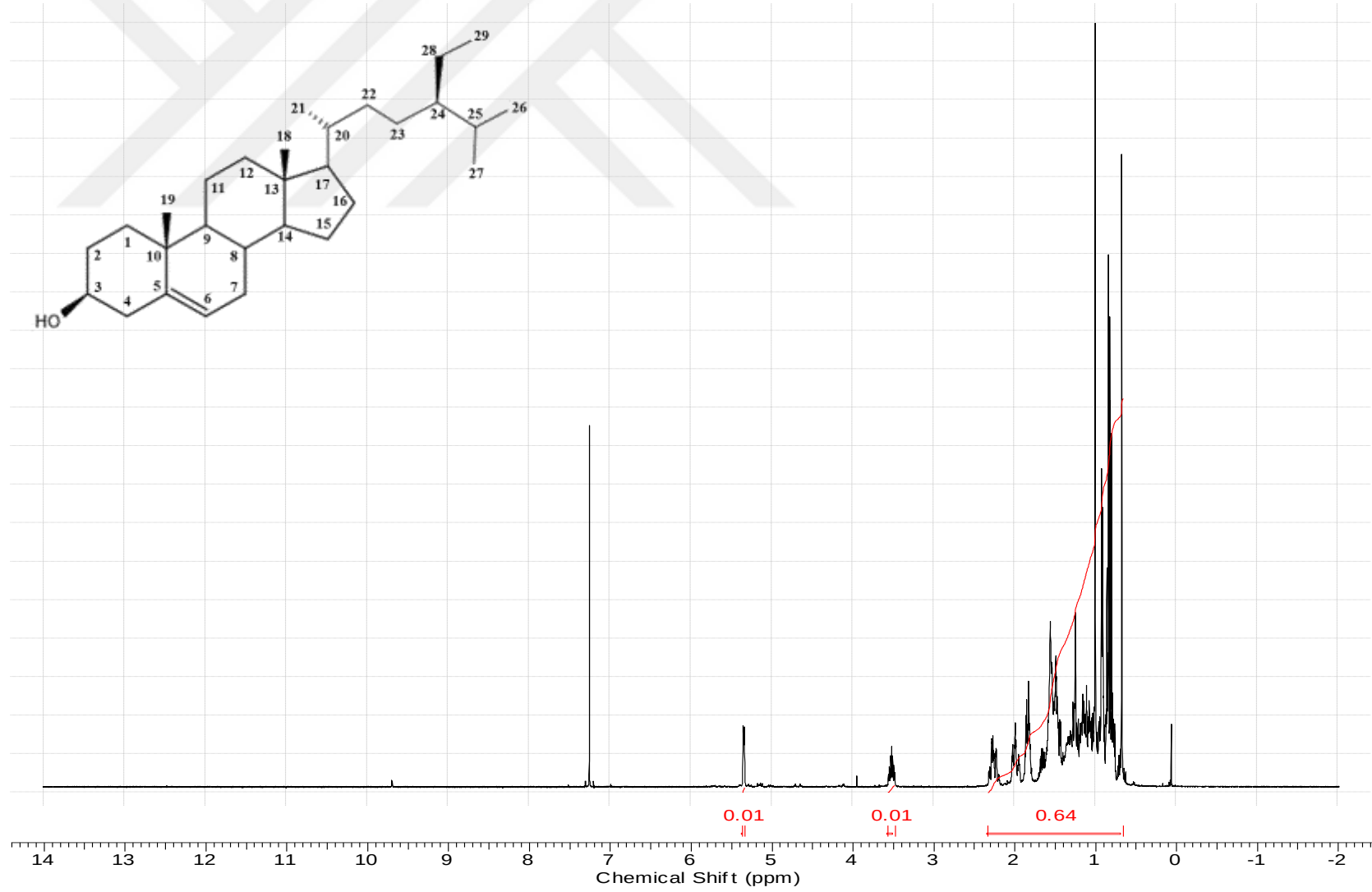
C/H	δ_{C} (ppm)
1	37.3
2	31.7
3	71.8
4	42.3
5	140.8
6	121.7
7	31.9
8	31.9
9	50.1
10	36.5
11	21.1
12	39.8
13	42.3
14	56.8
15	24.3
16	28.2
17	56.0
18	11.9
19	19.0
20	36.1
21	18.8
22	33.9
23	26.1
24	45.8
25	29.1
26	19.4
27	19.8
28	23.1
29	11.9

Beyaz renkli olan Bİ-1 bileşiği, İTK’da vanilin/ H_2SO_4 reaktifi püskürtmeden önce UV lamba altında görülmezken; reaktif püskürttükten sonra ısıtıldığında pembe mor renkli lekeler olarak görünmüştür.

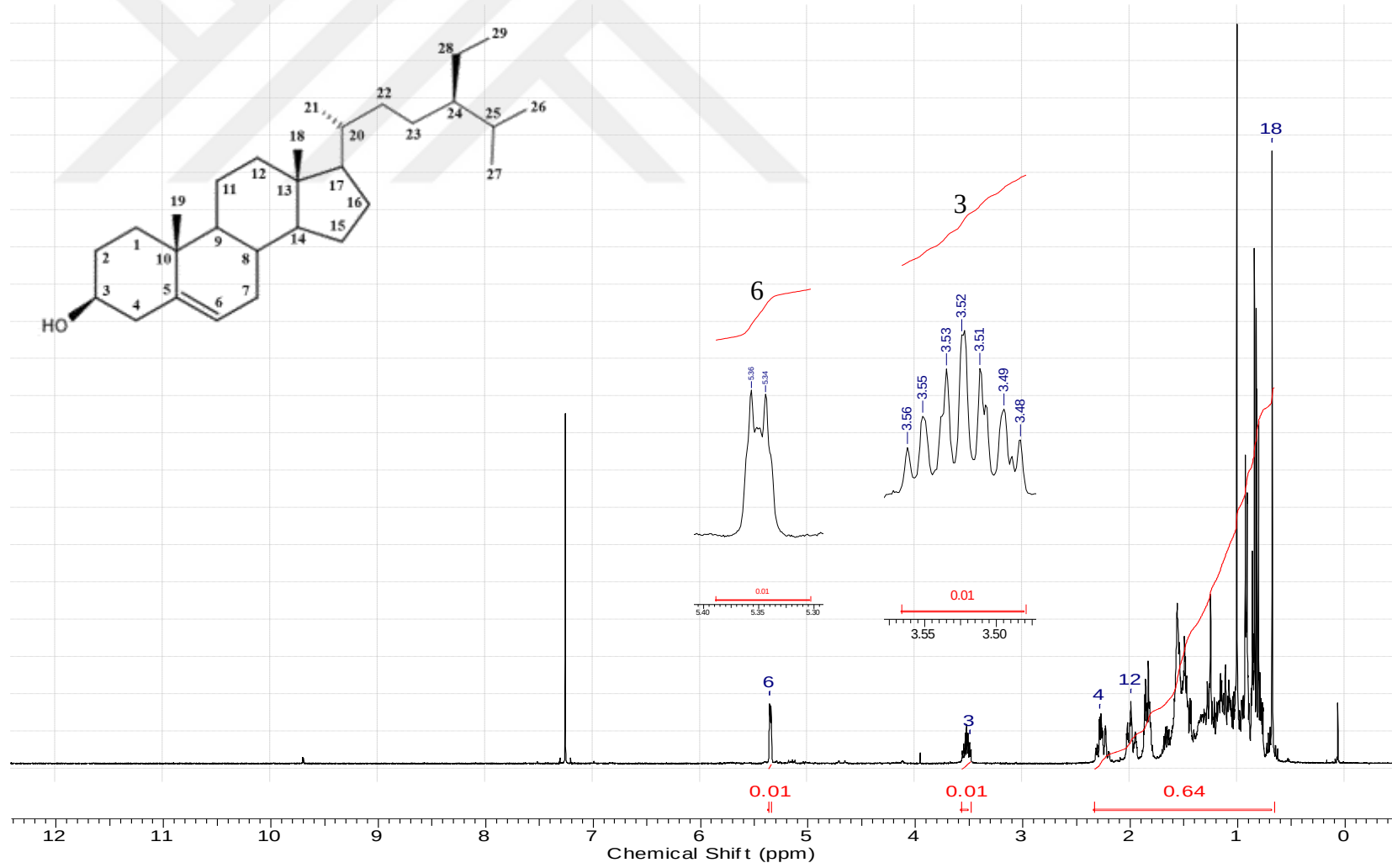
Bileşiğin ^1H -NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_{\text{H}} = 0.68\text{-}2.27$ ppm bölgesinde bulunan, birbirinden tam olarak ayrılmamış alifatik proton sinyalleri görünmektedir. $\delta_{\text{H}} = 3.52$ ppm'de oksijen atomuna komşu protonlara ait multipler sinyaller ve $\delta_{\text{H}} = 5.35$ ppm'de olefinik protonlara ait dublet sinyaller bulunmaktadır. Bu veriler molekülün alifatik yapıya olduğunu, yapısında çift bağ ve hidroksil grubunun yer aldığını işaret etmiştir.

Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumuna bakıldığında, 29 karbon sinyalinin olması yapısının stigmadan steroid olduğunu düşündürmüştür. $\delta_{\text{C}} = 140.8$ (C-5) ve $\delta_{\text{C}} = 121.7$ (C-6) ppm'de yer alan sinyaller yapıda çift bağ bulunduğunu doğrulamıştır. $\delta_{\text{C}} = 71.8$ (C-3) ppm'de yer alan sinyal oksijen atomunun yapıda yer aldığını göstermektedir. $\delta_{\text{C}} = 11.9$ (C-29), 11.9 (C-18), 18.8 (C-21), 19.0 (C-19), 19.4 (C-26) ve 19.8 (C-27) ppm'de yer alan sinyaller yapıdaki 6 metil grubunu işaret etmektedir.

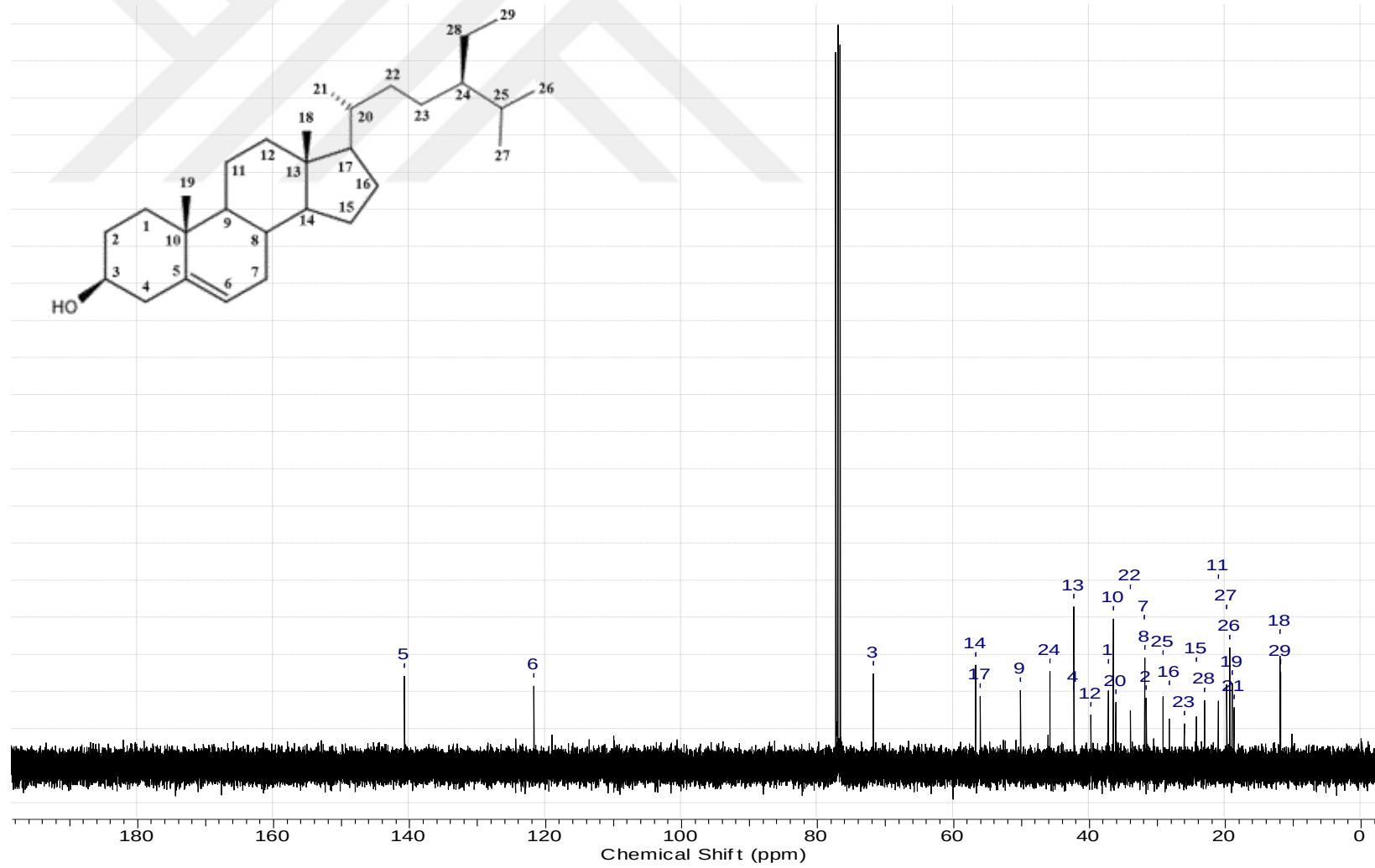
^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumlarından elde edilen değerler literatürlerle desteklenerek molekülün yapısı β -Sitosterol (Bİ-1) olarak belirlenmiştir (296-298).



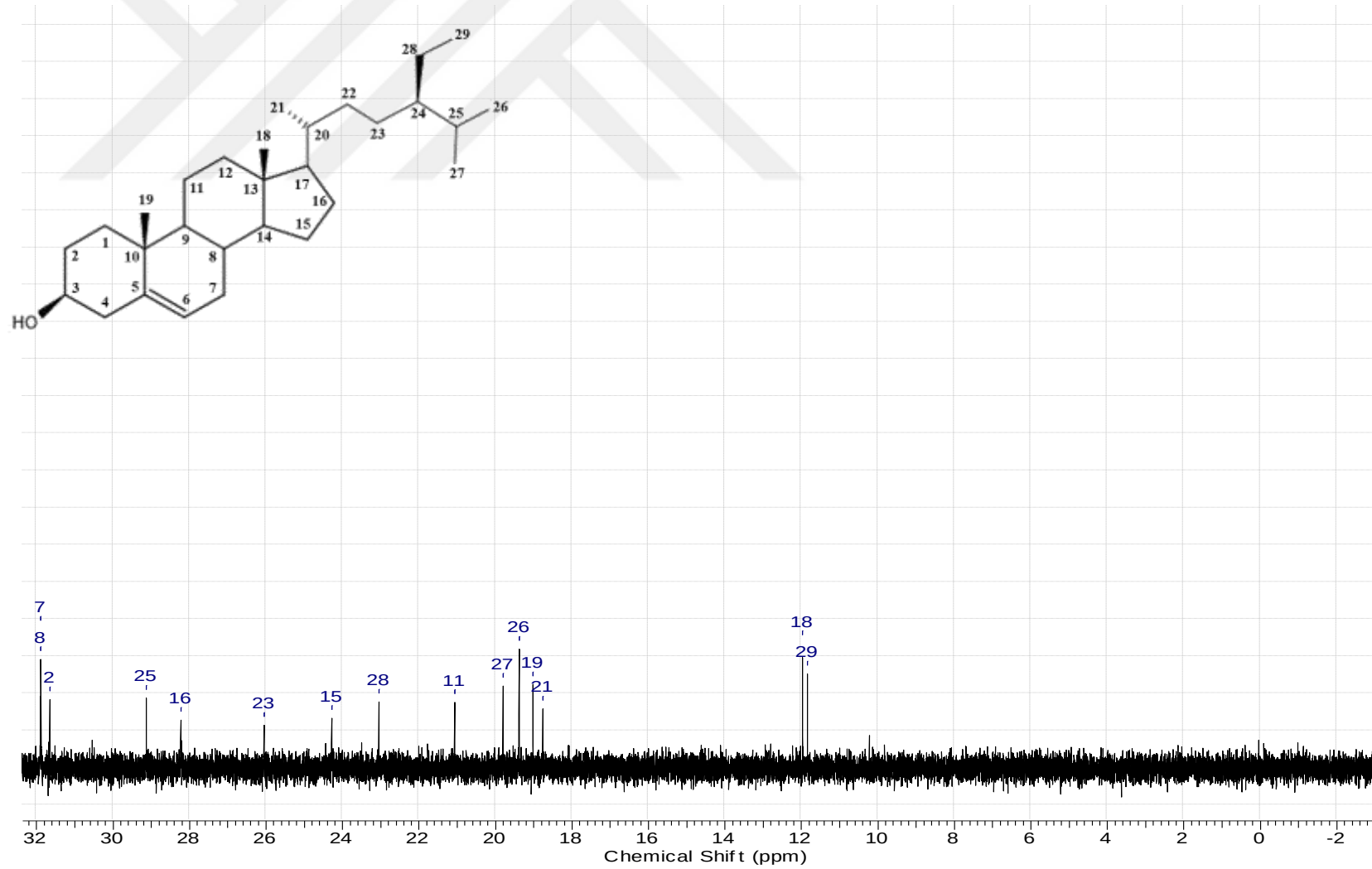
Şekil 64. β -Sitosterol (BI-1) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu-I



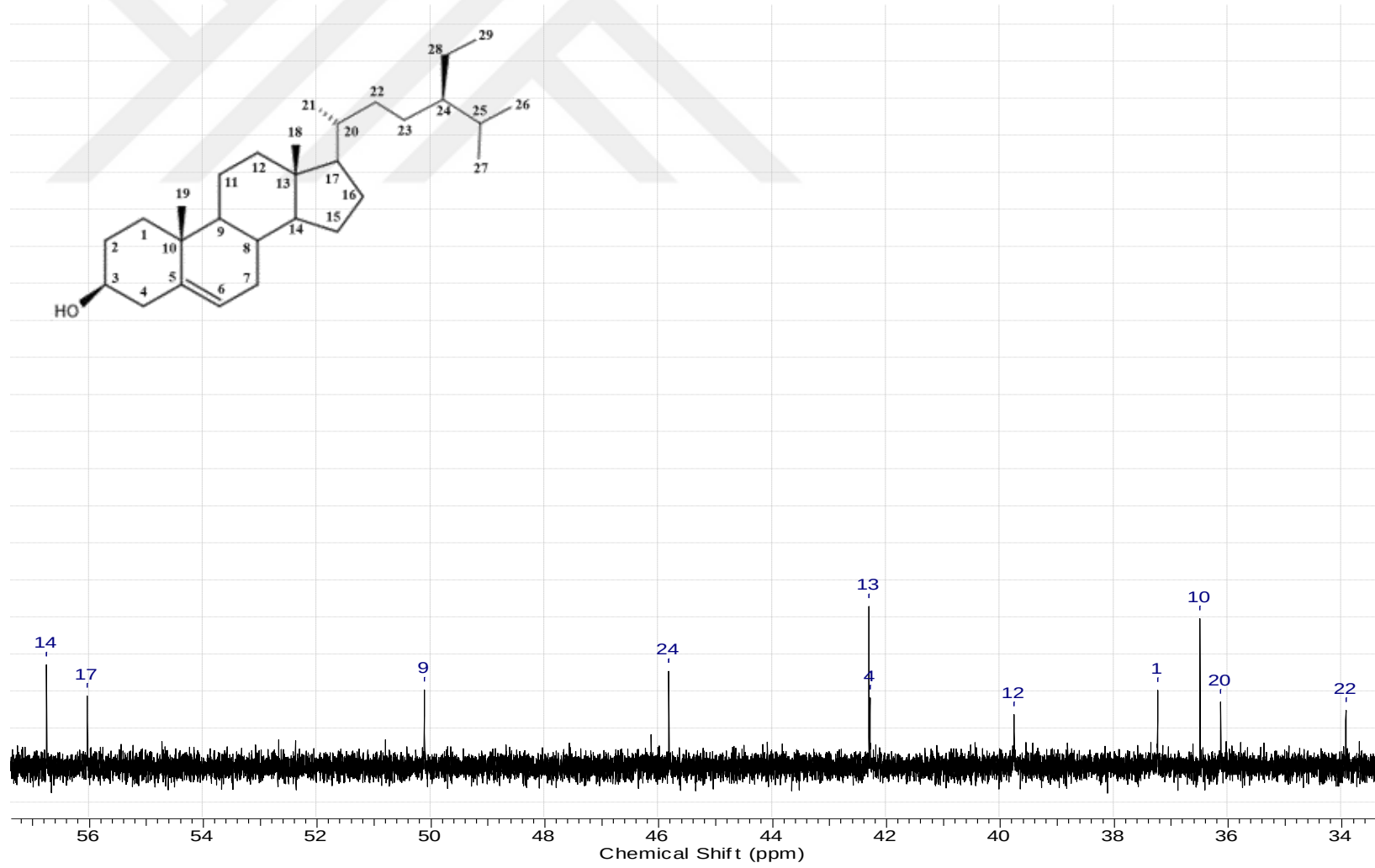
Şekil 65. β -Sitosterol (Bİ-1) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) Spektrumu-II



Şekil 66. β -Sitosterol (Bİ-1) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu-I

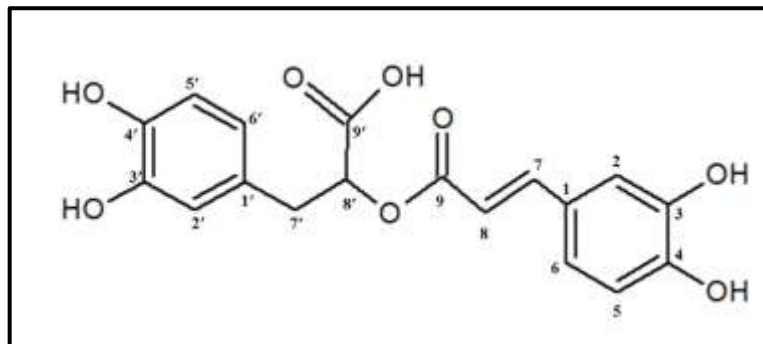


Şekil 67. β -Sitosterol (BI-1) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu-II



Şekil 68. β -Sitosterol (Bİ-1) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) Spektrumu-III

6.7.2. Rozmarinik Asit



C₁₈H₁₆O₈ (Molekül Ağırlığı: 360)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) Spektrumu: Şekil 69, 70; Tablo 30

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) Spektrumu: Şekil 71-73; Tablo 31

Tablo 30. Rozmarinik asit (Bİ-2) bileşiğinin ¹H-NMR spektral değerleri

H	δ _H (ppm)
H-2	7.05 (1H, d, <i>J</i> = 2.4 Hz)
H-5	6.78 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz)
H-6	6.94 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4 Hz, <i>J</i> = 2.0 Hz)
H-7	7.54 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)
H-8	6.26 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz)
H-2'	6.76 (1H, d, <i>J</i> = 2 Hz)
H-5'	6.70 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz)
H-6'	6.61 (1H, dd, <i>J</i> = 8 Hz, <i>J</i> = 2 Hz)
H-7'a	3.00 (1H, dd, <i>J</i> = 14.4 Hz, <i>J</i> = 4.4 Hz)
H-7'b	2.94 (1H, dd, <i>J</i> = 14.2 Hz, <i>J</i> = 8.4 Hz)
H-8'	5.18 (1H, dd, <i>J</i> = 8.6, <i>J</i> = 4.2 Hz)

Tablo 31. Rozmarinik asit (Bİ-2) bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektral Değerleri

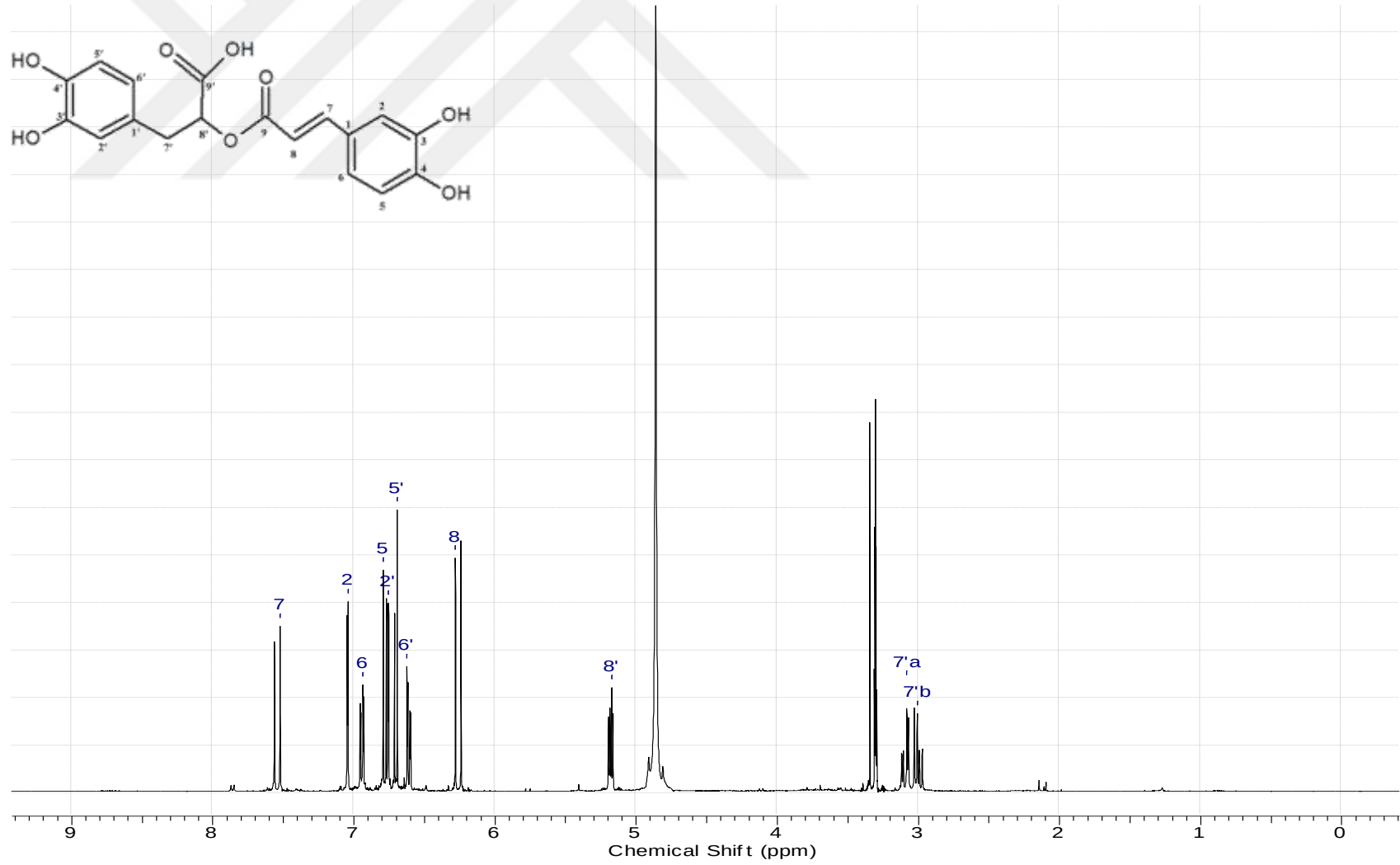
C/H	δ_{C} (ppm)
1	126.3
2	113.8
3	148.3
4	146.3
5	115.1
6	121.8
7	145.3
8	113.0
9	167.1
1'	127.9
2'	116.2
3'	144.7
4'	143.8
5'	114.9
6'	120.4
7'	36.5
8'	73.3
9'	172.3

Bİ-2 bileşiği, İTK'da vanilin/ H_2SO_4 reaktifi püskürtmeden önce UV_{254} nm'de sönük lekeler şeklinde, UV_{365} nm'de mavi renkli; reaktif püskürttükten sonra ısıtıldığında ise koyu pembe renkli leke olarak görünmektedir.

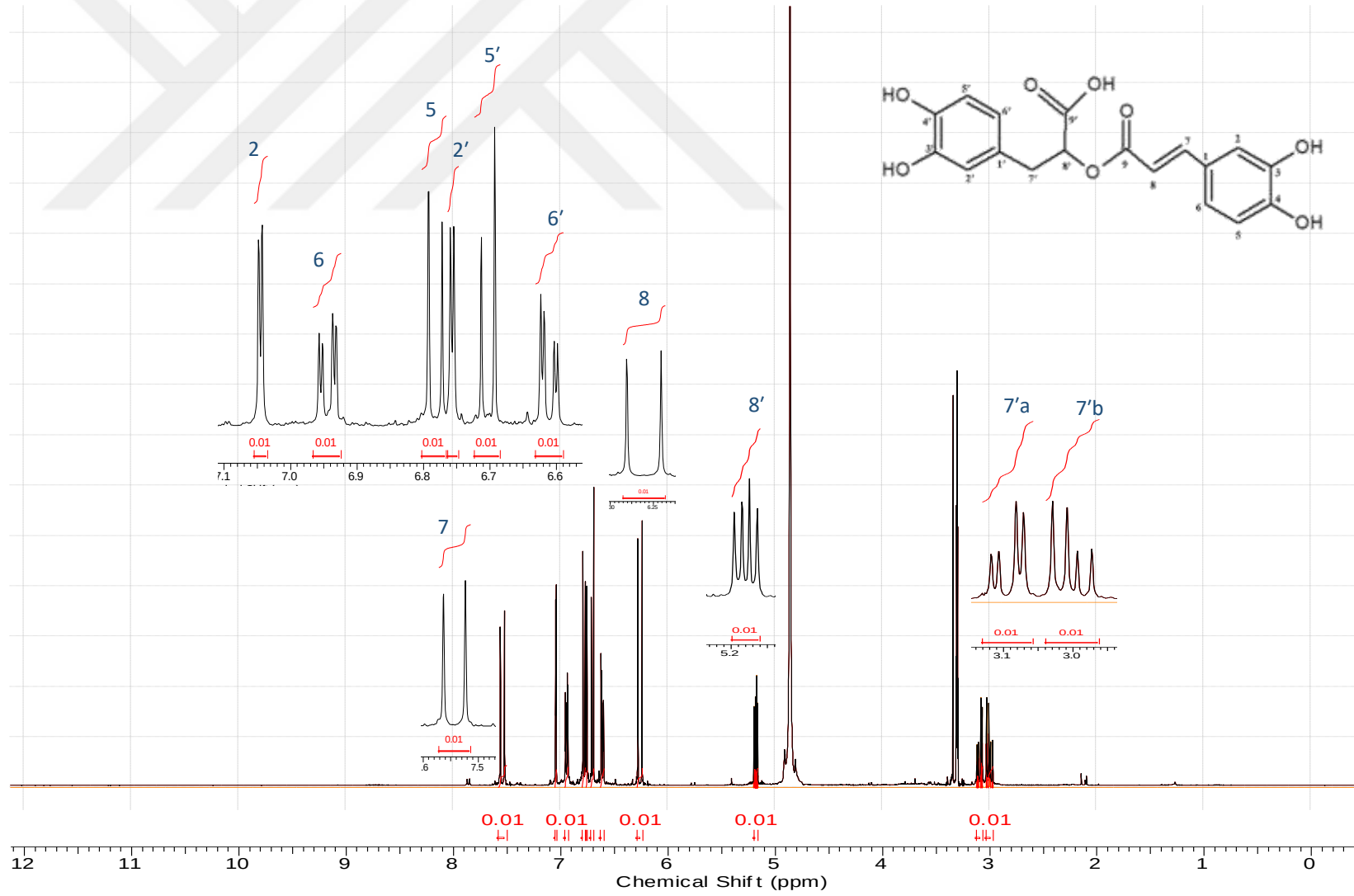
Bileşiğin ^1H -NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_{\text{H}} = 7.54$ (1H, d, $J = 15.6$ Hz) ve $\delta_{\text{H}} = 6.23$ (1H, d, $J = 16$ Hz) ppm'deki kimyasal kayma değerleri molekülde trans konumda yer alan olefinik protonların bulunduğunu işaret etmiştir. $\delta_{\text{H}} = 7.05$ (1H, d, $J = 2.4$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 6.94$ (1H, dd, $J = 8.4$, $J = 2.0$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 6.78$ (1H, d, $J = 7.6$ Hz) ve 6.76 (1H, d, $J = 2$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 6.70$ (1H, d, $J = 7.6$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 6.61$ (1H, dd, $J = 8$ Hz, $J = 2$ Hz) ppm'de iki grup aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-2, 6, 5 ve H-2', 5', 6' numaralı protonlar) gözlenmiştir. $\delta_{\text{H}} = 5.18$ (1H, dd, $J = 8.6$, $J = 4.2$ Hz) ppm'de bulunan sinyal, komşusunda oksijen atomunun olduğu H-8' protonunu ve $\delta_{\text{H}} = 3.00$ (1H, AB sisteminin A kısmı, dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 4.4$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 2.94$ (1H, AB sisteminin B kısmı, dd, $J = 14.2$

Hz, $J = 8.4$ Hz) ppm'de bulunan sinyallerin C-7' konumunda yer alan metilen yapısının protonlarını işaret ettiği literatürlerle karşılaştırılarak belirlenmiştir (299, 300).

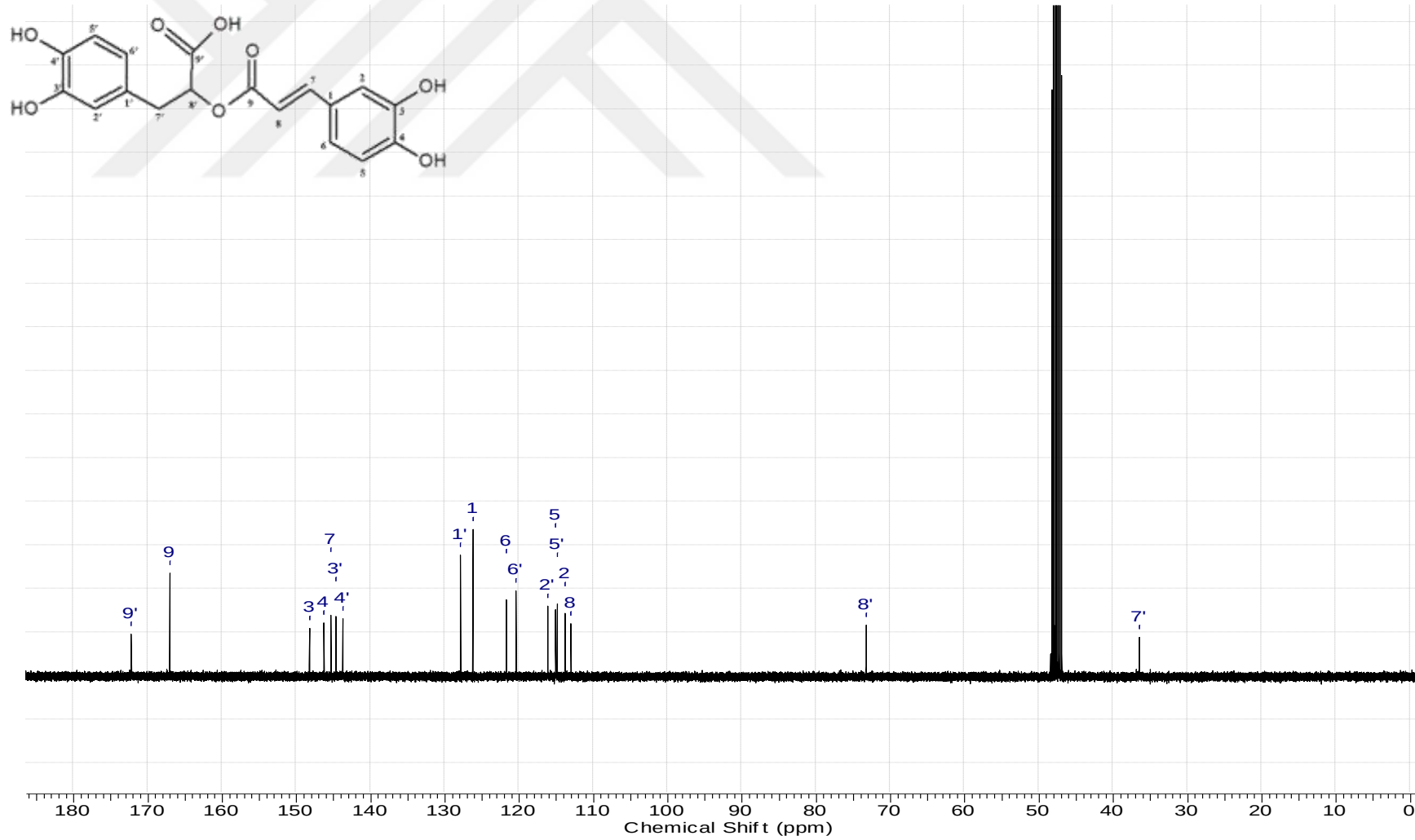
^{13}C -NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_{\text{C}} = 148.2$ (C-4), 145.6 (C-3), 144.7 (C-3') ve 143.6 (C-4') ppm'de yer alan sinyaller iki fenil halkasındaki OH grubu taşıyan dört tane C atomunun varlığı görünmektedir. $\delta_{\text{C}} = 176.5$ (C-9'), 167.9 (C-9) ppm'de iki karbonile ait karbonlar, $\delta_{\text{C}} = 145.5$ (C-7), 113.9 (C-8) ppm'de olefinik karbonlar, $\delta_{\text{C}} = 76.4$ (C-8') ppm'de ise ester yapısına komşu olan bir karbon gözlenmiştir. Spektrumdan elde edilen değerler literatürlerle desteklenerek molekülün yapısı rozmarinik asit (Bİ-2) olarak belirlenmiştir (299, 300).



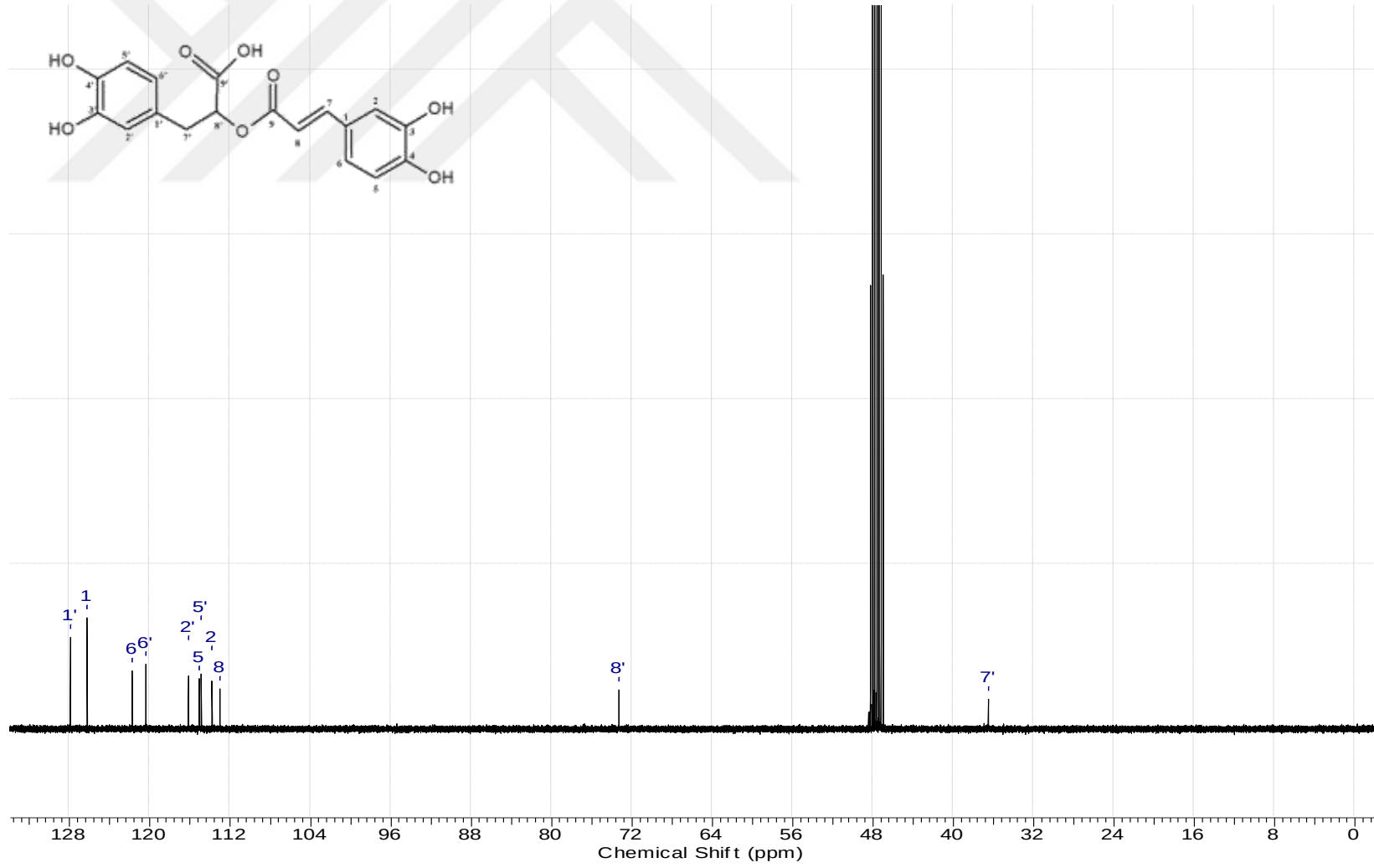
Şekil 69. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I



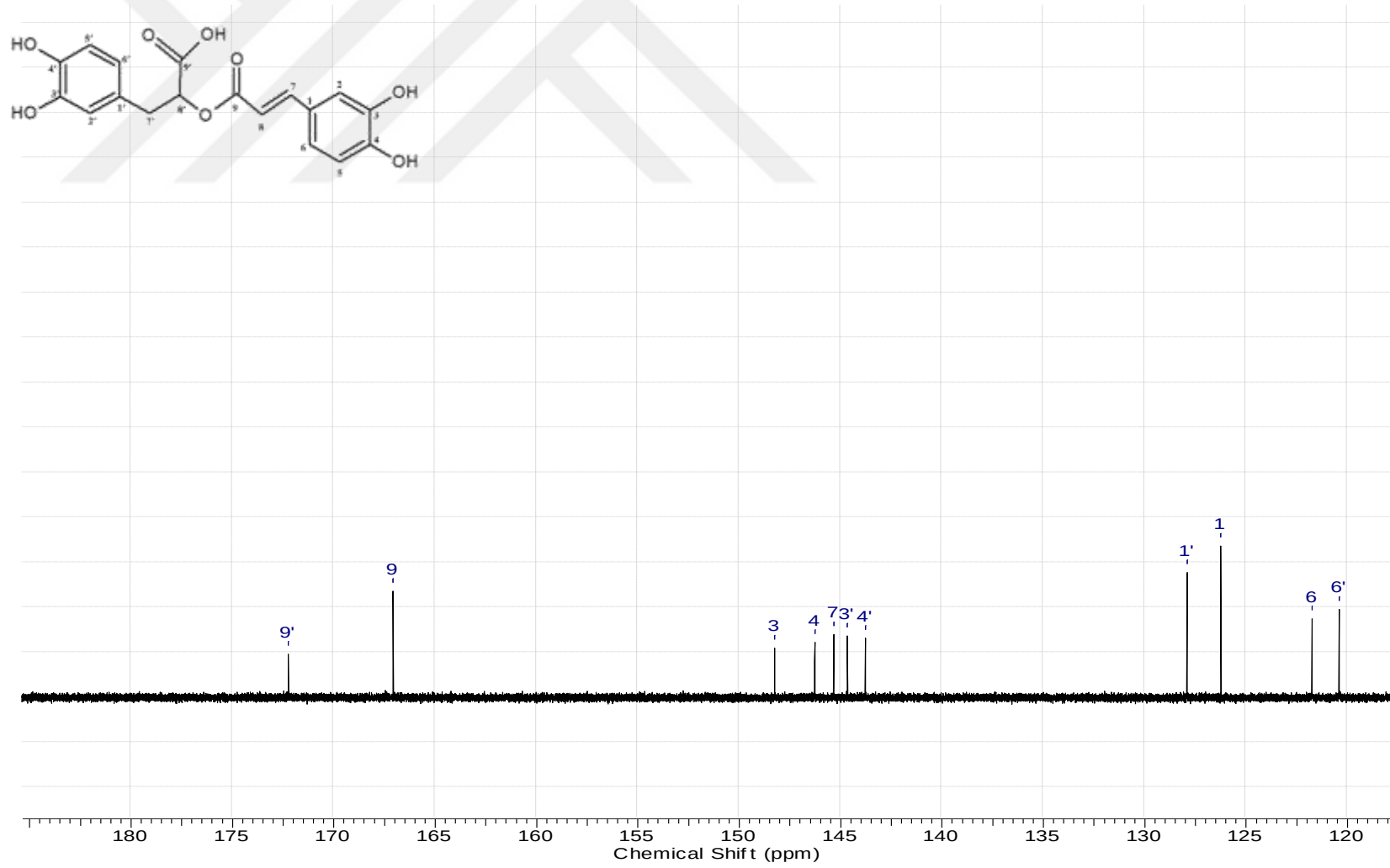
Şekil 70. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-II



Şekil 71. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^{13}C -NMR (CD₃OD, 100 MHz) spektrumu-I

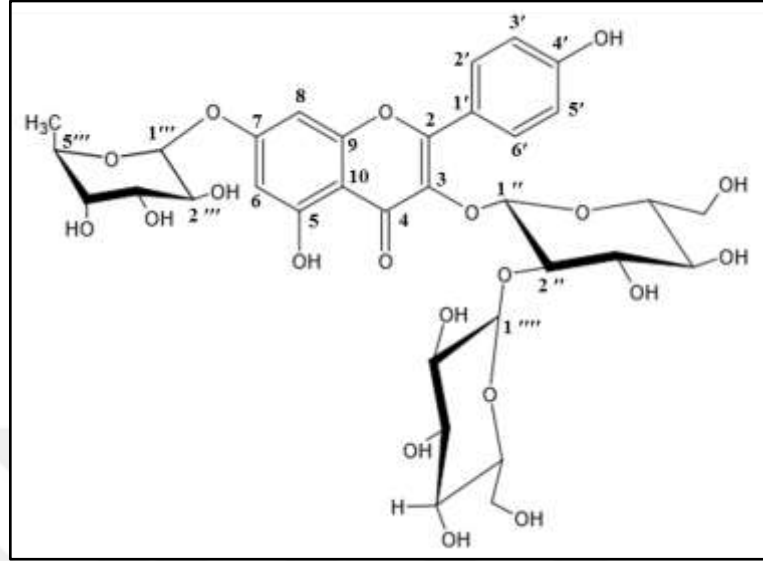


Şekil 72. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) spektrumu-II



Şekil 73. Rozmarinik asit (Bİ-2) ^{13}C -NMR (CD₃OD, 100 MHz) spektrumu-III

6.7.3. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozid-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit)



C₃₃H₃₉O₂₀ (Molekül Ağırlığı: 755)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) Spektrumu: Şekil 74, 75; Tablo 32

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) Spektrumu: Şekil 76; Tablo 33

2D-1H, ¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzun mesafe) Spektrumu (HMBC): Şekil 77-79

2D-1H, ¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (kısa mesafe) Spektrumu (HSQC): Şekil 80, 81

2D-1H, Homonükleer Korelasyonlu Spektrum (COSY) : Şekil 82

Tablo 32. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozid-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) bileşiğinin ¹H-NMR spektral değerleri

H	δ_H (ppm)
H-6	6.43 (1H, d, J = 2 Hz)
H-8	6.72 (1H, d, J = 1.2 Hz)
H-2'	8.05 (1H, dd, J = 1.8 Hz, J = 7 Hz)
H-3'	6.90 (1H, dd, J = 2 Hz, J = 7.2 Hz)
H-5'	6.90 (1H, dd, J = 2 Hz, J = 7.2 Hz)
H-6'	8.05 (1H, dd, J = 1.8 Hz, J = 7 Hz)
H-1''	5.48 (1H, d, J = 7.2 Hz)
H-1'''	5.56 (1H, d, J = 1.8 Hz)
H-6'''	1.24 (3H, d, J = 6.2 Hz)
H-1''''	4.77 (1H, d, J = 7.2 Hz)
H-2''	
H-3''	
H-4''	
H-5''	
H-6''	
H-2'''	
H-3'''	
H-4'''	3.19-4.03 (15H, m)
H-5'''	
H-2''''	
H-3''''	
H-4''''	
H-5''''	
H-2'''''	
H-6'''''	

Tablo 33. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozit-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri

C/H	δ_{C} (ppm)
2	159.37
3	135.14
4	179.78
5	162,81
6	100.53
7	163.41
8	95.51
9	157.97
10	107.43
1'	122.60
2'	132.42
3'	116.28
4'	161.66
5'	116.28
6'	132.42
1''	100.82
2''	82.64
3''	77.87
4''	71.11
5''	75.56
6''	62.44
1'''	99.75
2'''	71.24
3'''	71.65
4'''	72.05
5'''	71.11
6'''	18.07
1''''	104.76
2''''	73.57
3''''	78.17
4''''	71.65
5''''	78.29
6''''	62.56

Sarı renkli olan Bİ-3 bileşiği, İTK'da vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtmeden önce UV lamba altında koyu lekeler olarak görülürken; reaktif püskürttükten sonra ısıtıldığında sarı renkli lekeler olarak görünmüştür.

Bileşiğin ¹H-NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_H = 6.43$ (1H, d, $J = 2$ Hz) ve $\delta_H = 6.72$ (1H, d, $J = 1.2$ Hz) ppm'de bulunan sinyaller görülmektedir. Bu sinyallerin flavonoitin yapısında yer alan A halkasının C-6 ve C-8 protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir. Flavonoitin yapısında yer alan B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına ait sinyaller $\delta_H = 8.05$ (1H, dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 7$ Hz) ppm'de gözlenirken; C-3' ve C-5' protonlarına ait sinyaller $\delta_H = 6.90$ (1H, dd, $J = 2$ Hz, $J = 7.2$ Hz) ppm'de gözlenmiştir. Spektrumda C-3 protonuna ait herhangi bir sinyalin bulunmaması, flavonoitin flavanol yapısında olduğunu göstermiştir.

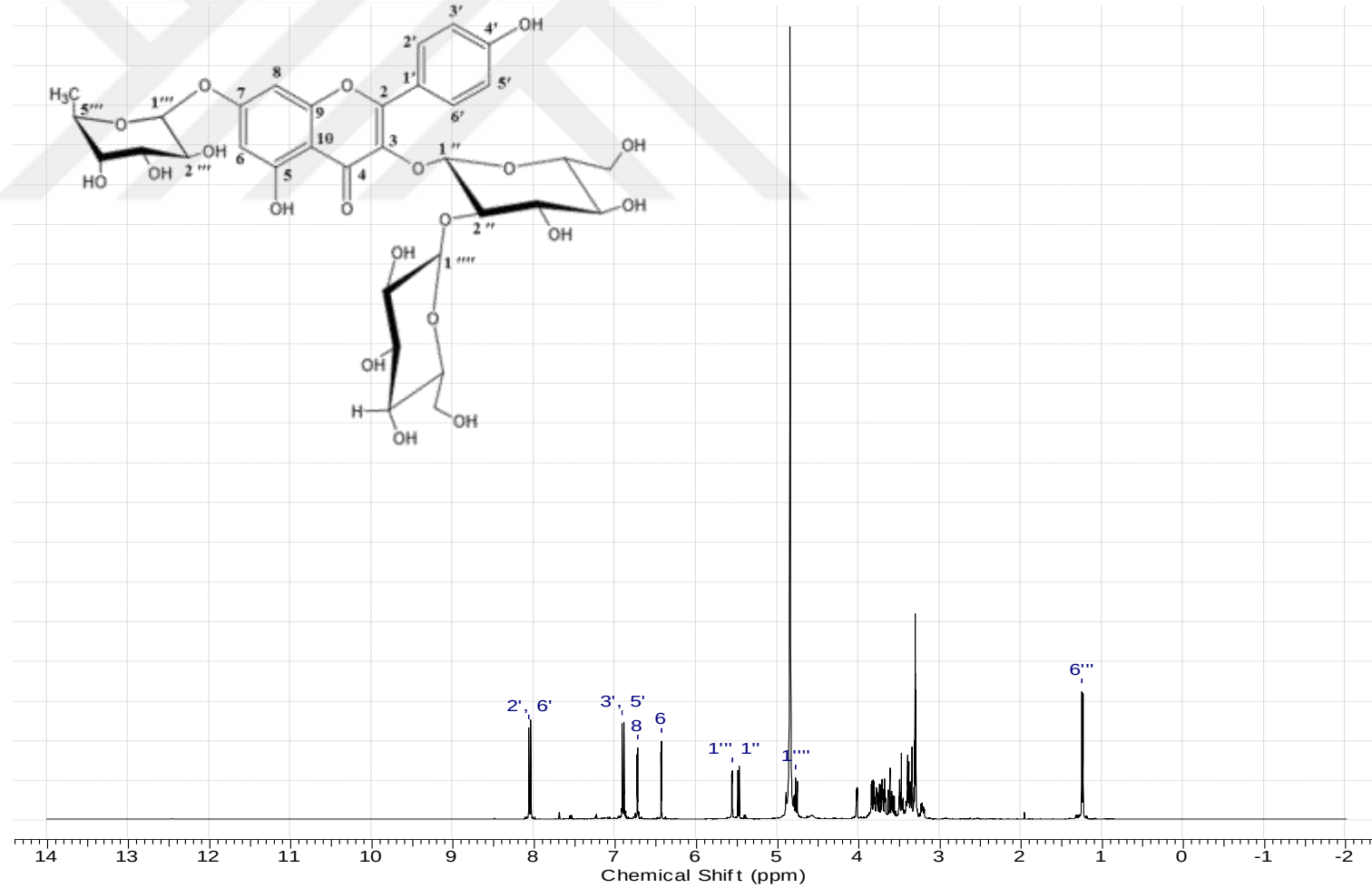
¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde, bileşiğin yapısında 3 tane şekerin bulunduğu tespit edilmiştir. ¹H-NMR spektrumunda $\delta_H = 5.56$ (1H, d, $J = 1.8$ Hz), $\delta_H = 5.48$ (1H, d, $J = 7.2$ Hz) ve $\delta_H = 4.77$ (1H, d, $J = 7.2$ Hz) ppm'de gözlenen sinyallerin, şekerlerin anomerik protonlarına ait olduğu saptanmıştır. Anomerik protonların etkileşme sabitlerine bakıldığında, $J = 1.8$ Hz değeri bir uzun α konfigürasyonuna sahip olduğunu; $J = 7.2$ Hz değeri ise iki uzun β konfigürasyonuna sahip olduğunu işaret etmiştir. Spektrumda $\delta_H = 1.24$ (3H, d, $J = 6.2$ Hz) ppm'de gözlenen sinyalin bir metil grubuna ait olduğu saptanmıştır. $\delta_H = 3.19-4.03$ (15H, m) ppm'de gözlenen sinyallerin şekerlere ait protonlar olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler literatürlerle karşılaştırılarak, bileşiğin yapısında bulunan ozlardan birinin ramnoz; diğer ikisinin glukoz olduğu saptanmıştır (301).

Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_C = 100.53$ ve $\delta_C = 95.51$ ppm'de gözlenen sinyallerin sırasıyla C-6 ve C-8'e ait olduğu gözlenirken; C-5 ve C-7'ye ait sinyallerin, sübstituentlerinden dolayı daha yüksek alanda, $\delta_C = 162.81$ ve $\delta_C = 163.41$ ppm'de olduğu gözlenmiştir. $\delta_C = 132.42$ ppm'de C-2' ve C-6' sinyallerinin ve $\delta_C = 116.28$ ppm'de C-3' ve C-5' sinyallerinin bulunması, serbest hidroksil grubunun C-4' konumunda olduğunu işaret etmiştir. C-4' konumuna ait sinyalin $\delta_C = 161.66$ ppm'de olduğu gözlenmiştir. Şekerlerin anomerik karbonlarına (C-1", C-1''' ve C-1''') ait sinyaller sırasıyla $\delta_C = 100.82$, $\delta_C = 99.75$ ve $\delta_C = 104.76$ ppm'de gözlenmiştir. $\delta_C = 18.07$ ppm'de gözlenen sinyalin ramnozun 6''' konumuna ait olduğu saptanmıştır. Elde edilen

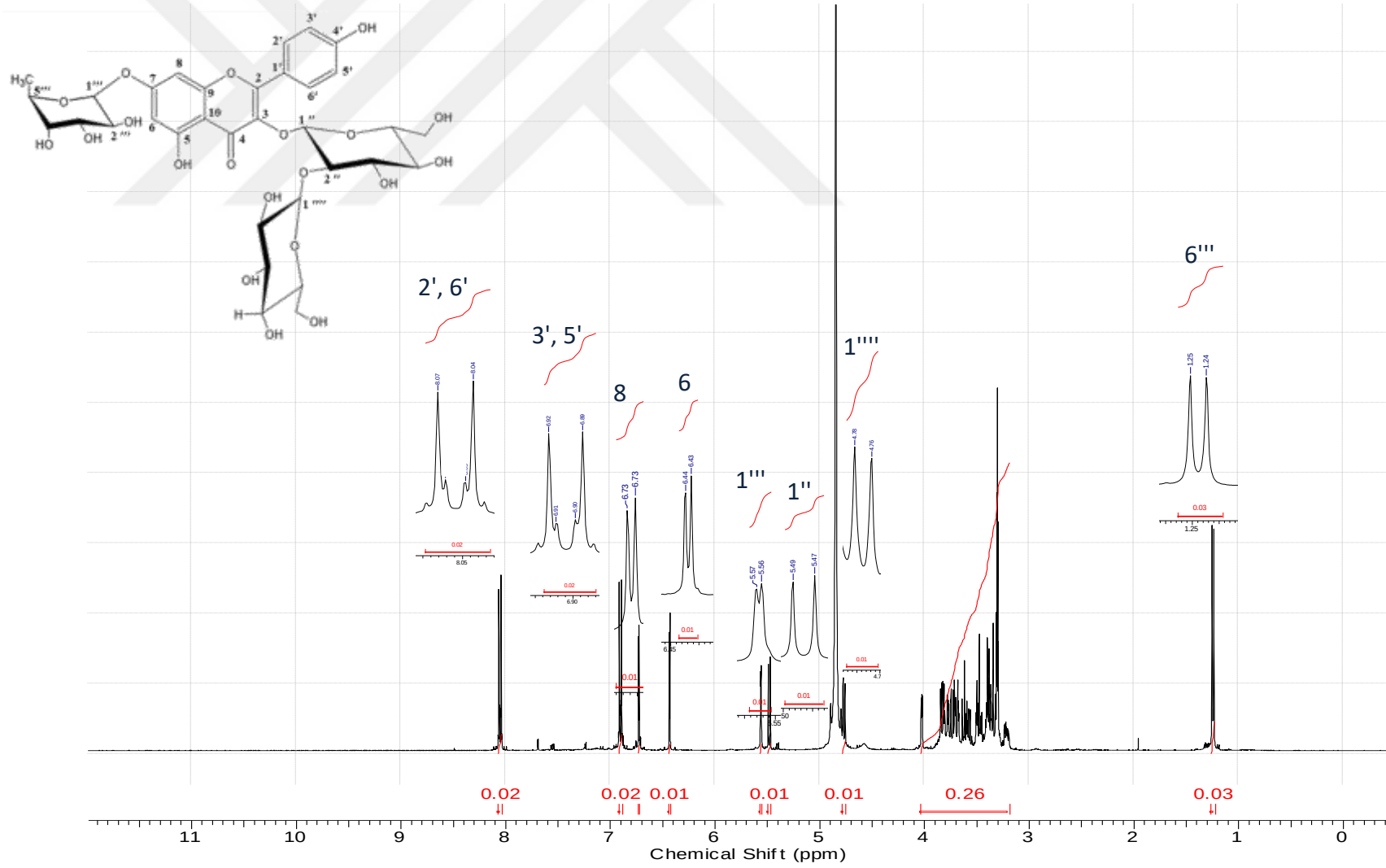
spektrum değerleri literatürlerle karşılaştırıldığında, $\delta_C = 82.64$, $\delta_C = 77.87$, $\delta_C = 71.11$, $\delta_C = 75.56$, $\delta_C = 62.44$, $\delta_C = 71.24$, $\delta_C = 71.65$, $\delta_C = 72.05$, $\delta_C = 71.11$, $\delta_C = 73.57$, $\delta_C = 78.17$, $\delta_C = 71.65$, $\delta_C = 78.29$ ve $\delta_C = 62.56$ ppm'de sırasıyla C-2", C-3", C-4" ve C-5", C-6", C-2"', C-3"', C-4"', C-5"', C-2''', C-3''', C-4''', C-5''' ve C-6''' karbonunlarına ait sinyaller olduğu saptanmıştır (301).

Bileşiğin HMBC spektrumlarına bakıldığında, ramnozun anomerik karbonuna (1'') ait protonunun flavonolün C-7 konumu ile, glukozlardan birinin 1" protonunun ise flavonolün C-3 konumu ile eşleştiği gözlenmektedir. Bu durum, ramnozun aglikona 7. konumdan; glukozlardan birinin aglikona 3. konumdan bağlandığını göstermiştir. Diğer glukoz molekülünün 1''' protonunun glukozun 2" karbonu ile etkileşmesi, iki glukozun birbirine 1→2 şeklinde bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca ramnozun 6''' protonlarının sadece 4''' ile etkileşimi de ramnoza bağlı bir ozun bulunmadığını onaylamaktadır. HMBC spektrumlarından elde edilen diğer uzak bağ mesafeli karbon ve proton etkileşimlerine ait veriler bileşiğin kemferol 7-O- α -L-ramnozit-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) olduğunu doğrulamaktadır.

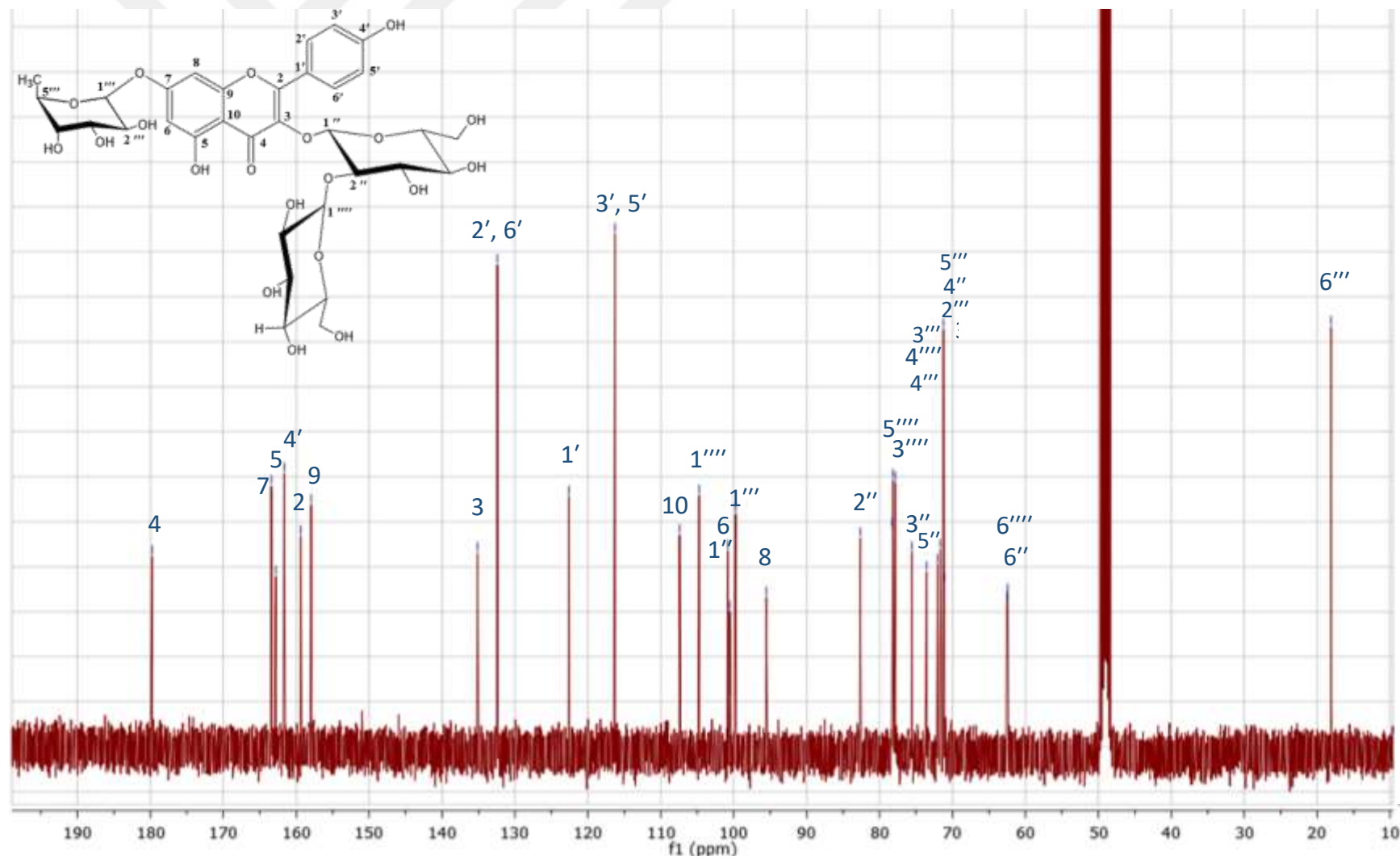
Bileşiğin HSQC ve COSY spektrumlarına bakıldığında, yapısında yer alan karbon ve protonlara ait değerlerin doğru olduğu belirlenmiştir.



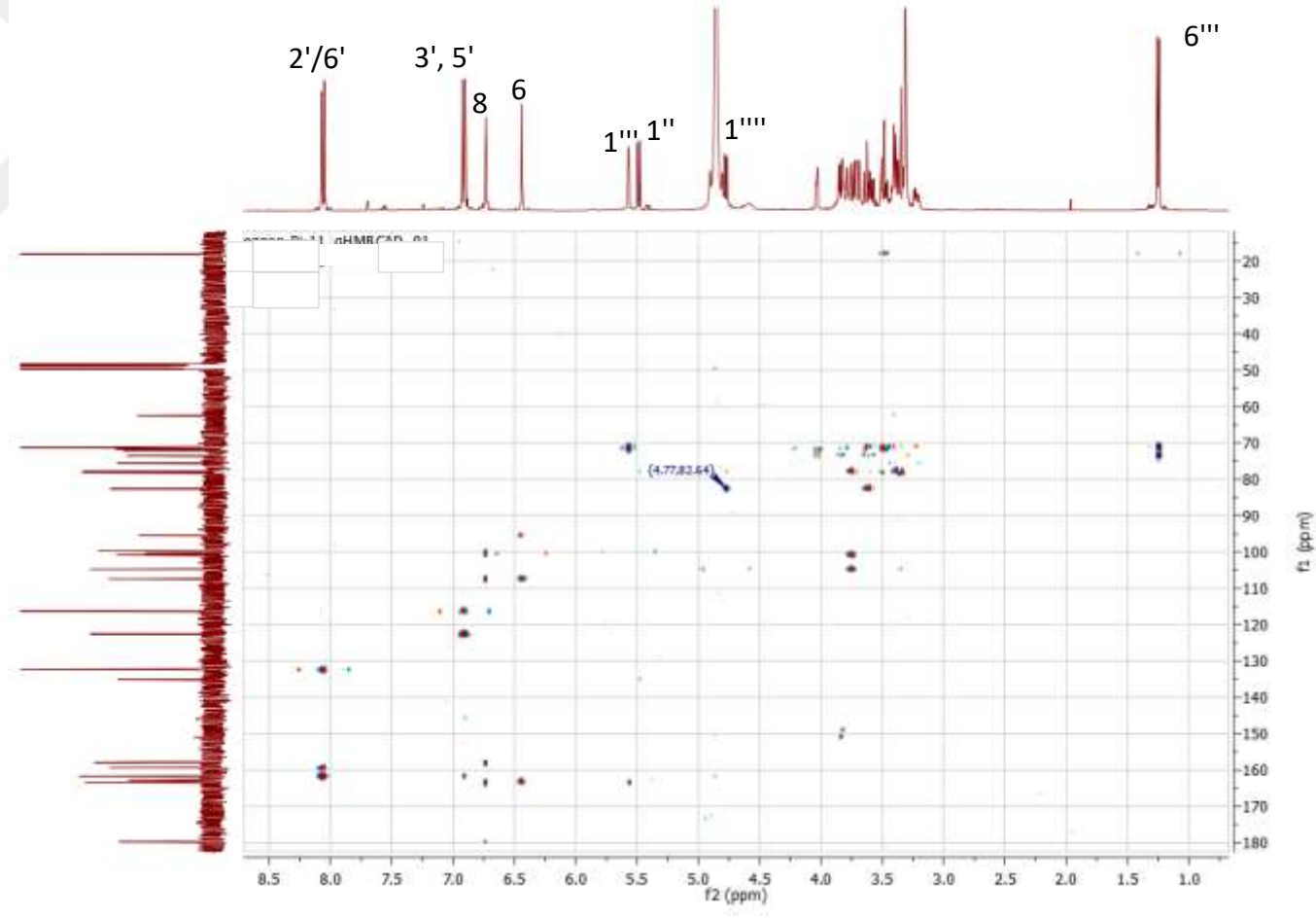
Şekil 74. Kemferol 7-O- α -L-ramnozitol-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I



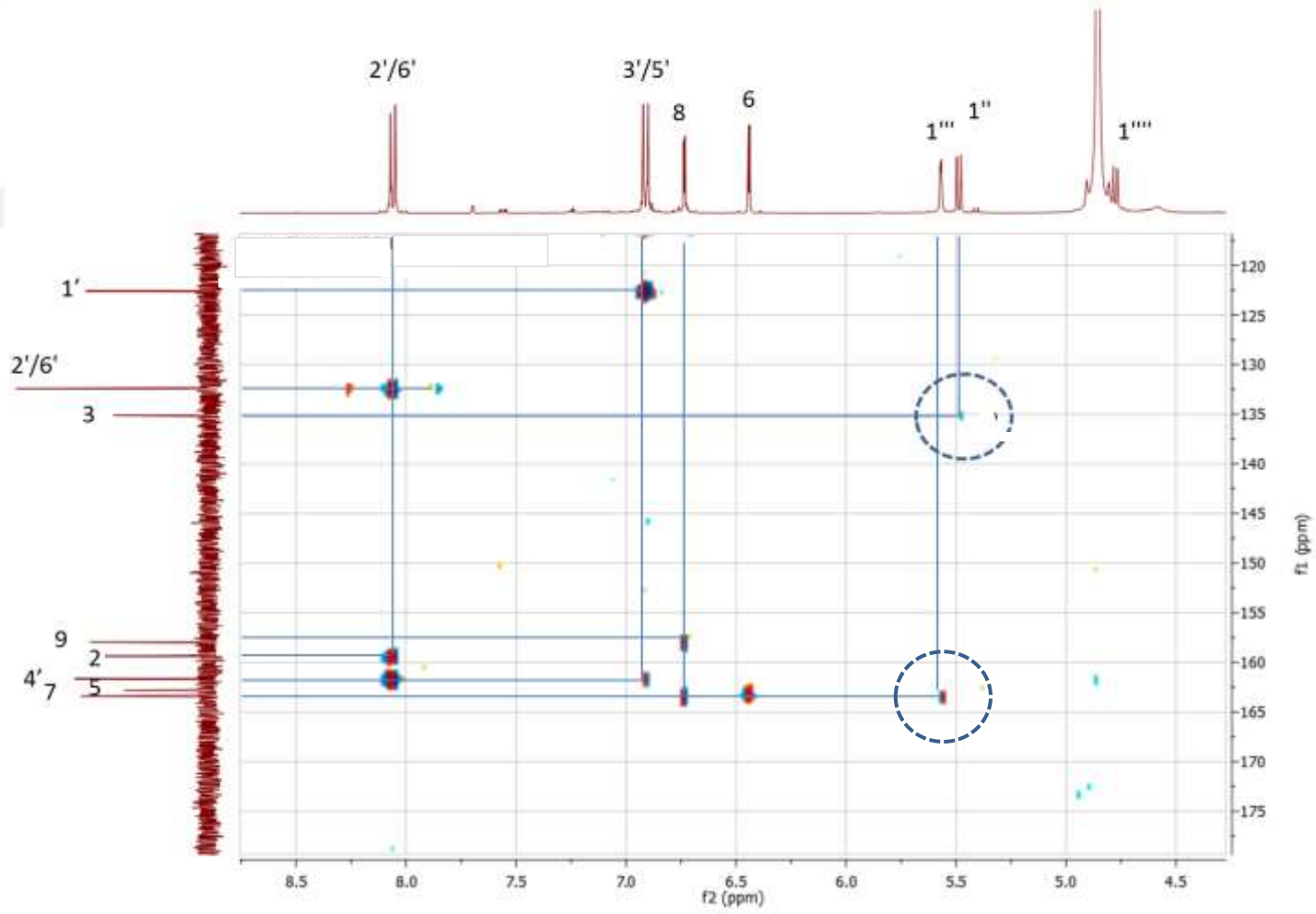
Şekil 75. Kemferol 7-O-α-L-ramnozitol-3-O-β-D-((2-O-β-D-glukozil)-β-D-glukozit) (Bİ-3) ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) spektrumu-II



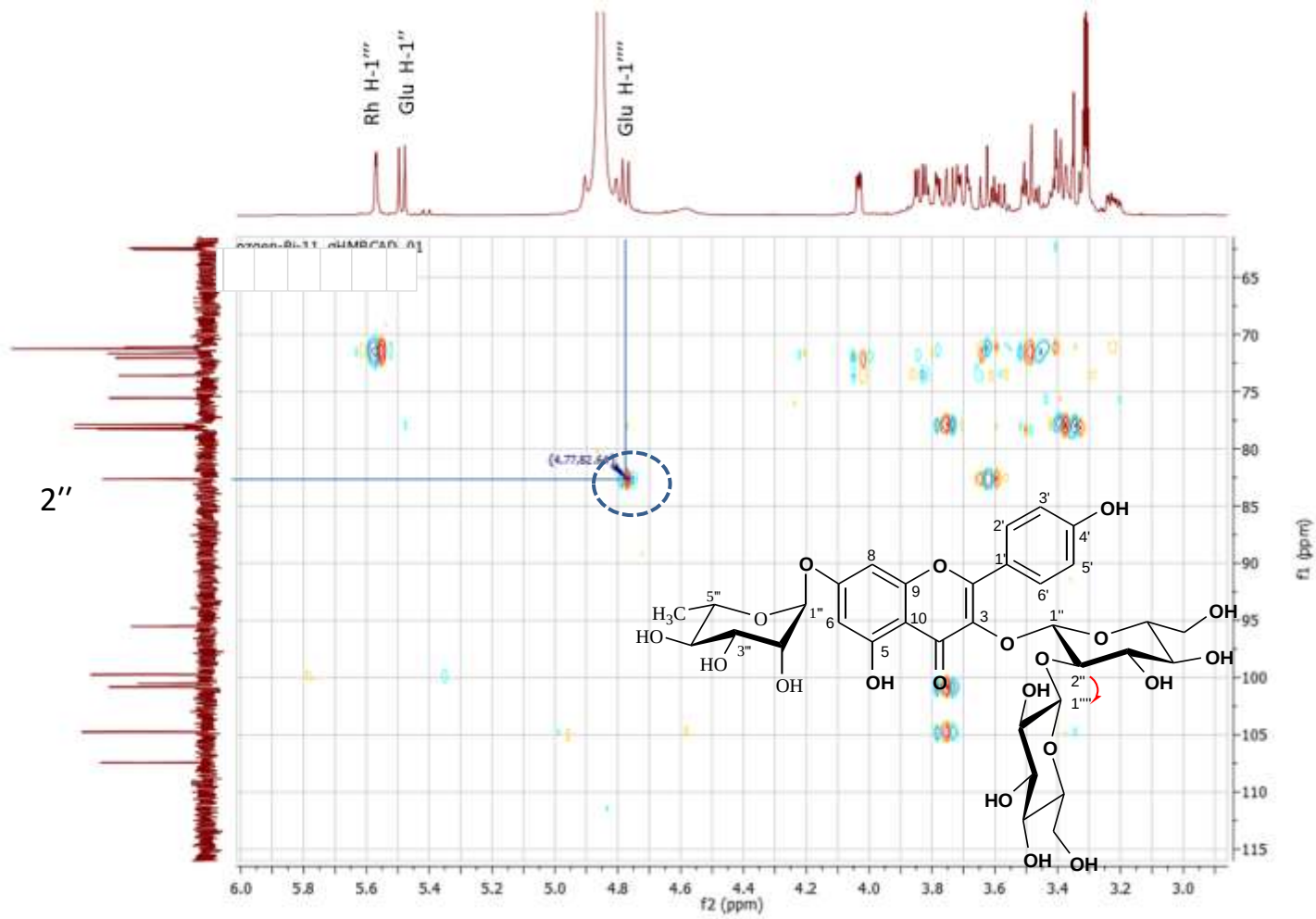
Şekil 76. Kemferol 7- O - α -L-ramnozit-3- O - β -D-((2- O - β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) ^{13}C -NMR (CD₃OD, 100 MHz) spektrumu



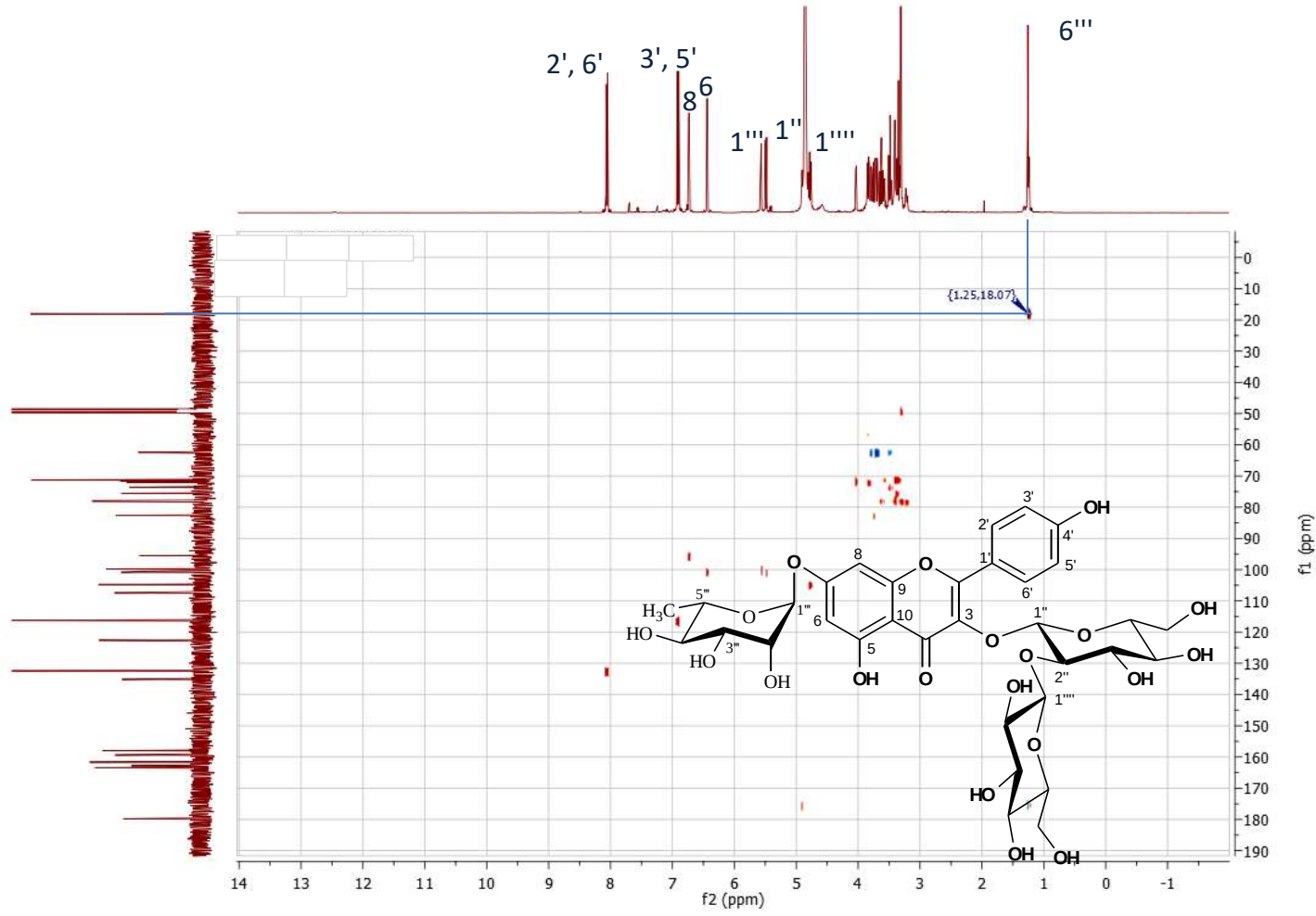
Şekil 77. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozitol-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-I



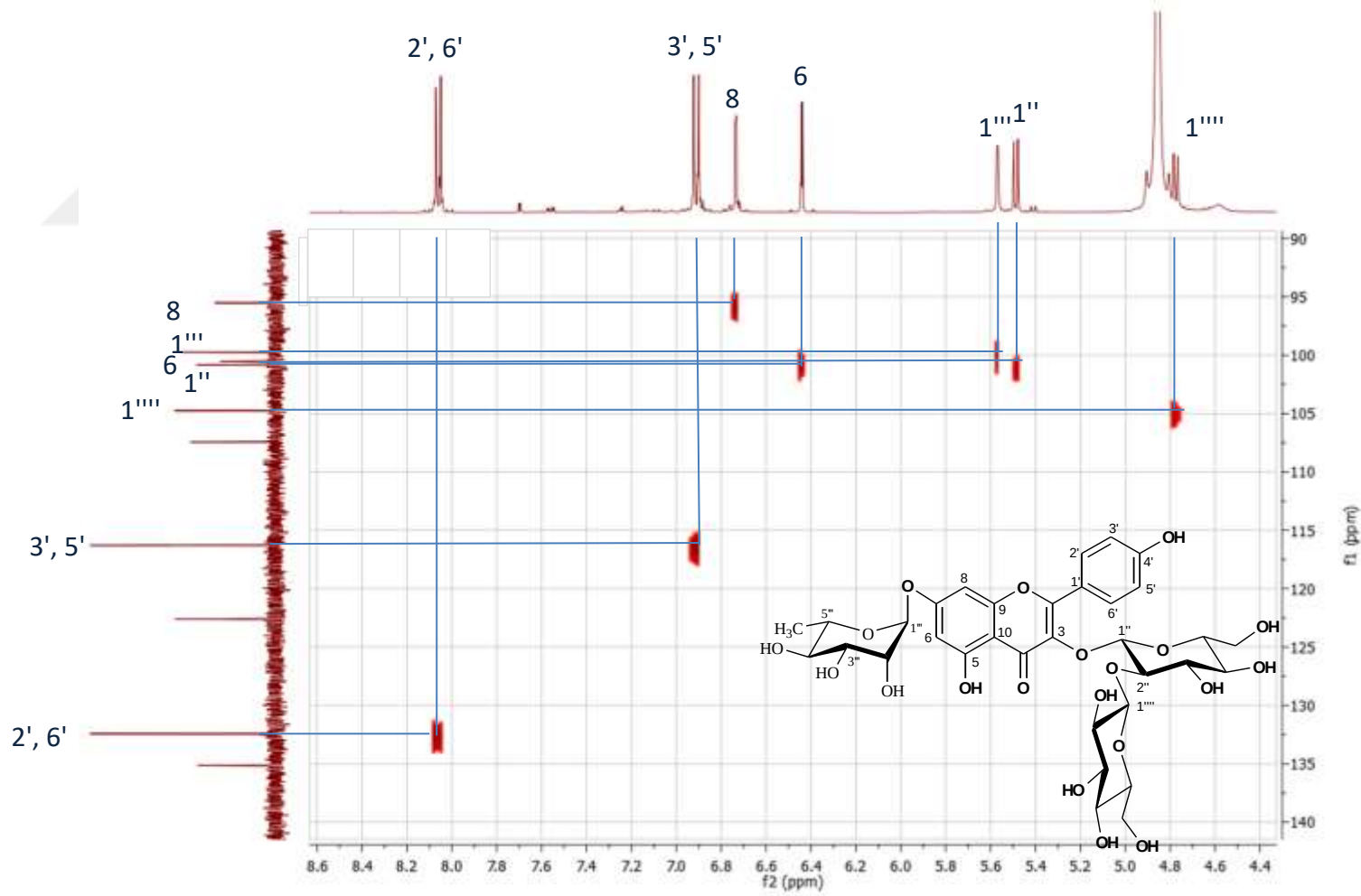
Şekil 78. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozit-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzun mesafe) Spektrumu (HMBC)-II



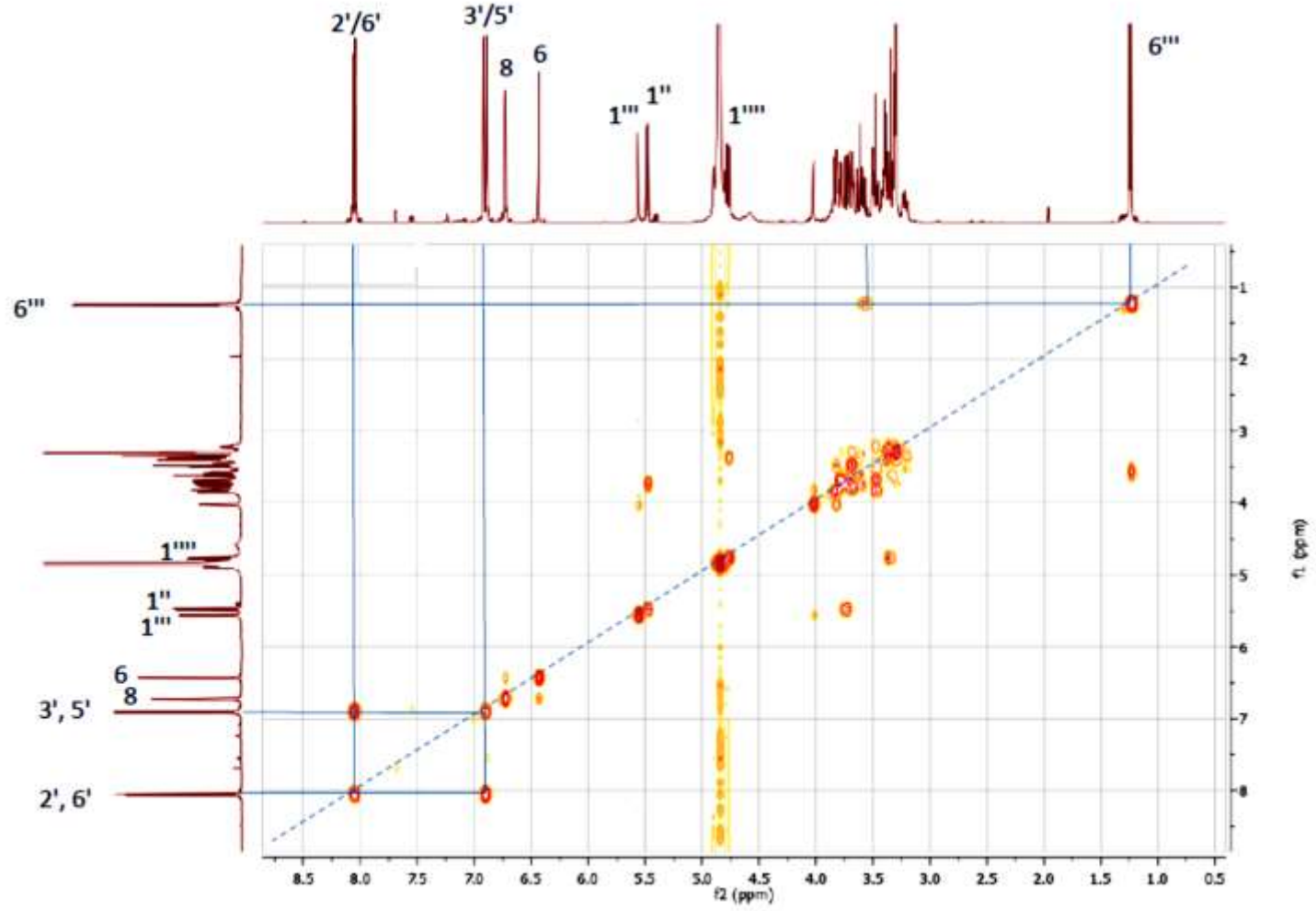
Şekil 79. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozit-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, 13 C-Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-III



Şekil 80. Kemferol 7-O- α -L-ramnozit-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, 13C-Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-I

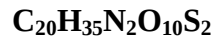
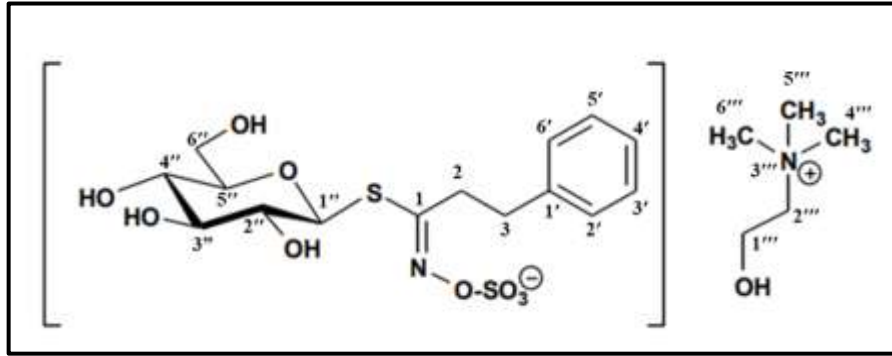


Şekil 81. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozit-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, ¹³C-Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-II



Şekil 82. Kemferol 7-*O*- α -L-ramnozit-3-*O*- β -D-((2-*O*- β -D-glukozil)- β -D-glukozit) (Bİ-3) 2D-1H, homonükleer korelasyonlu spektrum (COSY)

6.7.4. Glukonasturtin Kolin Tuzu



Molekül Ağırlığı: 526

^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) Spektrumu: Şekil 83, 84; Tablo 34

^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) Spektrumu: Şekil 85; Tablo 35

2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzun mesafe) Spektrumu (HMBC):
Şekil 86, 87

2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (kısa mesafe) Spektrumu (HSQC): Şekil
88, 89

2D- ^1H , Homonükleer Korelasyonlu Spektrum (COSY) : Şekil 90

Kütle Spektrumu: Şekil 91

Tablo 34. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) bileşiğinin ¹H-NMR spektral değerleri

H	δ _H (ppm)
H-2 H-3	δ _H = 2.94-3.06 (4H, m)
H-2' H-3' H-5' H-6'	δ _H = 7.29 (4H, m)
H-4' H-1'' H-6''a H-6''b H-1''' H-2'''	δ _H = 7.17 (1H, m) δ _H = 4.86 (1H, d, J= 8 Hz) δ _H = 3.81 (1H, dd, J= 12 Hz, J= 4 Hz) δ _H = 3.62 (1H, dd, J= 12 Hz, J= 4 Hz) δ _H = 3.47 (2H, t, J= Hz, J= Hz) δ _H = 3.99 (2H, m)
H-4''' H-5''' H-6'''	δ _H = 3.19 (9H, s)

Tablo 35. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) bileşiğinin ¹³C-NMR spektral değerleri

C/H	δ _C (ppm)
1	164.8
2	35.42
3	34.27
1'	142.28
2'	129.50
3'	129.50
4'	127.22
5'	129.50
6'	129.50
1''	83.46
2''	71.02
3''	74.10
4''	82.18
5''	79.43
6''	62.48
1'''	68.89
2'''	57.14
4'''	54.77
5'''	54.77
6'''	54.77

Elde edilen Bİ-4 bileşiği, İTK’da vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtmeden önce UV lamba altında koyu lekeler olarak görülürken; reaktif püskürtüldükten sonra mavimsi lekeler şeklinde görünmüştür.

Bileşiğin ¹H-NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_H = 7.29$ (4H, m) ppm’de ve $\delta_H = 7.17$ (1H, m) ppm’de bulunan sinyaller görülmektedir. Bu sinyallerin aromatik bir yapıya ait olduğu düşünülmüştür. $\delta_H = 2.94-3.06$ (4H, m) ppm’de bulunan sinyaller, alifatik bir zincir varlığına işaret etmektedir. $\delta_H = 3.81$ (1H, dd, $J = 12$ Hz, $J = 4$ Hz), $\delta_H = 3.62$ (1H, dd, $J = 12$ Hz, $J = 8$ Hz) ppm’de bulunan sinyallerin C-6"a ve C-6"b protonlarını işaret ettiği literatürlerle karşılaştırılarak belirlenmiştir. $\delta_H = 4.86$ (1H, d, $J = 8$ Hz) ppm’de gözlenen sinyalin bir şekerin anomerik protonuna ait olduğu saptanmıştır. Anomerik protonların etkileşme sabitlerine bakıldığında, $J = 8$ Hz değeri, uzun β konfigürasyonuna sahip glukoz olduğunu işaret etmiştir. $\delta_H = 3.99$ (2H, m) ppm, $\delta_H = 3.47$ (2H, t, $J =$ Hz, $J =$ Hz) ppm ve $\delta_H = 3.19$ (9H, s) ppm’de yer alan sinyallerin kolin (2-hidroksi-N,N,N-trimetiletanaminyum) yapısına ait olduğu düşünülmüş ve literatürlerle karşılaştırıldığında sinyallerin, sırasıyla, H-2"', H-1"' ve H-4"', H-5"', H-6"' protonlarına ait olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler literatürlerle karşılaştırıldığında, bileşiğin glukosinolat yapısında ve kolin tuzu şeklinde olduğu saptanmıştır (302, 303).

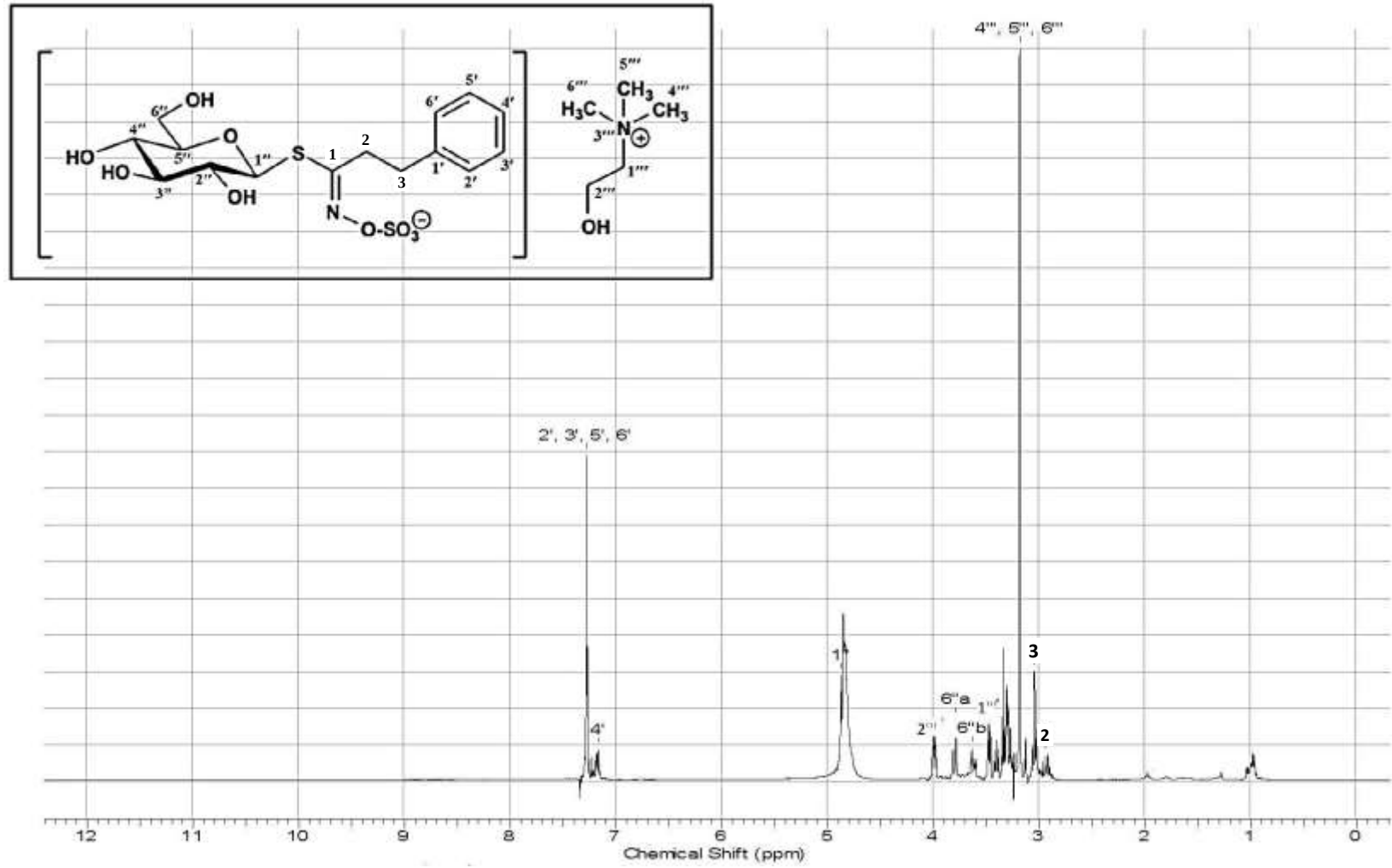
Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_C = 164.8$ ppm’de gözlenen sinyal C-1 karbonuna ait olup, glukosinolat yapısında sülfat grubunun bulunduğu işaret etmektedir. Şekerin anomerik karbonuna ait sinyal (C-1'') $\delta_C = 83.46$ ppm’de gözlenmiştir. $\delta_C = 34.27$ ve $\delta_C = 35.42$ ppm’de alkil grubunun C-2 ve C-3 karbonlarına ait sinyaller yer almaktadır. $\delta_C = 142.28$, $\delta_C = 129.50$ ve $\delta_C = 127.22$ ppm’de aromatik yapının karbonlarına ait sinyaller yer almaktadır. $\delta_C = 68.89$ ppm, $\delta_C = 57.14$ ppm ve $\delta_C = 54.77$ ppm’de gözlenen sinyaller, yapıda kolin bulunduğunu doğrulamıştır ve literatürlerle karşılaştırıldığında bu sinyallerin, sırasıyla, C-1"', C-2"' ve C-4"', C-5"', C-6"' karbolalarına ait olduğu saptanmıştır (304).

Elde edilen spektrum değerleri literatürlerle karşılaştırıldığında, molekülün 2-feniletil glukosinolat (glukonasturtin) kolin tuzu olduğuna karar verilmiştir (16, 304, 305).

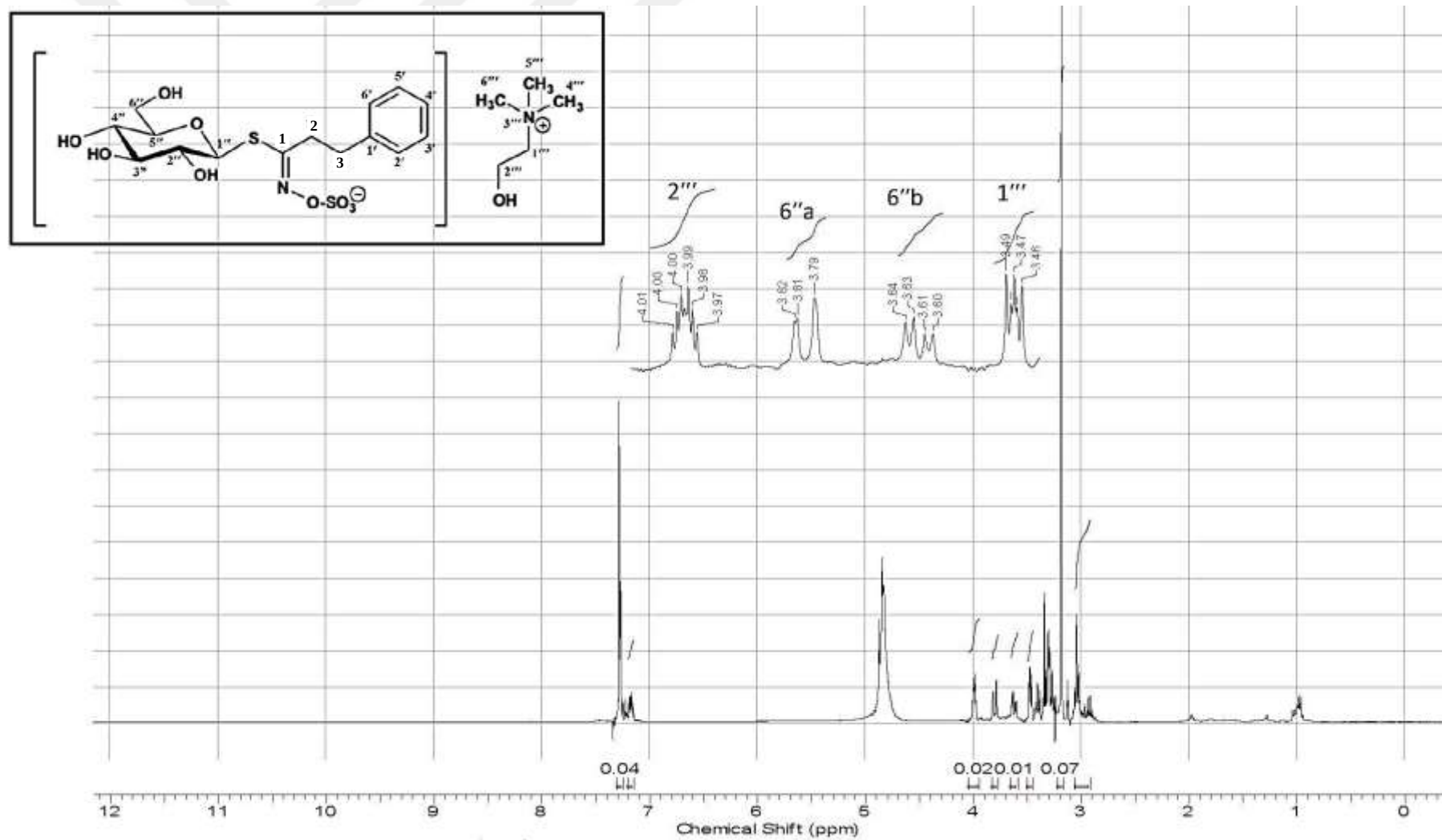
Bileşğin HMBC spektrumlarına bakıldığında, tiyoglukozun anomerik karbonuna (1") ait protonun yapıdaki C-1 konumu ile eşleştiği gözlenmektedir. Ayrıca yapıdaki C-2 ve C-3 karbonlarına ait protonların, sadece C-1 ve fenil halkası ile etkileşmesi yapıyı doğrulamaktadır. HMBC spektrumundan elde edilen diğer uzak bağ mesafeli karbon ve proton etkileşimlerine ait veriler de bileşğin yapısını onaylamaktadır.

Bileşğin HSQC ve COSY spektrumlarına bakıldığında, yapısında yer alan karbon ve protonlara ait değerlerin doğru olduğu belirlenmiştir.

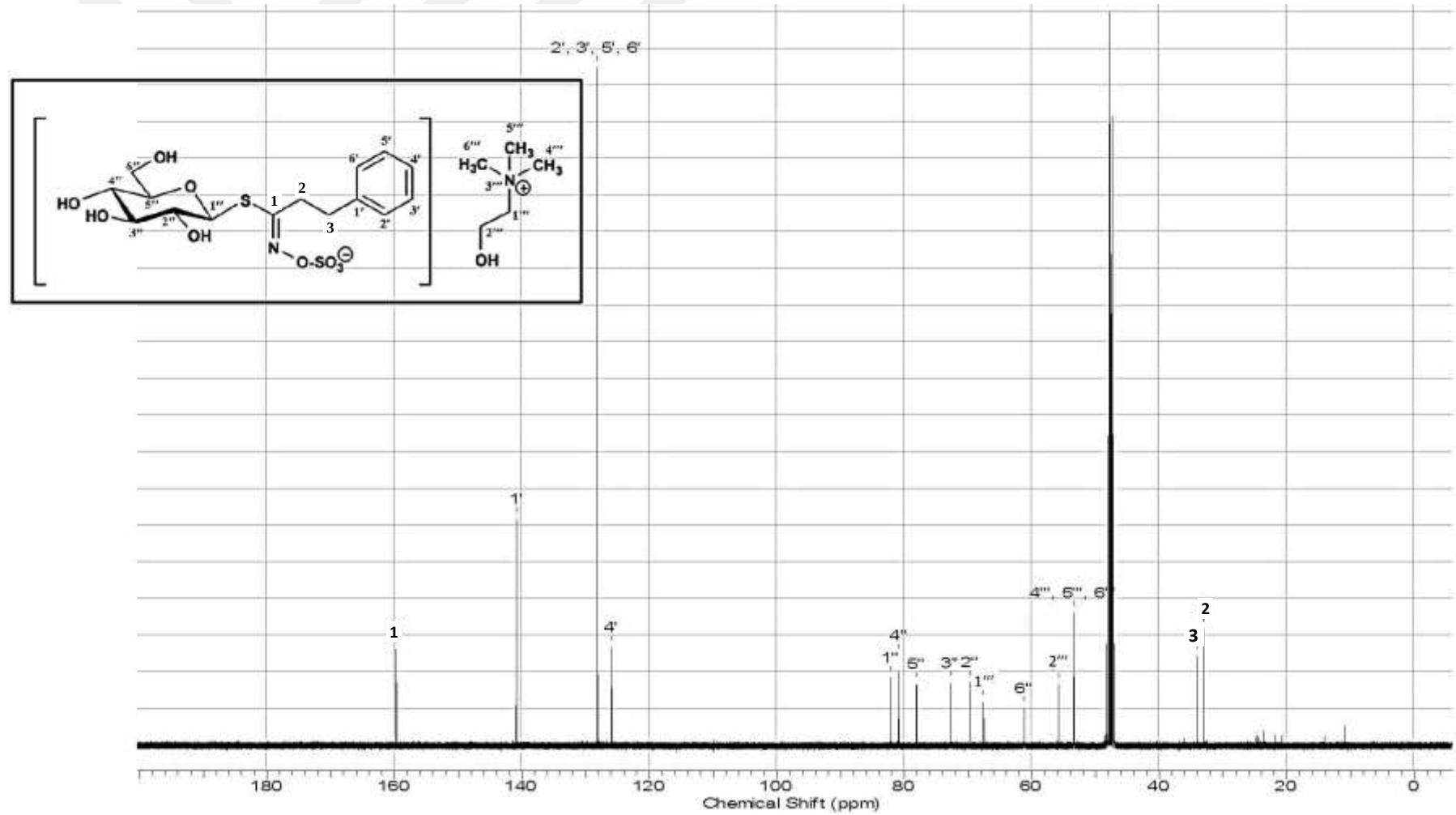




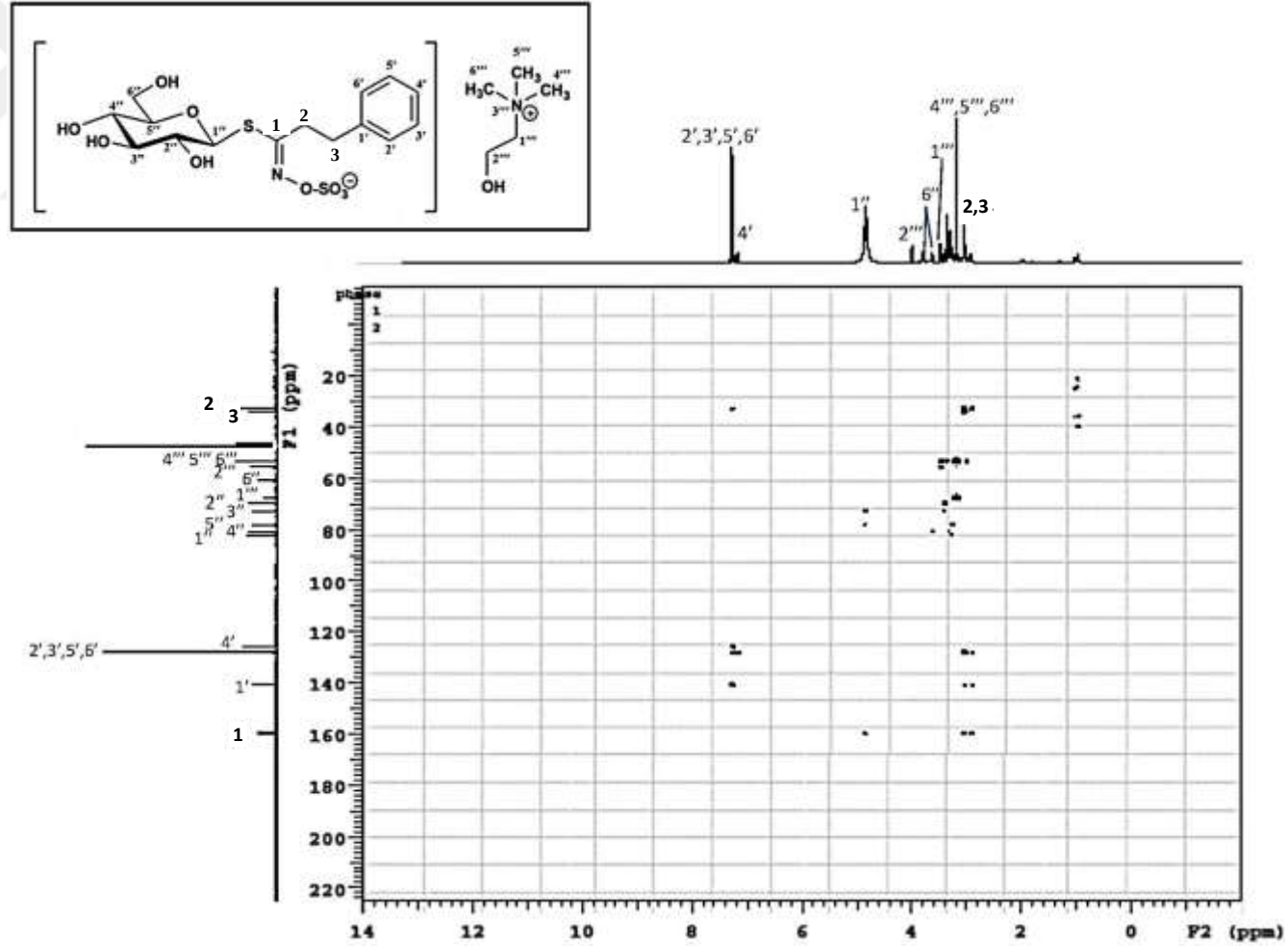
Şekil 83. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I



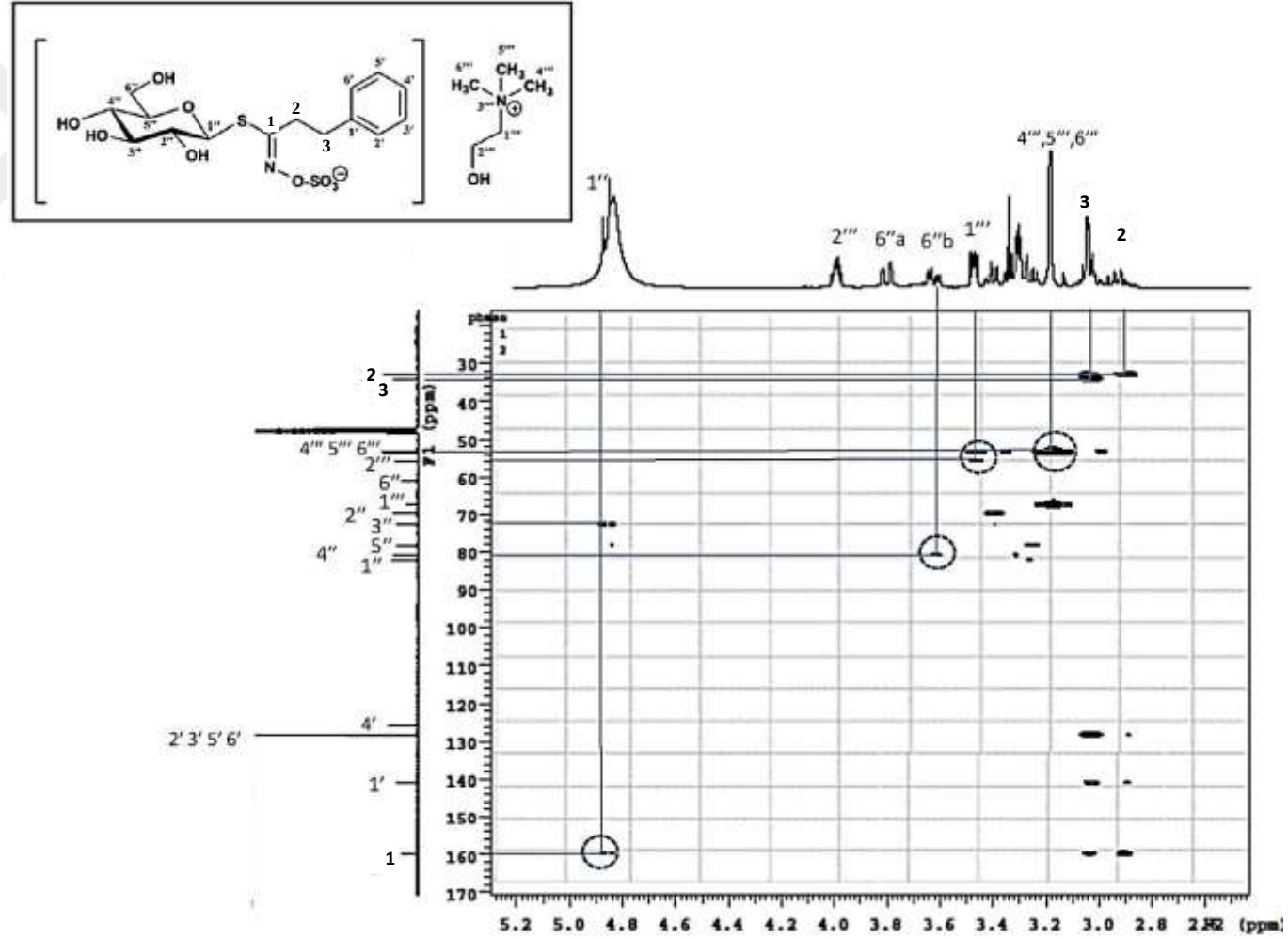
Şekil 84. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) spektrumu-II



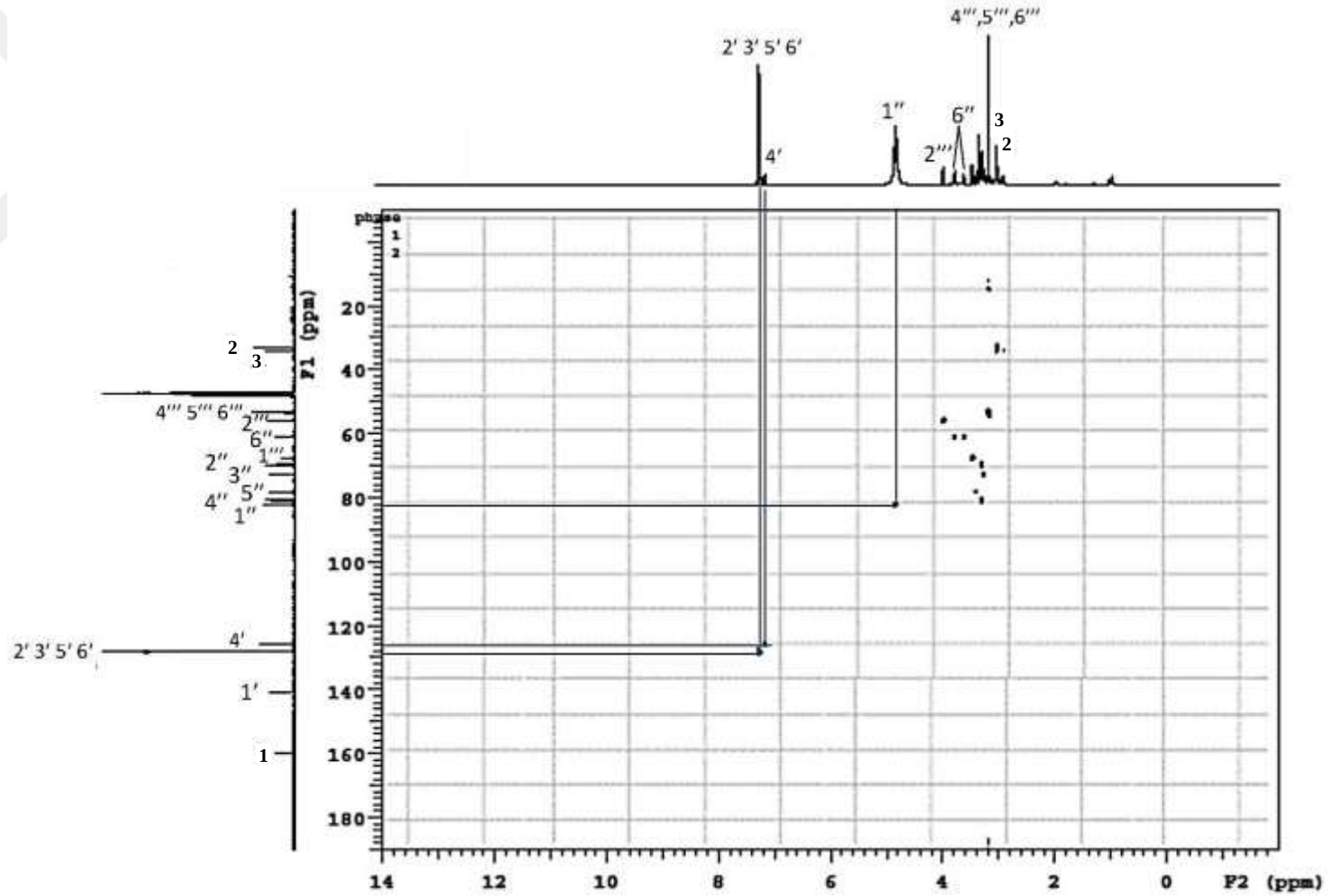
Şekil 85. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) spektrumu



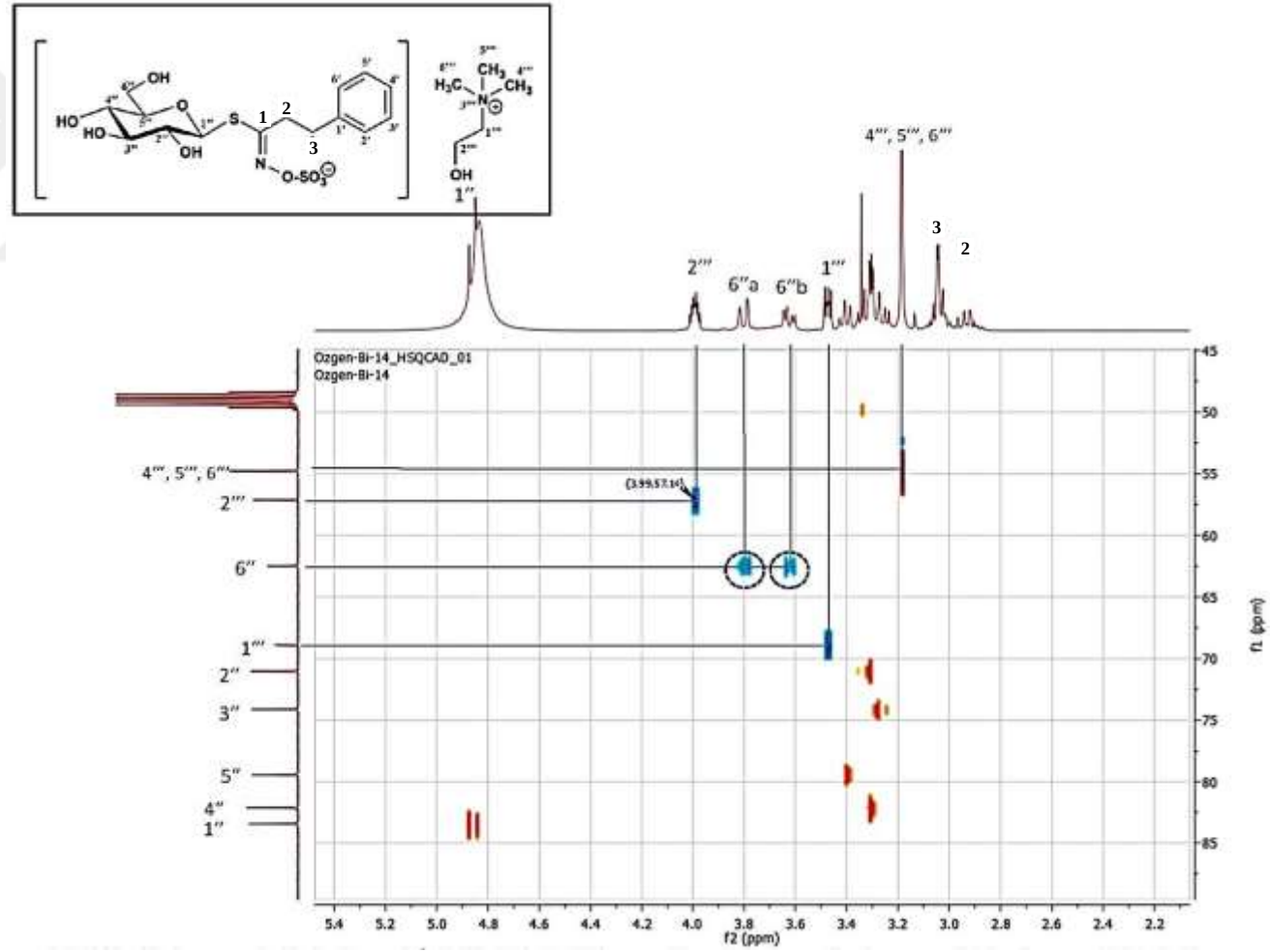
Şekil 86. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-I



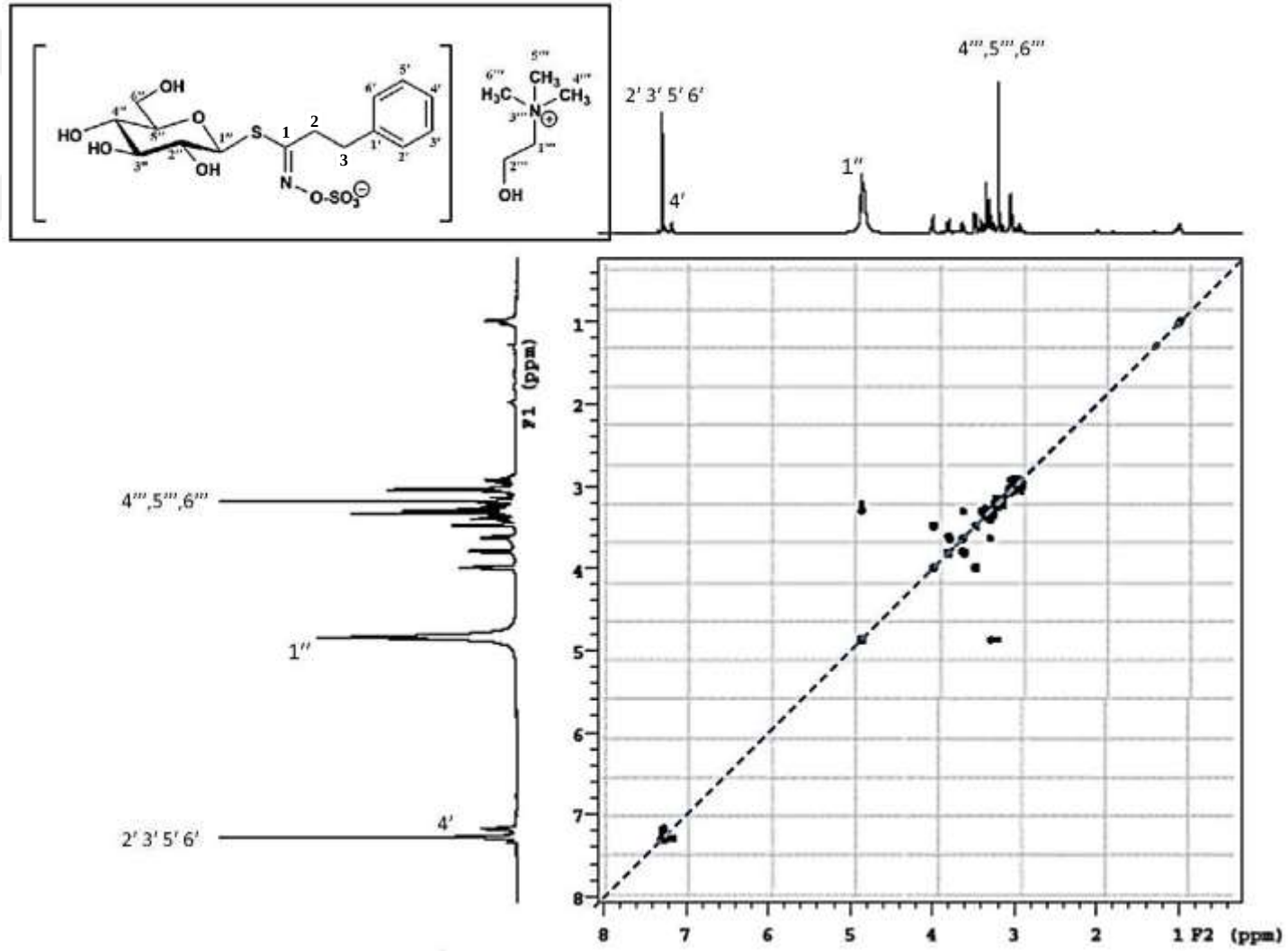
Şekil 87. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D-1H, ¹³C-Heteronükleer korelasyonlu (uzun mesafe) spektrumu (HMBC)-II



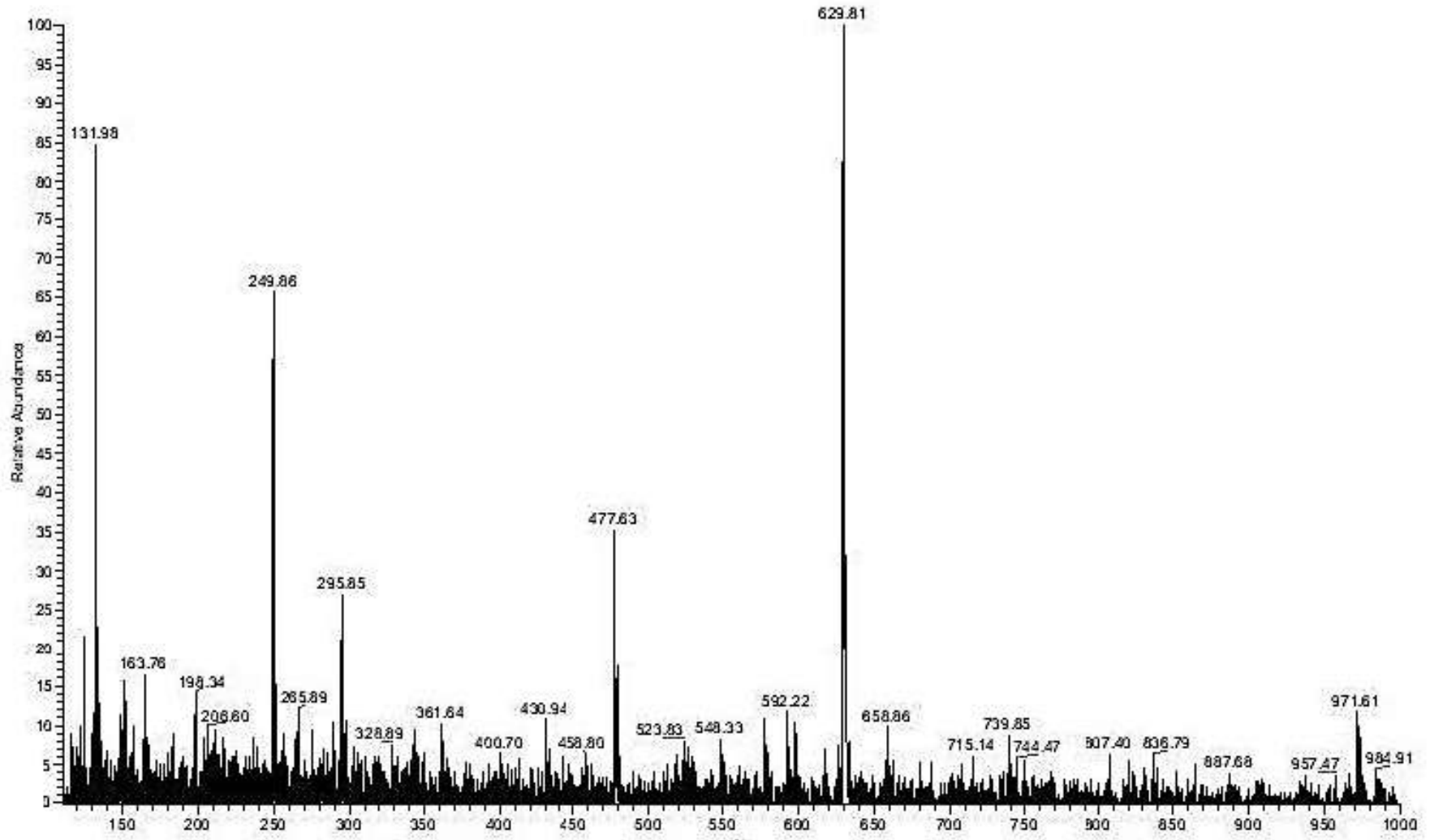
Şekil 88. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D-1H, ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-I



Şekil 89. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D- ^1H , ^{13}C -Heteronükleer korelasyonlu (kısa mesafe) spektrumu (HSQC)-II

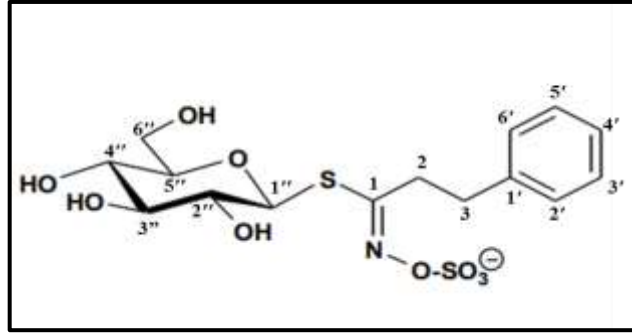


Şekil 90. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) 2D-1H, homonükleer korelasyonlu spektrum (COSY)



Şekil 91. Glukonasturtin kolin tuzu (Bİ-4) kütle spektrumu

6.7.5. Glukonasturtin (2-Feniletıl Glukosinolat)



C₁₅H₂₁NO₉S₂ (Molekül Ağırlığı: 422)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) Spektrumu: Şekil 92, 93; Tablo 36

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) Spektrumu: Şekil 94; Tablo 37

Kütle Spektrumu: Şekil 95

Tablo 36. Glukonasturtin (Bİ-5) bileşiğinin ¹H-NMR spektral değerleri

H	δ _H (ppm)
H-2	2.91-3.05 (4H, m)
H-3	
H-2'	7.18-7.28 (5H, m)
H-3'	
H-4'	
H-5'	
H-6'	
H-1''	4.88 (1H, d, J= 8 Hz)
H-6''a	δ _H = 3.79 (1H, dd, J= 14 Hz, J= 4 Hz)
H-6''b	δ _H = 3.61 (1H, dd, J= 12 Hz, J= 8 Hz)

Tablo 37. Glukonasturtin (Bİ-5) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektral değerleri

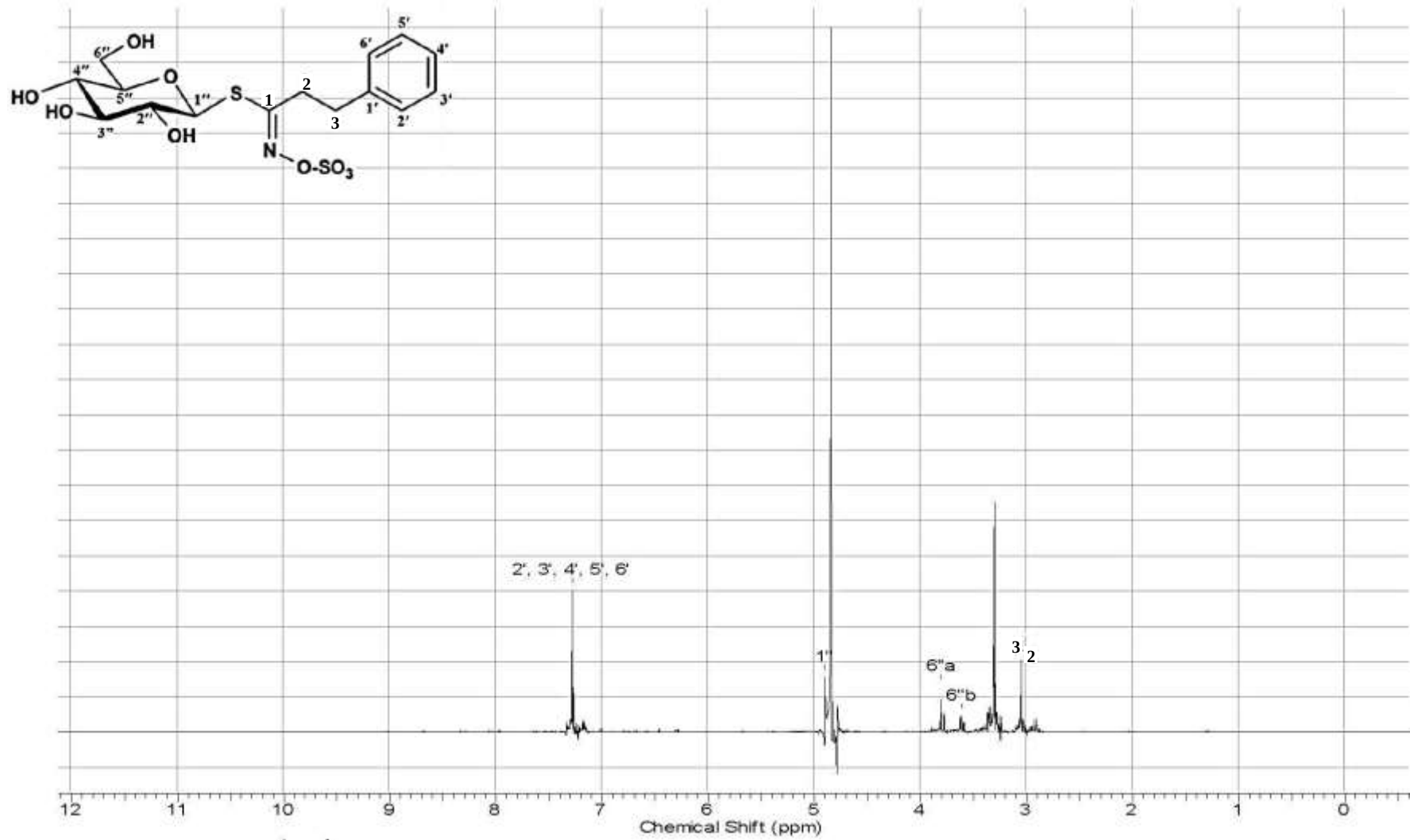
C/H	δ_{C} (ppm)
1	159.6
2	34.18
3	33.04
1'	140.97
2'	128.09
3'	128.09
4'	125.79
5'	128.09
6'	128.09
1''	82.25
2''	80.88
3''	78.11
4''	72.76
5''	69.72
6''	61.23

Elde edilen Bİ-5 bileşiği, İTK'da vanilin/ H_2SO_4 reaktifi püskürtmeden önce UV lamba altında koyu lekeler olarak görülürken; reaktif püskürttüp ısıtıldığında turuncu, soğutulduğunda mavimsi lekeler şeklinde görünmüştür.

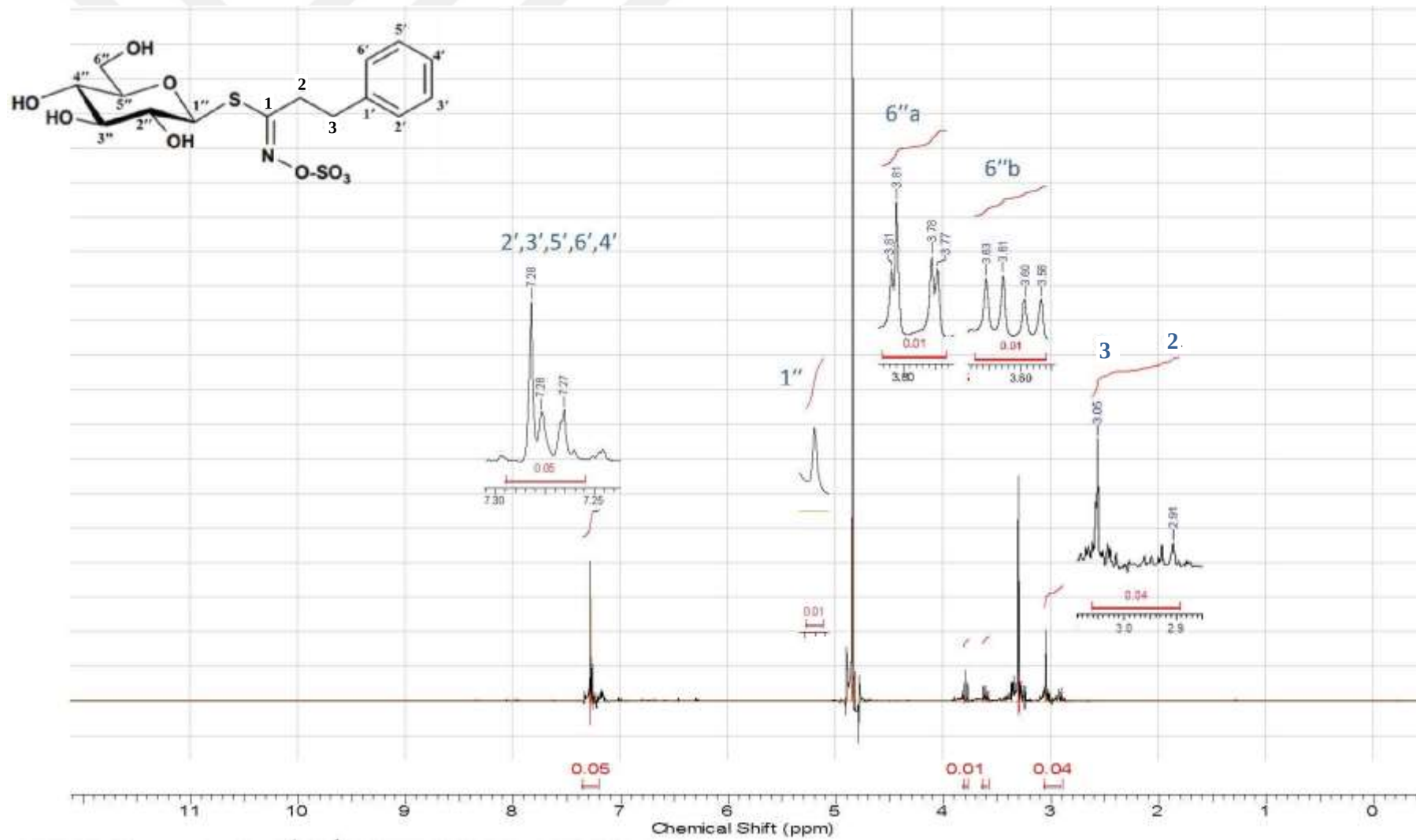
Bileşiğin ^1H -NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_{\text{H}} = 7.27\text{-}7.28$ (5H, m) ppm'de bulunan sinyaller görülmektedir. Bu sinyallerin aromatik bir yapıya ait olduğu düşünülmüştür. $\delta_{\text{H}} = 2.91\text{-}3.05$ (4H, m) ppm'de bulunan sinyaller, alifatik bir zincir varlığına işaret etmektedir. $\delta_{\text{H}} = 3.79$ (1H, dd, $J = 14$ Hz, $J = 4$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 3.61$ (1H, dd, $J = 12$ Hz, $J = 8$ Hz) ppm'de bulunan sinyallerin C-6"a ve C-6"b protonlarını işaret ettiği literatürlerle karşılaştırılarak belirlenmiştir. $\delta_{\text{H}} = 4.88$ (1H, d, $J = 8$ Hz) ppm'de gözlenen sinyalin bir şekerin anomerik protonuna ait olduğu saptanmıştır. Anomerik protonların etkileşme sabitlerine bakıldığında, $J = 8$ Hz değeri uzun β konfigürasyonuna sahip glukoz olduğunu işaret etmiştir. Elde edilen veriler literatürlerle karşılaştırıldığında, bileşiğin glukosinolat yapısında olduğu saptanmıştır (302, 303)

Bileşğin ^{13}C -NMR spektrumuna bakıldığında, $\delta_{\text{C}} = 159.6$ ppm'de gözlenen sinyal C-1 karbonuna ait olup, glukosinolat yapısında sülfat grubunun bulunduğu işaret etmektedir. Şekerin anomerek karbonuna ait sinyal (C-1") $\delta_{\text{C}} = 82.25$ ppm'de gözlenmiştir. $\delta_{\text{C}} = 33.05$ ve $\delta_{\text{C}} = 34.18$ ppm'de alkil grubunun C-2 ve C-3 karbonlarına ait sinyaller yer almaktadır. $\delta_{\text{C}} = 140.97$, $\delta_{\text{C}} = 128.09$ ve $\delta_{\text{C}} = 125.79$ ppm'de aromatik yapının karbonlarına ait sinyaller yer almaktadır. Elde edilen spektrum değerleri literatürlerle karşılaştırıldığında, molekülün 2-feniletıl glukosinolat (glukonasturtin) olduğuna karar verilmiştir (16, 305).

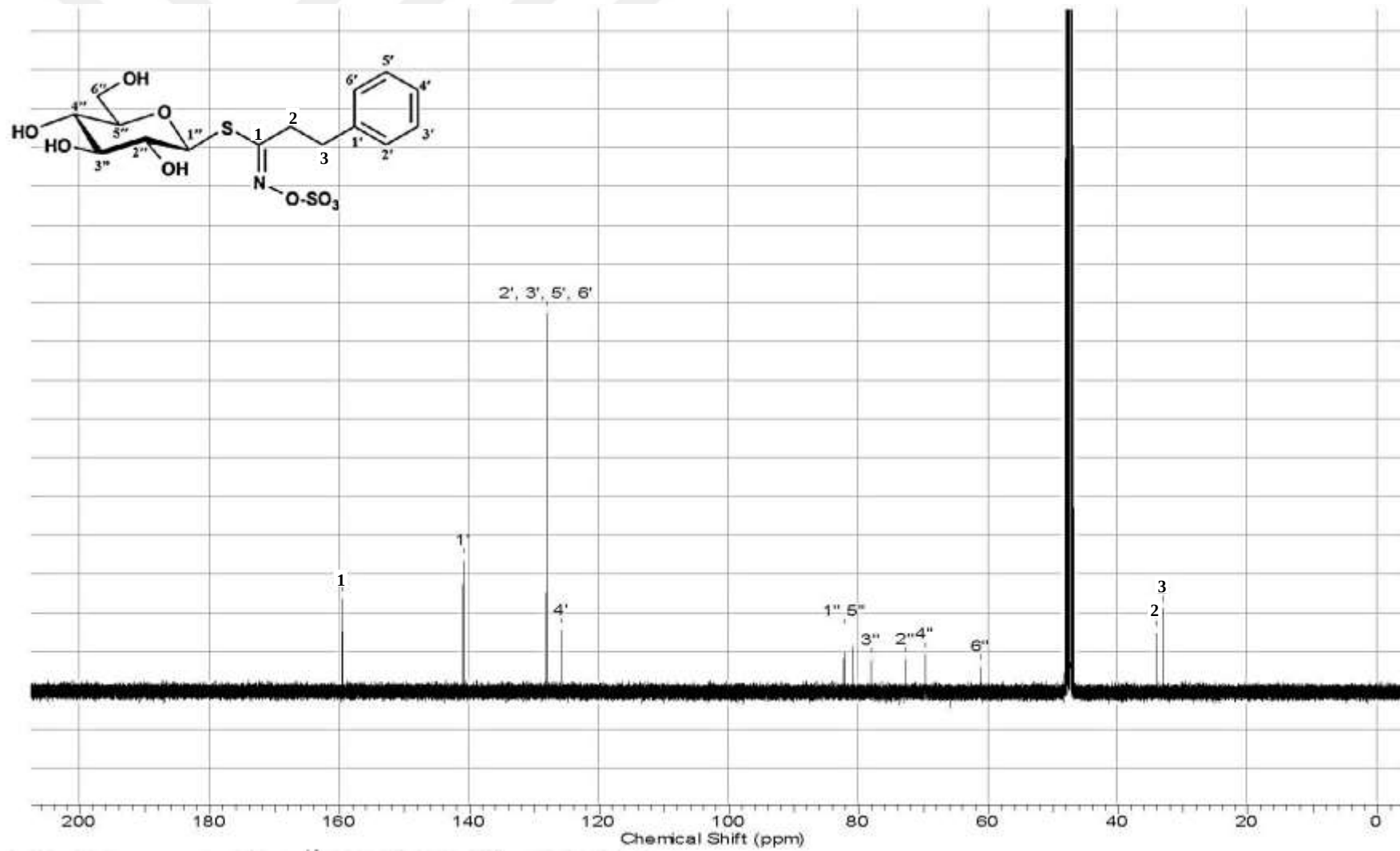
Bileşğin kütle spektrumu incelendiğinde, m/z 421.77'de görülen sinyal glukonasturtini işaret etmektedir.



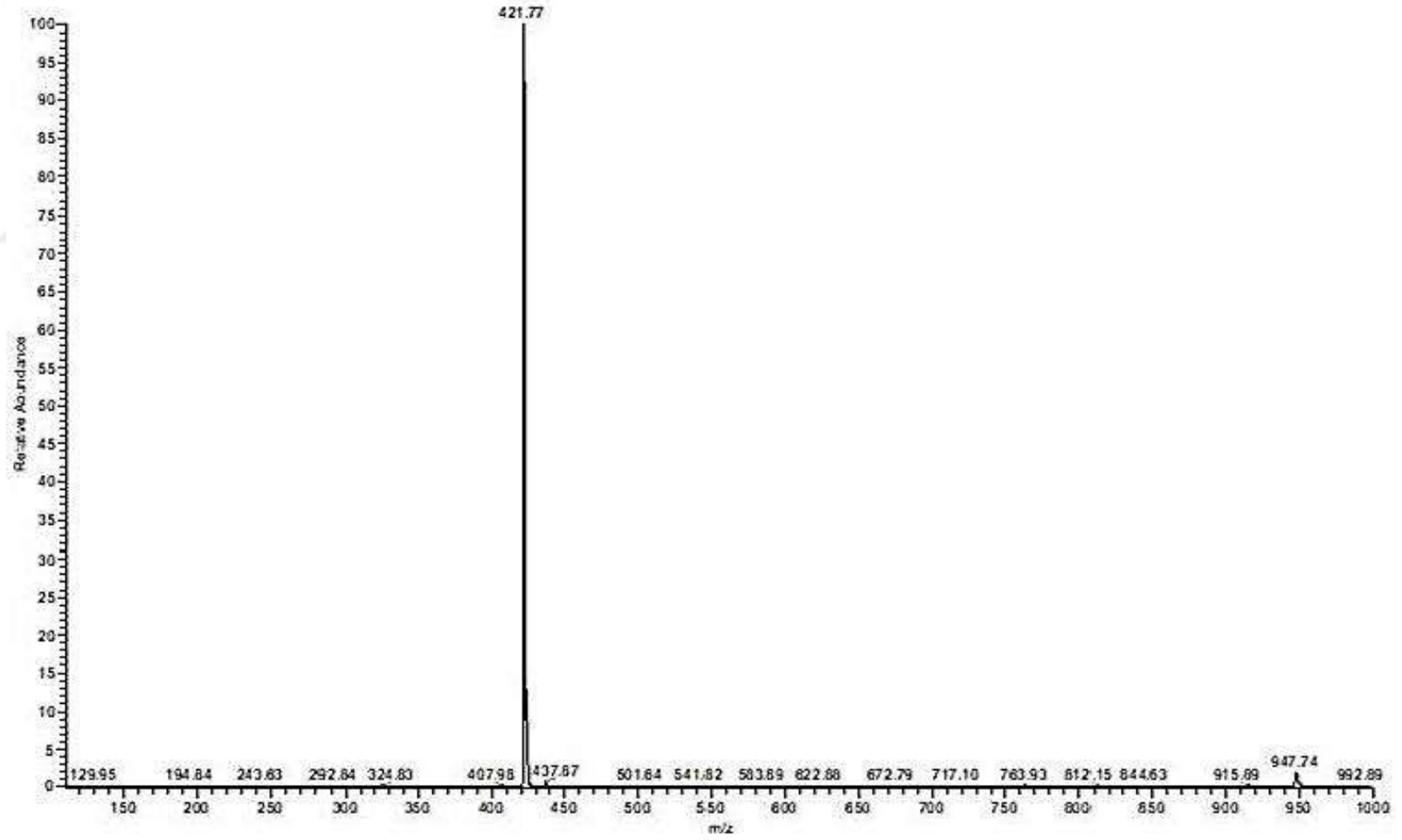
Şekil 92. Glukonasturtin (Bİ-5) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-I



Şekil 93. Glukonasturtin (Bİ-5) ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) spektrumu-II



Şekil 94. Glukonasturtin (Bİ-5) ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) Spektrumu



Şekil 95. Glukonasturtin (Bİ-5) Kütle Spektrumu

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada 338 cins ve 3709 tür ile temsil edilen Brassicaceae familyasının, Türkiye’de 91 cinse ait 571 türü, 65 alttürü, 24 varyetesi ve 660 taksonu bulunmaktadır. Brassicaceae familyasına ait cinslerden biri olan *Barbarea*, Avrupa ve Asya’da yaklaşık 20 türle temsil edilirken; Türkiye’de 9’u endemik, 12 türle (15 takson) temsil edilmektedir (9). Tez çalışmasında yer alan *Barbarea* türlerinden *B. auriculata* var. *paludosa* Erzincan yöresi Pöske Dağı’ndan (2100 m), *B. plantaginea* Kelkit (Gümüşhane), Çimen Köyü’nden (1750 m) ve *B. integrifolia* Kelkit (Gümüşhane), Uzunkol Köyü’nden (1900 m) toplanmıştır. Türlerin teşhisi Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından gerçekleştirilmiş olup; bitkilere ait herbaryum örnekleri Erzincan Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu’nda saklanmaktadır. Literatür taramalarında, üzerinde herhangi bir biyolojik aktivite ve fitokimyasal çalışmanın bulunmadığı tespit edilen bu 3 türün, metanol ekstresi ve metanol ekstresinden hareketle elde edilen kloroform, etil asetat ve su alt fraksiyonları üzerinde ilk kez antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyonu (tirozinaz, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz) ve sitotoksik aktivite tayinleri yapılmıştır. Biyolojik aktivite çalışmalarında daha yüksek aktivite gösteren *B. integrifolia*’nın metanol ekstresi ve alt fraksiyonları üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları ilk kez gerçekleştirilmiştir.

Bitkilerin sekonder bileşikler olarak ürettiği fenolik bileşiklerin, fenolik asitlerin ve flavon türevlerinin biyolojik olarak önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin antioksidan, antialerjik, antimikrobiyal, antitrombik ve anti-inflamatuvar gibi birçok etkilerinin olduğu bildirilmiştir (306). Patolojik bir olay olarak kabul edilen oksidatif stres, vücutta ROS’ların arttığı veya antioksidan savunma sisteminin zayıflayarak oluşan radikalleri temizleyemediği durumlarda görülmektedir. Yapılan araştırmalar kanser, diyabet ve kardiyovasküler sistem hastalıkları gibi çoğu şikayetin etyolojisinde oksidatif stresin rol aldığını ve fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinden dolayı oksidatif stres ile ilişkili rahatsızlıklara karşı koruyucu olabilecekleri düşünülmektedir (307, 308). Fenolik bileşiklerin etkilerinin son yıllarda yapılan çalışmalarla daha fazla ortaya çıkarılması, bilim dünyasını bu konuda daha fazla çalışma yapmasına yönlendirmektedir.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi, daha sonra yapılacak kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı kabul edildiği için, bilimsel çalışmalarda başlangıç noktası olarak düşünülmektedir (308).

Tez kapsamında çalışılan türlerin antioksidan kapasiteleri, Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini, FRAP Ölçümü, CUPRAC Tayini ve DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini ile belirlenmiştir.

Barbarea türlerine ait metanol, kloroform, etil asetat ve su ekstralarında fenolik madde miktarı galik asit standart grafiği yardımıyla belirlenmiştir. Türlerin kloroform ve etil asetat ekstralarında yapılan çalışmalarda sonuç elde edilememesine rağmen; su ve metanol ekstralarının sahip olduğu gözlenen fenolik bileşik miktarları Tablo 15’de belirtilmiştir. İçerdiği fenolik bileşikler açısından türleri değerlendirdiğimizde, *B. integrifolia* ve *B. plantaginea*’nın daha zengin olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda türlerin metanol, kloroform, etil asetat ve su ekstralarının DPPH radikalini süpürme kapasitelerinin belirlenmesinde BHT standart madde olarak kullanılmıştır. BHT, antioksidan özellik gösteren sentetik bir maddedir ve çalışmada ekstralara ait sonuçlar BHT’nin sonucuyla karşılaştırılmıştır. Her türden elde edilen ekstraların sonuçları kendi içinde değerlendirildiğinde, etil asetat ekstralarının daha iyi radikal süpürücü etkisinin olduğu belirlenmiştir. DPPH radikalini yüzde elli inhibisyona (IC_{50}) uğratan derişimlere bakıldığında, *B. auriculata* var. *paludosa*’nın etil asetat ekstresinin $0.0984 \pm 0.01 \text{ mg/mL}^{-1}$ olduğu ve en yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda türlerin metanol, kloroform, etil asetat ve su ekstralarının toplam antioksidan kapasiteleri, FRAP ve CUPRAC yöntemleriyle hesaplanmıştır ve sonuçlar Trolox eşdeğeri olarak verilmiştir. Fe^{+3} iyonlarının indirgenmesi esasına dayanan FRAP yöntemine ait sonuçlar değerlendirildiğinde, türlerden *B. integrifolia*’nın metanol ekstresinin en yüksek, *B. auriculata* var. *paludosa*’nın kloroform eksteresinin en düşük etkiye sahip olduğu gözlenirken; Cu^{+2} ’nin indirgenmesi esasına dayanan CUPRAC tayininde *B. integrifolia*’nın metanol ekstresinin en yüksek, *B. plantaginea*’nın kloroform eksteresinin en düşük etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Seo ve ark. tarafından yapılan araştırmada, *B. orthocerus*'un toprak üstü kısımlarından barbarin adı verilen (R)-5-fenil-2-oksazolidintiyoninin elde edildiği ve bu molekülün tirozinaz enzimi üzerine inhibitör etkisinin, kojik asit kadar güçlü olduğu bildirilmiştir (8). Ayrıca Hur ve ark. tarafından yapılan çalışmada *B. orthoceras*'ın çeşitli hücre tiplerinde NO sentezini inhibe ederek anti-inflamatuvar etki gösterdiği ve NO'ya bağlı Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda önleyici etkisinin olabileceği bildirilmiştir (17).

İçeriğinde alkaloitler, ksantonlar ve polifenoller ihtiva eden birçok bitki türünün kolinesteraz enzimleri üzerinde inhibitör etki gösterdiği ve bu sebeple nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olabilecekleri bildirilmiştir (309-314). Buradan yola çıkarak, tez kapsamında yer alan türlerin tirozinaz ve kolinesteraz enzimleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Türlerden elde edilen ekstrelerin tirozinaz inhibitör etkinliklerini değerlendirmek için standart olarak α -kojik asit kullanılmıştır. α -kojik asitin ve ekstrelerin IC₅₀ değerleri Tablo 16' da gösterilmiştir. Türlerden *B. plantaginea*'nın tirozinaz enzimi üzerinde inhibitör etkisinin çok zayıf olduğu saptanırken; *B. integrifolia* ve *B. auriculata* var. *paludosa*'nın aktivitesinin orta derecede olduğu gözlenmiştir.

Türlerin asetil ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerindeki etkisi galantamin standardı ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Galantamin ve ekstrelerin IC₅₀ değerleri Tablo 17'de gösterilmiştir. Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarına bakıldığında, türlerden en yüksek inhibitör etki, *B. auriculata* var. *paludosa*'nın su ekstresinde görülürken; bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarına bakıldığında en yüksek inhibitör etkinin *B. integrifolia*'nın su ekstresinde olduğu görülmüştür.

Yapılan literatür taramalarında *Barbarea* türlerinin fitoaleksinler yönünden zengin olduğu ve güçlü antifungal etki gösterdiklerine ulaşılmıştır (15, 21-29, 31, 41). Tez çalışmasında türlerden elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri, patojen sekiz bakteri ve iki mayanın kullanıldığı agar kuyucuk difüzyon ve minimal inhibisyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Türlerin antimikrobiyal etkilerinin, kullanılan standart ilaçlarla (Ampisilin, Streptomisin ve Flukonazol) karşılaştırıldığında, daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Türlerin su ekstrelerinin mikroorganizmalar üzerinde en düşük etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Türlerin sadece etil asetat ekstreleri, Gram (+)

bakterilerden *B. cereus* üzerinde etki göstermiştir. Gram (-) bakterilerden *P. aeruginosa*, Gram (+) bakterilerden *S. cerevisiae* ve *E. faecalis*'in, türlerden elde edilen ekstrelere karşı duyarlı olmadığı saptanmıştır. Türlerden elde edilen metanol, kloroform ve etil asetat ekstrelerinin tümünde antitüberküloz etkinin olduğu gözlenmiştir. Türlerden elde edilen örneklerin antifungal etkinliği değerlendirildiğinde, mayalar üzerinde daha zayıf etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Yapılan literatür taramalarında *Barbarea* türlerinde fenolik bileşiklerin klorojenik asit, 3,5-dikafeilkinik asit ve 1,5-dikafeilkinik asit olduğuna rastlanmıştır (27). Tez kapsamında türlerin metanol ekstreleri üzerinde yapılan HPLC çalışmalarında, fenolik bileşikler olarak *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, kumarik asit, sinapik asit ve benzoik asit bulunduğu saptanmıştır. Daha önceki çalışmalarda, *Barbarea* türlerinden kersetin ve türevlerinin izolasyonunun gerçekleştirilmesine rağmen; HPLC çalışması sırasında saptanmamıştır (21, 22). *B. plantaginea*'da sadece benzoik asit varlığı saptanırken; *B. integrifolia*'nın *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, kumarik asit, sinapik asit ve benzoik asit içerdiği saptanmıştır. *B. auriculata* var. *paludosa*'da ise vanilik asit, şiringaldehit, kumarik asit, sinapik asit ve benzoik asit varlığına rastlanmıştır.

Tez kapsamında türlerden elde edilen ekstrelerinin L929, Hep3B, MCF-7, HCT116, MDA-MB-231, A549 ve PC-3 hücre hatları üzerinde gösterdiği antiproliferatif etki MTT yöntemi ile incelenmiştir.

Barbarea türlerinin kanser hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiler değerlendirildiğinde, türlerden *B. integrifolia*'nın Hep3B, MDA-MB-231, HCT116 ve A549 hücre hatlarında Vinkristin'den daha etkili olduğu gözlenirken; MCF-7 hücre hattında *B. auriculata* var. *paludosa*'nın Vinkristin'den daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların kanser hücresinde etki göstermesi istenirken; sağlıklı hücrelerde herhangi bir etki göstermemesi veya minimum etki göstermesi istenmektedir. Bu durum göz önüne alınarak tez kapsamında yapılan çalışmalarda, ekstrelerin sağlıklı hücrelerdeki etkisini gözleyebilmek için normal fare fibroblast hücreleri (L929) seçilmiştir. Bu hücrelerde ekstreler farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çalışmalarda standart ilaç olarak, günümüzde kanser kemoterapisinde kullanılan ve bitkisel bir alkaloid olan Vinkristin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara

bakıldığında, sağlıklı hücreler üzerinde türlerden elde edilen su ve metanol ekstralarının, doz artışına bağlı olarak, önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. Türlerden elde edilen kloroform ve etil asetat ekstralarının sağlıklı hücreler üzerinde gösterdiği sitotoksik etkinin, Vinkristin ile kıyaslandığında, daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak *B. integrifolia* ve *B. auriculata* var. *paludosa*'nın kloroform ve etil asetat ekstralarının Hep3B, MCF-7, HCT116, MDA-MB-231, A549 ve PC-3 kanser hücre hatlarında Vinkristin'den daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında, antikanser ilaç geliştirme çalışmalarında türlerin potansiyel kaynaklar olarak değerlendirilebileceği görülmektedir.

Biyolojik aktivite çalışmalarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde, çalışılan diğer türlere göre daha etkili olduğu gözlenen *B. integrifolia*'nın ana bileşenlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *B. integrifolia*'nın su fazından 3 adet, etil asetat fazından 1 adet ve kloroform fazından 1 adet olmak üzere toplamda 5 adet ana bileşik izole edilerek, yapı analizleri çeşitli spektroskopik yöntemler [^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-NMR (COSY, HMQC, HMBC) ve MS] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *B. integrifolia*'nın toprak üstü kısmından izole edilen ana bileşiklerin 1 steroid (β -Sitosterol), 1 fenolik asit (rozmarinik asit), 1 flavonol heteroziti (Kemferol 7-O- α -L-ramnozid-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukozil)- β -D-glukozit), 1 glukosinolat (Glukonasturtin) ve 1 glukosinolat tuzu (Glukonasturtin kolin tuzu) olmak üzere 4 farklı kimyasal gruba ait olduğu gözlenmiştir.

Barbarea cinsi üzerinde daha önce yapılan çalışmalarda, *B. vulgaris*, *B. verna*, *B. intermedia*, *B. orthoceras*, *B. stricta*, *B. rupicola*, *B. bracteosa* ve *B. australis* türlerinde glukonasturtinin bulunduğu belirtilmiştir (6, 15, 16, 18, 20, 30, 33). Ayrıca tez kapsamında çalışılan *B. plantaginea* türünün glukonasturtin içerdiği, Agerbirk ve ark. tarafından yapılan HPLC çalışmasıyla gösterilmiştir (33). Tez çalışmasında izolasyonu yapılan *B. integrifolia*'ya ait herhangi bir izolasyon çalışmasına rastlanmamış olup ilk kez tarafımızca gerçekleştirilmiştir. Ayrıca izolasyon çalışmalarında elde edilen glukonasturtin'in kolin tuzu ilk kez saflaştırılmıştır. Literatürlerde *Barbarea* türlerinin kolin tuzu içerdiğine dair herhangi bir veriye rastlanmazken; Brassicaceae familyasına ait bazı türlerin kolin, betain ve fenolik asitlerin kolin esterlerini taşıdığına dair bilgilere rastlanmıştır (315-317).

Brassicaceae familyası üyelerinin güçlü antikarsinojenik etkileri onların içerdikleri glukosinolatlar ve parçalanma ürünleri olan izotiyosiyanatlar (ITC) ile ilişkilendirilmektedir (318-321). Aromatik bir glukosinolat olan glukonasturtin parçalandığında PEITC oluşturmaktadır ve yapılan çalışmalarda her ikisinin de güçlü antikarsinojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. PEITC, proteinlerin sistein gruplarıyla reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir ve gösterdiği biyolojik aktivitelerinin bu yeteneğine bağlı olduğu bilinmektedir. PEITC, sitoprotektif transkripsiyon faktörleri NRF2 ve HSF1'in aktivasyonu, epigenomun modifikasyonu gibi birçok hücre içi hedefi etkileyerek antikarsinojenik etki gösterdiği kabul edilmektedir (322).

Tez kapsamında *B. integrifolia*'nın topraküstü kısımları üzerinde gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarından elde edilen β -Sitosterol, yüksek biyolojik aktivitelere sahip önemli bir fitosterol olarak bilinmektedir. β -Sitosterol'ün reaktif oksijen radikallerinin seviyesini azalttığı ve lipit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan etki göstermekle birlikte, bazı mikroorganizmalar üzerinde güçlü antimikrobiyal etkisinin olduğu bildirilmiştir (323, 324). Yapılan literatür taramalarında β -Sitosterol'ün yüksek kolinesteraz inhibitör etkisinin olduğuna rastlanılmıştır (325, 326). Bahadori ve ark.'nın *Salvia syriaca* kökleri üzerinde yaptıkları çalışmada, türün aseton ekstresinin ve aseton ekstresinden saflaştırılan β -Sitosterol'ün kolinesteraz enzim üzerindeki inhibisyonları sırasıyla IC_{50} değerleri $499.5 \pm 6.8 \mu\text{g/mL}$ ve $24.1 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca β -Sitosterol'ün tirozinaz enzim üzerinde de güçlü inhibitör etkisinin olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (327, 328). Tez kapsamında *B. integrifolia*'nın kloroform ekstresinden β -Sitosterol elde edilmesine rağmen; ekstrenin tirozinaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin yüksek olmadığı gözlenmiştir (Tablo 15). Türlerin kloroform ekstresinin kolinesteraz enzimleri üzerindeki inhibitör etkisilerinin ise iyi olduğu gözlenmiştir (Tablo 16).

Kanser tedavisinde önemli sorunlardan biri, kullanılan ilaçlara karşı ortaya çıkan çoklu ilaç direnci (MDR)'dir Hücre membranında taşıyıcı olarak bulunan P glikoproteininin, MDR'nin gelişiminde rol alan etmenlerden biri olduğu ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda β -Sitosterol'ün MDR1 geni tarafından kodlanan bu proteini baskıladığı ve böylece kanser tedavisini desteklediği bildirilmiştir (312, 330). Prostat, kolon ve göğüs kanseri hücre hatları üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, β -

Sitosterol'ün β -katenin ve PCNA gibi proteinlerin ekspresyonunu azaltarak veya Fas miktarını, kaspaz-8 aktivasyonunu, ERK ve MAPK fosforilasyonunu artırarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (331-335).

Barbarea cinsi üzerinde yapılan literatür taramalarında, bu cinse ait türlerin rozmarinik asit içerdiğine yönelik herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Tez kapsamında yapılan çalışmada, *Barbarea* türlerinden ilk kez rozmarinik asit izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Rozmarinik asit, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, nöroprotektif ve anti-inflamatuar etki gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip önemli bir fenolik bileşiktir (336, 337). Rozmarinik asitin antioksidan etkisi, yapısında bulunan hidroksil gruplarının serbest radikallerle hidrojen bağı oluşturması ve bu sayede radikal süpürücü etki göstermesi ile ilişkilendirilmektedir (336).

Yapılan çalışmalarda, rozmarinik asitin, dopaminerjik hücrelerde, H_2O_2 ile indüklenmiş reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve apoptotik hücre ölümünü önemli ölçüde azaltarak, nöronları oksidatif strese karşı koruduğu ve bu sayede nöroprotektif etkiye katkıda sağladığı gösterilmiştir (336). Ayrıca tirozinaz ve kolinesteraz enzimi üzerinde güçlü inhibitör etkinliği olduğu bildirilmektedir (336-339). Tez kapsamında *B. integrifolia*'nın etil asetat ekstresinden rozmarinik asit elde edilmesine rağmen; ekstrenin tirozinaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin yüksek olmadığı gözlenmiştir.

Yapılan literatür taramalarında, *Barbarea* türlerinden flavonoit olarak kemferol, kemferol 3-O- β -D-glukofuranozit, kemferol 3-O- β -D-glukopiranozit, ve kemferol-3-O-(2,6-di-O- β -D-glukopiranozil)- β -D-glukopiranozit izole edildiğine rastlanmıştır (25-27). Tez kapsamında saflaştırılan Kemferol 7-O- α -L-ramnozit-3-O- β -D-((2-O- β -D-glukoil)- β -D-glukoil) bileşiğinin Brassicaceae familyasına ait farklı türlerde bulunduğunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen; *Barbarea* türlerinden elde edildiğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır (340, 341). Tez çalışmasında, bu türlerden bileşiğin izolasyonu ilk kez gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması ile birlikte, 3 *Barbarea* türü üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş olup; çalışmalardan elde edilen veriler, bu türlerle ilgili var olan literatür boşluğunun doldurulmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, yapılan biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçları, türlerin iyi bir antioksidan, antimikrobiyal

kapasiteye, güçlü sitotoksik etkiye ve tirozinaz, AChE ve BuChE enzimleri üzerinde orta seviyede inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler, türlerin doğal kaynaklı ilaç geliştirme çalışmalarında potansiyel kaynaklar olabileceğini göstermesinin yanında, türlerle ilgili yapılacak daha ileriki çalışmalara ışık tutması açısından önem arz etmektedir.



8. KAYNAKLAR

1. Kendir G, Güvenç A (2010). Etnobotanik ve Türkiye’de yapılmış etnobotanik çalışmalara genel bir bakış. Hacettepe Üniversitesi Dergisi 30: 48-80.
2. Kan Y, Arslan N (2001). *Datura stramonium* L’nin botanik varyetelerinin farklı organlarının total alkaloid miktarları ve verimi yönünden karşılaştırılması. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi 30: 1-11.
3. Bayramoğlu M. (2013). *Rosa pisiformis*’in antioksidan, antiradikal aktivitesinin ve izoproterenol ile okdidatif stres oluşturulan ratlarda antioksidan etkisinin belirlenmesi. Doktora tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
4. Ayan AK, Çalışkan Ö, Çırak C (2006). Isırganotu (*Urtica* spp.)’nun ekonomik önemi ve tarımı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 21: 357-363.
5. Diri HA (2006). Uçucu bileşenlerin karakterizasyonu ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
6. Baytop T (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey, University of Istanbul, Istanbul, 273.
7. Lamond J (1978). *Primula* L. (Primulaceae). In: Davis PH, (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh: Edinburgh University Press, 6: 112-120.
8. Zeybek N, Zeybek U (1994). Kapalı tohumlu bitkiler (Angiospermae) sistematigi ve önemli maddeleri. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları 2: 216-217.
9. Al-Shehbaz İ.A, Mutlu B, Dönmez A (2007). The Brassicaceae (Cruciferae) of Turkey, updated. Turkish Journal of Botany 31: 327-336.
10. Davis PH, Parris BS (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Editör: Davis, P.H. Edinburgh, Edinburgh University Press, 1: 433-438.
11. Davis PH, Parris BS (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Editör: Davis, P.H. Edinburgh, Edinburgh University Press, 10: 382-383.

12. Agerbirk N, Olsen CE (2015). Glucosinolate hydrolysis products in the crucifer *Barbarea vulgaris* include a thiazolidine-2-one from a specific phenolic isomer as well as oxazolidine-2-thiones. *Phytochemistry* 115: 143-151.
13. Bianco G, Agerbirk N, Losito I, Cataldi TR (2014). Acylated glucosinolates with diverse acyl groups investigated by high resolution mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation. *Phytochemistry* 100: 92-102.
14. Seo B, Yun J, Lee S, Kim M, Hwang K, Kim J, Moon D (1999). Barbarin as a new tyrosinase inhibitor from *Barbarea orthoceras*. *Planta Medica* 65: 683-686.
15. Pedras MSC, Alavi M, To QH (2015). Expanding the nasturlexin family: Nasturlexins C and D and their sulfoxides are phytoalexins of the crucifers *Barbarea vulgaris* and *B. verna*. *Phytochemistry* 118: 131-138.
16. Barillari J, Gueyrard D, Rollin P, Iori R (2001). *Barbarea verna* as a source of 2-phenylethyl glucosinolate, precursor of cancer chemopreventive phenylethyl isothiocyanate. *Fitoterapia* 72: 760-764.
17. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
18. Toribio A, Boudesocque L, Richard B, Nuzillard JM, Renault JH (2011). Preparative isolation of glucosinolates from various edible plants by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography. *Separation and Purification Technology* 83: 15-22.
19. Matthäus B, Luftmann H (2000). Glucosinolates in members of the family Brassicaceae: separation and identification by LC/ESI-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2234-2239.
20. Andersson AA, Merker A, Nilsson P, Sørensen H, Aman P (1999). Chemical composition of the potential new oilseed crops *Barbarea vulgaris*, *Barbarea verna* and *Lepidium campestre*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 179-186.

21. Badenes-Pérez FR, Reichelt M, Gershenzon J, Heckel DG (2011). Phylloplane location of glucosinolates in *Barbarea* spp. (Brassicaceae) and misleading assessment of host suitability by a specialist herbivore. *New Phytologist* 189: 549-556.
22. Agerbirk N, Olsen CE, Nielsen JK (2001). Seasonal variation in leaf glucosinolates and insect resistance in two types of *Barbarea vulgaris* ssp. *arcuata*. *Phytochemistry* 58: 91-100.
23. Agerbirk N, Petersen BL, Olsen CE, Halkier BA, Nielsen JK (2001). 1,4-Dimethoxyglucobrassicin in *Barbarea* and 4-hydroxyglucobrassicin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1502-1507.
24. Agerbirk N, Olsen CE, Heimes C, Christensen S, Bak S, Hauser TP (2015). Multiple hydroxyphenethyl glucosinolate isomers and their tandem mass spectrometric distinction in a geographically structured polymorphism in the crucifer *Barbarea vulgaris*. *Phytochemistry* 115: 130-142.
25. Senatore F, Dagostin M, Dini I (2000). Flavonoid glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2659-2662.
26. Fursa NS, Litvinenko VI, Krivenchuk PE (1969). Flavonoids of *Armoracia rusticana* and *Barbarea arcuata*. *Chemistry of Natural Compound* 5: 270-270.
27. Dalby-Brown L, Olsen CE, Nielsen JK, Agerbirk N (2011). Polymorphism for novel tetraglycosylated flavonols in an eco-model crucifer, *Barbarea vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 6947-6956.
28. Augustin JM, Bak SD, Shinoda T, Sanmiya K, Nielsen JK, Khakimov B, Hauser TP (2012). UDP-glycosyltransferases from the UGT73C subfamily in catalyse saponin 3-O-glucosylation in saponin-mediated insect resistance. *Plant Physiology* 160:1881-95.
29. Nielsen NJ, Nielsen J, Staerk D (2010). New resistance-correlated saponins from the insect-resistant crucifer *Barbarea vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5509-5514.

30. Agerbirk N, Olsen CE, Bibby BM, Frandsen HO, Brown LD, Nielsen JK, Renwick JAA (2003). A saponin correlated with variable resistance of *Barbarea vulgaris* to the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1417-1433.
31. Shinoda T, Nagao T, Nakayama M, Serizawa H, Koshioka M, Okabe H, Kawai A (2002). Identification of a triterpenoid saponin from a crucifer, *Barbarea vulgaris*, as a feeding deterrent to the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 587-599.
32. Agerbirk N, De Nicola GR, Olsen CE, Müller C, Iori R (2015). Derivatization of isothiocyanates and their reactive adducts for chromatographic analysis. *Phytochemistry* 118: 109-115.
33. Kuzina V, Nielsen JK, Augustin JM, Torp AM, Bak S, Andersen SB (2011). *Barbarea vulgaris* linkage map and quantitative trait loci for saponins, glucosinolates, hairiness and resistance to the herbivore *Phyllotreta nemorum*. *Phytochemistry* 72: 188-198.
34. Khakimov B, Amigo JM, Bak S, Engelsen SB (2012). Plant metabolomics: resolution and quantification of elusive peaks in liquid chromatography–mass spectrometry profiles of complex plant extracts using multi-way decomposition methods. *Journal of Chromatography* 1266: 84-94.
35. Khakimov B, Tseng LH, Godejohann M, Bak S, Engelsen SB (2016). Screening for triterpenoid saponins in plants using hyphenated analytical platforms. *Molecules* 21: 1614.
36. Fraisse D, Carnat A, Viala D, Pradel P, Besle JM, Coulon JB, Lamaison JL (2007). Polyphenolic composition of a permanent pasture: variations related to the period of harvesting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 2427-2435.
37. Greer MA, Whallon J (1961). Antithyroid effect of barbarin (phenylthiooxazolidone), a naturally-occurring compound from *Barbarea*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 107: 802-804.

38. Ribnicky DM, Dey M, Raskin I (2010). U.S. Patent No. 7,838,045. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
39. Dey M, Ribnicky D, Kurmukov AG, Raskin I (2006). In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of a seed preparation containing phenethylisothiocyanate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317: 326-333.
40. Hur J, Yoo M, Shin DB, Lee S (2013). Inhibition of nitric oxide production corresponds to the sulforaphane content in Korean shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris*) and related species in BV-2 cell. *Food Science and Biotechnology* 22: 1085-1089.
41. Badenes Perez FR, Gershenzon J, Heckel DG (2014). Insect attraction versus plant defense: young leaves high in glucosinolates stimulate oviposition by a specialist herbivore despite poor larval survival due to high saponin content. *PLoS One* 9: 95766.
42. Nielsen JK, Nagao T, Okabe H, Shinoda T (2010). Resistance in the plant, *Barbarea vulgaris*, and counter-adaptations in flea beetles mediated by saponins. *Journal of Chemical Ecology* 36: 277-285.
43. Davis PH (1965-1985). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 1: 248. Edinburgh University Press, Edinburgh.
44. Agerbirk N, Olsen CE (2011). Isoferuloyl derivatives of five seed glucosinolates in the crucifer genus *Barbarea*. *Phytochemistry* 7: 610.
45. Baytop T (1984). *Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün)*. University of İstanbul, İstanbul, 417.
46. Halliwell B, Gutteridge MC (1985). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Journal Biochemistry* 219: 1-14.
47. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Turkish Journal of Biochemistry* 31: 51-56.
48. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology* 39: 44-84.

49. Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri Gıda Mühendisliği Dergisi 32-35.
50. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. New York.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. New York, 10-121.
52. Ali ATMM, Al-Swayeh OA, Al-Rashed RS (1996). Role of oxygen-derived free radicals on gastric mucosal injury induced by ischemia reperfusion. Saudi J Gastroenterol 2: 19-28.
53. Bagchi K, Puri S (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. East Mediterr Health J 4: 350-360.
54. Cadenas E (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. Annual Review of Biochemistry 58: 79-110.
55. Nagendrappa CG (2005). An appreciation of free radical chemistry-3. free radicals in diseases and health. Resonance 10: 65-74.
56. Pham Huy LA, He H, Pham-Huyc C (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. International Journal of Biomedical Science 4: 89-96.
57. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. International Journal of Pharmaceutical Science and Research 1: 185-192.
58. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. International Journal of Pharmaceutical Science and Research 3: 91-100.
59. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 4: 50-59.
60. Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları Konya.

61. Miser E (2011). Çeşitli bitkisel halk ilaçlarının antioksidan aktivite yönünden değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
62. Nordberg J, Arner ESJ (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1287-1312.
63. Koç YL (2012). Bazı bitki ekstrelerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileriyle, kanserli dokularda adenozin deaminaz enzimi üzerine etkisi. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
64. Lee J, Koo N, Min DB (2004). reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3: 21-33.
65. Nawar WW (1996). Lipids. In *Food Chemistry*, O.R. Fennema (Ed), Marcel Dekker, New York, 225-319.
66. Kojo S (2004). Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 11: 1041-1064.
67. Boots AW, Haenen GMMR, Bast A (2008). Health effect of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 585: 325-337.
68. Halliwell B, Gutteridge MC (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Anal of the Newyork Academy of Sciences* 899: 136-147.
69. Gutteridge JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41: 1819-1828.
70. Kılınç K, Kılınç A (2002). Oksijen toksisitesinin araç molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 33: 110-118.
71. Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress?. *Metabolism* 49: 3-8.
72. Meram I, Aktaran Ş (2002). Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri. *Arşiv* 11: 299-304.

73. Shih MK, Hu ML (1999). Relative roles of metal ions and singlet oxygen in UVA-induced liposomal lipid peroxidation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 77: 225-230.
74. Das KC (2000). Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: Redox independent functions. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 277: 443-447.
75. Burtis CA, Ashwood ER(1999). *Tietz textbook of clinical chemistry*. W.B. Saunders Company, Amerika.
76. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS (1996). *Basic medical biochemistry a clinical approach*. Lippincott, Baltimore, Maryland.
77. Tietz NW (1995). *Clinical guide to laboratory tests*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Amerika.
78. Rubbo H, Radı R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, Eiserich JP, Freeman BA (2000). Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry* 275: 10812-10818.
79. Ekici L, Sağdıç O (2008). Free radicals and their inhibitions with antioxidant foods. *Gıda* 33: 251-260.
80. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of Association Physicians of India* 52: 794-804.
81. Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
82. Fang YZ, Yang S, Wu G (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.
83. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4: 118–126.
84. Stefanis L, Burke RE, Greene LA (1997). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Current Opinion in Neurology* 10: 299-305.

85. Halliwell B (1994). Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews* 52: 253-265.
86. Bacanlı M (2014). Bitkisel kaynaklı fenolik yapıdaki bileşiklerin olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
87. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Veteriner Fakültesi Dergisi* 1: 65-76.
88. Devasagayam TPA, Boloor KK, Ramsarma T (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (mini review). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 40: 300-308.
89. Hawkins CL, Davies MJ (1998). Degradation of hyaluronic acid, poly- and monosaccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radical Biology And Medicine* 24: 1396-1410.
90. Sen S, Chakraborty R (2011). The role of antioxidants in human health. *American Chemical Society* 1: 1-37.
91. Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 54: 176-186.
92. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF (1987). The function of catalase-bound NADPH. *Journal of Biological Chemistry* 262: 660-666.
93. Limon-Pacheco J, Gonshebb ME (2009). The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674: 137-147.
94. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van-Zanden J, Van Bladeren PJ (2001). The interplay of glutathione related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10: 141- 152.
95. Deaton CM, Marlin DJ (2003). ExerciseAssociated Oxidative Stress. *Clinical Techniques Equine Practice* 2: 278-291.

96. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry* 37: 1932- 1937.
97. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research* 18: 1-11.
98. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (2002). İnsan biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara.
99. Hevia D, Mayo JC, Tan DX, Rodriguez-Garcia A, Sainz RM (2014). melatonin enhances photo-oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by an antioxidant reaction that renders N1Acetyl-N2-Formyl-5-Methoxykynuramine (AFMK). *Plos One* 9: 109-257.
100. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I (2004). Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin - the antioxidant proteins. *Life Sciences* 75: 2539–2549.
101. Burtis CA, Ashwood ER (2005). Vitaminler. Çeviren: Aslan D. Eds. Klinik Kimyada Temel İlkeler. Palme Yayınları, Ankara.
102. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine Pharmacotherapy* 57: 145-155.
103. Kumar AN, Aruna P, Naidu JN, Kumar R, Srivastava AK (2015). Review of concepts and controversies of uric acid as antioxidant and pro-oxidant. *Archives Medical Review Journal* 24: 19-40.
104. Waring WS (2002). Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. *QJM* 95: 691-693.
105. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 582: 1783-1787.

106. Lavelli V, Peri C, Rizzola A (2000). Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copperinduced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1442-1448.
107. Duthie GG, Wahle KWJ, James WPT (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews* 2: 51-62.
108. Shahidi F, Naczsk M (1995). *Food phenolics*. A Technomic Publication, USA.
109. Khan MH, Shahidi F (2001). Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chemistry* 75: 421-437.
110. Hall C (2001). Source of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. Pokorny J, Yanislhlieva N, Gordon M editors. *Antioxidants in Food. Practical Applications*. Cambridge, Woodhead Publishing Ltd, 169-219.
111. Breinholt VM, Mølck AM, Svendsen GW, Daneshvar B, Vinggaard AM, Poulsen M (2003). Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazo [4,5-quinoline (IQ)] on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1315-1323.
112. Dündar Y, Aslan R (1999). Oksidan-Antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 9: 32-39.
113. Carr AC, 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.
114. Dündar Y, Aslan R (1999). Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi* 2: 134-142.

115. Hatano T, Edamatsu R, Mori A, Fujita Y, Yasuhara E (1989). Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. Chemical of Pharmaceutical Bulletin 37: 2016-2021.
116. Burak M, Çimen Y (1999). Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri 19: 296-304.
117. Satué-Gracia MT, Heinonen M, Frankel EN (1997). Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin Liposome Systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 80: 1063-1072.
118. Liu RH (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. American Society for Nutritional Sciences 134: 3479-3484.
119. Kaya Ö (2011). Investigation of antioxidant and antimicrobial effects of *Plantago major* leaves. Yüksek lisans tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
120. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik ES, Bektaşoğlu B, Berker IK, Özyurt D (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 12: 1496-1547.
121. Okan OT, Varlıbaş H, Öz M, Deniz İ (2013). Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler. Kastamonu Üni Orman Fakültesi Dergisi 13: 48-59.
122. Albayrak S, Sağdıç O, Aksoy A (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri. Enstitüsü Dergisi 26:401-409.
123. Mot CA, Dumitrescu SR, Sarbu C (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-VIS spectroscopic data. Journal of Food Composite and Analysis 24: 516-522.
124. Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, Bora U (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Science Direct Food Research 41: 1-15.

125. Özkan MT (2015). *Primula vulgaris* (Çuha çiçeği) ekstraktlarının HPLC ile karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
126. Yıldız L (2007). Bazı bitki örneklerinde antioksidan kapasitenin spektrofotometrik ve kromatografik tayini. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
127. Prior RL, Wu X, Karen S (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 53: 4290-4302.
128. Özyürek M, Güçlü K, Apak R (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry* 30: 652-664.
129. Khan R, Islam, B, Akram M (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 14: 586-97.
130. Quave CL, Plano LRW, Pantuso T, Bennett BC (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 118: 418-28.
131. Köse Odabaş E, Vural T (2009) Türkiye'ye endemik iki bitki türünden elde edilen etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri. *Turkish Journal of Biology* 16: 183-189.
132. Karou D, Nadembega WMC, Ouattara L, Ilboudo DP, Canini A, Nikiema JB, Simporé J, Colizzi V, Traore A (2007). African ethnopharmacology and new drug discovery. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 1: 61-69.
133. Iwu MM, Duncan AR, Okunji CO (1999). New antimicrobials of plant origin. Çeviren: J.Janick, ASHS Press, Alexandria, 457-62.
134. Shinji M (1993). Research on antibiotic screening in japan over the last decade: A Producing microorganism approach. *Actinomycetol* 7:100-106.

135. Silva NCC, Fernandes JA (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 16: 402-413.
136. Cowan MM (1999). Plant Products as Antimicrobial Agent. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564.
137. Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 487-491.
138. Boulekbache-Makhlouf L, Slimani S, Madani K (2012). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products* 41: 85-89.
139. Cushnie TPT, Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356.
140. Kahraman A, Serteser M, Köken T (2002). Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 3: 01-08.
141. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008). Biological effects of essential oils-A Review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.
142. Simic A, Sokovic MD, Ristic M, Grujic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin PD (2004). The chemical composition of some lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research* 18: 713-717.
143. Opalchenova G, Obreshkova D (2003). Comparative studies on the activity of basil-an essential oil from ocimum *Basilicum* against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods* 54: 105-110.
144. Cheesman L, Nair JJ, Van Staden J (2012). Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 140: 405-408.

145. Chamorro C, Boerman MA, Arnusch CJ, Breukink E, Pieters RJ (2012). Enhancing membrane disruption by targeting and multivalent presentation of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes* 1818: 2171-2174.
146. Ciocan ID, Bara II (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Sectionea genetica Biologie Moleculara* 8: 151-156.
147. Tüzün C (1997). *Biyokimya*. Palme Yayınları, Ankara, 124-125.
148. Park TG, Hoffmann AS (1993). Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized β -Galactosidase in temperature sensitive hydrogel beads. *Enzyme Microbial Technology* 15: 476-556.
149. Tekman Ş, Öner N (1981). *Genel Biyokimya*. Fatih Yayınevi, İstanbul, 351- 367.
150. Ulakoğlu Zengin E. Enzimler. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari>. (son erişim tarihi: 05.03.2018)
151. Bingöl G (1977). *Vitaminler ve enzimler*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara.
152. Calay Ö (2010). Tirozinaz enziminin bazı tıbbi bitkiler tarafından inhibisyonu. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
153. Whitaker JR (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker Inc., America, pp. 517-520.
154. Badem M (2017). Akkuş (Ordu) ve köylerinde bulunan bitkilerin etnobotanik ve etnomedikal özelliklerin belirlenmesi ve halk ilacı olarak kullanılan türlerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
155. Nelson JM, Dawson CR (1944). Tyrosinase. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology* 4: 99-152.
156. Çiçek H (2000). Beyaz çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

157. Çörtenlioğlu E (2006). Tirozinaz enzimi kullanılarak L-DOPA üretimi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
158. Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ, Pavel S, Ramsden CA, Riley PA (1997). Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26226–26235.
159. Witkop GJ (1985). Inherited disorders of pigmentation. *American Journal of Clinical Dermatology* 3: 70-13.
160. Dec J, Bollag JM (1995). Effect of various factors on dehalogenation of chlorinated phenols anilines during oxidative coupling. *Environmental Science Technology* 29: 657-663.
161. Özçelik D (2005). mantardan (*Agaricus bisporus*) tirozinaz enziminin izole edilmesi ve fenol giderilmesinde kullanılması. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
162. Kim YJ, Uyama H (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 707-1723.
163. Kubo I, Kinst Hori I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sánchez Y, Ogura T (2000). Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8: 1749-55.
164. Badria FA, El-Gayyar MA (2001). A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. *Boll. Chim. Farma* 140: 267–71.
165. Kubo I, Yokokawa Y (1992). Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*. *Phytochemistry* 31: 1075-1077.
166. Kubo I, Kinst Hori, I (1999). Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4121-4125.

167. Kim YM, Yun J, Lee CK (2002). Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds: inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 16340-16344.
168. Kubo I, Yokokawa Y, Kinst-Hori I (1995). Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. *Journal of Natural Product* 58: 739-743.
169. Adhami MV, Khan N, Mukhtar H (2009). Cancer chemoprevention by pomegranate: Laboratory and clinical evidence. *Nutrition and Cancer* 61: 811-815.
170. Kim JH, Sapers GM, Choi SW (1998). Identification of tyrosinase inhibitor from *Galla rhois*. *Journal of Food Science and Biotechnology* 7: 56-59.
171. Parvez S, Kang M, Chung HS (2006). A review: Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research* 20: 921-934.
172. Kubo I, Chen QX, Nihei K (2003). Molecular design of antibrowning agents: Antioxidative tyrosinase inhibitors. *Food Chemistry* 81: 241-247.
173. Lim JY, Ishiguro K, Kubo I (1999). Tyrosinase inhibitory *p*-coumaric acid from *Ginseng* leaves. *Phytotherapy Research* 13: 371-375.
174. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ (1998). Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysics Research Communication* 243: 801-803.
175. Parvez S, Kang M, Chung HS, Bae H (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health, cosmetic and agriculture industries. *Phytotherapy Research* 21: 805-816.
176. Schallreuter KU, Wood JW (1990). A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Archives of Dermatological Research* 282: 168-171.
177. Wiley JW, Tyson GN, Steller JS (1942). The configuration of complex kojates formed with some transition elements as determined by magnetic susceptibility measurements. *Journal of American Chemical Society* 64: 963-964.
178. Niwa Y, Akamatsu H (1991). Kojic acid scavenges free radicals while potentializing leukocyte functions including free radical generation. *Inflammation* 15: 303-315.

179. Geotgwileyhebur M, Kermasha S (1996). Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metalllothionein from *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 42: 935-94.
180. Parrish FW, Wiley BJ, Simmons EG, Long LJ (1966). Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Journal of Applied Microbiology* 14: 139.
181. Friedman M (1996). Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 631-653.
182. Sugumaran M (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis comparison with insect cuticular sclerotization. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 293: 4-10.
183. Barrett FM (1984). Wound-healing phenoloxidase in larval cuticle of *Calpodes ethulius* (Lepidoptera: Hesperidae). *Canadian Journal of Zoology* 62: 834-838.
184. Irmak MK, Temel İ (2000). Melanin ve kimyasallar. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 7: 87-91.
185. Spritz RA, Hearing VJR (1994). Genetic disorders of pigmentation. *Advances in Human Genetics* 22: 1-45.
186. Frank E (1995), Treatment of melasma with depigmenting agents. In: *Melasma: New approaches to treatment*. Martin Dunitz, London, 9-15.
187. Baharav E, Merimski O, Shoenfeld Y (1996). Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clinical Experimental Immunology* 105: 84-88.
188. Orhan DD, Şenol FS, Hosbas S, Orhan IE (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 Products* 62: 341-349.
189. Hasegawa T (2010). Tyrosinase-expressing neuronal cell line as in vitro model of parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 1082-1089.
190. Xu Y, Stokes AH, Freeman WM, Kumer SC, Vogt BA, Vrana KE (1997). Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Brain Res Mol Brain Res* 45: 159-62.

191. Wilson IB, Nachmansohn D (1954). Ion transport across membranes. Acedemic Pres Inc, New York, 35.
192. Akman E (2007). Van gölü balığının beyin ve karaciğerinden asetilkolinesteraz enziminin afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
193. Carlson P (1992). Tıp ve Fen Bilimleri İçin Biyokimya. Kırıkkale, 420
194. Temel HE (2008). Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi. Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
195. Jack C, Waymire PD (2018). Acetylcholine Neurotransmission. <http://nba.uth.tmc.edu/neuroscience>. Son erişim tarihi: 21.09.2018.
196. Chang MS, Strichartz GR (2005). Cholinergic pharmacology (Editörler: Golan DE, Tashjian AH). Principles of Pharmacology, Wolters Kluwer Company, New York, 89-93.
197. Çinkılıoğlu E (2007). Cyprinus Carpio’da beyin dokusunda fenthionun antioksidant savunma sistemi, lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesine N-Asetilsistein modülatörlüğünde etkileri. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
198. Allam AR, Sridhar GR, Das UN (2007). Elevated butrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer’s disease. Medical Hypothesis 69: 1272-1276.
199. Neşe Ç (2003). Butrylcholinesterase: Structure and physiological importance. Turkish Journal of Biochemistry 28: 54-61.
200. David G, Wilkinson PT, Schwam E, Parrish JP (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of alzheimer’s disease. The relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. Drugs Aging 21: 453-478.
201. Koçancı FG, Aslım B (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences 6: 19-35.

202. Harel M, Schalk I, Ehret Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Sussman JL (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 9031-9035.
203. Arsava M, Selekler K (2003). Alzheimer Hastalığı ve Diğer Demanslar. Güneş Kitabevi, İstanbul. 1-3.
204. Lleo A, Greenberg S.M, Growdon JH (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine* 57: 513-533.
205. Alzheimer's disease. <http://mayoclinic.com/health/alzheimers-disease/DS00161>, Son erişim tarihi: 13.03.2018.
206. Toiber D, Berson A, Greenberg D, Melamed Book N, Diamant S, Soreq H (2008). N-Acetylcholinesterase induced apoptosis in Alzheimer's disease. *PloS One* 3:3108.
207. Silveyra MX, García Ayllon MS, Barreda EG, Small DH, Martinez S, Avila J, Saez Valero J (2012). Altered expression of brain acetylcholinesterase in FTDP-17 human tau transgenic mice. *Neurobiology of aging* 33: 624-e23.
208. Beyreuther K, Christen Y, Masters CL (2001). Neurodegenerative disorders: Loss of function through gain of function. Springer Science & Business Media.
209. Rubio Perez JM, Morillas Ruiz JM (2011). A review: İnflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal* 2012: 1-15.
210. Jeger RV (2013). Mens sana in corpore sano revisited. *European Heart Journal* 34: 2580-2581.
211. Zhang HY, Tang XC (2000). Huperzine B, a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Neuroscience letters* 292: 41-44.
212. Gong J, Ju A, Zhou D, Li D, Zhou W, Geng W, Song M (2015). Salvianolic acid Y: A new protector of PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury from *Salvia officinalis*. *Molecules* 20: 683-692.

213. Wang Y, Pan WL, Liang WC, Law WK, Tsz Ming ID, Chi Cheong Wan D (2013). Acetylshikonin, a novel AChE inhibitor, inhibits apoptosis via upregulation of heme oxygenase-1 expression in SH-SY5Y cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013.
214. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine 14: 289-300.
215. Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, Cho JH (2004). Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. Phytomedicine 11: 544-548.
216. Ingkaninan K, Best D, Heijden VD, Hofte AJP, Karabatak B, Irth H, Tjaden UR, Greef VD, Verpoorte R (2000). High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. Journal of Chromatography 872: 61-73.
217. Ingkaninan K, Temkitthawon, P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. Journal of Ethnopharmacology 89: 261-264.
218. Orhan I, Sener B, Choudhary MI, Khalid A (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 91: 57-60.
219. Das A, Shanker G, Nath C, Pal R, Singh S, Singh HK (2002). A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba* anticholinesterase and cognitive enhancing activities. Pharmacology Biochemical and Behavior 73: 893-900.
220. Perry EK, Pickering AT, Wang WW, Houghton PJ, Perry NSL (1998). Medicinal plants and Alzheimer's disease: Integrating ethnobotanical and contemporary scientific evidence. Journal of Alternative and Complementary Medicine 4: 419-428.

221. Ahmad W, Ahmad B, Ahmad M, Iqbal Z, Nisar M, Ahmad M (2003). In vitro inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase by crude extract of *Myricaria elegans* Royle. Journal of Biological Sciences 3: 1046-1049.
222. Siqueira IR, Fochesatto C, Lourenco da Silva A, Nunes DS, Battastini AM, Netto CA, Elisabetsky E (2003). *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian nerve tonic possesses anticholinesterase activity. Pharmacology Biochemical and Behavior 75: 645-650.
223. Hillhouse BJ, Ming DS, French CJ, Neil Towers GH (2004). Acetylcholine esterase inhibitors in *Rhodiola rosea*. Pharmaceutical Biology 42: 68-72.
224. Perry N, Court G, Bidet N, Court J, Perry E (1996). European herbs with cholinergic activities: Potential in dementia therapy. International Journal of Geriatric Psychiatry 11: 1063-1069.
225. Perry NSL, Houghton PG, Theolad AE, Jenner P, Perry EK (2000). In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. Journal of Pharmacy and Pharmacology 52: 895-902.
226. Perry NSL, Houghton PG, Sampson J, Theolad AE, Hart S, Lis Balchin M, Hoult JRS, Evans P, Jenner P, Milligan S, Perry EK (2001). In vitro activities of *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. Journal of Pharmacy and Pharmacology 53: 1347-1356.
227. Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. Life Sciences 71: 2521-2529.
228. Rahman AU, Choudhary MI (2001). Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores a theory of memory. Pure and Applied Chemistry 73: 555-560.

229. Andrade MT, Lima JA, Pinto AC, Rezende CM, Carvalho MP, Epifanio RA (2005). Indole alkaloids from *Tabernae montana australis* (Muell. Arg) miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 13: 4092-4095.
230. Kim DK (2002). Inhibitory effect of corynoline isolated from the aerial parts of *Corydalis incisa* on the acetylcholinesterase. *Archives of Pharmacal Research* 25: 817-819.
231. Rhee IK, Meent MV, Ingkaninan K, Verpoorte R (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography* 915: 217-223.
232. Rizzi A, Schuh R, Bruckner A, Cvitkovich B, Kremser L, Jordis U, Frohlich J, Kuenburg B, Czollner L (1999). Enantiomeric resolution of galantamine and related drugs used in anti-Alzheimer therapy by means of capillary zone electrophoresis employing derivatized cyclodextrin selectors. *Journal of Chromatography* 730: 167-175.
233. Tang XC, Kindel GH, Kozikowski AP, Hanin I (1994). Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine-A on rat brain cholinergic function *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology* 44: 147-155.
234. Ashani Y, Grunwald J, Kronman C, Velan B, Shafferman A (1994). Role of tyrosine in the binding of huperzine A to the active site of human acetylcholinesterase. *Molecular Pharmacology* 45: 555-560.
235. Kim DK, Lee KT, Baek NI, Kim SH, Park W, Lim JP, Shin TY, Eom DO, Yang JH, Eun JS (2004). Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Archives of Pharmacal Research* 27, 1127-1131.
236. Karczmar A (1998). Invited review: Anticholinesterases dramatic aspects of their use and misuse. *Neurochemistry International* 32: 401-411.
237. Roddick JG (1989). The acetylcholinesterase inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *Phytochemistry* 28: 2631-2634.

238. Lee KY, Sung SH, Kim YC (2003). New acetylcholinesterase inhibitory pregnane glycosides of *Cynanchum atratum* roots. *Helvetica Chimica Acta* 86: 474-483.
239. Urbain A, Marston A, Queiroz EF, Ndjoko K, Hostettmann K (2004). Xanthones from *Gentiana campestris* as new acetylcholinesterase inhibitors. *Planta Medica* 70: 1011-1014.
240. Sung SH, Kang SY, Lee KY, Park MJ, Kim JH, Park JH, Kim YC, Kim J, Kim YC (2002). (+)- α -Viniferin, a stilbene trimer from *Caragana chamlaque* inhibits acetylcholinesterase. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 25: 125-127.
241. Chung YK, Heo HJ, Kim EK, Kim HK, Huh TL, Lim Y, Kim SK, Shin H (2001). Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L on the acetylcholinesterase. *Molecules and Cells* 11: 137-143.
242. Tuncer S, Demirci M (2011). Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 21: 141-149.
243. Ağrap B (2013). *Cinnamomum cassia* Bark ekstraktlarının oksidatif stres, sitotoksikite ve DNA hasarı üzerindeki etkilerinin akım sitometrisi ve comet yöntemi ile araştırılması. Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
244. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bredesen DE (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16: 1093-1107.
245. Tokur O, Aksoy A (2017). In vitro sitotoksikite testleri. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 6: 112-118.
246. Putnam K, Bombick D, Doolittle D (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro* 16: 599-607.
247. Björkman M, Klinge I, Birch AN, Bones AM, Bruce TJ, Johansen TJ, Stewart D (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health—Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* 72: 538-556.

248. Terao J, Kawai Y, Murota K (2008). Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 17: 291-293.
249. Nagao A (2009). Absorption and function of dietary carotenoids. *Forum Nutrition* 61: 55-63.
250. Steinbrecher A, Linseisen J (2009). Dietary intake of individual glucosinolates in participants of the EPIC-Heidelberg cohort study. *Annals of Nutrition and Metabolism* 54: 87-96.
251. Steinbrecher A, Nimptsch K, Hüsing A, Rohrmann S, Linseisen J (2009). Dietary glucosinolate intake and risk of prostate cancer in the EPIC-Heidelberg cohort study. *International Journal of Cancer* 125: 2179-2186.
252. Niles AL, Moravec RA, Riss TL (2009). In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current Chemical Genomics* 3: 33-41.
253. Giuseppe SA, Sorbello L, Saydam G, Banerjee D, Bertin, JR(2006). Cytotoxicity and cell growth analysis. *Cell Biology* 38: 315-324.
254. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunology Methods* 160: 81-88.
255. Fan F, Wood KV (2007). Bioluminescent assays for highthroughput screening. *Assay Drug Development Technologies* 5: 127-136.
256. Longo Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR (2006). Cytotoxicity and cell growth assays. *Cell biology: A laboratory handbook*. Ed: Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington.
257. Aruoma OI, Halliwell B, Dizdaroglu M (1989). Iron Ion-Dependent Modification of Bases in DNA by the Superoxide Radical Generating System Hypoxanthine/Xanthine Oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 264: 13024-13028.
258. Mossman T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.

259. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis (2005). Cytotoxic Compounds of Plant Origin Biological and Chemical Diversity. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy.
260. Balunas MJ, Kinghorn AD (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78: 431-441.
261. Petric RC, Braicu C, Raduly L, Zanoaga O, Dragos N, Monroig P (2015). Phytochemicals modulate carcinogenic signaling pathways in breast and hormone related cancers. *Onco Targets Ther* 8: 2053.
262. Açıkgöz, A, Yıldız, EA (2017). Meme Kanseri ve Fitokimyasallar. *Journal of Nutrition and Dietetics* 45: 77-82.
263. Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM (2006). Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer Properties. *FEBS Letters* 580: 533-538.
264. Siriwantanmetanon N, Fiebich BL, Efferth T, Prieto JM, Heinrich M (2010). Traditionally used Thai medicinal plants: In vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 197-207.
265. Heo BG, Park YJ, Park YS, Bae JH, Cho JY, Park K, Jastrzebski Z, Gorinstein S (2014). Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of *indigo plant*. *Industrial Crops and Products* 56: 9-16.
266. Malíkova J, Swaczynova J, Kolar Z, Strnad M (2008). Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 69: 418-426.
267. Steigerova J, Oklestkova J, Levkova L, Kolar Z, Strnad M (2010). Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico Biological Interactions* 188: 487-496.
268. Steigerova J, Rarova L, Okleestkova J, Krizova K, Levkova M, Svachova M, Kolar Z, Strnad M (2012). Mechanisms of natural brassinosteroid induced apoptosis of prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 50: 4068-4076.

269. Shah U, Shah R, Acharya S, Acharya N (2013). Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11: 16-23.
270. Greenwell M, Rahman PKSM (2015). Medicinal Plants: Their use in anticancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6: 4103-4112.
271. Neuss N, Gorman M, Hargrove W, Cone NJ, Biemann K, Büchi G, Manning RE (1964). Vinca alkaloids. XXI. The structures of the oncolytic alkaloids vinblastine (VBL) and vincristine (VCR). *Journal of the American Chemical Society* 86: 1440-1442.
272. Potmeisel M, Pinedo H (1995). Camptothecins: New anticancer agents. Boca Raton, Florida, CRC Press, 149-150.
273. Stahelin H (1973). Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. *European Journal of Cancer* 9: 215-21.
274. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93: 2325-2327.
275. Itokawa H, Wang X, Lee KH (2005). Homoharringtonine and related compounds. Editor: Cragg GM, Kingston, DGI, Newman D. *Anticancer agents from natural products*. Boca Raton, Florida, Brunner Routledge Psychology Press, Taylor Francis Group, 47-70.
276. Powell RG, Weisleder D, Smith CRJr, Rohwedder WK (1970). Structures of harringtonine, isoharringtonine, and homoharringtonine. *Tetrahedron Letter* 11: 815-18.
277. Cragg GM, Newman DJ (2005). Plants as source of anticancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72-79.
278. Pettit GR, Singh SB, Boyd MR, Hamel E, Pettit R, Schmit JM, Hogan F (1995). Antineoplastic agents. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5 and A-6. *Journal of Medicinal Chemistry* 38: 1666-72.

279. Skoog DA, West DM (1981). Principles of Instrumental Analysis.
280. Perçin S (2008). Bazı sülfonamitlerin elektrokimyasal ve kromatografik davranışlarının incelenmesi. Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
281. <https://akademik.ahievran.edu.tr/kullanicidosyalar/files/HPLC.pdf>
282. Rieux L, Sneekes E, Swart R (2011). Nano LC: Principles, evolution, and state of art of the technique. LC-GC North America 29: 926-934.
283. Kapçak E (2017). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile kanser tedavisinde kullanılan ilaçların miktar tayini ve ilaç-DNA etkileşimlerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
284. Petritis K, Chaimmault P, Elfaki, C, Dreux M (2000). Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography ion spray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography 896: 253-263.
285. Zacharis C, Tzanavaras P (2013). Liquid chromatography coupled to online post column derivatization for the determination of organic compounds: A review on instrumentation and chemistries. Analytica Chimica Acta 798: 1-24.
286. Hanekamp H, Boss P, Frei R (1982). Liquid chromatography detectors. Trends in Analytical Chemistry 1: 20-22.
287. Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158. 69.
288. Benzie IFF, Strain JJ (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology 299: 15-27.
289. Perez C, Pauli M, Bazerque P (1990). An antibiotic assay by the well agar method. Acta Biologia et Medicine Experimentalis 15: 113-115.

290. Woods GL, Brown Elliott BA, Desmond EP, Hall GS, Heifets L, Pfyffer GE, Ridderhof JC, Wallace RJ, Warren NC, Witebsky FG (2003). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard. NCCLS document M24, 23.
291. Cuendet M, Hostettman K, Potterat O, Dyatmiko W (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helvetica Chimica Acta 80: 1144-1152.
292. Likhitwitayawuid K, Sritularak B (2001). A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. Journal of Natural Product 64: 1457-1459.
293. Ellman GL, Courtney KD, Andres JV, Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7: 88-95.
294. George D, Mallery P (2010). SPSS for Windows Step by Step: A Simple Guide and Reference 17.0 Update. 10th Edition, Pearson, Boston.
295. Çeliker G (2017). Yüksek basınç sıvı kromatografisi yöntemi ile Türkiye’de halk tıbbında kullanılan bazı bitkilerin parmakizi kromatogramlarının elde edilmesi. Araştırma projesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Trabzon.
296. Güvenalp Z (1999). *Centranthus longiflorus* subsp. *longiflorus* bitkisi üzerinde fitokimyasal araştırmalar. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
297. Boğa M (2012). *Cirsium leucopsis* ve *Cirsium sipyleum* Bitkilerinden Sekonder Metabolitlerin Saflaştırılması, Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
298. Ferlinahayati F, Gultom RPJ, Herlina H, Eliza E (2017). Steroid compounds from *Gynura pseudochina* (Lour) DC. Molekul 12: 8-13.
299. Karaoğlu Sezen E (2011). Bazı *Origanum* türleri üzerinde farmakognozik çalışmalar. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

300. Sevindik Gökben H (2009). *Thymus praecox* opız subs. *Grossheimii* (Ronniger) *jalas* var. *grossheimii* üzerinde farmakognozik araştırmalar. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
301. Rösch D, Krumbein A, Mügge C, Kroh LW (2004). Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4039-4046.
302. Agerbirk N, Warwick SI, Hansen PR, Olsen CE (2008). Sinapis phylogeny and evolution of glucosinolates and specific nitrile degrading enzymes. Phytochemistry 69: 2937-2949.
303. İbrahim N, Allart Simon I, De Nicola G R, Iori R, Renault JH, Rollin P, Nuzillard JM (2018). Advanced NMR-based structural investigation of glucosinolates and desulfoglucosinolates. Journal of Natural Products 81: 323-334.
304. Çalış İ, Güvenç A, Armağan M, Koyuncu M, Gotfredsen CH, Jensen SR (2007). Iridoid glucosides from *Eremostachys moluccelloides* Bunge. Helvetica Chimica Acta 90: 1461-1466.
305. Agneta R, Rivelli AR, Ventrella E, Lelario F, Sarli G, Bufo SA (2012). Investigation of glucosinolate profile and qualitative aspects in sprouts and roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) using LC-ESI-hybrid linear ion trap with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 7474-7482.
306. Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural Food Chemistry 47: 3954-3962.
307. Demir S, Turan İ, Aliyazıcıoğlu R, Mısır S, Aliyazıcıoğlu Y. *Dianthus carmelitarum* ekstraktının antioksidan ve sitotoksik özelliklerinin incelenmesi. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 7: 41-50.

308. Kaur C, Kapoor HC (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science Technology* 36: 703-725.
309. Chear NJY, Khaw KY, Murugaiyah V, Lai CS (2016). Cholinesterase inhibitory activity and chemical constituents of *Stenochlaena palustris* fronds at two different stages of maturity. *Journal of Food and Drug Analysis* 24: 358-366.
310. Okonogi S, Chaiyana W (2012). Enhancement of anti-cholinesterase activity of *Zingiber cassumunar* essential oil using a micro emulsion technique. *Drug Discoveries Therapeutics* 6: 249-255.
311. Gironés Vilaplana R, Valentão P, Andrade PB, Ferreres F, Moreno DA, GarcíaViguera C (2012). Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential. *Food Chemistry* 134: 2090-2096.
312. Okello EJ, Leylabi R, McDougall GJ (2012). Inhibition of acetylcholinesterase by green and white tea and their simulated intestinal metabolites. *Food Function* 3:651-661.
313. Urbain A, Marston A, Grilo LS, Bravo J, Purev O, Purevsuren B, Batsuren D, Reist M, Carrupt PA, Hostettmann K (2008). Xanthones from *Gentianella amarella* ssp. *acuta* with acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities. *Journal of Natural Product* 71: 895-897.
314. Konrath EL, Santos Passos C, Klein Júnior LC, Henriques AT (2013). Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65:1701-1725.
315. Wanasundara JPD, Abeysekara SJ, McIntosh TC, Falk KC (2012). Solubility differences of major storage proteins of Brassicaceae oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists Society* 5: 869.
316. Böttcher C, Von Roepenack Lahaye E, Schmidt J, Clemens S, Scheel D (2009). Analysis of phenolic choline esters from seeds of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* by capillary liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 4: 466.

317. Niciforovic N, Abramovic H (2014). Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13: 34.
318. Perocco P, Iori R, Barillari J, Broccoli M, Sapone A, Affatato A, Paolini M (2002). In vitro induction of benzo (a) pyrene cell-transforming activity by the glucosinolate gluconasturtiin found in cruciferous vegetables. *Cancer Letters* 184: 65-71.
319. Okulicz M, Bialik I, Chichłowska J (2005). The time-dependent effect of gluconasturtiin and phenethyl isothiocyanate on metabolic and antioxidative parameters in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89: 367-372.
320. Chung L, Kelloff G, Steele V, Pittman B, Zang E, Jiao D, Rigotty J, Choi CI, Rivenson A (1996). Chemopreventive efficacy of arylalkyl isothiocyanates and N-acetylcysteine for lung tumorigenesis in Fischer rats. *Cancer Research* 56: 772-778.
321. Stoner GD, Morse MA (1997). Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. *Cancer Letters* 114: 113-119.
322. Dayalan Naidu S, Suzuki T, Yamamoto M, Fahey JW, Dinkova Kostova AT (2018). Phenethyl Isothiocyanate, a Dual Activator of Transcription Factors NRF2 and HSF1. *Molecular Nutrition Food Research* 62: 1700908.
323. Baskar AA, Al Numair KS, Gabriel Paulraj M, Alsaif MA, Muamar MA, Ignacimuthu S (2012). β -Sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine ninduced colon cancer. *Journal of Medicinal Food* 15: 335-343.
324. Sen A, Dhavan P, Shukla KK, Singh S, Tejovathi G (2012). Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -Sitosterol isolated from *Momordica charantia*. *Science Secure Journal of Biotechnology* 1: 9-13.

325. Bahadori MB, Dinparast L, Valizadeh H, Farimani MM, Ebrahimi SN (2016). Bioactive constituents from roots of *Salvia syriaca* L. acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking studies. South African Journal of Botany 106:1-4.
326. Ayaz M, Junaid M, Ullah F, Subhan F, Sadiq A, Ali G, Ovais M, Shahid M, Ahmad S (2017). Anti-Alzheimer's studies on β -Sitosterol isolated from *Polygonum hydropiper* L. Frontiers in Pharmacology 8: 697.
327. Panda P, Priyanka D, Goutam G (2018). Chemometric profile, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of Camel's foot creeper leaves (*Bauhinia vahlii*). Natural Product Research 32: 596-599.
328. Nuttiya W, Kaewamatawong R (2010). Chemical constituents from *Parinari anamense*. Biochemical Systematics and Ecology 38: 836-838.
329. Ovesnaa Z, Lkovaa AV, Thovaa KH (2004). Taraxasterol and β -Sitosterol: New naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. Neoplasma 51: 407.
330. Novotny L, Abdel Hamid ME, Hunakova L (2017). Anticancer potential of β -Sitosterol. International Journal of Clinical Pharmacology Pharmacotherapy 2: 129-132.
331. Alam P, Alhowiriny TA, Siddiqui NA, Alqasoumi SI, Basudan OA, Khan AA, Alam N (2018). Interspecies estimation of β -Sitosterol by a validated high-performance thin-layer chromatography method in genus Ficus and cytotoxic activity against HepG2, HEK-293, MCF-7, and MDA-MB-231 cell lines. JPC- Journal of Planar Chromatography Modern TLC 31: 213-219.
332. Awad AB, Chinnam M, Fink CS, Bradford PG (2007). β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. Phytomedicine 14:747-754.
333. Baskar AA, Lgnacimuthu S, Paulraj GM, Al-Numair KS (2010). Chemopreventive potential of β -Sitosterol in experimental colon cancer model an invitro and in vivo study. BMC Complementary Alternative Medicine 10: 1472-6882.

334. Chai JW, Kuppuswamy UR, Kanthimathi MS (2008). Beta sitosterol induced apoptosis in MCF-7 cells. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 16: 28-30.
335. Shahzad N, Khan W, Shadab MD, Ali A, Saluja SS, Sharma S, Afify MA (2017). Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine Pharmacotherapy* 88: 786-794.
336. Bhatt R, Mishra N, Bansal PK (2013). Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific* 28-34.
337. Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert Vitse A, Riviere C, Hennebelle T (2013). Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2013-2024.
338. Kang HS, Park HJ, Kim HR, Byun DS, Choi JS (2004). Rosmarinic acid as a tyrosinase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Science* 10: 80–84.
339. Lin L, Dong Y, Zhao H, Wen L, Yang B, Zhao M (2011). Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedalitin isolated from *Rabdosia serra* as inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase. *Food Chemistry* 129: 884-889.
340. Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P (2010). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* 16: 251-280.
341. Martinez Sanchez A, Gil Izquierdo A, Gil MI, Ferreres FA (2008). Comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56: 2330-2340.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı :BADEM Merve
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 10.03.1990 – Gerede/BOLU
Medeni hali : Evli
E-Posta : ecz.mervebadem@outlook.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	2014-
Yüksek Lisans	KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı	2014-2017
Lisans	İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2008-2013
Lise	Gerede Hacı Sadık Öztosun Anadolu Lisesi	2004-2008

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2014-2017

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Farmakognozi
Biyokimya

YAYINLAR

1. Aliyazicioğlu R, Demir S, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Ayazoglu Demir E (2017). Antioxidant, antigenotoxic, antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Dianthus carmelitarum*. Records of Natural Products 11: 270-284.
2. Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Akkaya Ş, Şener SÖ, Badem M, Alpaz Karaoğlu Ş, Eyüboğlu OE (2016). Phenolic components, antioxidant and antimicrobial activities of *Centranthus longiflorus* L. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences 3: 80-87.
3. Akkaya S, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Aliyazicioğlu R (2016). Antioxidant activity and phenolic profiles with HPLC of *Consolida orientalis*. International Journal of Current Research 8: 43735-43738.
4. Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R (2016). HPLC profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of *Echium vulgare* growing in Turkey. International Journal of Recent Scientific Research 7: 14425-14429.

BİLDİRİLER

1. Badem M, Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Özgen U (2016). HPLC profiles of phenolic compounds, and antioxidant activity on the aerial parts of *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica*. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya 311-311.
2. Korkmaz N, Şener S Ö, Badem M, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R (2016). HPLC profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of *Echium vulgare* Growing in Turkey. International Journal of Recent Scientific Research, 7: 14425-14429.
3. Şener SÖ, Badem M, Korkmaz N, Özgen U, Dirmenci T (2016). Bazı endemik *Cirsium* türlerinin tirozinaz enzimi üzerine etkileri. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, Türkiye, 238-238.

4. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Badem M, Korkmaz N, Akkaya Ş (2016). Antioxidant activity of aerial parts of *Parantucellia latifolia*. 4th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, Türkiye, 255-255.
5. Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Akkaya Ş, Badem M, Şener SÖ., Özgen U (2016). Biological activity of the aerial parts of *Euphorbia seguieriana*. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 291-29.
6. Korkmaz N, Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Badem M, Şener SÖ, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibitor activities of *Melilotus officinalis*. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 308-308.
7. Badem M, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Akkaya Ş, Korkmaz N, Özgen U (2016). Antioxidant activities of the aerial parts and roots of *Cirsium trachylepis*. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya 309-309.
8. Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of green coffee. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 314-314.
9. Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Badem M, Şener SÖ, Akkaya Ş, Özgen U (2016). The Assessment of *Centaurea carduiformis* in terms of phenolic compounds and antioxidant capacity. 4th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, Türkiye, 231-231.
10. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Badem M, Şener SÖ, Akkaya Ş, Korkmaz N (2016). Antimicrobial and tyrosinase inhibitor activity of *Consolida orientalis* (Gay) Schrod. 4th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, Türkiye, 254-254.
11. Seçkin G, Babadağ D, Özgen U, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N (2016). *Cirsium aytatchii* üzerinde fitokimyasal çalışmalar ve tirozinaz enzimine etkileri. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, Türkiye, 237-237.

12. Abanoz ME, Tuğcu Ö, Özgen U, Korkmaz N, Badem M, Şener SÖ (2016). *Cirsium polunii* üzerinde fitokimyasal çalışmalar ve tirozinaz enzimine etkileri. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, Türkiye, 235-235.
13. Şener SÖ, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Akkaya Ş, Badem M, Özgen U (2016). The effects of tyrosinase activation of aerial parts of *Calystegia silvatica*. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 316-316.
14. Şener SÖ, Aliyazicioğlu R, Badem M, Akkaya Ş, Korkmaz N, Özgen U (2016). HPLC profiles of phenolic compounds, volatile compounds by GC-MS, antioxidant activity studies on the aerial parts of *Centhranthus longgiflorus* subsp *longiflorus*. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 15-315.
15. Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Badem M, Şener SÖ, Alpay Karaoglu Ş (2016). Phenolic compounds of *Ornithogalum pyrenaicum* together with microbial and antioxidant studies. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 314-314.
16. Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibitor activities of the aerial parts of *Salvia verticillata*. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 313-313.
17. Şener SÖ, Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Korkmaz N, Badem M (2016). Biological and chromatographic studies on *Hypericum perforatum* L. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 317-317.
18. Badem M, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Korkmaz N, Akkaya Ş, Özgen U (2016). Tyrosinase inhibition activity studies of aerial parts of three *Barbarea* species. 2th International Turkic World Conferance on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 310-310.

19. Korkmaz N, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Badem M, Akkaya Ş, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of Turkish coffee. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 307-307.
20. Korkmaz N, Aliyazicioğlu R, Badem M, Şener SÖ, Akkaya Ş (2016). Phenolic composition and antioxidant activity of black tea. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 306-306.
21. Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M (2016). HPLC profiles and antioxidant activity of white tea. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya, 292-292.
22. Emiroğlu Ş, Geniş H, Özgen U, Şener SÖ, Korkmaz N, Badem M (2016). *Cirsium dirmilense* üzerinde fitokimyasal çalışmalar ve tirozinaz inhibitör aktivite çalışmaları. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, Türkiye, 236-236.
23. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Badem M, Yıldırım S, Ulaş N (2015). HPLC fingerprint analysis and quantification of phenolic compounds in some endemic *Cirsium* Species. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye, 389-390.
24. Güven L, Şener SÖ, Badem M, Özgen U, Seçen H (2015). Phytochemical studies on the roots of *Rosa pimpinellifolia*. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye, 391-391.
25. Şener SÖ, Badem M, Özgen U, Çelebi İH (2015). İki *Thymus* türünün uçucu yağının tirozinaz inhibitör aktivite çalışmaları. 2. İVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, İstanbul, Türkiye, pp.100-100.
26. Çetin A, Yılmaz İ, Bindak S, Badem M (2015). The investigation of wound healing effect of Theranekron® in rats", International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye, 421-421.

27. Şener SÖ, Badem M, Güven L, Özgen U (2015). Determination of ascorbic acid and catechin in root and fruits of *Rosa pimpinellifolia* by HPLC. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye, 387-388.
28. Aliyazicioğlu R, Eyüpoğlu OE, Özgen U, Badem M, Şener SÖ, Yildirmiş S (2015). Antioksidant activity of *Echium vulgare*. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye, 327-327.
29. Aliyazicioğlu R, Eyüpoğlu OE, Özgen U, Badem M, Şener SÖ, Yildirmiş S (2015). Antimicrobial activity and characterisation of volatile compounds of *Echium vulgare*. International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 328-329.
30. Aliyazicioğlu R, Aliyazicioğlu Y, Eyüpoğlu OE, Şener SÖ, Badem M, Özgen U (2015). *Dianthus carmelitarum*'un uçucu bileşenleri ve antioksidan, antimikrobiyal aktivitesi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 76-76.
31. Aliyazicioğlu R, Badem M, Şener SÖ, Özgen U, Yildirmiş S, Karaoğlu ŞA (2015). *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* üzerinde antimikrobiyal, antioksidan aktivite çalışmaları ve fenolik bileşiklerin karakterizasyonu. 2. İVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, İstanbul, Türkiye, 287-287.
32. Aliyazicioğlu R, Eyüpoğlu OE, Şener SÖ, Badem M, Özgen U, Yildirmiş S (2015). *Teucrium orientale* var. *glabrescens*'in uçucu bileşenlerinin analizi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 77-77.
33. Aliyazicioğlu R, Eyüpoğlu OE, Şener SÖ, Badem M, Özgen U, Yildirmiş S (2015). Antioxidant, antimicrobial activity and characterisation of phenolic compounds of *Teucrium orientale* var. *glabrescens*. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye, 230-231.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

Doktora Eğitim Bursu, TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU, Eylül 2015.