



**TÜRKİYE CUMHURİYET  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

***MYOSOTIS ALPESTRIS* BİTKİSİNİN  
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ**

**ÖMER ÖZTEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ**

**TRABZON 2018**

## ONAY

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



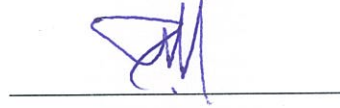
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ömer ÖZTEN'nin hazırladığı “*Myosotis Alpestris* Bitkisinin Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ



Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

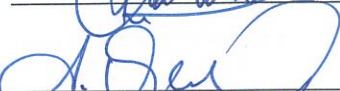
Prof Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU



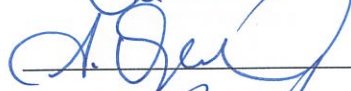
Prof.Dr. Ahmet ALVER



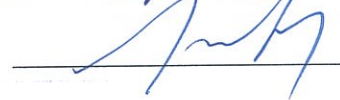
Doç.Dr. Hüseyin Avni UYDU



Yrd.Doç.Dr. Arzu ÖZEL



Yrd.Doç.Dr. Sermet YILDIRMIŞ



Tarih: ....../.../201...

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

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## 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.

Tarih:

Ömer ÖZTEN

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamda benden desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ' a candan teşekkür ederim.

Tez çalışmamda gerekli laboratuvar deneyimleriyle her daim yanımda olan Arş. Gör. Nuriye DERTLİ'ye ve Arş. Gör. Şeyda AKKAYA' ya tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamda en başta Sana Tabbouche olmak üzere tüm Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvar personeli ve saygıdeğer hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca bana desteğini esirgemeyen, kendilerini her zaman yanımda bulduğum aileme ve manevi katkılarıyla bütün arkadaşlarıma sonsuz kez minnettar olduğumu belirtirim.

Ömer ÖZTEN

**İÇİNDEKİLER****Sayfa****KABUL ve ONAY****BEYAN****TEŞEKKÜR****İÇİNDEKİLER****TABLolar DİZİNİ****viii****ŞEKİLLER DİZİNİ****ix****KISALTMALAR ve SEMBOLLER DİZİNİ****x****1. ÖZET****1****2. ABSTRACT****2****3. GİRİŞ ve AMAÇ****3****4. GENEL BİLGİLER****5**

4.1. Botanik Bilgiler

5

4.1.1. Boraginaceae Familyası

5

4.1.2. Myosotis Cinsi

5

4.1.3. Myosotis alpestris

5

4.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

7

4.2.1. Radikal Kavramı

7

4.2.2. Serbest Radikallerin Oluşumu

7

4.2.3. Reaktif Oksijen Metabolitleri

7

4.2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları

8

4.2.5. Radikallerin Biyolojik Etki Mekanizmaları

11

4.2.6. Bitkilerde Reaktif Oksijen Ürünlerinin Kimyası

11

4.2.7. Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgiler

13

4.2.8. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

14

4.2.9. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma

14

4.2.10. Vitaminlerin Antioksidan Mekanizmalardaki Önemi

15

4.2.11. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Mekanizmalardaki Önemi

15

4.2.11.1. Flavonoidler

16

4.2.11.2. Fenolik Asitler

17

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|                                                                                                         | vi        |
| 4.3. Çalışmada Kullanılan Enzimler Hakkında Genel Bilgiler                                              | 18        |
| 4.3.1. Tirozinaz Enzimi                                                                                 | 18        |
| 4.3.2. Asetil-bütirilkolinesteraz Enzimleri                                                             | 20        |
| <b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                                               | <b>22</b> |
| 5.1. Gereç                                                                                              | 22        |
| 5.1.1. Kullanılan Cihazlar                                                                              | 22        |
| 5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler                                                                     | 22        |
| 5.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler                                                                  | 23        |
| 5.1.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayininde Kullanılan Çözeltiler                                   | 23        |
| 5.1.3.2. FRAP (Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi)                                    | 23        |
| 5.1.3.3. CUPRAC (Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite Yöntemi) Tayininde Kullanılan Çözeltiler    | 24        |
| 5.1.3.4. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Kapasitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 24        |
| 5.1.4. Numunenin Toplanması ve Ekstrelerin Hazırlanması                                                 | 24        |
| 5.2. Yöntemler                                                                                          | 25        |
| 5.2.1. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler                                                       | 25        |
| 5.2.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini                                                            | 25        |
| 5.2.1.2. FRAP (Demir(III) İndirgeyici Antioksidan Güç)                                                  | 26        |
| 5.2.1.3. CUPRAC (Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite) Yöntemi                                    | 27        |
| 5.2.1.4. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi                                                              | 28        |
| 5.2.2. Çalışmada Kullanılan Enzim Deneyleri                                                             | 29        |
| 5.2.2.1. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu                                                                    | 29        |
| 5.2.2.2. Antikolinesteraz Tayin Yöntemleri                                                              | 30        |
| 5.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini                                                                   | 31        |
| 5.2.3.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu                                                                   | 31        |
| 5.2.3.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Tayini                                                       | 32        |
| <b>6. BULGULAR</b>                                                                                      | <b>34</b> |
| 6.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Bulguları                                                             | 34        |
| 6.2. FRAP Metodu Bulguları                                                                              | 35        |
| 6.3. CUPRAC Metodu Bulguları                                                                            | 36        |
| 6.4. DPPH Metodu Bulguları                                                                              | 37        |

|                                                  |           |
|--------------------------------------------------|-----------|
|                                                  | vii       |
| 6.5. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu                 | 40        |
| 6.6. Antikolinesteraz Etki Tayin Yöntemleri      | 41        |
| 6.7. Antimikrobiyal Aktivite ile İlgili Bulgular | 42        |
| <b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>                      | <b>44</b> |
| <b>8. KAYNAKLAR</b>                              | <b>49</b> |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>                               | <b>56</b> |



**TABLÖLAR DİZİNİ**

| <b>Tablo</b>                                                                              | <b>Sayfa</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Tablo 1.</b> Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Cihazlara Ait Firmalar                   | 22           |
| <b>Tablo 2.</b> Madde Marka ve Ürün Numaraları                                            | 22           |
| <b>Tablo 3.</b> Test Edilmiş Mikroorganizmalar                                            | 31           |
| <b>Tablo 4.</b> <i>Myosotis alpestris</i> Bitkisine ait Antioksidan Etki Sonuçları        | 39           |
| <b>Tablo 5.</b> <i>Myosotis alpestris</i> Bitkisinin AChE/BChE İnhibitör Etkisi Sonuçları | 42           |
| <b>Tablo 6.</b> Ekstrelerin ve Standartların İnhibisyon Çapları                           | 42           |
| <b>Tablo 7.</b> Ekstrelerin ve Standartların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu            | 43           |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil                                                                                 | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1. <i>Myosotis alpestris</i>                                                    | 6     |
| Şekil 2. Oksijenden Reaktif Oksijen Metaboliti Oluşumu                                | 8     |
| Şekil 3. Patojen ROS ve Bitki Savunma Mekanizması                                     | 10    |
| Şekil 4. Radikallerin Biyolojik Etki Şekli                                            | 11    |
| Şekil 5. Reaktif Oksijen Türlerinin Oksidasyon ve Redüksiyon Dengesi                  | 12    |
| Şekil 6. Haber - Weiss Tepkimesi                                                      | 12    |
| Şekil 7. Fenton Tepkimesi                                                             | 13    |
| Şekil 8. 1,3-Difenilpropan Yapısına Sahip Flavonoidler                                | 16    |
| Şekil 9. 1,2-Difenilpropan Yapısına Sahip Flavonoidler                                | 17    |
| Şekil 10. 1,3-Difenilpropan Yapısına Sahip Antosiyanidin                              | 17    |
| Şekil 11. 1,3-Difenilpropan Yapısına Sahip Flavanon                                   | 17    |
| Şekil 12. HCA ve HCB Yapısına Ait İskeletlerinin Gösterimi                            | 18    |
| Şekil 13. Tirozinaz Enzim Fonksiyonu ve Melanin oluşumu                               | 19    |
| Şekil 14. Asetilkolin-Asetilkolinesteraz İlişkisi Gösteren Metabolik Denge            | 20    |
| Şekil 15. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tespit Yöntemi                                 | 26    |
| Şekil 16. Toplam Fenolik Madde Tespiti Yöntemine Ait Gallik Asit Standard<br>Grafığı  | 34    |
| Şekil 17. <i>Myosotis alpestris</i> Bitkisinin Toplam Fenolik Madde Tayin Bar Grafığı | 35    |
| Şekil 18. FRAP Yöntemine Ait Troloks Standard Grafığı                                 | 36    |
| Şekil 19. <i>Myosotis alpestris</i> Bitkisine Ait FRAP Bar Grafığı                    | 36    |
| Şekil 20. CUPRAC yöntemine ait Troloks Standart Grafığı                               | 37    |
| Şekil 21. <i>Myosotis alpestris</i> Bitkisine Ait CUPRAC Grafığı                      | 37    |
| Şekil 22. BHT Standardının DPPH –SC <sub>50</sub> Grafığı                             | 38    |
| Şekil 23. <i>M. alpestris</i> ’in Sulu Ekstresinin DPPH-SC <sub>50</sub> Grafığı      | 39    |
| Şekil 24. <i>M. alpestris</i> ’in Metanollü Ekstresinin DPPH-SC <sub>50</sub> Grafığı | 40    |
| Şekil 25. <i>M. alpestris</i> Bitkisine Ait DPPH Grafığı                              | 40    |
| Şekil 26. Kojik Asit Standardına Ait Tirozinaz İnhibisyon (%) Grafığı                 | 41    |
| Şekil 27. <i>Myosotis alpestris</i> Türüne Ait Tirozinaz Enzim İnhibisyon (%) Grafığı | 41    |

## KISALTMALAR ve SEMBOLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

|                               |                                                                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| AChE                          | Asetilkolinesteraz enzimi                                         |
| Bc                            | <i>Bacillus cereus</i> 702 Roma,                                  |
| BChE                          | Bütirilkolinesteraz enzimi                                        |
| BHT                           | Bütillenmiş Hidroksi Toluen                                       |
| Ca                            | <i>Candida albicans</i>                                           |
| Ca <sup>2+</sup>              | Kalsiyum iyonu                                                    |
| CCl <sub>4</sub>              | Karbon Tetraklorür                                                |
| CUPRAC                        | Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite Yöntemi                |
| DHA                           | Dehidroaskorbik asid                                              |
| DNA                           | Deoksiribonükleik asit                                            |
| DPPH                          | (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi |
| DPPH•                         | (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikali                           |
| Ec                            | <i>Escherichia coli</i>                                           |
| Ef                            | <i>Enterococcus faecalis</i>                                      |
| FAD                           | Flavin Adenin Dinükleotid                                         |
| FRAP                          | Ferrik Demir İndirgeme Antioksidan Gücü                           |
| GR                            | Glutasyon Redüktaz                                                |
| GSH                           | Glutasyon                                                         |
| GSH-Px                        | Glutasyon Peroksidaz                                              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit                                                 |
| HBA                           | Hidroksibenzoik asid                                              |
| HCA                           | Hidroksisinamik asid                                              |
| LDL                           | Düşük Dansiteli Lipoprotein                                       |
| L-DOPA                        | L-dihidroksifenilalanin                                           |
| Lm                            | <i>Listeria monocytogenes</i>                                     |
| LOOH                          | Lipid Hidroperoksit                                               |
| Ms                            | <i>Mycobacterium smegmatis</i>                                    |

|                                     |                                                       |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| NaCl                                | Sodyum Klörür                                         |
| NAD <sup>+</sup>                    | Nikotinamid Adenin Dinükleotid                        |
| NADP <sup>+</sup>                   | Nikotinamid Adenin Difosfat                           |
| NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO | Amonyum asetat                                        |
| NO <sub>2</sub>                     | Azot dioksit                                          |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>        | Süperoksit anyon radikali                             |
| OH <sup>•</sup>                     | Hidroksil Radikali                                    |
| OONO <sup>-</sup>                   | Peroksinitrit                                         |
| Pa                                  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                         |
| PUFA                                | (Poliansaturated fatty acid) Çoklu doymamış yağ asidi |
| ROS                                 | Reaktif Oksijen Türleri                               |
| Sa                                  | <i>Staphylococcus aureus</i>                          |
| Sc                                  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                       |
| SOD                                 | Süperoksit Dismutaz                                   |
| TPTZ                                | 2,4,6-tripiridil-S-triazin                            |
| UV                                  | Ultraviyole                                           |
| Yp                                  | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>                    |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>         | Singlet Oksijen                                       |

### Semboller

|    |            |
|----|------------|
| µg | Mikrogram  |
| µL | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| γ  | Gama       |
| mL | Mililitre  |
| mM | Milimolar  |
| nm | Nanometre  |
| α  | Alfa       |
| β  | Beta       |

## 1. ÖZET

### ***Myosotis alpestris* Bitkisinin Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi**

Bu çalışmada Artvin yöresinden 2016 Haziran ayında toplanan *Myosotis alpestris* bitkisinin toprak üstü kısımları kurutulup toz haline getirildikten sonra; sulu ve metanollü ekstraktları hazırlanarak DPPH (2,2-Difenil-1-pikril hidrazil), FRAP (Demir İndirgeyici Antioksidan Güç) ve CUPRAC (Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik madde miktarı, tirozinaz, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz enzim inhibisyon etkileri ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı.

DPPH radikal temizleme aktiviteleri sulu ekstrede ( $SC_{50}=0.2118$  mg/mL), metanolik ekstresine ( $SC_{50}=0.6118$  mg/mL) göre daha yüksek bulundu. FRAP ve CUPRAC değerleri Troloks eşdeğeri cinsinden hesaplandı. FRAP sonuçları sulu ekstrede 1038  $\mu$ mol Troloks/g numune, metanolik ekstrede 171  $\mu$ mol Troloks/g numune olarak, CUPRAC değerleri; sulu ekstrede 1913  $\mu$ mol Troloks/g numune, metanolik ekstrede 289  $\mu$ mol Troloks/g numune olarak bulundu. Toplam fenolik madde değerleri galik asid eşdeğeri cinsinden ifade edilerek sulu ekstrede 21.8 mg GAE/g numune, metanolik ekstrede 2891 mg GAE/g numune olarak hesaplandı.

Tirozinaz enzim inhibisyonu ( $IC_{50} = >1000$   $\mu$ g/mL) kojik aside ( $IC_{50} = 63,096$   $\mu$ g/mL) göre oldukça yüksek bulundu. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin % inhibisyon değerleri (43.5, 54.9) standart olarak kullanılan galantamin'e (97.13) göre daha düşük bulundu. Ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi Agar Kuyucuk Difüzyon yöntemiyle test edildi. Bitkinin sulu ekstresinin antimikrobiyal aktivite göstermediği, metanolik ekstresinin ise antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulundu.

*Myosotis alpestris* bitki ekstrelerinin antioksidan, enzim inhibisyon etkileri ve antimikrobiyal etkilerine bakıldığında; antioksidan bileşiklere kaynak sağlayacağı ve doğal antioksidan kaynağı olarak insan sağlığına fayda sağlayacağı, farmakolojik ve ilaç endüstrisinde kullanım alanlarının olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Myosotis alpestris*, Antioksidan aktivite, Tirozinaz, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, Antimikrobiyal aktivite

## 2. SUMMARY

### **The Investigation of Biological Activities of *Myosotis alpestris* Plant**

In this study, above the soil parts of *Myosotis alpestris* plant collected from Artvin region of Turkey in June 2016, were dried and powdered. Their antioxidant activities were tested by DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl), FRAP( Ferric Iron Reducing Antioxidant Power) and CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) methods. Total phenolic substance quantities, tyrosinase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase enzyme inhibition effects and antimicrobial activities were tested.

DPPH radical scavenging activities were found to be higher in aqueous extract ( $SC_{50}$ :0.2118 mg/mL) than methanolic extract ( $SC_{50}$ :0.6118 mg/mL). FRAP and CUPRAC values were calculated in Trolox equivalent. FRAP results were determined as 1038  $\mu$ mol Trolox/g sample in aqueous extract, 171  $\mu$ mol Trolox/g sample in methanolic extract, CUPRAC values; 1913  $\mu$ mol Trolox/g sample in aqueous extract, 289  $\mu$ mol Trolox/g sample in methanolic extract. The total phenolic values were expressed as gallic acid equivalent, 21.8 mg GAE/sample in aqueous extract and 2891 mg GAE/g sample in methanol extract were calculated.

The tyrosinase enzyme inhibition ( $IC_{50}$ =>1000 $\mu$ g/mL) was significantly higher than kojic acid ( $IC_{50}$ =63.096). The % inhibition values of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes (43.5, 54.9) were significantly lower than those of galantamine (97.13). The antimicrobial activity of the extracts was tested by the Agar Well Diffusion method and the aqueous extract of the plant showed no antimicrobial activity.

The antioxidant, enzyme inhibition effects and antimicrobial effects of the extract obtained from *Myosotis alpestris* showed that, antioxidant compounds of this plant could be used as a natural antioxidant source to provide benefits to human health and they could be used in pharmacological and pharmaceutical industries as well.

**Key Words:** *Myosotis alpestris*, Antioxidant activity, Tyrosinase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, antimicrobial activity.

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Türkiye tıbbi ve endemik tür bakımından zengin bir ülkedir. Yaklaşık olarak 12000 takson bulunduğu bildirilmiştir. Bu bitkilerden de 1000 kadarı ilaç ham maddesi ve baharat olarak kullanılmaktadır (1, 2). Bölgemiz bitki florası bakımından oldukça zengin olduğundan bitki araştırmaları için uygun bir kaynak oluşturmaktadır.

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde yaşayan insanları yaklaşık yüzde sekseninin hastalıkların tedavisinde geleneksel yöntemleri kullanmaktadır. 1984 yılında Amerika ve Kanada da ilaç hammaddelerinin yaklaşık yüzde 25 ini doğal kaynakların oluşturduğu bildirilmiştir (1).

Bitkilerin temininin kolay olması, ucuz tedavi imkanları sağlaması yanında doğal kaynaklardan elde edilen ilaçların yan etkilerinin sentetik ilaçlara göre daha az olması, sentetik ilaçlara karşı bakterilerin kolay direnç kazanması nedeniyle bitkisel kaynaklardan ilaç etken maddesi eldesi önem kazanmıştır (3).

Vücudumuzda fizyolojik olarak meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal olaylar sonucunda da reaktif oksijen türleri yani serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikallerin aşırı üretilmesi lipid, protein, DNA gibi biyomoleküllerin yapılarında oksidatif hasar meydana getirmektedir. Bu hasar sonucunda ateroskleroz, diyabet, kanser, çeşitli kronik hastalıklar gelişmektedir (4). Vücutta bu oksidan ajanlara karşı çeşitli koruyucu sistemler geliştirmiştir. Bu mekanizmalar düzenli çalışmadığında hastalıkların ortaya çıkması kaçınılmazdır. Bu sebepten dolayı, dışarıdan besinlerle antioksidanların vücuda alınmaları önemlidir. Bitkilerde bu oksidan ajanları temizleyen fenolik bileşikler, vitaminler, terpenler, fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, kumarinler, ligninler, kinonlar bulunmaktadır (5).

Dünyada ve ülkemizde son zamanlarda bitkilerle tedavi yöntemleri, özellikle fitoterapötik yöntemler üzerine bilimsel araştırmalarda artış gözlenmektedir. Bu konulardaki giderek artan ilgi, tez konusu seçiminde bölgemizde Artvin yöresinde yetişen ve Boraginaceae familyasından olan, dünyada 100 cins ve 2000 kadar türle tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yayılım gösteren, *Myosotis alpestris* isimli tür bitkisinin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi hususunda etkili olmuştur.

Bu alışmada, Artvin yöresinde yetişen ve Boraginaceae familyasına ait KATO 24440 herbaryum numaralı *Myosotis alpestris* bitkisinin, toprak üstü kısımlarından elde edilen saf sulu ve metanolik ekstrelerde antioksidan aktivite ile antimikrobiyal etkinin ve yine aynı bitki örneğine ait ekstrenin tirozinaz, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyon deneylerinin, incelenmesi amaçlanmıştır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Botanik Bilgiler

#### 4.1.1. Boraginaceae Familyası

Boraginaceae, dünyada 100 cins ve 2000 kadar türle temsil edilen, tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yayılımı bulunan, Lamiales takımına ait bir familyadır. Türkiye'de bu familyaya ait 34 cins ve 300'den fazla türün bulunduğu bilinmektedir (6).

Genellikle otsu, bazen çalimsı veya tırmanıcı bitkilerden oluşmaktadır. Bitkinin gövdesi ve yaprakları genellikle sert tüylerle kaplı olup, yapraklar basit, stipulasız ve alternattır. Çiçekler hermafrodit, aktinomorf veya nadiren zigomorftur. Kaliksin serbest veya bileşik 5 sepalli, korollanın ise 5 petalli ve petallerin bileşik olduğu bilinmektedir (6).

#### 4.1.2. *Myosotis* Cinsi

*Myosotis* cinsinin sistematik sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (7).

Alem : Plantae  
Bölüm : Magnoliophyta  
Sınıf : Magnoliopsida  
Alt Sınıf : Asteridae  
Takım : Lamiales  
Familya : Boraginaceae  
Cins : *Myosotis*  
Tür : *Myosotis alpestris*

#### 4.1.3. *Myosotis alpestris*

Sıklıkla uzun, belirli bir dereceye kadar etli kökleri olan kısa ve çok sayıda rizomları bulunan çok yıllık bir bitkidir. Gövde genellikle alt kısma doğru tüylü olup, nadiren de tüysüzdür. Gövde uzunluğu 5-35 cm arasında değişir. Bazal yapraklar saplı ya da sapsızdır. Ayrıca sap üzerinde bulunan kısmı çok değişkendir. Eliptik, spatül, yumurtamsı veya lineer şekillidir (6).



**Şekil 1.** *Myosotis alpestris* (8)

İnfloresans (çiçek durumu) yoğun bir şekilde tüylerle kaplıdır. Kaliks 7mm'ye kadar büyüyebilir ve sıklıkla genişlemiş şekildedir. Yoğun bir şekilde kıvrılmış veya kıvrılmamış kıllarla kaplıdır, yoğun bir şekilde tüylüdür (6). Tüyler daha fazla veya daha az yayılım göstererek gümüşümsü bir renktedir. Korollanın içerdiği tüp ise kaliksinkinden daha kısadır. Korolla 0,4 -1,2 cm çapında uzayabilir; korolla tüpü kısadır ve solgun sarı renklidir. Bazı yerlerde korolla çapı 9mm'ye kadar yükselebilir, açık ya da koyu mavi renklidir. Korolla lobları yaklaşık olarak 1-5 mm ebatlarındadır, açık mavi renklidirler ve her lobun tabanında parlak sarı renkli küçük iki lobdan oluşan bir yapı ihtiva ederler. Tübün içinde 5 stamenli korolla loblarıyla alması olan 5 stamen bulunur (9).

Androkeum daima izostemondur ve 5. stamenin kaybolma eğilimi yoktur. Ovaryum üst durumludur, iki orta karpelden oluşur ve tek bölmelidir. Genellikle 4 kısma ayrılmasına rağmen tek bölmeli olarak kalır (6).

Meyve tabanındaki tüy ya daha çok ya da daha az akut (ince keskin)'dur. Meyve 4 nutletten oluşmuştur. Nutletler sıklıkla yumurtamsıdan elipse doğru değişen bir tür yuvarlak şekle sahip, siyah renkli ve parlayan bir durumdadırlar. Sıklıkla 2 mm'den daha büyüktürler. Ayrıca kenar-merkez arasındaki uzaklığın yarısına kadar (yani 2,5 mm'ye kadar) büyüyebilirler. Dokunulabilir alanı ise geniş, böbrek şeklinde ve oluklardan lateral (yan hatlara) doğru uzayıp genişlemiş biçimdedirler. Sıklıkla da aşağıya doğru genişlemektedir (9).

## 4.2. Antioksidanlar Hakkında Bilgiler

### 4.2.1. Radikal Kavramı

Dış yörüngelerindeki orbitallerinde çiftlenmemiş elektron bulunduran reaktif maddelere radikal adı verilmektedir. Vücutta metabolizma sonucu meydana gelen bu radikaller zararlı olaylara sebep olmaktadır. Genel karakterleri kısa ömürlü ve serbest (herhangi bir yere bağımlı olmayan) olmaları olarak bilinmektedir. İçerdikleri elektron sayılarını proton sayılarıyla eşleştirmek istediklerinden dolayı son derece reaktif oldukları bilinmektedir (10).

### 4.2.2. Serbest Radikallerin Oluşumu

Serbest radikaller homolitik bağ kırılması sonucu oluştukları gibi elektron alma ve elektron verme gibi olaylar sonucu da oluşabilmektedir. Radikaller yapıları gereği zincir reaksiyonları meydana getirirler (11).

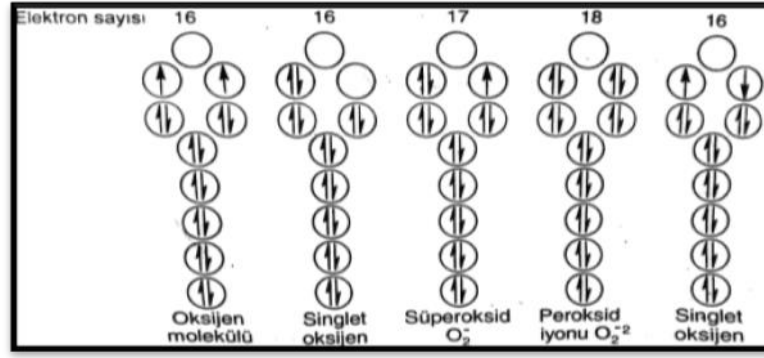
Radikaller dış etkenlere bağlı olarak da meydana gelebilirler. Bu dış sebepler şöyledir:

- Hava kirliliği (Ozon, azot dioksit)
- Toksik kimyasallar ( $\text{CCl}_4$  ve halojenlenmiş hidrokarbonlar, difenoller)
- Bazı metaller (civa, kadmiyum, nikel, krom, arsenik, kurşun gibi)
- Çeşitli antibiyotikler (Tetrasiklinler ve kinon antibiyotikleri gibi)
- Radyasyon
- Sigara
- Alkol (12, 13)

### 4.2.3. Reaktif Oksijen Metabolitleri

Singlet oksijen molekülü aracılığı ile oksijen moleküllerinden meydana gelen reaktiflerdir ve oksijenin metabolizmasının ara ürünleri olarak oluşmaktadırlar. Büyük miktarda hücre içinde, özellikle de mitokondride elektron transport zinciri (ETS)'nde oluşmaktadır (14).

En toksik ürünleri sırasıyla  $\text{OH}^\cdot$  radikali, süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) ve hidrojen peroksittir ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (15,16).



**Şekil 2.** Oksijenden Reaktif Oksijen Metaboliti Oluşumu (17)

Oksijen moleküllerine elektron aktaran oksidaz enzimleri ve oksijen moleküllerinin substrata aktarılmasını sağlayan oksijenaz enzimleri reaktif oksijen metabolitlerinin oluşmasında görev almaktadır (17).

#### 4.2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları

Bitkilerin çevresel faktörlere diğer organizmalara kıyasla daha çok maruz kaldığından dolayı oksidatif hasara daha dayanıksız olduğu belirtilmektedir. Bunun için, bitkilerin ROS oluşumunu engellemek amacıyla birçok mekanizma geliştirdiği ileri sürülmektedir. Bitkilerde oksidatif stresi oluşturan faktörler arasında; fotosentez, hücrelerin atmosfer oksijen basıncına maruz kalması, solar radyasyon (özellikle UV), hücre sıcaklığındaki ani değişimler, ROS salgılanmasına neden olan mantar patojenlerinin saldırıları ve Oksidatif strese sebep olan bazı enzimler yer almaktadır. İlaveten, ağır-metal bakımından zengin olan topraklarda yetişen tohumlar, Fenton reaksiyon mekanizması vasıtasıyla hidroksil oluşumuna karşı daha dayanıksız olduğu bildirilmektedir (18, 19).

Fotosentez esnasında elektronlar güneş enerjisini kullanarak daha ileri enerji seviyelerine yükselmektedirler. Aktive edilen elektronların çoğu ya özel elektron alıcılarına geçer ya da ısı veya floresan olarak dağıldığı bilinmektedir. Ancak; belirli miktardaki ileri enerji düzeyli elektronlar, istenilen hedefe ulaşmadığından toksik radikal moleküllerini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, mevcut elektron alıcılarına transfer edilen elektronlar, daha sonra elektron transport zincirleri boyunca akım göstermek suretiyle, oksijen ile etkileşim göstererek süperoksid radikalini ürettiği bilinmektedir. Fazla sayıdaki elektronların her saniye başı bu yollardan geçtiğini

düşündüğümüzde; organizmanın işleyişinin düzenli olmasına rağmen, bazı elektronların bu reaksiyonları oluşturabileceği farkedilmektedir (20).

Bir başka reaktif oksijen metaboliti olan  $H_2O_2$  üretimi fotorespirasyon süresince meydana gelen fotosentez ile ilgili olduğu belirtilmektedir. Bu hidrojen peroksid kaynağı özellikle yüksek ışık yoğunluğunda, düşük karbondioksit ve yüksek oksijen konsantrasyonunda olduğu bildirilmektedir (21, 22).

### **Atmosfere Maruz Kalma**

Verilen bir dokudaki oksijen konsantrasyonu, difüzyonun, çözünübilirliğin, ve tüketimin bir fonksiyonudur. Örneğin, toplardamar kanındaki oksijen konsantrasyonu, bütün kanın çeyreği kadardır; oysa fotosentetik hücrelerdeki oksijen konsantrasyonu, fotosistem 2 kompleksindeki oksijen üretim bölgesinde bulunan konsantrasyonu aşabildiği bilinmektedir (21, 22).

### **Solar Radyasyon**

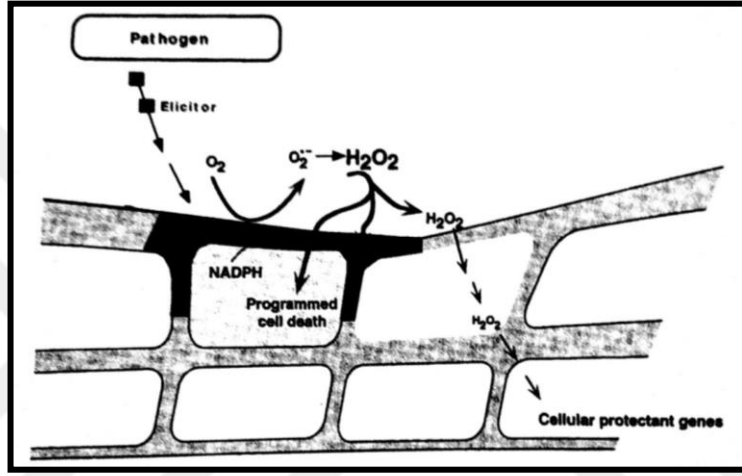
Fotosentez için gerekli olan enerjiyi sağlamanın yanısıra, solar radyasyon radikallerin oluşumu ile sonuçlanmak suretiyle, moleküllere doğrudan enerji yükleyebilmektedir. Örneğin; UV radyasyon iki hidroksil radikali oluşturmak için hidrojen peroksidin homolitik fizyonuna sebep olacak yeterli enerjiye sahip olduğu bilinmektedir (23).

### **Sıcaklık Etkisi**

Elektron transport zinciri boyunca mevcut olan enerji akımı, yaşayan her hücre için zorunlu olduğu kabul edilmektedir. İdeal olarak düzenlenen bir sistemde, enerji yüklenmiş elektronlar, bir protein donöründen özel bir alıcıya yavaşça azalan redox potansiyel gradiyenti boyunca geçirilmektedir. Uyarılan elektronların bu şekildeki elektron transferi, donör ve akseptör moleküllerin kusursuz olarak pozisyon almasını gerektirmektedir. Açıkçası, membran akıcılığındaki düzensizlikler (örneğin sıcaklık değişikliklerinin bir sonucu olarak) membran proteinlerinin dizilimini bozarak elektron sızımına neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu elektronlar mevcut moleküler oksijen ile birleştikleri zaman reaktif oksijen türleri ve lipid hidroperoksidlerini oluşturmaktadır (23).

### Bitki-Patojen Etkileşimlerinde Oksidatif Stres

Uzun zamandan beri, bitki enfeksiyonu esnasında oluşan doku hasarının sebebinin reaktif oksijen türleri (ROS)'nin olduğu düşünülmektedir. Bilim adamlarının yaptığı çalışmalarda, bitki hücrelerinin, işgal edici organizmaların varlığını hissettiklerinde reaktif oksijen türlerini oluşturduklarını göstermiştir. Patojen organizmaların bulaşmasını takiben ROS'un meydana gelişi, bitkilerin patojenlere karşı olan en hızlı tepkilerinden biri olduğu belirtilmektedir (24, 25).



Şekil 3. Patojen ROS ve Bitki Savunma Mekanizması (21)

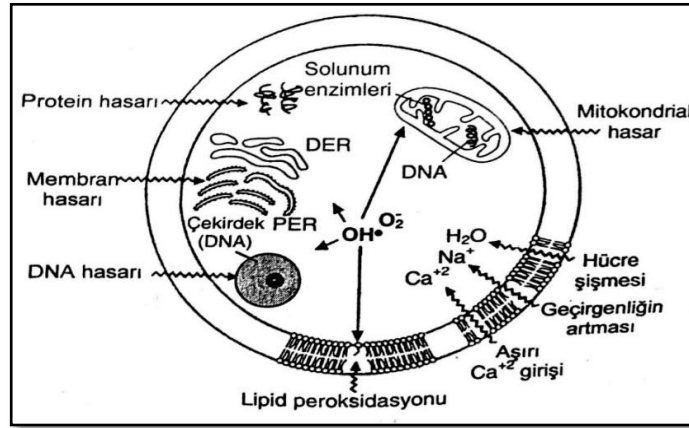
### Oksidatif Strese Sebep Olan Bazı Enzimler

Radikallerin diğer potansiyel kaynakları, enzimatik reaksiyonların yan ürünleri olduğu bilinmektedir. Pürinlerin ksantin oksidaz tarafından yıkımı, mono-, di- ve poliaminlerin oksidazlar tarafından yıkım olayları örnek olarak verilebilir. Ayrıca belirli koşullarda polifenollerin, polifenol oksidazlar tarafından yıkımı da bir reaksiyon ürünü olarak  $H_2O_2$  üretimine neden olmaktadır. Bitkilere özel olan diğer bir enzimatik olay, hidrojen peroksid oluşum kaynağı ise hücre duvarı peroksidazlarının olduğu bilinmektedir. Peroksidazlar, hücre duvarı bileşenlerini çapraz-bağ oluşumunu katalizlemek yoluyla süperoksit anyon radikalinin ortadan kaldırılması sırasında  $H_2O_2$  meydana getirebilmektedirler (26-28)

#### 4.2.5. Radikallerin Biyolojik Etki Mekanizmaları

Serbest radikaller, arginin, histidin gibi aminoasitleri oksidasyona uğratarak hasara yola açmaktadırlar. Ancak, en büyük hasarı doymamış yağ asitleri (PUFA)'ni oksidasyona uğratarak meydana getirmektedirler. Doymamış yağ asitlerinde bulunan çift bağ sayısı arttıkça bu yağ asitlerindeki peroksidasyon oranı da artmaktadır (29).

Radikal metabolitler ilk önce yağ asidini etkileyerek yağ asidi radikalinin oluşturmaktadır. Oluşan yağ asidi radikalleri başka yağ asitlerinin içerdiği yan zincirlerle etkileşime girerek hidroperoksidlerin oluşumuna sebep olmaktadır. Oluşan bu hidroperoksidler metal iyonlarıyla malondialdehid gibi yıkım ürünlerini meydana getirmektedirler. Lipid peroksidasyonu ve çeşitli proteinlerin oksidasyonlarının yarattıkları bu durum, hücre membran yapısı seçici geçirgen özelliğinde azalmaya sebep olmaktadır. Böylece hücre içine giren  $Ca^{2+}$  iyonu artarak fosfolipaz enziminin fonksiyonunu artmasına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak membranın fosfolipid miktarı azalarak potansiyel kaybı oluşmaktadır. Bu oluşum sonucu, membran yapısında proteolitik etki artarak endonükleaz enzim faaliyetinin ilerlemesine ve toksik etki düzeyinde artışa sebep olmaktadır (29, 30).



Şekil 4. Radikallerin Biyolojik Etki Şekli (17)

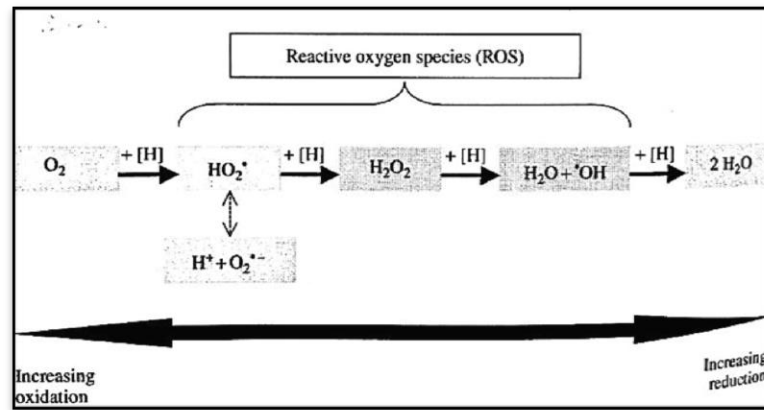
#### 4.2.6. Bitkilerde Reaktif Oksijen Ürünlerinin Kimyası

Bitkilerde moleküler oksijenin ardışık redüklenmesi yoluyla değişen sayıda elektronlar, farklı ROS türlerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Oksijenin tek elektron alarak indirgenmesi süperoksit anyonunun ( $O_2^-$ ) üretimi ile

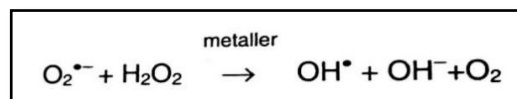
sonuçlanmaktadır. Bu genellikle, ilk ROS oluşuncaya kadar meydana gelmektedir. Eklenmiş tekil elektron çiftlenmemiş olduğu için süperoksid bir serbest radikal olarak sınıflandırılmaktadır. Düşük pH'da süperoksidin dismutasyonu oluşmaktadır; yani bir süperoksid anyonunun ekli elektronunu diğer süperoksid anyonuna vererek ve daha sonra sonra protonlanarak  $H_2O_2$  oluşturmaktadır. Hidrojen peroksit zayıf bir oksidasyon ajanıdır ve proteinler gibi biyolojik moleküllerle reaksiyona girmektedir (29, 30).

Bitkilerde dismutasyon reaksiyonu süperoksid dismutaz tarafından etkili bir şekilde kataliz edilmektedir. Bitkilerde SOD'in farklı hücresel kısımlarda yerleşik şekilde çeşitli tiplerinin varlığı bilinmektedir (29, 30).

Hem süperoksid hem de  $H_2O_2$  bitkilerde potansiyel sinyal yayan moleküller olarak bilinmektedir.  $H_2O_2$  molekül ağırlığının az ve yüksüz olması sebebiyle membranlardan geçerek hızlıca yok edilmektedir. Öte yandan, süperoksid nispeten yarı ömrü kısa ve yüklü bir molekül olduğundan dolayı hareketleri, üretim bölgesine olan yakınlığı ile sınırlandırılmaktadır. Ama süperoksid, perhidroksil radikalini oluşturmak üzere protonlanabilir ve membranlardan geçebilme potansiyeline sahip olabilmektedir (29, 30).



**Şekil 5.** Reaktif Oksijen Türlerinin Oksidasyon ve Redüksiyon Dengesi (31)



**Şekil 6.** Haber - Weiss Tepkimesi (32)



**Şekil 7.** Fenton Tepkimesi (32)

Hidroksil radikalleri ( $\text{OH}^\bullet$ ), son derece reaktiftir ve sınırlı-difüzyon oranında reaksiyon verebilmektedirler.

Süperoksit çok etkili olan, başka sinyal yayan serbest radikalle reaksiyon verebilir, mesela nitrik oksit ile peroksinitrit üretmektedir. Peroksinitrit oldukça reaktiftir ve memeli sistemlerinde toksik bir ajan olduğu bilinmektedir (33).

Aslında,  $\text{OONO}^-$  oluşumu  $\text{NO}$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin hücrel fonksiyonlarını ortadan kaldırabilmektedir. Singlet oksijen reaktif oksijenin diğer bir formudur fakat burada moleküler oksijene extra bir elektron eklenmesi yoktur; aslında daha yüksek enerjili orbitale bir elektron yükselmiştir. O sebepten sınırlı-dönme fazından oksijenin serbestlenmesi gerçekleşmektedir. Bu spin kısıtlamasının ortadan kaldırılması singlet oksijenin organik moleküllerle hızlıca reaksiyona girmesine yol açmakta ve potansiyel olarak da zarara sebep olmaktadır (34, 35).

#### **4.2.7. Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgiler**

Serbest radikaller ve reaktif oksijen metabolitleri ve bunları meydana getirebilen bütün maddeler oksidan diye adlandırılmaktadır. Bu oksidanları direkt olarak azaltan veya yok eden yapılara antioksidanlar adı verilmektedir (35, 36).

Antioksidanlar, aktivitelerini genel anlamda 6 yolla meydana getirmektedirler. Bu yollar şunlardır:

- Radikalleri temizleme
- Endojen antioksidan savunmayı güçlendirme
- Tahrip olan yapıları onarma
- Oksidan maddeleri oluşturan reaksiyonları durdurma
- Hücrede etkili olan kinaz kayıplarını önleme
- Oksidan oluşturan reaksiyon hızlarını azaltma (35, 36).

#### 4.2.8. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

Süperoksid dismutaz [(SOD), süperoksid oksidoredüktaz], oksijen metabolizmasının olduğu tüm yapılarda bulunmaktadır. Bu enzimin aktivitesi bakır, çinko ve mangan elementleriyle düzenlenmektedir (37).



İnsan hücrelerinde sitozolde ve mitokondri membran aralığında yer almaktadır ve süperoksidi hidrojen perokside dönüştürmekle görevli olduğu bilinmektedir (37).

Katalaz, bir hemoprotein olup aktivitesi demir iyonlarıyla düzenlenmektedir. Yüksek düzeyde hidrojen peroksid oluştuğunda katalaz enzimi aktivasyonu da artmaktadır (38).

#### Glutasyon Redüktaz (GR)

Yükseltgenmiş glutasyonu indirgemedi görev almaktadır. Bu işlev sırasında NADPH bileşiğine ihtiyaç duymaktadır. Böylece hücre yapısı için önemli olan GSH/GSSG oranının korunmasını sağlamaktadır (39).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px); hidrojen peroksid ve lipid peroksidleri de indirgenmesini ve glutasyonun yükseltgenmesini sağlamaktadır. Aktivasyonu için selenyum elementine ihtiyaç duymaktadır (40).

#### 4.2.9. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma

Ekstraselüler sıvılarda antioksidan enzimlerin aktivite göstermediği bilinmektedir. Çünkü bu sıvılar antioksidan enzimler içermezler. Ekstraselüler yapılarda antioksidan sistemin çalışma esası, oksidan yapıların geçiş metalleriyle karşılaşmasını önlemektir. Vücut sıvılarında antioksidan savunma, transferrin, laktoferrin, haptogloblin, mukus, bilirubin, hemopeksin, ürik asit, glukoz gibi yapılardan meydana gelmektedir. Transferrin 2 tane  $\text{Fe}^{3+}$  bağlar, laktoferrin ise bu işlemi düşük pH'da gerçekleştirmektedir (41).

Bilirubin aktivitesi oksijen yoğunluğuna bağlıdır ve singlet oksijeni yok etmede görev almaktadır. Ayrıca  $\beta$ -karoten de aynı özellik ve işlevde görev almaktadır (38).

Süperoksit radikali, serüloplazmin tarafından etkisiz hale getirilir. Albümin HOCl radikalini toplar ve bakır metal iyonunu bağladığı bilinmektedir (41).

#### **4.2.10. Vitaminlerin Antioksidan Mekanizmalardaki Önemi**

Vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol)

$\alpha$ -tokoferol kolay oksitlenebilen bir yapıya sahiptir. Isı, ışık, asit gibi etkenlere dayanıklı iken ultraviyole ışınlarına karşı çok dayanıksızdır. Vitamin E'nin diğer tokoferollerden farkı 6-hidroksi kroman halkasındaki metil gruplarının bulunduğu konumun farklılığı ve bu metil gruplarının sayısıdır (42, 43).

Vitamin E, hidrofobik yapısından ötürü yalnızca hücre membranında aktivite göstererek, lipidlerde peroksidasyon zincirinin durdurulmasında görev almaktadır (42, 43). Vitamin E, kapsamlı bir antioksidan gücüne sahiptir. Bu güç özellikle 4 önemli etkiden kaynaklanır:

- Radikal giderme (radikalleri toplama ve temizleme yoluyla)
- Bu radikal türlerini oluşturan reaksiyonları durdurma veya reaksiyon hızlarını negatif olarak etkileme
- Endojen antioksidan savunma gücünü artırma
- Zarar gören yapıları onarma (42, 43).

Vitamin C (askorbik asid)

Askorbik asid (Vitamin C) hücre membranı dışındaki yapılarda bulunur ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasında görevlidir. Ayrıca lipid peroksidasyonu ürünü olan LOOH gibi yapıların sudaki çözünürlüğünü artırır. Antioksidan aktivitesini yitirmiş olan Vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlar (44, 45).

#### **4.2.11. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Mekanizmalardaki Önemi**

2001 yılında yapılan, meyvelerde, şarap ve çayda bulunan fenolik bileşiklerin kimyasal ve farmolojik özelliklerini kapsayan çalışmalarda, birçok bilgi elde edilmiştir. Fenolik maddelerin, koroner kalp yetmezliği ve kanser türlerini kapsayan çeşitli hastalıklarda koruyucu rolünün bulunduğu ispatlanmıştır. Fenolik bileşikler, asidik fenolik hidroksil grubunun elektron verme aktivitesi sayesinde antioksidan etki gösterirler (46).

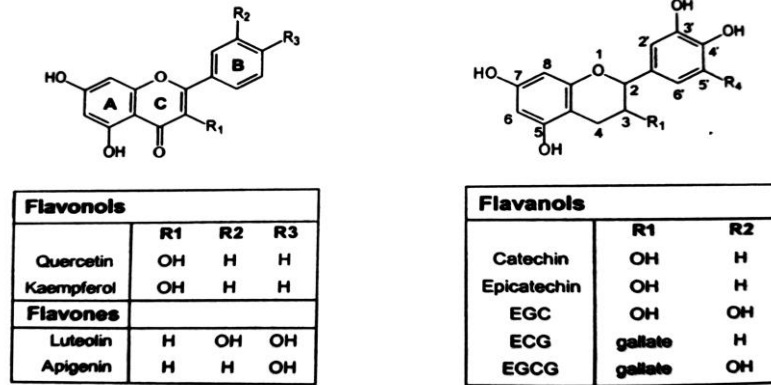
Fenolik asitlerin ve 30'dan fazla flavonoid yapısındaki fenolik maddelerin antioksidan özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bileşiklerin vitamin E analogu olan Trolox'tan daha yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olduğu ispatlanmıştır (46, 47).

Fenolik bileşiklerin doğrudan radikal süpürücü etkilerinin yanında, DNA ve lipidleri ROS tarafından kaynaklanan oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (48).

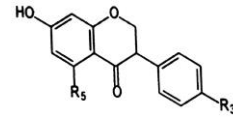
#### 4.2.11.1. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeletini 15 karbon atomlu difenilpropan yapısı oluşturur. Fenil halkalarının propan zincirine değişik pozisyonlarda bağlanmaları nedeniyle sınıflara ayrılırlar. Ayrıca bu yapı iskeletindeki halkalı yapılara eklenen farklı gruplar sayesinde değişik derecede antioksidan etki gösterirler (48, 49).

Flavonoidler C halkasının oksidasyon derecesine göre ve halka yapısındaki hidroksilasyona göre çeşitli yapılara ayrılırlar. Ayrıca çok sayıda in vitro çalışma flavonoidleri, reaktif oksijen türlerine karşı etkili güçlü antioksidanlar olarak tanımlamıştır (49).

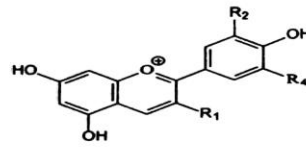


Şekil 8. 1,3-Difenilpropan İskeletine Sahip Flavonoidler (49)



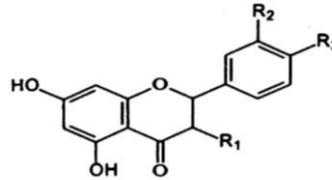
| Isoflavones |    |    |
|-------------|----|----|
|             | R3 | R5 |
| Genistein   | OH | OH |
| Daidzein    | OH | H  |

Şekil 9. 1,2-Difenilpropan İskeletine Sahip Flavonoidler (49)



| Anthocyanidins |                  |                  |
|----------------|------------------|------------------|
|                | R2               | R4               |
| Cyanidin       | OH               | H                |
| Malvidin       | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> |
| Delphinidin    | OH               | OH               |

Şekil 10. 1,3 Difenil Propan Yapı İskeletine Sahip Başka Bir Flavonoid Çeşidi Antosiyanidin (49)



| Flavanones |    |                  |    |
|------------|----|------------------|----|
|            | R1 | R2               | R3 |
| Taxifolin  | OH | OH               | OH |
| Naringenin | H  | H                | OH |
| Hesperetin | OH | OCH <sub>3</sub> | H  |

Şekil 11. 1,3 Difenil Propan Yapı İskeletine Sahip Flavanon (49)

#### 4.2.11.2. Fenolik Asitler

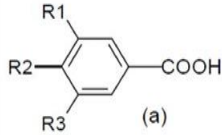
Fenolik asitler Hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinamik asitler olarak iki sınıfa ayrılırlar:

### Hidroksibenzoik Asid (HBA)

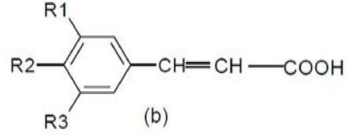
HBA'lar benzoik asid türevli bileşiklerdir. Yapısal değişkenliklerinin altında, aromatik halkanın hidroksilasyon ve metoksilasyon işlemlerine uğramaları yer almaktadır (49).

### Hidroksisinamik Asid (HCA)

HCA'lar Fenolik bileşiklerin önemli parçasıdır. Bu bileşiklerin önemi, bol miktarda olan, yapısal farklılıklarından kaynaklanmaktadır. HCA'ların hepsi sinamik asitten türerler. Genellikle de dört temel molekülün kombine formları olarak mevcuttur. Bu dört temel molekül kumarik asid, kafeik asid, ferulik asid ve sinapik asid yapılarıdır (49).



(a)



(b)

| Asit                      | R1                | R2 | R3                | Asit              | R1                | R2 | R3                |
|---------------------------|-------------------|----|-------------------|-------------------|-------------------|----|-------------------|
| <i>p</i> -Hidroksibenzoik | H                 | OH | H                 | <i>p</i> -Kumarik | H                 | OH | H                 |
| Pirokate şüik             | H                 | OH | OH                | Kafeik            | H                 | OH | OH                |
| Vanilik                   | CH <sub>3</sub> O | OH | H                 | Ferulik           | CH <sub>3</sub> O | OH | H                 |
| Siringik                  | CH <sub>3</sub> O | OH | CH <sub>3</sub> O | Sinapik           | CH <sub>3</sub> O | OH | CH <sub>3</sub> O |
| Gallik                    | OH                | OH | OH                |                   |                   |    |                   |

Şekil 12. HCA ve HCB Yapı İskeletlerinin Gösterimi (49)

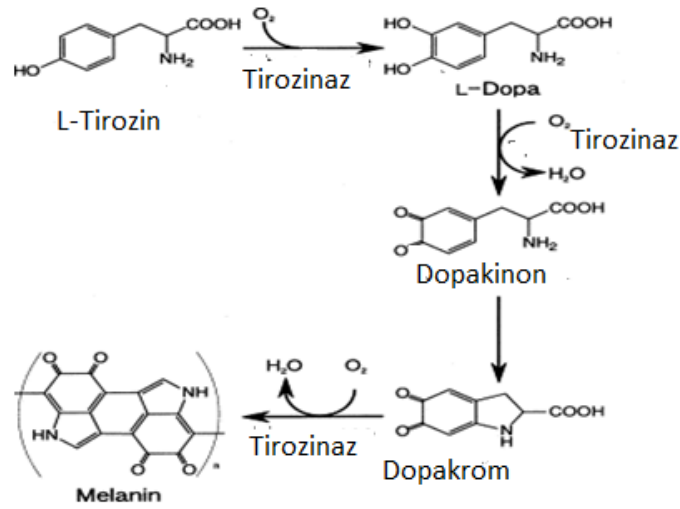
## 4.3. Çalışmada Kullanılan Enzimler Hakkında Genel Bilgiler

### 4.3.1. Tirozinaz Enzimi

Oksidoredüktaz enzim sınıfına ait olan tirozinaz (Tirozinaz: E.C.1.10.3.1) enzimi doğada memelilerde, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve mantarlarda, hayvansal organizmaların özellikle deri, saç ve göz pigmentlerinde bulunmaktadır.

Tirozinazın monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu katalizlediği kabul edilmektedir. Melanositlerde tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu, L-DOPA'nın dopakinon'a oksidasyonu, dopakinonun

siklizasyon ve oksidatif polimerizasyonunu içeren ardışık reaksiyonlarla melanine dönüşmesini sağlamaktadır (50).



**Şekil 13.** Tirozinaz Enzim Fonksiyonu ve Melanin Oluşumu

Melanin negatif yüklü karboksil grupları ve semikinonlar içerdiğinden katyonik maddeler, iyonik olarak, van der Waals veya hidrofobik etkileşimlerle melanine bağlandığı bilinmektedir. Melanine bağlanma fizyolojik önemi tam olarak bilinmese de melanin bulunduğu dokularda kimyasal bir filtre görevi görerek, zararlı maddeleri kendine bağladığı ve düşük konsantrasyonlarda salınımını sağlayarak dokuyu koruduğu düşünülmektedir (50).

Melanin ultraviyole ışınları absorblayarak cildi UV hasarına, reaktif oksijen türlerine karşı koruduğu, toksik maddelerin ve ilaç kalıntılarının uzaklaşmasını sağladığı bilinmektedir. Pigmentlerin düzensiz dağılımı sonucu dermatolojik şikayetler meydana gelmekte, hiperpigmentasyonun veya hipopigmentasyonun ve kötü huylu tümörlerin göstergesi olarak kabul edilmektedir (50).

Tirozinaz inhibitörü olarak kullanılan bazı ilaçların toksik olması doğal tirozinaz inhibitörlerine olan ilginin artmasına sebep olduğu kabul edilmektedir.

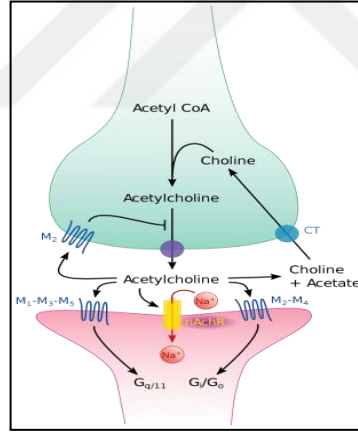
Dopaminin oksidasyonu ile oluşan metabolitler dopamin kinon olarak bilinmektedir ve beyinde nörotoksositeye sebep olduğu bildirilmiştir. Tirozinaz, tirozinin dopakinona dönüşümünü katalizlediğinden dolayı enzim inhibitörlerinin Alzheimer tedavisinde yeni bir yol olabileceği düşünülmektedir (51).

Bütün bunlar tirozinaz enzim etkinliği ile ilgili araştırmaların önemini göstermektedir (51).

#### 4.3.2. Asetil-bütirilkolinesteraz Enzimleri

Asetilkolin (ACh) kolinerjik nöronların gövdesinde asetil-KoA'dan gelen asetil ve kolinin kolin asetiltransferaz (ChAT) aracılığıyla oluşan, beyinde bellek ile ilgili bölgelerde görev alan önemli bir nörotransmitterdir (52).

Presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanan ACh, nörona sinir uyarısı geldiğinde i sinaptik boşluğa döküldükten sonra genellikle postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh moleküllerinin yıkılımı ise AChE (asetilkolinesteraz) tarafından gerçekleştirilir. ACh molekülleri postsinaptik nöronda sinir uyarısını gerçekleştirdikten sonra ilgili reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılması ile oluşan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (52, 53).



**Şekil 14.** Asetilkolin-Asetilkolinesteraz Enzimi Arasındaki Metabolik Denge (53)

Plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunan kolinesterazlar, kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılım gösterirler. Kolinesterazlar AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolin asetilhidrolaz) ve bütirilkolinesteraz (BChE: E.C.3.1.1.8 açilkolin açilhidrolaz) spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu sınıflandırmada substrat özgüllüğü, aşırı substrat varlığındaki davranışları ve inhibitörlere karşı

duyarlılıkları göz önüne alınmıştır. AChE beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen; BChE serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunmaktadır (52, 53).

AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılması iken diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir. Alzheimer hastalığında asetilkolin salınımında azalma gözlenir. Bunun sebebi, nöron ve akson kaybının olmasıdır. Azalan Asetilkolin düzeyini arttırmak için kullanılan yöntemlerden biri, asetilkolini yıkan AChE enzimini baskılamaktır. Yapılan çalışmalar, Alzheimer hastalığının erken evrelerinde AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışlarının hastalığı iyileştirebileceğini göstermiştir. Alzheimer hastalığının tedavisinde kolinesteraz enzim inhibitörlerinin tercih edilmesi sebebiyle, tez kapsamında enzim inhibitör çalışmalarına yer verilmiştir (53, 54).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Gereç

#### 5.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Cihazlara Ait Firmalar

| Cihaz adı               | Model        | Marka            |
|-------------------------|--------------|------------------|
| pH metre                | Starter 3000 | OHAUS            |
| Manyetik karıştırıcı    | MR HEI       | Heidolph         |
| Hassas terazi           |              | OHAUS Pioneer    |
| Biyogüvenlik kabini     |              | BİLSER           |
| Santrifüj               |              | SİGMA            |
| İnkübatör               |              | MEMMERT          |
| Vorteks                 |              | İSOLAB           |
| Spektrofotometre cihazı |              | UV-1800 Shimadzu |

#### 5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemelerin listesi Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2.** Madde, Marka ve Ürün Numaraları

| Madde                                            | Marka ve Lot numarası     |
|--------------------------------------------------|---------------------------|
| Metanol (CH <sub>3</sub> OH)                     | Merck, 106009             |
| Tirozinaz                                        | Sigma, T3824-25KU         |
| Kojik asit                                       | Sigma, K3125-5G           |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | Sigma Aldrich, 7558-80-7  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | Sigma Aldrich, 10039-32-4 |
| L-DOPA                                           | Sigma, D9628-5G           |
| 8-Metoksipsoralen                                | Roth, 5497.2              |
| HCl                                              | Sigma, 7647-01-0          |
| FeCl <sub>3</sub>                                | Sigma, 77-05-08-0         |
| TPTZ                                             | Sigma 3682-35-7           |
| Troloks                                          | Sigma, 53188-07-1         |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                  | Sigma, 497-19-8           |
| CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O             | Sigma, 10125-13-0         |
| NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> | Sigma, 631-61-8           |
| Neocuproin                                       | Sigma, 654054-57-6        |
| DDPH                                             | Sigma, 1898-66-4          |
| Gallic asit                                      | Sigma, 149-91-7           |
| L-DOPA                                           | Sigma, 59-92-7            |
| Folin Reaktifi                                   | Sigma, 800-188-25         |

### 5.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

#### 5.1.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- 0,2 N Folin-Ciocalteu : 2 N Folin 1:10 oranında saf suyla seyreltildi.
- % 7,5'luk  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  : 90 mL su içerisinde 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözüldükten sonra su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Gallik Asit Çözeltisi : 31,25-62,5-125-250-500-1000 $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarda 1000  $\mu\text{g/mL}$  stok çözeltiden hareketle %99,8'lik metanol ile seyreltilerek hazırlandı.

#### 5.1.3.2. FRAP (Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- 40 mM HCl : 340  $\mu\text{L}$  % 37'lik HCl saf suyun bir kısmıyla çözdürüldükten sonra yine saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
- 10 mM TPTZ : 75 mL 40 mM'luk HCl içerisinde 234,249 mg TPTZ çözüldü.
- 20 mM  $\text{FeCl}_3$  : 324,4 mg  $\text{FeCl}_3$  saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6) : 2,5 ml asetik asit su ile 40 mL'ye tamamlandıktan sonra 90 mL %99,8'lik metanol ilave edildi, daha sonra 0,5 M NaOH ile pH=3,6'ya ayarlandıktan sonra 150 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- FRAP Reaktifi : 10:1:1 oranında yukarıda belirtilen asetat tamponu: TPTZ:  $\text{FeCl}_3$  çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.
- Troloks Çözeltisi : Troloks'un 1000, 500, 250, 125, 62,5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları etanolle uygun oranda seyreltilerek hazırlandı.

#### 5.1.3.3. CUPRAC (Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite Yöntemi) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- 10 mM  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 92,4 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  distile su ile 50 mL'ye tamamlandı (pH:7'ye NaOH ile ayarlandı).
- 1M  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}^-$  : 3,8 g  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}^-$  distile su ile 50 mL'ye tamamlandı (pH:7'ye NaOH ile ayarlandı).
- 7,5 mM Neokuproin : 78 mg neokuproin 50 mL %99,8'lik metanol ile Çözeltisi çözülerek hazırlandı.
- Troloks Çözeltisi : Troloks'un 1000, 500, 250, 125, 62,5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları etanolle uygun oranda seyreltilerek hazırlandı.

#### 5.1.3.4. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Kapasitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- DPPH Reaktifi: : 3,94 mg DPPH 90 mL %99,8'lik metanolle çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- BHT Çözeltisi: : 0,01 mg/mL stok çözeltiden 0,005 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,00625 mg/mL azalan konsantrasyonlarda 1:1 oranında %99,8'lik metanol ile seyreltilerek hazırlandı.

#### 5.1.4. Numunenin Toplanması ve Ekstrelerin Hazırlanması

Herbaryum numarası 24440 olan *Myosotis alpestris* bitkisi 2016 Haziran ayında Artvin ili, Yusufeli ilçesi, Demirkent köyünden Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU tarafından toplandı. Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU tarafından teşhis edildi. *M. alpestri* bitkisinin topraküstü kısımları alınarak gölgede kurutuldu ve öğütücü ile toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş bitkinin topraküstü kısmından 200 g tartılarak alındı. Metanolik ve sulu ekstrelerinin hazırlanması için 24 saat boyunca ısıtıcı çalkalayıcıda tutuldu. Çözeltiliyi katı partiküllerden arındırmak için önce normal süzgeç kağıdından daha sonra mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek

son hacimleri (50 mL) ayarlanarak konsantrasyonları belirlendi. Sulu ve metanolik ekstreler analiz süresine kadar +4 °C’de muhafaza edildi.

## **5.2. Yöntemler**

### **5.2.1. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler**

*M. alpestris* bitkisinin toprak üstü kısımları kurutulup toz haline getirildikten sonra; sulu ve metanolik ekstrelerinde Toplam Fenolik Madde miktarları, FRAP (Demir(III) İndirgeyici Antioksidan Güç), CUPRAC (Bakır(II) İyon İndirgeyici Antioksidan Kapasite, DPPH (2,2-Difenil-1-pikril hidrazil) antioksidan aktiviteler bakıldı.

#### **5.2.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini**

Toplam fenolik madde ölçümü için Folin Ciocalteu reaktifi yaygın olarak kullanılmaktadır. Metot alkali ortamda fenolik yapıya sahip bileşiklerin renkli kompleks oluşturması ve absorbansın 765 nm’de okunması esasına dayanmaktadır (55)

Standart olarak gallik asidin farklı konsantrasyonları (1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 ve 0.03125 mg/mL) hazırlanıp absorbansları okunmuştur. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri ile grafik çizilmiştir. Çizilen grafiğe göre bitki ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı bulunmuş ve sonuçlar mg GAE (Gallik Asit Eşdeğeri)/g numune olarak ifade edilmiştir. Toplam fenolik madde ölçümü aşağıdaki yöntem takip edilerek yapılmıştır.

| Yöntem                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 50 µL numune, (¼ seyreltilen) (veya standart, her biri 3 paralel)<br>(Test tüplerine numune körü sırasına numune pipetlendi.) |
| ↓                                                                                                                             |
| 50 µL numune çözücüsü reaktif körü sırasına göre pipetlendi.                                                                  |
| ↓                                                                                                                             |
| Bütün tüplere 2.5 mL saf su ilave edildi.                                                                                     |
| ↓                                                                                                                             |
| 250 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi (3. sıra numune körüne su)<br>( 20 sn arayla pipetlendi)                         |
| ↓                                                                                                                             |
| Karıştırıldı ve 3 dk. oda sıcaklığında bekletildi.                                                                            |
| ↓                                                                                                                             |
| 750 µL % 7.5'lik Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ilave edildi ve vortekslendi.                                                |
| ↓                                                                                                                             |
| Oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.                                                                                           |
| ↓                                                                                                                             |
| 765 nm dalga boyunda 20 sn arayla absorbanslar okundu.                                                                        |

**Şekil 15.** Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi

#### 5.2.1.2. FRAP (Demir(III) İndirgeyici Antioksidan Güç)

FRAP metodu basit, hızlı, pahalı olmayan ve bitki ekstraktlarındaki antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde geçerli bir yöntem olarak görülmektedir. Yöntem düşük pH'da Fe(III)-TPTZ(2,4,6-tripiridil-S-triazin) kompleksinin koyu mavi renkli Fe(II)-TPTZ formuna indirgenmesi ve kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanır (56). Bu yöntemle göre indirgeme kuvveti, numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup  $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$  indirgenmesi ile meydana gelen  $Fe^{+2}$ ,  $K_3(Fe)CN_6$  ün 595 nm'de absorbans veren

renkli kompleksini oluşturur. Bu yöntemde bitki ekstrahelerin ve standardın (Troloks) belli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı ve standart Troloks metanol ile seyreltilerek 5 farklı konsantrasyonu (1000- 500- 250-125-62.5 µM) hazırlandı. 595 nm'deki absorbans değeri grafiğe geçirilerek standart grafiği oluşturuldu. FRAP değerleri grafikten yararlanılarak g numune başına µM olarak hesaplandı. Numuneler üçlü olarak çalışılmıştır.

#### **FRAP Metodunun Yapılışı**

- FRAP reaktifi taze hazırlandı, kullanılmaya başlayıncaya kadar düşük hızda karıştırıldı.
- Test çözeltileri hazırlandı.
- Test 1, Test 2 ve Test 3 ve numune körü sıralarına 100 µL test çözeltileri ve reaktif körü sırasına 100 µL numune çözücüsü pipetlendi.
- Test 1, Test 2 ve Test 3 reaktif körü sıralarına 3.0 mL FRAP reaktifi, numune körü sırasına ise 3.0 mL FRAP çözücüsü (su-metanol (2:3) 20 sn arayla pipetlendi ve vortekslendi.
- İlk pipetlenen tüpten başlanarak 20. dakikası dolan tüp alınıp, plastik küvete aktarıldı ve absorbans 595 nm'de okundu. Tüpler arası süre 20 saniyeye ayarlandı.
- $A_{595}$  [Troloks]'a karşı grafiğe geçildi. FRAP değeri aşağıdaki gibi hesaplandı:
- $FRAP \text{ değeri} = (\text{Numune absorbansının karşılık geldiği [Troloks]} \times 2) \mu M$

#### **5.2.1.3. CUPRAC (Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite) Yöntemi**

Bu yöntem, karmaşık ve yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan kısa sürede sonuç almamızı sağlayan kullanımı kolay, hızlı, etkili ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Apak ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde, 2,9- dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), antioksidan maddeler varlığında 450 nm' de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme özelliğinden yararlanarak antioksidan kapasite ölçülmektedir (57). Bu yöntemde bitki ekstrahelerin ve standardın (Troloks) belli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı ve standart Troloks metanol ile seyreltilerek 5 farklı konsantrasyonu (1000- 500- 250-125-62.5

$\mu\text{M}$ ) hazırlandı. 450 nm'deki absorbans değeri grafiğe geçirilerek standart grafiği oluşturuldu. CUPRAC değerleri grafikten yararlanılarak g numune başına  $\mu\text{M}$  Troloks olarak hesaplandı. Numuneler üç paralel olarak çalışılmıştır.

#### **CUPRAC Yönteminin Yapılması**

- Reaktifler ve Test çözeltileri hazırlandı.
- Test 1, Test 2 ve Test 3 ve numune körü sıralarına 500  $\mu\text{L}$  test çözeltileri ve reaktif körü sırasına 500  $\mu\text{L}$  numune çözücüsü pipetlendi.
- Test 1, Test 2 ve Test 3, reaktif körü, numune körü sıralarına 1000  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}^-$  ve 1000  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pipetlendi.
- Test 1, Test 2 ve Test 3 ve reaktif körü sıralarına 1000  $\mu\text{L}$  neokuproin reaktifi pipetlenirken numune körü sıralarına 1000  $\mu\text{L}$  reaktif çözücüsü (metanol) 20 sn arayla pipetlendi ve vortekslendi.
- Karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- İlk pipetlenen tüpten başlanarak 30. dakikası dolan tüp alınıp, plastik küvete aktarıldı ve absorbans 450 nm'de okundu. Tüpler arası süre 20 saniyeye ayarlandı.

#### **5.2.1.4. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi**

DPPH $\cdot$  (2,2 Difenil-1- pikrilhidrazil) bir molekül üzerinde elektron çiftinin yer eğiştirmesiyle karakterize olmuş kararlı bir serbest radikaldır. Diğer serbest radikallrde olduğu gibi molekül dimerize olmaz. Bu elektron delokalizasyonu yoğun koyu mor menekşe rengin oluşmasını sağlar. Mor menekşe renk metanolde 517 nm de maksimum absorpsiyon verir. Bu absorpsiyon, radikal süpürücülerin hidrojen atomu veya elektron verebilme yatkınlıkları etkisiyle DPPH'nın metanoldeki çözeltisinin mor renginin açılmasıyla azalır. Bu yöntem antioksidan madde varlığında bu absorbans miktarındaki azalıştan faydalanarak bu maddelerin tespit edilmesi esasına dayanmaktadır (58, 59, 60,61).

DPPH aktivitesini kontrol etmek için 100  $\mu\text{M}$  DPPH çözeltisi ile deneme yapıldı. Belirli konsantrasyondaki numuneden ve DPPH çözeltisinden eşit miktarda alınarak renk değişimi gözlemlendi. Rengin çok açık mor olması aktivitenin yüksek olduğunu gösterir. Örneğin; Konsantrasyonu 2 mg/mL olan bitki numunesi için 100  $\mu\text{M}$  DPPH (750  $\mu\text{L}$ ) ve bitki numunesi (750  $\mu\text{L}$ ) bir tüpte karıştırıldığında rengin

sarıya yakın olduğu gözlemlendi. Bunun için numuneden gerekli seyreltmeler yapıldı ve aktivite için uygun bitki ekstresi konsantrasyonun 0.25 mg/mL olduğu gözlemlendi. Gerekli seyreltmeler bitkinin çözücü kullanılarak 6 farklı konsantrasyonda hazırlandı. Standart olarak Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) 6 farklı konsantrasyonda metanol ile seyreltilerek hazırlandı.

#### Yöntemin Yapılışı:

- DPPH çözeltisi 6 farklı konsantrasyonda (200, 150, 100, 75, 50, 25  $\mu$ M) metanolde hazırlandı (Günlük hazırlanır).
- Deney tüpleri, her bir numune, kontrol ve standart için hazırlandı.
- Kontrol tüplerine (C) ve numune tüplerine (N) 750  $\mu$ L numune konuldu.
- Numune körü tüplerine (K) numune yerine 750  $\mu$ L numune çözücüsü ilave edildi.
- Numune pipetlemesi bitince 20 sn arayla önce kontrol tüplerine ardından numune tüplerine 750  $\mu$ L DPPH çözeltisi ve en son numune körlerine 750  $\mu$ L DPPH çözücüsü (metanol) pipetlendi.
- 50 dk. bekletildikten sonra 20 sn arayla absorbans okundu.
- Sonuçlar grafiğe geçirilip herbir ekstrenin SC<sub>50</sub> değeri hesaplandı.

### 5.2.2. Çalışmada Kullanılan Enzim Deneyleri

#### 5.2.2.1. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu

Tez kapsamında çalışılan bitkinin 10 mg/mL olarak hazırlanan metanol ekstresinin potasyum fosfat tamponu (pH=6,8) ile 25, 50, 100 ve 500  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde dilüe örnekleri elde edildi. Ekstrelerin tirozinaz inhibisyon kapasitesi, L-DOPA'nın substrat olarak kullanıldığı Likhitwitayawuid ve Sritularak tarafından modifiye edilen yöntem ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (62). Pozitif kontrol için fungal bir metabolik ürün olan ve bakır ile şelasyon sonucu güçlü tirozinaz inhibitör özellik gösteren alfa-kojik asit farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak (25, 50, 100 ve 500  $\mu$ g/mL) kullanılmıştır. Örneklerin ölçümleri 96-kuyucuklu mikropalak kullanılarak, ELISA okuyucuda gerçekleştirildi. Deney protokolü A, B, C ve D karışımları olarak oluşturulmuştur. A, 120  $\mu$ L fosfat tamponu (pH=6.8), 40  $\mu$ L tirozinaz solüsyonu (46 U/ mL); B, 160  $\mu$ L fosfat tamponu (pH=6.8); C, 80  $\mu$ L fosfat tamponu (pH=6.8), 40  $\mu$ L tirozinaz

solüsyonu (46 U/ 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 konulmuş ve tekrar 23 °C’de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında mikropalaklar ELISA cihazına yerleştirilerek, örnekler ve kontrol numunesinin absorbansları 490 nm dalga boyunda okunarak, ilgili kuyucuklara ait absorbanslar formülde yerlerine yazılarak hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmıştır (62).

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

Elde edilen sonuçlar madde miktarının logaritması - % enzim inhibisyon değeri (absis-ordinat) olacak şekilde grafiğe geçirilmiş ve elde edilen denklemden ekstrelerin enzim üzerine olan inhibisyon yüzde değerleri hesaplanmıştır (62).

#### 5.2.2.2. Antikolinesteraz Tayin Yöntemleri

Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5- tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5’-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir yöntem olan Ellman metodu, 96 kuyucuklu mikropalaklarda gerçekleştirilecektir (63).

#### Asetilkolinesteraz Enzim İnhibisyon Yöntemi

Asetilkolinesteraz aktivitesi için enzim olarak asetil kolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanıldı. Mikropalakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), *M. alpestris* bitki ekstresinden 25-50-100-200 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve 20 µL substrat herbir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak (antikolinesteraz) *Galanthus* bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanıldı. Mikropalaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu. Aktivite gösteren bileşiklerin, seri halinde 200 µg/mL’den 25 µg/mL’ye kadar seyreltilmiş çözeltileri ve yine bu konsantrasyonlardaki AChE enzim yüzde inhibisyon değerleri, aynı işlemlerin tekrarlanması yoluyla, hesap edildi.

### Bütirilkolinesteraz Enzim İnhibisyon Yöntemi

Bütirilkolinesteraz aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise bütiriltiyokolin iyodür kullanıldı. Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), *M. alpestris* bitki ekstresinden 25-50-100-200 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C’de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak (antikolinesteraz) Galanthus bitkisinden izole edilen alkoloid tipi ilaç olan Galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu. Aktivite gösteren bileşiklerin, seri halinde 200 µg/mL’den 25 µg/mL’ye kadar seyreltilmiş çözeltileri ve yine bu konsantrasyonlardaki BChE enzim yüzde inhibisyon değerleri, aynı işlemlerin tekrarlanması yoluyla hesap edildi (64).

#### 5.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal aktivite testleri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Mikrobiyoloji Labrotuarı’nda yapıldı. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları Tablo 3’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Test Edilmiş Mikroorganizmalar

|                                             |                                                                                   |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Gram pozitif koklar;                        | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, |
| Gram pozitif sporlu basiller;               | <i>Bacillus cereus</i> 709 ROMA                                                   |
| Gram pozitif sporsuz basiller;              | <i>Listeria monositogenes</i> ATCC 43251                                          |
| Gram almayan asidoresistant bakteri;        | <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC607                                            |
| Gram negatif enterik bakteriler (basiller); | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911 ve <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 |
| Gram Negatif non fermentatif bakteri;       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 43288                                          |
| Maya mantarları;                            | <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 ve <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RSKK 251    |

#### 5.2.3.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

*Myosotis alpestris* bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri olup olmadığının belirlenmesinde ilk olarak agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı

(65). Bakteriler için Mueller Hinton agar ve sıvı besiyerleri, *Mycobacterium smegmatis* için Brain heart infusion (BHI) sıvı ve katı besiyeri, mantarlar için maya ekstreli sıvı besiyeri (YEG) (Difco, Detroit, MI) ve Potato Dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, MI) kullanıldı. Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden sıvı besiyeri içinde yaklaşık olarak  $10^6$  kob/mL (koloni oluşturan birim: colony forming unit) şeklinde dilüsyonları hazırlandı. Daha sonra önceden hazırlanmış katı besiyerlerine yaygın ekimleri yapıldı. Ekimleri tamamlanan besiyerlerin üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açılarak her bir kuyucuğa test edilecek ekstraların 1 mL’de hazırlanmış stok çözeltilerinden 50 µL damlatıldı. Bakteri ihtiva eden petriler 24 saat, maya ihtiva eden petriler ise 48 saat 36 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zonları ölçüldü. Standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), mayalar için Flukonazol (5 µg), *M. smegmatis* için Streptomisin ve standart çözücü kontrolü kullanıldı (65).

#### 5.2.3.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Tayini

Agar kuyucuk difüzyon metodunda *M. alpestris* bitki ekstralarının 500-250 µg/mL miktarlarının 10 mm ve üzeri zon çapı oluşturdıklarından bu etkinliğin kantitatif etki değerinin belirlenmesi için sıvı besiyerlerinde mikrodilüsyon sıvı yöntemi uygulanarak, minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) ve Bakterisit konsantrasyon (MBC) değeri µg/mL olarak belirlendi (66, 67).

MIC ve MBC yöntemi, “National Committee for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS) standartlarının belirlediği kritere göre uygulandı (66,67). Bu amaçla bakteriler için Mueller-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) besiyerleri kullanıldı. Antitüberküloz aktivitenin belirlenmesinde *Mycobacterium smegmatis* RSKK 251 suşu ve kültürü üretimi/testi için Brain Heart İnfüsyon (Difco, Detroit, MI) besiyeri kullanıldı. Kültürler 3-5 gün 35 °C’de aerobik koşullarda inkübe edildi.

Mikrodilüsyon testi için ELISA pleytleri kullanılarak ekstraların 0.1 mL’si sıvı besiyerleri ile seri sulandırıldı. İnoküle edilecek mikroorganizmaların bir gecelik

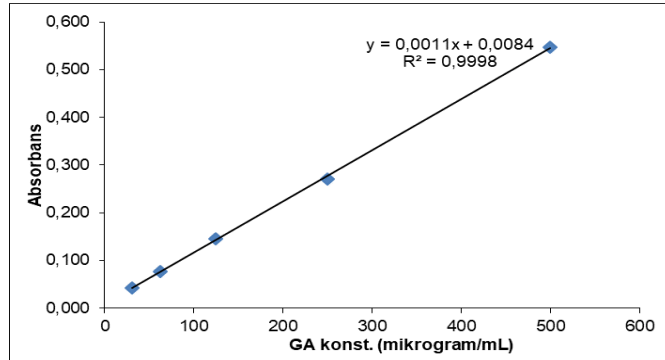
kültürlerinden McFarland 0.5 bulanıklılığında ( $1 \times 10^8$  kob/mL) sulandırım hazırlanıp 1:10 sulandırılarak her bir kuyucuğa 0.005 mL mikroorganizma (son test konsantrasyonu  $5 \times 10^4$  kob/kuyucuk) ilave edilmiştir. Pleytler 35°C’de 16-72 saat süre ile aerobik koşullarda etüvde bekletildi. MIC değeri, mikrodilüsyon kuyucuklarındaki mikroorganizmanın üremesi tamamen engellenmiş ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobik madde konsantrasyonu olarak belirlendi. Minimal bakterisit konsantrasyonu (MBC) belirlemek için üreme olmayan kuyucuklardaki dilüsyon alınıp agar plaklara ekilerek ve 35°C’de 16-24 saat de inkübasyona tabi tutuldu. Plakta üremenin olmadığı kuyucuktaki madde konsantrasyonu MBC olarak belirlendi.

## 6. BULGULAR

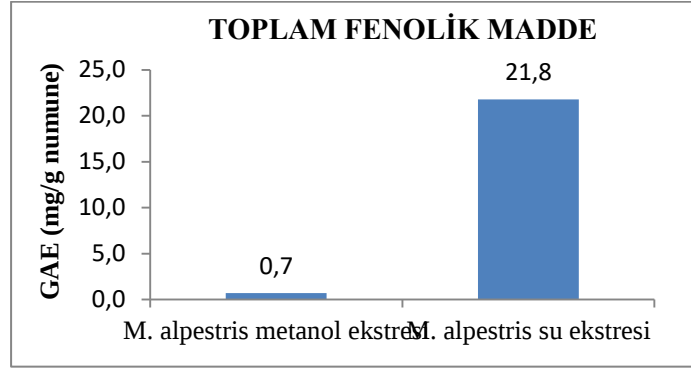
### 6.1. Toplam Fenolik Madde Miktar Bulguları

*M. alpestris* bitkisinin toprak üstü kısımlarının kurutulup toz haline getirildikten sonra hazırlanan sulu ve metanolik ekstralarında, Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini 5.2.1.1. bölümünde bahsedilen yöntemle yapıldı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart gallik asit çözeltisi ile elde edilen 765 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde standart grafiği hazırlandı. Elde edilen standart grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi  $y = 0,0011x + 0,0084$  olarak tespit edildi (Şekil 16). Sonuçlar daha sonra bar grafiği olarak ayrıca gösterildi. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g bitkinin içerdiği mg cinsinden toplam fenolik madde miktarı belirlendi.

*M. alpestris* bitkisinin su ekstresinin Toplam Fenolik Madde Miktar değeri  $21.8 \pm 0.302$  mg/g gallik asit eşdeğeri olarak, metanol ekstresinin Toplam Fenolik Madde Miktar değeri  $0.7 \pm 0.009$  mg/g gallik asit eşdeğeri olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 17).



**Şekil 16.** Toplam Fenolik Madde Tespiti Yöntemine Ait Gallik Asit Standard Grafiği

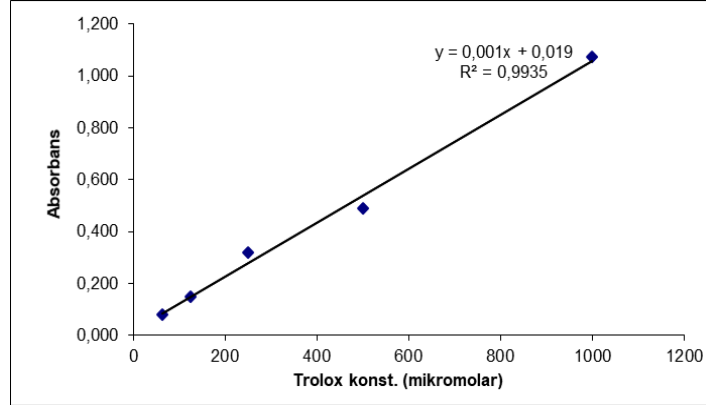


**Şekil 17.** *Myosotis alpestris* Bitkisinin Toplam Fenolik Madde Tayin Bar Grafiği

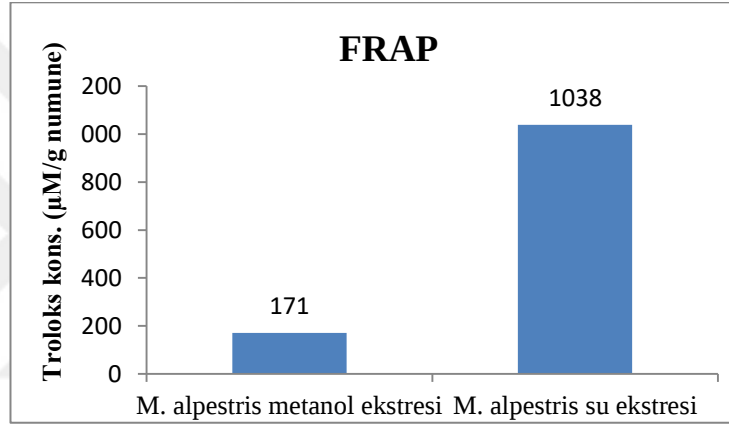
## 6.2. FRAP Metodu Bulguları

*M. alpestris* bitkisinin toprak üstü kısımlarının kurutulup toz haline getirilmesinden başlanarak hazırlanan, sulu ve metanolik ekstralarında, FRAP (Demir(III) İndirgeyici Antioksidan Güç) metodu, bölüm 5.2.1.2 de anlatılan yöntemle yapıldı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart Troloks çözeltisi ile elde edilen 595 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde standart grafiği hazırlandı. Elde edilen standart grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi  $y = 0,001x + 0,019$  (Şekil 18) olarak tespit edildi. Sonuçlar daha sonra bar grafiği olarak (Şekil 19) ayrıca gösterildi. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g bitkinin sahip olduğu antioksidan güç  $\mu\text{M}$  cinsinden belirlendi.

Elde edilen değerlerden sulu ekstrenin FRAP değeri  $1038 \pm 8.589$  Troloks eşdeğeri olarak, metanolik ekstrenin FRAP değeri de  $171 \pm 4.109$  Troloks eşdeğeri olarak tespit edildi.



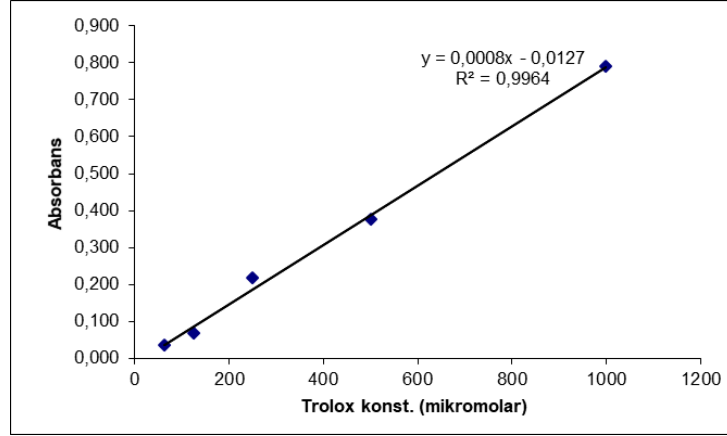
**Şekil 18.** FRAP Yöntemine Ait Troloks Standard Grafiği



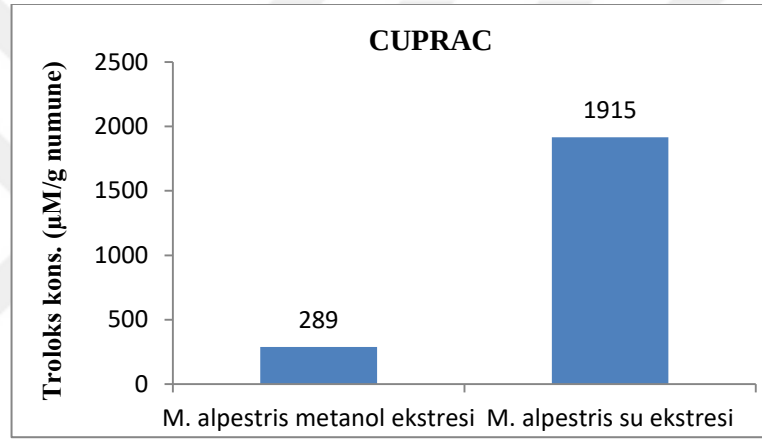
**Şekil 19.** *Myosotis alpestris* Bitkisine Ait FRAP Bar Grafiği

### 6.3. CUPRAC Metodu Bulguları

*M. alpestris* bitkisinin toprak üstü kısımlarının kurutulup toz haline getirilmesinden başlanarak hazırlanan sulu ve metanolik ekstralarında CUPRAC metodu bölüm 5.2.1.3’de anlatılan yöntemle göre anlatıldı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart Troloks çözeltisi ile elde edilen 450 nm’deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde standart grafiği hazırlandı. Elde edilen standart grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi  $y = 0,0008x - 0,0127$  (Şekil 20) olarak tespit edildi. Sonuçlar daha sonra bar grafiği olarak (Şekil 21) ayrıca gösterildi. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g bitkinin sahip olduğu antioksidan kapasite µM cinsinden belirlendi.



**Şekil 20.** CUPRAC Yöntemine Ait Troloks Standart Grafiği



**Şekil 21.** *Myosotis alpestris* Bitkisine Ait CUPRAC Grafiği

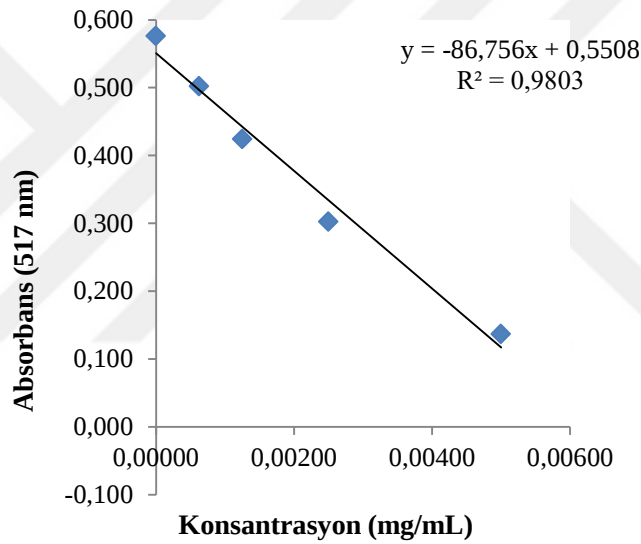
Sulu ekstrenin CUPRAC değeri  $1913 \pm 5.890$  Troloks eşdeğeri olarak bulundu. Metanolik ekstrenin CUPRAC değeri ise  $289 \pm 2.105$  Troloks eşdeğeri olarak bulundu.

#### 6.4. DPPH Metodu Bulguları

Bu metot, sentetik bir madde olan DPPH radikalının indirgeyici özellik gösteren bir antioksidan tarafından hidrojen veya elektron alması yoluyla, renk değişiminin gözlenmesi esasına dayanır. DPPH· radikalının, mor menekşe renginin, giderek sarı renk halini almasıyla karakterize edilen bu test literatürde en çok tercih edilen metotlardan biridir. Bu yöntemde, 517 nm dalga boyunda maksimum absorbanş gösteren numunenin, konsantrasyon değerlerinin seyreltilmesi yoluyla, maksimum absorbanşının azalması izlendi. Bu yöntemde gözlenen düşük  $SC_{50}$  değeri

yüksek antioksidan etkisini, yüksek SC<sub>50</sub> değeri de düşük antioksidan etkiyi temsil eder.

Bu metot ile elde edilen absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği (Şekil 22) hazırlandı. Elde edilen standart grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi  $y = -86,756x + 0,5508$  (Şekil 22) olarak tespit edildi. *M. alpestris* bitkisinin sulu ekstresinin SC<sub>50</sub> değeri  $0.2118 \pm 0.0021$ mg/mL olarak bulundu. Metanolik ekstresinin, SC<sub>50</sub> değeri  $0.6178 \pm 0.0042$  mg/mL olarak bulundu (Tablo 4).

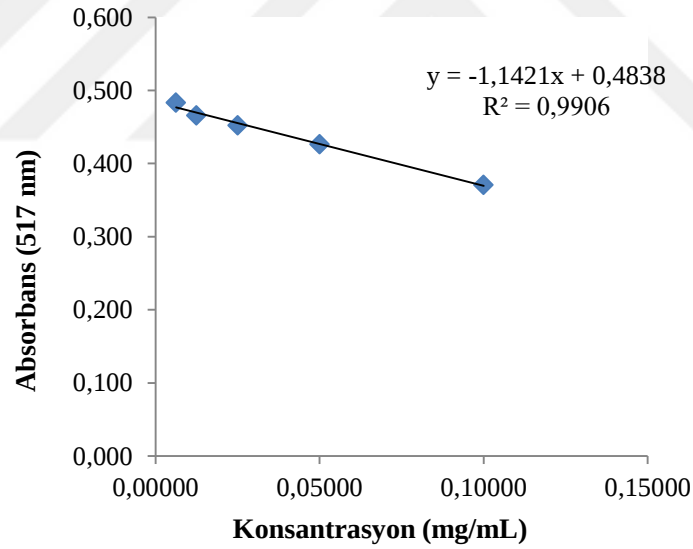


**Şekil 22.** BHT Standardının DPPH –SC<sub>50</sub> Grafiği

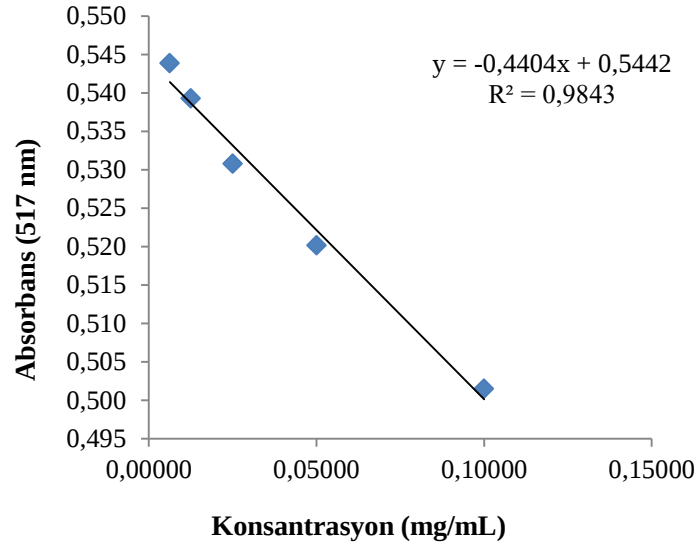
**Tablo 4.** *M. alpestris* bitkisine ait Antioksidan Etki Sonuçları

|                                            | TOPLAM FENOLİK MADDE MİKTARI (Gallik asit Eşdeğer) | FRAP (Troloks Eşdeğer)      | CUPRAC (Troloks Eşdeğer)    | DPPH                     |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                                            | (mg GAE/g numune)                                  | ( $\mu$ M Troloks/g numune) | ( $\mu$ M Troloks/g numune) | SC <sub>50</sub> (mg/mL) |
| <i>Myosotis alpestris</i> sulu ekstre      | 21.8 $\pm$ 0.302                                   | 1038 $\pm$ 8.589            | 1913 $\pm$ 5.890            | 0.2118 $\pm$ 0.0021      |
| <i>Myosotis alpestris</i> metanolik ekstre | 0.7 $\pm$ 0.009                                    | 171 $\pm$ 4.109             | 289 $\pm$ 2.105             | 0.6178 $\pm$ 0.0042      |
| BHT                                        | -                                                  | -                           | -                           | 0.0031 $\pm$ 0.0002      |

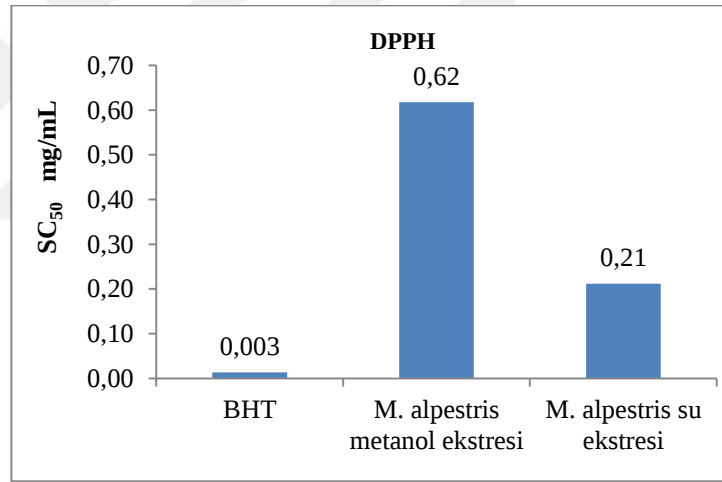
Sulu (Şekil 23) ve metanolik (Şekil 24) ekstrelerin DPPH-SC<sub>50</sub> Grafiği grafikleri çizilerek sonuçlar ayrıca bar grafiği olarak (Şekil 25) de gösterildi.



**Şekil 23.** *M. alpestris* 'in Sulu Ekstresinin DPPH-SC<sub>50</sub> Grafiği



Şekil 24. *M. alpestris* 'in Metanolik Ekstresinin DPPH-SC<sub>50</sub> Grafiği



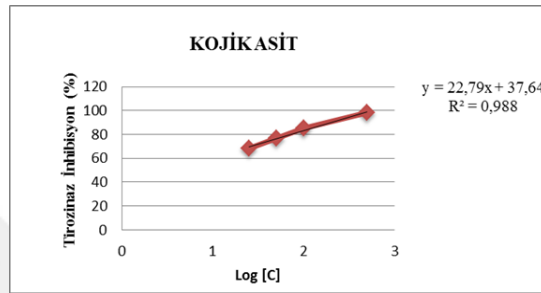
Şekil 25. *M. alpestris* Bitkisine Ait DPPH grafiği

## 6.5. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu

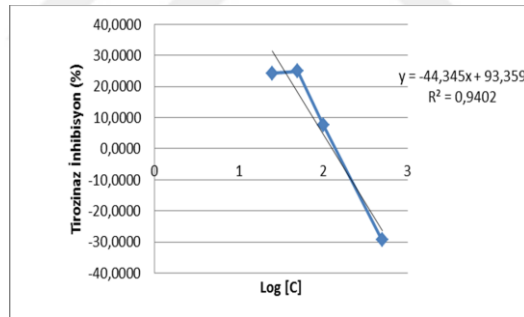
*M. alpestris* bitkisinin toprak üstü kısmının kurutulup toz haline getirilmesinden sonra oluşan metanolik ekstresinde, enzim inhibisyon etki tayini bölüm 5.2.2.1'de anlatılan yöntemle uygun şekilde yapıldı. Bu ekstrenin inhibisyon yüzdelерinin belirlenmesinde spektrofotometrik olarak Likhitwitawuid ve Sritularak (62) tarafından modifiye edilen yöntemden faydalanıldı.

*M. alpestris*'in tabi tutulduğu tirozinaz enzim inhibisyon testinde standart olan kojik asidin, artan konsantrasyonlarına bağlı olarak, enzim inhibisyon yüzdesini artırdığı Şekil 26'da görüldü.

Bitkinin toprak üstü kısmının farklı konsantrasyonlarında hazırlanan metanol ekstresi için enzim inhibisyon yüzdeleri hesaplandı. Tirozinaz enzim inhibisyonu ( $IC_{50} = >1000 \mu\text{g/mL}$ ) kojik aside ( $IC_{50} = 63,096 \mu\text{g/mL}$ ) göre oldukça yüksek bulundu.



Şekil 26. Kojik Asit Standardına Ait Tirozinaz İnhibisyon (%) Grafiği



Şekil 27. *Myosotis alpestris* Türüne Ait Tirozinaz Enzim İnhibisyon (%) Grafiği

## 6.6 Antikolinesteraz Etki Tayin Yöntemleri

*M. alpestris* bitkisi kurutulup toz haline getirildikten sonra oluşturulan metanolik ekstrede Antikolinesteraz Etki Tayini, bölüm 5.2.2.2'de anlatılan Ellman yöntemine göre yapıldı. Bu deneyde standart olarak, Alzheimer tedavisinde kullanılan Galantamin etken maddesi seçildi.

Bitkinin metanolik ekstresinin  $25 \mu\text{g/mL}$ ,  $50 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$  ve  $200 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarına ait AChE % inhibisyon değerleri;  $10,0 \pm 0,5$ ;  $19,4 \pm 0,2$ ;  $31,8 \pm$

0.3;  $43.5 \pm 0.7$  olarak; BChE % inhibisyon değerleri ise;  $26.3 \pm 0.3$ ;  $35.8 \pm 0.7$ ;  $39.4 \pm 0.5$ ;  $54.9 \pm 0.8$  olarak bulundu. Bulunan sonuçlar Tablo 5’de verildi.

**Tablo 5.** *Myosotis alpestris* Bitkisinin AChE/BchE İnhibitör Etki Sonuçları

|                          | 25 µg/mL       | 50 µg/mL       | 100 µg/mL      | 200 µg/mL       |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| AChE % inhibisyonu       | $10.0 \pm 0.5$ | $19.4 \pm 0.2$ | $31.8 \pm 0.3$ | $43.5 \pm 0.7$  |
| BChE % inhibisyonu       | $26.3 \pm 0.3$ | $35.8 \pm 0.7$ | $39.4 \pm 0.5$ | $54.9 \pm 0.8$  |
| Galantamin % inhibisyonu | -              | -              | -              | $97.13 \pm 0.3$ |

## 6.7. Antimikrobiyal Aktivite ile İlgili Bulgular

**Tablo 6.** Ekstrelerin ve Standartların İnhibisyon apları

| Test Edilen Bileşikler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Miktar (µg/mL) | Mikroorganizmalar ve inhibisyon çapları (mm) |    |    |              |    |    |    |              |            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------|----|----|--------------|----|----|----|--------------|------------|----|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                | Gram Negatif                                 |    |    | Gram Pozitif |    |    |    | Gram Olmayan | Biramayası |    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                | Ec                                           | Yp | Pa | Sa           | Ef | Lm | Bc | Ms           | Ca         | Sc |
| <i>Myosotis alpestris</i> (sulu ekstre)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 10 000         | -                                            | -  | -  | -            | -  | -  | -  | -            | -          | -  |
| <i>Myosotis alpestris</i> (metanolik ekstre)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10 000         | 14                                           | -  | 8  | 6            | -  | 6  | -  | 12           | -          | -  |
| Ampisilin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 10             | 10                                           | 10 | 18 | 35           | 10 | 10 | 15 |              |            |    |
| Streptomisin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10             |                                              |    |    |              |    |    |    | 35           |            |    |
| Flukonazol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 5              |                                              |    |    |              |    |    |    |              | 25         | 25 |
| <p><b>Ec:</b> <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <b>Lm:</b> <i>Listeria monositogenes</i> ATCC 43251,<br/> <b>Yp:</b> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911, <b>Bc:</b> <i>Bacillus cereus</i> 709 ROMA,<br/> <b>Pa:</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 43288 , <b>Ms:</b> <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC607,<br/> <b>Sa:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <b>Ca:</b> <i>Candida albicans</i> ATCC 60193,<br/> <b>Ef:</b> <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <b>Sc:</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RSKK 251</p> |                |                                              |    |    |              |    |    |    |              |            |    |

**Tablo 7.** Ekstrelerin ve Standartların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

| Test Edilen Bileşikler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Miktar (µg/mL) | Mikroorganizmalar ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (µg/mL) |    |      |              |    |     |    |              |             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------|----|------|--------------|----|-----|----|--------------|-------------|----|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                | Gram-Negatif                                                   |    |      | Gram-Pozitif |    |     |    | Gram Olmayan | Bira mayası |    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                | Ec                                                             | Yp | Pa   | Sa           | Ef | Lm  | Bc | Ms           | Ca          | Sc |
| <i>Myosotis alpestris</i> ( sulu ekstre)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 10 000         | -                                                              | -  | -    | -            | -  | -   | -  | -            | -           | -  |
| <i>Myosotis alpestris</i> (metanolik ekstre)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 10 000         | 14                                                             | -  | 350  | 700          | -  | 700 | -  | 62,25        | -           | -  |
| Ampisilin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 10             | 10                                                             | 18 | >128 | 35           | 10 | 10  | 15 |              |             |    |
| Streptomisin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 10             |                                                                |    |      |              |    |     |    | 4            |             |    |
| Flukonazol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 5              |                                                                |    |      |              |    |     |    |              | <8          | <8 |
| <p><i>Ec:</i> <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Lm:</i> <i>Listeria monositogenes</i> ATCC 43251,<br/> <i>Yp:</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911, <i>Bc:</i> <i>Bacillus cereus</i> 709 ROMA,<br/> <i>Pa:</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 43288, <i>Ms:</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC607,<br/> <i>Sa:</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Ca:</i> <i>Candida albicans</i> ATCC 60193,<br/> <i>Ef:</i> <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>Sc:</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RSKK 251</p> |                |                                                                |    |      |              |    |     |    |              |             |    |

Test sırasında sulu ve metanolik ekstrelerde antimikrobiyal aktivite tayini, bölüm 5.2.3.1 ve bölüm 5.2.3.2’de anlatılan yöntemlere göre sırayla yapıldı. Sulu ve metanollü ekstrelerle, 4 farklı sınıfa ait 10 mikroorganizma içeren bir antimikrobiyal aktivite tayin testi uygulandı. *M. alpestris* bitkisine ait saf su ekstresinin herhangi bir antimikrobiyal etkisine rastlanmadı. Ancak *M. alpestris* bitkisinin metanolik ekstresinde bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkiler tespit edildi. Maya mantarlarına karşı antimikrobiyal bir sonuca varılmadı. Gram-negatif bir bakteri olan *Escheria coli*’ye karşı antimikrobiyal etkide değişiklik gözlenmedi. Gram olmayan bakterilerden *Mycobacterium smegmatis*’e karşı orta derecede antimikrobiyal etki görüldü. Gram pozitif bakterilerden olan *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* mikroorganizmalarına karşı ise orta derecede antimikrobiyal etki gözlemlendi.

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Oksidanlar canlılarda mevcut olan sitrik asit döngüsü, fotosentez olayı gibi zorunlu ve önemli olaylarda ortaya çıkan istenmeyen ara ürünlerdir. Bu ara ürünlerden biri olan serbest radikaller, yaşlanma, kanser, ateroskleroz, diyabet, astım, gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (68). Doğal ürünlerde bulunan biyolojik aktif bileşikler bu hastalıkların oluşumuna yol açan oksidasyonu ve serbest radikal mekanizmalı reaksiyonları engelleyerek rol oynar. Bitkiler içerdikleri çeşitli flavonoid, fenolik asit gibi bileşenlerden dolayı doğal antioksidan kaynağıdır. Bu nedenle günümüzde oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynadığından dolayı doğal ürünlere karşı ilgi gün geçtikçe artmıştır (69, 70).

Türkiye farklı iklimlere, coğrafik konuma, ekolojik faktörlere sahip olmasından dolayı biyolojik kaynakları bakımından son derece zengin bir ülkedir. Bu kadar zengin çeşitliliğe sahip ülkemizde bitkilerin çoğu zengin polifenol ve flavonoid içeriğine sahiptir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu, flavonoidlerin bir çoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, antioksidan kapasitesini artırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (70,71). Fenolik maddelerin sağlıkla ilişkisi incelendiğinde toplam fenolik miktarı veya flavonol, flavon gibi alt grupların miktarından çok bu maddelerin türevleri ve her birinin miktarının önemli olduğu vurgulanmıştır. Fenolik maddelerin hücre metabolizmasında rol alan regülasyon faktörleri olabileceği belirtilmektedir (71, 72). Birçok çalışmada elde edilen bulgular flavonoidlerin antimutajen ve antikanserojen olduğunu desteklemektedir.

Fenolik bileşikler, hidroksil gruplarının serbest radikalleri giderme özelliğine sahip olmasından dolayı en önemli bitki bileşenleridir (73). Fenolik bileşenler antioksidan aktiviteye direk katkıda bulunabilir (74). Son yıllarda tıbbi bitkilerdeki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin incelenmesi giderek önem kazanmaktadır (75). Geniş bir aile olan fenolik bileşiklerin spesifik bir grubunun ayrı ayrı analizleri mümkün olsa da bitkilerdeki toplam fenolik bileşiklerin tayini her zaman yapılması ihtiyaç duyulan bir analizdir. Fenolik bileşikler doğal antioksidanlar olarak

bilinmekle birlikte belirli bir konsantrasyonda konjuge dienlerin oluşum hızını azaltırlar.

Çalışmamızda toplam fenolik madde miktarının *M. alpestris*'in sulu ekstresinde  $21.8 \pm 0.302$  mg/g GAE, metanolik ekstresinde  $0.7 \pm 0.009$  mg/g GAE olarak bulundu. Fenolik bileşikler, antioksidan etkili bileşiklerdir. Bu tür üzerinde literatür çalışması yapıldığında biyolojik aktivitesini aydınlatan çalışmaya rastlanamadı. Çeşitli bitki türlerinde toplam fenolik madde miktarı sonuçları farklı bulunabilir. Bitkilerin polifenol içeriği; bitki türü, tarımsal proses, ışık, iklim, hasat zamanı gibi pek çok dış etkenden etkilenmekle birlikte kullanılan çözücü ve ekstraksiyon proseslerindeki çeşitlilik de fenolik bileşiklerde gözlenen miktar değişikliklerinin sorumluları arasında tutulabilir.

Çalışmamızda antioksidan kapasite, *M. alpestris* bitkisinin metanolik ve su ekstresinde FRAP, CUPRAC ve DPPH yöntemleriyle değerlendirildi. FRAP değeri sulu ekstrede  $1038 \pm 8.589$   $\mu$ M troloks/g numune, metanolik ekstrede ise  $171 \pm 4.109$   $\mu$ M troloks/g numune olarak tespit edilidi. CUPRAC değeri sulu ekstrede  $1913 \pm 5.890$   $\mu$ M troloks/g numune, metanolik ekstrede ise  $289 \pm 2.105$   $\mu$ M troloks/g numune olarak tespit edildi. DPPH radikalinin oluşumunun %50'sini engelleyen madde miktarı SC<sub>50</sub> değeri olarak bilinir ve SC<sub>50</sub> değerlerinin düşük oluşu radikal temizleme aktivitesinin yüksek olduğu anlamına gelir. Çalışmamızda *M. alpestris* bitkisinin sulu ekstresi metanolik ekstresine göre yüksek radikal temizleme aktivitesine ( $0.2118 \pm 0.0021$  mg/mL), metanolik ekstresi ise düşük radikal temizleme aktivitesine ( $0.6178 \pm 0.0042$  mg/mL) sahiptir. Standart olarak kullanılan BHT ile ekstre sonuçlarımız karşılaştırıldığında hem sulu hem de metanolik ekstre BHT ( $0.0031 \pm 0.0002$  mg/mL)'den daha düşük radikal yakalama aktivitesine sahiptir.

Mikroorganizmaların gelişmesini durdurabilen veya onları öldürebilecek ajanlara antimikrobiyal ajanlar denmektedir. Son yıllarda, antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların sayısındaki artışa paralel olarak bu mikropların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi de zorlaşmaktadır. Antibiyotiklere direnç geliştiren bakterilerin varlığı, ilaç dirençliliğini artırması gibi nedenler göz önüne alındığında, ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılmasına ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır (76, 77). Bazı çalışmalar, bitkilerin tedavi edici etkilerinin tek bir etken

maddeden ziyade çok sayıda bileşimin sinerjik etkisinden kaynaklandığını belirtmektedir. Bu noktadan hareketle bitkisel bileşimlerin tek bir antibiyotikle öldürülmesi zor olan mikroorganizmaların dirençliliğine karşı koyarak daha etkin bir tedavi sağladığını rapor etmektedir (78, 79). Bu durum, araştırmacıları bitki özütlerinden elde edilen doğal antimikrobiyal ajanların inhibitör etkiye sahip bileşimlerini araştırmaya sevk etmiştir (80).

Bu amaçla, çalışmamızda *M. alpestris*'in antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile incelendi. Bu inhibisyon yönteminde 10 adet mikroorganizma kullanıldı. Su ekstresinde antimikrobiyal etki gözlenmedi. Metanolik ekstre gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43288; gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 43251; gram olmayan bakteriden *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 standartlarla karşılaştırıldığında orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterdi. Ekstrelerin, test edilen mikroorganizmalara karşı orta düzeyde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu, bu bitkinin içerdiği etken maddelerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bazı sentetik antibiyotiklere alternatif olabileceğini söyleyebiliriz. Antimikrobiyal aktivite; bitkinin türüne, kompozisyonuna ve konsantrasyonuna, hedef mikroorganizmanın türüne ve yüküne, gıdanın kompozisyonuna, işleme ve depolama koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Proteinler, lipitler, tuzlar, pH, ve sıcaklık fenolik maddelerin antimikrobiyal aktivitelerini etkileyen faktörler arasındadır (81).

Günümüzde farklı faktörlere bağlı olarak hastalıkların sayısı ve çeşidi de küresel boyuta ulaşmıştır. Bu bağlamda çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik yeni stratejilerin belirlenmesi ve uygulamaya konulması önemli hale gelmektedir. Bu stratejiler arasında en çok üzerinde durulanlarından birisi anahtar enzimlerin inhibisyonu çalışmaları olmuştur. Enzim inhibisyon çalışmalarında, hastalıkların patolojisinde rol oynayan anahtar enzimler inhibe edilerek hastalıktan kaynaklanabilecek semptomların hafifletilmesi sağlanır. Bu noktadan yola çıkılarak bitkisel kaynaklı doğal inhibitörlere her geçen gün ilgi biraz daha artmaktadır. Günümüzde enzim ve enzim inhibitörleri tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, tekstil, kağıt, deterjan ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır.

Tirozinaz enzimi gıda, sağlık ve kozmetik alanlarında kullanılabilen bir enzimdir. Tirozinaz inhibitörleri melanin hiperpigmentasyonu ile ilgili bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik endüstrisinde ve eczacılıkta deri beyazlatılması etkisinden de yararlanılmaktadır (82). Bu alanlarda kullanılan sentetik inhibitörlerin yerine doğal inhibitörlerin araştırılması güncel çalışma alanlarını oluşturmuştur. Çalışmamızda standart olarak kullanılan kojik aside göre bitkimizin metanolik ekstresinin IC<sub>50</sub> değerinin çok yüksek olduğu bunun sonucunda kojik aside göre inhibisyon etkisinin olmadığı belirlendi.

Asetil kolin, sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücrelerine sinir impulsu taşımakla görevli bir nörotransmitterdir (83). Asetil kolin beyin hücrelerinde depolanıp uyarı sonrası sinaptik boşluğa salınan öğrenme ve hafıza ile yakından ilişkili olan bir bileşiktir (84). Ayrıca Alzheimer hastalarında en fazla azalan nörotransmitter asetilkolindir (85).

Asetilkolinesteraz'ın görevi sinir iletiminde rol oynayan asetilkolinin fazlasını ortamdan kaldırmaktır. Bütirikolinesteraz insan metabolizmasında karaciğerden salgılanan bir enzim olup çeşitli kolin türevi bileşikleri hidroliz etmekle sorumlu bir enzimdir. Asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz alzheimer hastalığının ortaya çıkmasında rol oynayan enzimlerdir. Hastalığın kesin nedeni henüz tam olarak bilinmemekle beraber, kolin bileşiklerinin eksikliği arttıkça bu hastalığın ortaya çıkma olasılığının arttığı bilinmesinden dolayı, bu enzimler sorumlu tutulmuşlardır (86).

Asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak alzheimer tedavisi için kullanılan yöntemlerin önemini oluşturmaktadır. Bu amaca yönelik olarak da kolin bileşiklerini inhibe edici özelliği olan kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda farklı konsantrasyonlardaki *M. alpestris* metanolik ekstrelerine belli hacimde asetilkolinesteraz çözeltisinden koyulduktan sonra bu bitki ekstresine spektrofotometrik Ellman yöntemi uygulandı (87). Aktivitesi pH 8'de maksimum olan asetilkolinesteraz tarafından asetilkolinin asetik asit ve tiyokoline hidrolizi sonrasında oluşan tiyokolinin, DTNB (5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) ile sarı renkli 5-tiyo-2-benzoat iyonu oluşumunun görülmesi ve bu sarı rengin artışıyla da farklı asetilkolinesteraz inhibisyon yüzdelерinin elde edilmesi amaçlandı (87).

Bu amaç doğrultusunda 25-50-100-200µg/mL konsantrasyonlarında bitki metanol ekstresi hazırlandı ve asetilkolinesteraz çözeltisi ilave edildi. İlk önce 25 µg/mL konsantrasyonlu *M. alpestris*'in metanolik ekstresinde %10; 50 µg/mL konsantrasyonlu ekstresinde %19.4; 100 µg/mL konsantrasyonlu ekstresinde %31.8; 200 µg/mL konsantrasyonlu ekstresinde %43,5 asetilkolinesteraz inhibisyonu olduğu tespit edildi (Tablo 5).

Asetilkolinesteraz için yapılan işlemlerin hepsi sırasıyla bütirilkolinesteraz için de yapıldı. Bütirilkolinesteraz enzim inhibisyon değerleri de sırasıyla ilk işlem için %26,3; ikinci işlem için %35,8 üçüncü işlem için %39,4 ve dördüncü işlem için de %54,9 olarak tespit edildi (Tablo 5). Her iki enzim için ulaşılan bu inhibisyon yüzdeleri göz önüne alındığında *M. alpestris*'in metanolik ekstresinin, artan konsantrasyonlarında, Alzheimer hastalığında tedavi amaçlı kullanılan bir ilaç etken maddesi olan Galantamin'in inhibisyon etkinliğine yaklaştığı görüldü. Bu konuda daha kesin sonuçların elde edilebilmesi için aynı bitkinin farklı lokalitelerinin toplanıp farklı ekstre konsantrasyonları ile daha ileri çalışmalar yapılabileceği kanaatindeyiz.

## 8. KAYNAKLAR

1. Baytop T (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey, University of İstanbul 273.
2. Zeybek N, Zeybek U (1994) Kapalı Tohumlu(Angiospermae) Bitkiler Sistematığı ve Önemli Maddeleri. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınlar, 2:216-217.
3. Dimayuga RE, Garcia SK(1991). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. Journal of Ethnopharmacology.31:181-192.
4. Halliwell B(1994). Free radicals antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence, lancet.344:721-724.
5. Velioğlu VS, Mazza G, Gao L (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry.46:4113-4117.
6. Grau J, Merxmüller H (1972). Flora of U.S.S.R, 110-114.
7. Akman Y (2007). Angiospermae (Kapalı Tohumlular). Palme yayıncılık. Ankara, 512-521.
8. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myosotis\\_alpestris002.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myosotis_alpestris002.jpg) [Accessed 08.01. 2018],
9. Schmidt FW (1964). Myosotis alpestris in Biological Flora of The British Isles. Journal of Ecology Vol 52, No 3. Published by British Ecological Society, University of Copenhagen, 709-722.
10. Konukoğlu D (2007). Serbest Radikaller ve Önemleri. Türk Aile Hekimliği Dergisi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 197-200.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press.
12. Niki E, Minamiwasa S, Oikawa M And Komuro E (1992). Membrane Damage From Lipid Peroxidation Induced By Free Radicals And Cigarettes Smoke. Ann. N.Y. Acad Sci, 29-34.
13. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, Proc Natl Acad Sci U S A. 8; 91(23): 10771–10778.

14. Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997). Reactive Oxygen Species and antioxidants: relationships in green cells, *Physiol. Plant.* 100: 224-233.
15. Asada, K (1996). Radical production and scavenging in the chloroplasts, *Photosynthesis and the Environment*, Kluwer Academic Publishers, 123-150.
16. Saldamlı İlbilge (2016). Gıda katkı maddeleri. *Gıda Kimyası*. Ankara, Hacettepe yayınları, 500-503.
17. Onat T (2016). Yaşlanma Biyokimyası. İnsan Biyokimyası. Palme yayıncılık. Ankara, 749-758.
18. Thomas MJ (1995). The Role of Free Radicals and Antioxidants: How Do We Know That They Are Working? *Critical Rev. Food.Sci.and Nutrient*, 21-39.
19. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1189-1203.
20. Foyer CH, Decourvieres P, Kunert KJ (1994). Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ*, 507-523.
21. Levine A (1999). *Oxidative Stress as a Regulator of Environmental Responses in Plants*. The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel.
22. Elstrer EF, Osswald W (1994). Mechanisms of Oxygen Activation During Plant Stress. *Proc R Soc Edinb*, 131-154.
23. Davies KJ (1995) Oxidative Stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 1-31.
24. Wojtaszek P (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem*, 681-692.
25. Greenberg JT, Guo A, Klessig DF (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 551-563.
26. Koç E (2008). Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 82-100.
27. Anderson MD, Prasad TK, CR Stewart (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings, *Plant Physiology*, 1247-1257.

28. Byung Pal Yu (1994). Cellular Defenses Against Damage From Reactive Species. *Physiological Reviews*, Volume 74, 139-172.
29. Buettner GR (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 535-543.
30. Perrone ST, Sutherland MW, Guest DI (2003). 'Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabaccum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora*' *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 62, Issue 3, 127-135.
31. Smirnoff N (2005). Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. School of Biological and Chemical Sciences University of Exeter UK, syf 216.
32. Dündar Y, Aslan R (2000). Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 4-54.
33. Bowler C, Van Comp W (1994). Superoxide dismutaz in plants. *Plant Sci*, 199-218.
34. Leshem YY (1996). Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regul*, Volume 18, Issue 3, 155-159
35. Özgüneş H, Sabuncuoğlu S (2011). Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stress. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 137-150.
36. Mittler R (2002). 'Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance' *Trends in Plant Science*, Volume 7, Issue 9, 405-410.
37. Keha E E (2014). *Biyokimya 10*. Baskı, Aktif Yayınevi, syf 328.
38. Appleman D, Pyfrom HT (1955). Changes in catalase activity and other responses induced in plants by red and blue light, *Plant Physiology*, 543-549.
39. Aksoy Y (2002). Antioksidan Mekanizmada Glutasyonun Rolü. *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ph.D*, Ankara, 442-448.
40. Maddipati KR, Marret LJ (1987). Purification and properties of a Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, *J Bol Chem*, sayfa 262.
41. Augustin W, Wiswedel I, Noack H, Reinheckel T, Reichelt O (1997). Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria, *Volume 174*, 199-205.

42. Packer L (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr.* 53(4 Suppl), pages 1050-1055.
43. GW Burton, KU Ingold (1981). Autoxidation of biological molecules, Antioxidation of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *J.Am.Chem.Soc.* 6472-6477
44. Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52(4):673-751.
45. Ancos B, Gonzalez EM, Cano MP (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit, *J Agric Food Chem.* 48(10):4565-70.
46. Hopia AI, Heinonen M (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity, *J Agric Food Chem.* 49(8):4076-82.
47. Strack D, Bramley P (1997). *Plant Biochemistry. Phenolic Metabolism* ( Ed: Harborne JB ), 10: 399-408.
48. Booker FL and Miller JE (1998). Phenylpropanoid metabolism and Phenolic composition of soybean leaves following exposure to ozone, *Journal of Experimental Botany*, Volume 49, Issue 324, 1191-1202.
49. Jeremy PE Spencer and Catherine A.Rice-Evans (2003). *Flavonoids in Health and Disease.* King's College London, England, pages 3-7, page 364.
50. Çolak A, Kolaylı S, Dinçer B, Doğan N (2011). *Temel Biyokimya Laboratuvar Teknikleri ve Uygulamaları. Uygulamalar* (Ed: Küçük M) Bölüm (II). Trabzon, 227-231.
51. Kim YJ, Uyama H (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 62: 1707-23.
52. Temel HE (2008) *Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri İle Değişimi*, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı.
53. Huff FJ, Reiter CT, Rand JB (1989). The ratio of ACE/BchE influences the specificity of assays for each enzyme in human brain,129-134.

54. FS Şenol, Orhan I, Yilmaz G, Cicek M, & Şener B. (2010). Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria* L. taxa from Turkey. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 781-788.
55. Singleton VL, Rossi Jr JA (1965). Colorimetry of total phenolics width phosphomolibdic phosphotungstic acid reagents. 1965;16; 144-158.
56. Strain JJ, Benzie IF (1996). The Ferric Reducing Ability Of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant power. *Anal Biochem*. 15;239(1):70-6.
57. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem*; 52:7970-7981.
58. Blois MS (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
59. Molyneux P (2004). The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Songlanakarin J. Sci Technol*; 26: 211-219.
60. Küçük M, Çolak A, Kolaylı S, Dinçer B, Doğan N (2011). Temel Biyokimya Laboratuar Teknikleri ve Uygulamaları. Bitki Özülerinde Antioksidan Bileşenlerin Belirlenmesi (Ed: Küçük M). Trabzon, 189-192
61. ME Cuveiler, C Berset (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Volume 28, Issue 1*, 25-30
62. Likhitwitayawuid K, Sritularak B (2001). A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. *J. Nat. Prod* 64: 1457-1459.
63. Whittaker M (1981). Methods of Enzymatic Analysis. *Methods in enzymology* (Eds: Bergmeyer HU, Bergmeyer J). Volume IV, 55-58.
64. R Carbonell, A Henriquez Perez, L Gomez (2004). Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the *Gallotia galloti palmae* by pesticides : a field study, *volume 132*, 479-488.
65. Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, Hall GS (2003). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. NCCLS document M24-A, 23 (18).

66. Özçelik B, Kaynak F, Abbasoğlu U (2004). Evaluation of Susceptibility Testing by Comparison of Broth Microdilution and Disk Agar Diffusion Tests in Staphylococci. Turkish J. Pharm. Sci. 1 (2), 77-86.
67. Barry AL, Craig WA, Nadler H, PE Patrice (1999). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS), (Ed: Polgar PE). NCCLS document M26-A, Wayne, Pennsylvania, USA, (19):18, 1-16.
68. Sies H (1991). Oxidative Stress From Basic Research to Clinical Application, American Journal Medical, 31-37.
69. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Science. 2(4)152-159.
70. Karakaya S (1997). Flavonoidler ve Sağlık. Beslenme ve Diyet Dergisi 26(2), 54-60.
71. Cemeroğlu AP (1998). Sağlık açısından gıda fenolikleri. Gıda Teknolojisi 3(9), 52-55.
72. Shaidi F (1995). Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications ancaster, Lancaster, Pa. : Technomic Pub. USA.
73. Hatano T, Edamatsu R, Mori A., Fujita Y, Yasuhara E. (1989). Effect of interaction of tannins with co-existing substances. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37: 2016-2021
74. Duh PD, Tu YY (1999). Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebnesmittel-Wissenschaft und Technologie*. 32: 269-277.
75. Özkan M (2016). *Primula vulgaris* (çuha çiçeği) ekstraktlarının HPLC ile karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
76. Cushnie T, Andrew JL (2005). Antimicrobial Activity of Flavonoids. The Robert Gordon University, Aberdeen, 343-356.
77. Balouri M, Sadiki M, Ibsoudas S (2016). Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.

78. ShanthiSree KS, Yasodamma N, Paramageetham CH (2010). Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of them ethanolic leaf extract: Sebastian iachamaelea Müell. Arg The Bioscan 5:173-175.
79. Mohd Nazri NAA, Ahmat N, Adnan A, SyedMohamad SA, SyaripahRuzaina SA (2011). In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. Afr J Biotech 10:5728-5735.
80. Dash BK, Sultana S, Sultana N (2011). Antibacterial activities of methanol and acetone extracts of fenu greek (*Trigonella foenum*) and coriander (*Coriand rumsativum*). Life Sci Med Res 27:1-8.
81. Sağdıç O (2003). Sensitivity of Four Patogenic Bacteria to Turkish Thyme and Oregano Hydrosols. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. 36:467-473
82. Maeda K, Fukuda M (1991). In vitro effectiveness of several whitening cosmetics components in human melanocytes. J Soc Cosmet Chem 42: 361-368.
83. Güven A (2000). Asetilkolinesterazın önemi ve inhibitörleri. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg, 6(1-2):145-151.
84. Morrison A, Lyketsons C (2005). The pathophysiology of Alzheimer disease and directions in treatments. Advances Studies in Nursing, 2005 3(8): 256-70
85. Smith CM, Swash M. Possible biochemical basis of memory disorder in Alzheimer Disease. Ann Neurol (1978) 3, 471-473
86. Beach TG (2000). The Cholinergicdeficit Coincides with Ab Deposition at the Earliest Histopathologic stages of Alzheimer Disease. J Neutropathol Exp Neurol, 54(9):308-313,
87. Ellman GL, Country KD, Valentino Andres JR (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology Volume 7, 88-90.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**T.C. Kimlik No** : 24263585364  
**Soyadı, Adı** : ÖZTEN, Ömer  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum tarihi ve yeri** : 26.10.1984  
**Medeni hali** : Bekar  
**Telefon** : 0 462 351 32 61  
**E-posta** : omerozten61 gmail.com  
**Yazışma adresi** : Trabzon Ortahisar İlçesi Çukurçayır Mah. Barbaros Cad  
No:16/4

### EĞİTİM BİLGİLERİ

| Derece | Mezun Olduğu Kurumun Adı                 | Mezuniyet Yılı |
|--------|------------------------------------------|----------------|
| Lisans | Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi | 2009           |
| Lise   | Trabzon Affan Kitapçıoğlu Lisesi         | 2002           |

### YABANCI DİL

İngilizce

### UZMANLIK ALANI

Eczacılık