



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***Isatis cappadocica*'NIN ANTİOKSİDAN,
ANTİMİKROBİYAL, TİROZİNAZ İNHİBİTÖR
VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Meltem LERMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2018

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

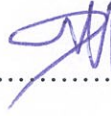
Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı


.....

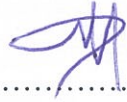
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Meltem LERMİ'nin hazırladığı “*Isatis cappadocica*’nın Antioksidan, Antimikrobiyal, Tirozinaz İnhibitör ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

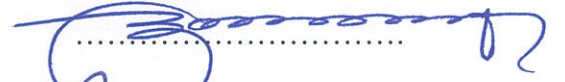

.....

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU


.....

Prof. Dr Nuri BAKAN


.....

Doç. Dr. Atila Taner KALAYCIOĞLU


.....

Tarih: .. /.. /2018

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.

23/03/2018

Meltem LERMİ

TEŞEKKÜR

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU'na; ikinci danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Mahmoud ABUDAYYAK'a

Örneklerimin toplanması için her türlü desteği sağlayan Erzincan Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. Ali KANDEMİR'e

Tez çalışmam boyunca bilgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen araştırma görevlisi Nuriye KORKMAZ'a, Şeyda AKKAYA'ya ve Sıla Özlem ŞENER'e;

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili aileme;

Tez çalışmam boyunca beni motive eden tez yazım aşamasında da yardımlarını esirgemeyen müstakbel eşim Dr. Mustafa GÜNER'e teşekkür ederim.

Meltem LERMİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ

vii

ŞEKİL DİZİNİ

vii

KISALTMALAR, SEMBOLLER ve FORMÜLLER DİZİNİ

x

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

5

4.1. *Isatis cappadocica* Bitkisi Hakkında Bilgi

5

4.1.1. *Isatis* L. Cinsinin Bitki Sistematikindeki Yeri

5

4.2. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması

7

4.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

7

4.3.1. Bitkiler Tarafından Üretilen Bazı Antioksidanlar

12

4.3.1.1. E Vitamini (α - tokoferol)

12

4.3.1.2. Karotenoidler

12

4.3.1.3. C Vitamini (Askorbik Asit)

13

4.4. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler

14

4.4.1. Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılması

14

4.5. Enzim İnhibisyonu

15

4.6. Antimikrobiyal Maddeler Hakkında Bilgi

17

4.7. Kanseri

18

4.7.1. Prostat Kanseri

20

5. GEREÇ ve YÖNTEM

23

5.1. Kullanılan Cihazlar

23

5.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

23

5.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

24

5.4. Bitkinin Toplanması, Sulu ve Metanollü Ekstrelerinin Hazırlanması	26
5.4.1. Döner Vakum Evaporatörü ile Çözücü Uçurulması	27
5.5. RP- HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini	27
5.5.1. RP-HPLC-UV Koşulları	27
5.6. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler	28
5.6.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	28
5.6.2. Demir (III) İngidgeme Antioksidan Güç-FRAP Tayini	29
5.6.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini	30
5.6.3.1. SC ₅₀ Değerinin Bulunması	31
5.6.4. CUPRAC (Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi	31
5.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	32
5.7.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu	32
5.7.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Tayini	33
5.8. Enzim İnhibisyonu	34
5.8.1. Tirozinaz İnhibisyonu Tayini	34
5.9. Sitotoksite Tayini	35
5.9.1. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Edilmesi	35
5.9.2. MTT Testinin Uygulanışı	36
6. BULGULAR	37
6.1. Toplam Fenolik Madde ile İlgili Bulgular	37
6.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasite Ölçümünün (FRAP) Belirlenmesi	38
6.3. DPPH• Testi Sonucu	39
6.3.1. DPPH Aktivitesi İçin SC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması	40
6.4. CUPRAC Testi Sonucu	42
6.5. Antimikrobiyal Aktivite ile ilgili Bulgular	43
6.6. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu ile İlgili Bulgular	44
6.7. Sitotoksik Aktivite ile İlgili Bulgular	46
6.8. RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Sonuçları ve Kromatogramları	48
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
8. ÖNERİLER	56
9. KAYNAKLAR	57
10. ÖZGEÇMİŞ	66

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. En Sık Kullanılan Serbest Radikaller ve Serbest Radikal Üreten Türlerin Bazı Özellikleri	9
Tablo 2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	14
Tablo 3. Kullanılan Cihazlar ve Marka/Modelleri	23
Tablo 4. Kullanılan Kimyasallar ve Satın Alınan Firma	24
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	25
Tablo 6. Test Edilmiş Mikroorganizmalar	32
Tablo 7. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerinde Bulunan Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Değerleri (Ort±SP)	40
Tablo 8. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerinin Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ile Oluşturduğu Zon Çapları	44
Tablo 9. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerinin Mikro Dilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Değerlerinin Hesaplanması	44
Tablo 10. <i>I. cappadocica</i> Ekstrelerinin ve Standardın IC ₅₀ değerleri	45
Tablo 11. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Metanollü Ekstresinin PC-3 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyonu	46
Tablo 12. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Metanollü Ekstresinin 3T3 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyonu	47
Tablo 13. RP-HPLC-UV ile Numunelerin Fenolik Bileşen Sonuçları	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin genel görünüşü	6
Şekil 2. <i>I. cappadocica</i> Türünün Türkiye'deki Yayılışı (Kars, Erzurum, Muş, Niğde, Tunceli, Van)	6
Şekil 3. Antioksidanların Sınıflandırılması	11
Şekil 4. E Vitamini (α - tokoferol)	12
Şekil 5. β -karotenin Yapısı	13
Şekil 6. Askorbik Asidin (C vitamini) Yapısı	13
Şekil 7. Tirozinden Dopakinon Sentezi	16
Şekil 8. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları	17
Şekil 9. Erkek Üreme Anatomisi	21
Şekil 10. Toplam Fenolik Madde Tayini İçin Gallik Asit Standardı Kullanılarak Hazırlanan Standart Çalışma Grafiği	37
Şekil 11. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Ekstrelerinin (metanol ve su) Toplam Fenolik Madde Miktarı Değerleri	38
Şekil 12. FRAP Testi İçin Troloks Standardı Kullanılarak Elde Edilen Standart Çalışma Grafiği	38
Şekil 13. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Ekstrelerinin (metanol ve su) FRAP değerleri	39
Şekil 14. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerindeki DPPH SC_{50} Değerleri	40
Şekil 15. BHT Standardının DPPH- SC_{50} Grafiği	41
Şekil 16. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Metanollü Ekstresinin DPPH- SC_{50} Grafiği	41
Şekil 17. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Sulu Ekstresinin DPPH- SC_{50} Grafiği	42
Şekil 18. CUPRAC Testi İçin Troloks Standardı Kullanılarak Elde Edilen Standart Çalışma Grafiği	43
Şekil 19. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Ekstrelerinin (metanol ve su) CUPRAC Değerleri	43
Şekil 20. Kojik Asit Standartının % Tirozinaz İnhibisyonu	45
Şekil 21. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Sulu Ekstresinin % Tirozinaz İnhibisyonu	45

Şekil 22. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Metanollü Ekstresinin % Tirozinaz İnhibisyonu	46
Şekil 23. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Metanollü Ekstresinin PC-3 Hücrelerde IC ₅₀ Grafiği	47
Şekil 24. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Metanollü Ekstresinin 3T3 Hücrelerde IC ₅₀ Grafiği	47
Şekil 25. <i>I. cappadocica</i> Bitkisinin Metanollü Ekstresinin Kromatogramı	48



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
°C	: Santigrat derece
CUPRAC	: Bakır (II) indirgeme/antioksidan kapasite
DAD	: Fotodiyot dizisi dedektörü
DHAA	: Dehidroaskorbik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dk	: Dakika
DPPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
e ⁻	: Elektron
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan kapasitesi
g	: Gram
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kDa	: Kilodalton
LC	: Likit kromatografisi
m	: metre
mM	: Milimolar
M	: Molar
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
ORAC	: Oksijen radikal antioksidan kapasitesi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PC-3	: İnsan prostat kanser hücresi
3T3	: Fare fibroblast hücreleri
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritma değeri

ppm	: Milyonda bir birim
RID	: Refraktif indeks dedektörü
HPLC	: Ters faz- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi- Ultra viyole
RT	: Alıkonma zamanı
SC ₅₀	: % 50 Temizleme konsantrasyonu
SP	: Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart sapma
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TP	: Toplam polifenolik madde
TPTZ	: Tripridiltiazin
Troloks®	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

Simgeler

α	: Alfa
B	: Beta
γ	: gama
δ	: Delta
%	: Yüzde

Formüller

$\text{CCl}_3^\bullet$	: Triklorometil radikali
CCl_4	: Karbon tetraklorür
Cl^-	: Klorür iyonu
$\text{Fe}^{2,3+}$	: Demir II, III iyonu
FeCl_3	: Demir(III)klorür
$\text{H}^\bullet$	: Hidrojen radikali

HCO_3^-	: Bikarbonat iyonu
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
$\text{HO}_2^\bullet$	: Perhidroksil radikali
NH_2	: Amin
$\text{NO}^\bullet$	: Azot monoksit radikali
NO_2	: Azot dioksit
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
$\text{O}_2^{\bullet -}$	: Süperoksit radikali
$\text{OH}^\bullet$	: Hidroksil radikali
$\text{RO}^\bullet$	: Alkoksil radikali
$\text{ROO}^{\bullet -}$	: Peroksil radikali
$\text{RS}^\bullet$	: Tiyl radikali

Mikroorganizmalar

<i>Bc</i>	: <i>Bacillus cereus</i> 709 ROMA
<i>Ca</i>	: <i>Candida albicans</i> ATCC 60193
<i>Ec</i>	: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Ef</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Lm</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43251
<i>Ms</i>	: <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC607
<i>Pa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 43288
<i>Sa</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Sc</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RSKK 251
<i>Yp</i>	: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911

1. ÖZET

***Isatis cappadocica*'nın Antioksidan, Antimikrobiyal, Tirozinaz İnhibitör ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi**

Yapılan çalışmada *Isatis cappadocica* subsp. *alyssifoli*'nin sulu ve metanollü ekstrelerinin antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör, sitotoksik aktiviteleri ve ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi kullanılarak fenolik profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bitkinin metanollü ve sulu ekstreleri hazırlanarak spektrofotometrik *in vitro* antioksidan analizleri için FRAP, DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi ve CUPRAC testleri uygulanmıştır. Çalışmamızda toplam fenolik madde miktarı bitkinin metanollü ekstresinde 10.1mg GAE/g numune, sulu ekstresinde ise 22.1 mg GAE/ g numune olarak tespit edilmiştir. FRAP ve CUPRAC yöntemine göre ise toplam antioksidan kapasitesi Troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. FRAP sonuçları bitkinin sulu ekstresinde 848 µmolTroloks/g numune, metanollü ekstresinde ise 398 µmol Troloks/g numune bulunmuştur. CUPRAC sonuçları sulu ekstrede 2189 µM Troloks/g numune, metanollü ekstrede ise 4377 µM Troloks/g numune olarak bulunmuştur. *I. cappadocica* bitkisinin sulu ekstresi (SC₅₀: 0.0425 mg/mL) metanollü ekstresine (SC₅₀: 0.0661 mg/mL) göre daha yüksek DPPH radikaltemizleme aktivitesine sahiptir. *I. cappadocica* ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi Agar Well Difüzyon ve Mikrodilüsyon yöntemiyle test edilmiştir. Bitkinin sulu ekstresinin antimikrobiyal aktivite göstermediği metanollü ekstresinin ise antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *I. cappadocica* metanol ekstresi ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC-UV) ile incelendiğinde yapısında sinapik asit, benzoik asit tespit edilmiştir. Sadece metanol ekstresinin tirozinaz enziminin inhibe ettiği ve artan konsantrasyonlarda da bu etkiyi giderek arttırdığı saptanmıştır. MTT yöntemine göre metanollü ekstrelerde test edilen konsantrasyonlarda PC-3 ve 3T3 hücre hatlarında yüksek konsantrasyonlarda doza bağlı olarak sitotoksikiteye neden olmuştur.

I. cappadocica ekstrelerinin antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik ve tirozinaz inhibitör aktivitelerinin test edildiği bu çalışma sonuçlarına göre bitkinin farmakolojik, kozmetik ve besin endüstrilerinde kullanılabileceği kanaati doğmuştur.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Antimikrobiyal, Sitotoksikite, Tirozinaz İnhibitör Aktivite, HPLC, *Isatis cappadocica*

2. SUMMARY

Investigation of Antioxidant, Antimicrobial, Tyrosinase Inhibitor and Cytotoxic Effect of *Isatis cappadocica*

In this study, it is aimed to examine antioxidant, antimicrobial, tyrosinase inhibitor, cytotoxic activities and determination of phenolic profile using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method in the aqueous and methanolic extracts of *Isatis cappadocica* subsp. *alyssifoli*.

The CUPRAC, FRAP and DPPH Radical Scavenging Activity tests are applied to spectrophotometric *in vitro* antioxidant analysis by preparing methanolic and aqueous extracts of the plant. The total phenolic substance quantity is identified as 10.1mg GAE/ g in methanolic extracts and 22.1 mg GAE/g in the aqueous extracts. According to FRAP and CUPRAC methods, the antioxidant capacity is counted as Trolox equivalent. The FRAP results are defined as 848 μ mol Trolox/g sample in the aqueous extract and as 398 μ mol Trolox/g sample in methanolic extract. CUPRAC results are defined as 2189 μ M Trolox/g sample in the aqueous extract and as 4377 μ M Trolox/g sample in methanolic extract. DPPH radical scavenging activity (SC_{50} : 0.0425 mg/mL) of the aqueous extract of *I. cappadocica* has higher than methanolic extract (SC_{50} : 0.0661 mg/mL). The antimicrobial activities of *I. cappadocica* extracts are tested as Agar Well Diffusion Method. The aqueous extract of plant hasn't showed antimicrobial activity, but methanolic extract has showed antimicrobial activity. Synapic acid, benzoic acid was detected when methanol extract of *I. cappadocica* was examined by reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC-UV). It was found that only methanol extract inhibited tyrosinase enzyme and this effect is increasing gradually in increasing concentrations. According to MTT method, the methanol extract has caused to death of cells by dosage in the high concentrations cytotoxic activity on the PC-3 ve 3T3 celllines.

When the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and tyrosinase inhibitor activities of *I. cappadocica* extracts were examined, we believe that there may be usage areas in pharmacological, cosmetic and food industries.

Keywords: Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, Tyrosinase Inhibitor, HPLC, *Isatis cappadocica*

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde doğal yaşama dönüşün yeni trendler arasında olması nedeniyle bitkilerin önemi de giderek artmaktadır. Çok uzun yıllardır hastalıklara karşı korunmada ve tedavi amaçlı olarak bitkilerden faydalanılmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık % 70-80'i bitkisel kaynaklarla tedaviden yararlanmakta olup, özellikle Çin tıbbında yaklaşık yarım asırdır kanser dahil pek çok hastalığın tedavisinde bitkilerden ilaç olarak faydalanılmıştır (1, 2).

Ülkemizde de gerek kırsal kesimde gerekse şehirlerde hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan doğal kaynakların önemli bir kısmını bitkiler oluşturmaktadır (3). Dünya üzerinde kullanılan tıbbi bitkilerin yaklaşık 100 bin civarında olduğu tahmin edilmektedir. Son yıllarda tıbbi bitkilerin saptanması, kimyasal içerikleri, kullanımları, biyolojik aktivitelerinin çok ilgi uyandırmasının sebepleri kısaca şöyle izah edilebilir (4);

1. Halk arasında uzun yıllardır tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin yan etkilerinin görülmemesi,
2. Bazı ilaç ve ilkel maddelerin, bitkisel kaynaklardan elde edilebilmesinin sentetik yollara nazaran daha ucuz ve kolay olması,
3. Sentetik ilaçlar genellikle tek yönlü etkiye sahipken, bitkisel ilaçların birkaç etkiye birden sahip olmaları,
4. Kalkınma yolunda olan ve kimya sanayisi yeterince gelişmemiş ülkelerin kolay ve ucuz yoldan ilaç elde etmek istemeleri denebilir.

Ayrıca kronik hastalıkların yaygınlaşarak başlıca ölüm nedenlerinden biri olduğu günümüzde, sentetik ilaçlarla tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması veya istenmeyen sonuçlara yol açması da bitkilerle tedaviye ilgiyi arttırmıştır (5). Birçok epidemiyolojik çalışmada bitkisel ürünlerce zengin bir diyet ile beslenmenin insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ve bu beslenme tarzıyla oksidatif stres ile ilişkili bir çok hastalığa karşı bünyenin korunduğu ortaya çıkarılmıştır. Bitkisel kaynaklı ürünlerde vitaminler, fitoöstrojenler, sülfür bileşikler, karotenoidler ve hormonlar gibi pek çok sayıda yararlı bileşik bulunmaktadır (6).

Bu tez çalışması ile Erzincan yöresinden toplanan *I. cappadocica* bitkisinin ilaç, kozmetik ve besin endüstrisi gibi alanlarda kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Isatis cappadocica* Bitkisi Hakkında Bilgi

Isatis L. cinsi *Brassicaceae* (*Cruciferae*) familyasından olup bu familyadan dünyada 338 cins ve 3709 tür bulunmaktadır. Türkiye *Brassicaceae* türleri sayısı bakımından dünyanın en zengin ülkeleri arasından ikinci sırada gelmektedir (7). Yapılan en son taksonomik çalışmalara göre *Brassicaceae* familyasından Türkiye'de 91 cins, 571 tür bulunmaktadır. Yayılış kökeninin İran-Turan bölgesi olduğu düşünülmektedir (8).

Azotlu bileşikler yanında fenolik bileşikler yönünden de zengin üyeleri olan *Brassicaceae* familyasının *Isatis* cinsine ait türleri tarih öncesinden bu yana mavi boya eldesinde kullanılmaktadır. Deri mantarları, mide ve bağırsak rahatsızlıkları ve yara tedavisinde kullanılan *Isatis*'in pişirilmiş kökünden veya yapraklarından hazırlanan sıcak lapanın yılanığa, çibana ve ekzamaya karşı önerildiği görülmektedir (9).

Akdeniz, Doğu ve Orta Asya'ya özgü bir bitki olan *Isatis* cinsinin dünyada yaklaşık 79 türü bulunmaktadır. İran-Turan fitocoğrafik bölgesinde yayılış gösteren *Isatis* çoğunlukla yüksek dağlık kesimlerde bulunur (10). *Isatis* cinsi tek, iki veya çok yıllık otsu bir bitki türüdür. Yaşam alanı olarak bozkır ve nadaslı araziler, yol ve tarla kıyılarında bulunur. Türkiye'de *Isatis* türlerine 0-3600 m yükseklikte rastlanılabilir (11). Anadolu'daki *Isatis* türleri hakkında ayrıntılı bilgi ilk kez Boissier (1867) tarafından yazılan "Flora orientalis" adlı eserde yer verilmiştir. Eserde söz ettiği 28 türden 15'i Türkiye'de bulunmaktadır (12). Yapılan çalışmalar sonucu daha sonra yeni türler tespit edilmiş ve cinsin 34 tür, 16 alttür ve 2 varyete ile temsil edildiği bu 34 türden 20'sinin, 16 alttürden 5'inin de endemik kategorisinde olduğu ortaya konulmuştur (13).

4.1.1. *Isatis* L. Cinsinin Bitki Sistematikindeki Yeri

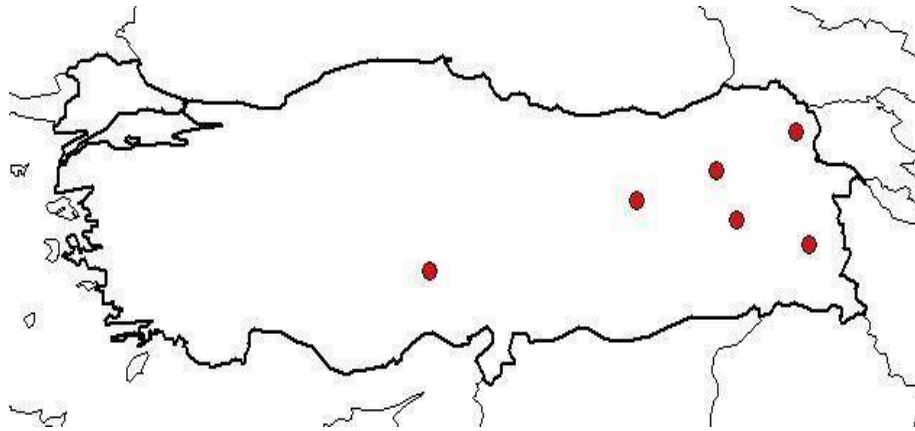
Bölüm	: Tracheobionta
Alt Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Takım	: Dilleniidae
Familya	: Capparales
Alt Familya	: Brassicaceae
Cins	: <i>Isatis</i>

Tür : *Isatis cappadocica* Desv. (14).



Şekil 1. *I. cappadocica* Bitkisinin Genel Görünüşü

Kafkasya, Kuzey ve Kuzeybatı İran ile Türkiye'nin Doğu ve Güney Anadolu'sunda yetişen *I. cappadocica* bitkisi iki ya da çok yıllıktır. Gövde dipten çok dallı tüylü, yeşil, nadiren morumsu ve belirgin köşelidir. Meyve genç iken 2-4x2.5-5 mm, olgun iken 6-10x4-9 mm, dairesel, baklavamsı, eliptik, yoğun velutinos tüylü, nadiren tüysüz, uçta ve tabanda küt veya emerginat, stilus belirgin 0.5 mm veya belirgin değil, göbek belirgin rugoz, kısa villoz tüylü, kanat düz veya yarı ondülelidir. Çiçeklenme zamanı Haziran ayı, meyvelenme zamanı Temmuz ayıdır (15).



Şekil 2. *I. cappadocica* Türünün Türkiye'deki Yayılışı (Kars, Erzurum, Muş, Niğde, Tunceli, Van) (11).

4.2. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması

Geçmişten günümüze kadar ilk insanın var oluşundan bu yana dünya üzerinde hastalık etkenlerinin var olduğu ve bu hastalıklara karşı korunma yöntemlerinin geliştirildiği düşünülmektedir. Arkeolojik bulgulara göre insanlar, hem besin hem de ilaç kaynağı olarak öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır (16). Yüzyıllar öncesine dayanan insanların bitkilerle çok yönlü ilişkisi günümüzde tüm dünyanın kabul ettiği ve önemli araştırmaların yapıldığı etnobotanik adı verilen bilim dalını ortaya çıkarmıştır (17).

Günümüzde dünya nüfusunun % 64'ü bitkilerden tedavi amaçlı yararlanmaktadır (18). Kullanılan tıbbi bitkilerin 20.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir (19). Diğer taraftan gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların %25'ini bitkisel kaynaklı ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentezlenmiş türevidir (20).

Yapay olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar bitkisel kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bu sebeple bitkilerin hastalık tedavisindeki rolü üzerine yapılan araştırmalar gün geçtikçe hız kazanmaktadır (21-25).

4.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

İnsan yaşamı için hayati fonksiyon taşıyan oksijen metabolik yolların birincil oksidan molekülüdür. Oksidatif stres, oksijen kullanan metabolik yollarda oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin çeşitli nedenlerle oksidan oluşumu yönünde bozulması durumudur. Karbohidratlar, proteinler, nükleik asitler ve lipidler gibi bir çok biyomoleküle zarar veren oksidatif stres; kanser, kalp hastalıkları, yaşlanma, diyabet ve diyabetin komplikasyonları gibi pek çok patolojik tablonun da patogenezi ile yakın ilişkilidir. Oksidatif stres durumunda sebest radikaller oluşur, bu radikaller karbohidratlarla reaksiyona girerek karbon merkezli radikallerin oluşmasına neden olur. En toksik radikal olan hidroksil radikali nükleik asitlerin yapısında bulunan pentoz fosfat yapıya saldırarak çeşitli değişikliklere neden olmaktadır. Oksidatif stresten etkilenen bir diğer biyomolekül ise proteinlerdir, protein yapısında bulunan triptofan, tirozin, metiyonin, prolin, histidin, fenil alanin amino asitleri oksidatif stres durumunda değişikliğe uğramaktadır. Oksidatif stres aynı zamanda lipid peroksidasyonuna neden olarak membranların yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadır. Peroksidasyon sonucu oluşan

malondialdehid, membran komponentlerinin çapraz bağlanması ve polimerizasyonuna neden olduğu için oksidatif stresin bir diğer göstergesi olarak da kullanılabilmektedir (26).

Serbest radikal, dış orbitalinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom ya da moleküllerdir. Bu atom veya moleküller bağ oluşturmamış elektron içerdiklerinden oldukça reaktiftirler (27). Bir molekül ya da atom bir elektron kaybederek ya da bir elektron alarak radikal oluşturabilir. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü iyon halinde olacağı gibi nötr de olabilirler. Radikaller serbestçe diffüze olabilen türler olabileceği gibi büyük bir yapının parçası da olabilirler (28).

Günümüzde radikallerin bir çok hücrede moleküler ve genetik değişimlere neden olduğu bilinmekte olup hücresel hasar ve doku tahribatında aktif rol oynadığı kabul görmüştür (29).

Serbest radikallerin oluşumu metabolizmanın normal işleyişi sırasında olduğu gibi dış kaynaklı da olabilmektedir. Serbest radikal oluşturan kaynaklar; radyasyon, virüsler, UV ışınları, X- ışınları, ozon kozmik ışınlar, hava kirliliği yaratan fosil kökenli yakıtların yanma ürünleri, ağır metaller, sigara dumanı, otomobil egzoz gazları, sanayi atıkları, enfeksiyon, stres, lipid metabolizmasının ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, kullanılan birçok sentetik ilaç, tüketilen işlenmiş besinler, alkol tüketimi ve bir çok başka etkindir (30).

Anında oluşup yok olabilen radikaller yapılarındaki kararsızlık nedeniyle oldukça reaktiftir bir çok hücre bileşikleriyle etkileşebilmekte ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonunu kaybetmesine neden olmaktadırlar. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda serbest radikaller günümüzde kanser, travma, yaşlanma, alzheimer, ateroskleroz gibi bir çok hastalığın oluşmasından sorumlu ajanlar olarak bilinmektedir. Radikaller yapısında oksijen içeren serbest oksijen radikalleri (SOR) ve yapısında oksijen içermeyen radikaller olarak iki sınıfta incelenebilirler (31). Temel haldeki moleküler oksijen yapısında bulunan iki eşleşmemiş elektrondan dolayı bir diradikaldir ve diğer radikallerle kolaylıkla reaksiyona girebilir. Ayrıca moleküler oksijen, enerji üretimi sırasında karbon bileşiklerinin oksidasyonunda kullanılır, en son elektron alıcısı olarak dört elektron alarak indirgenir ve suya dönüşür.

Tablo 1. En Sık Kullanılan Serbest Radikaller ve Serbest Radikal Üreten Türlerin Bazı Özellikleri

Serbest Radikalin ve Radikal Üreten Türün		
Adı	Simge	Etkisi
Hidrojen radikali	$H^{\bullet}$	En basit serbest radikal
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet-}$	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil radikali	$OH^{\bullet}$	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	1O_2	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	$HO_2^{\bullet}$	Lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	$RO_2^{\bullet}$	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili
Tiyil radikali	$RS^{\bullet}$	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel
Nitrik oksit radikali	$NO^{\bullet}$	L- arginin amino asitinden in vivo koşullarda üretilir
Azot dioksit	$NO_2^{\bullet}$	$NO^{\bullet}$ nun O_2 ile reaksiyonundan oluşur

Biyolojik sistemlerde radikallerin çoğunluğunu oksijen içeren serbest radikaller meydana getirir. Nedeni, aerobik solunum sırasında mitokondrilerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılardan geçerek moleküler oksijene transferi esnasında moleküler oksijenin tam olarak indirgenmemesi sonucu serbest radikallerin oluşmasıdır.

Moleküler oksijenin bünyesine bir elektron ilavesiyle süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) iki elektron ilavesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2), üç elektron ilavesiyle ise hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali meydana gelir (32, 33).

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) genellikle aerobik hücrelerde ve daha çok elektron transport zincirinde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşur (I) ve genellikle $O_2^{\bullet-}$ veya O_2^- anyonu şeklinde gösterilir. Ayrıca birçok yollarla da meydana gelebilir (34).

Diğer radikallere göre daha az toksik etkiye sahip olan süperoksit radikali, yüklü olduğu için hücre membranından doğrudan diffüze olamazken eritrosit membranlarındaki anyon kanalından Cl^- ve HCO_3^- iyonlarının yer değiştirmesiyle diffüze olur.

Süperoksit radikalinin toksik etkisi onun protonlanması ile çok daha reaktif olan perhidroksil radikalinin (HO_2^-) oluşmasıyla ortaya çıkar. Birbiriyle reaksiyona giren süperoksit radikali ile perhidroksil radikalinden biri yükseltgenirken diğeri indirgenerek oksijen molekülünü ve hidrojen peroksiti oluşturur (II). Ayrıca iki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni meydana getirir (III). Bu reaksiyon neticesinde radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (35).



Hidrojen peroksit kendisi bir radikal olmamasına rağmen süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve toksik hidroksil radikalini oluşturur (IV) .



Hidroksil radikali ($\text{HO}^\bullet$), serbest oksijen radikal türleri arasındaki bilinen en toksik ve tüm biyomoleküllere saldırabilme yeteneğine sahip oksidandır. Aşağıda hidroksil radikallerinin çeşitli oluşum şekilleri verilmiştir.

H_2O_2 'deki O-O bağının ısıyla ya da ışık etkisiyle homolitik olarak parçalanması sonucunda iki hidroksil radikali meydana gelir. Ayrıca H_2O_2 Fe (II) ve Bakır (I) tuzlarıyla reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (V) ve (VI). Bu reaksiyon Fenton Reaksiyonu olarak bilinir (36).



Oldukça aktif olan serbest radikaller oksidan ve prooksidan sınıfında değerlendirilir. Bu moleküller lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere saldırarak oksidatif hasara ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olay ve hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Dolayısıyla bu türlerin çoğalması canlı sistemlerde kontrol edilemeyen hasarlara neden olabilmektedir.

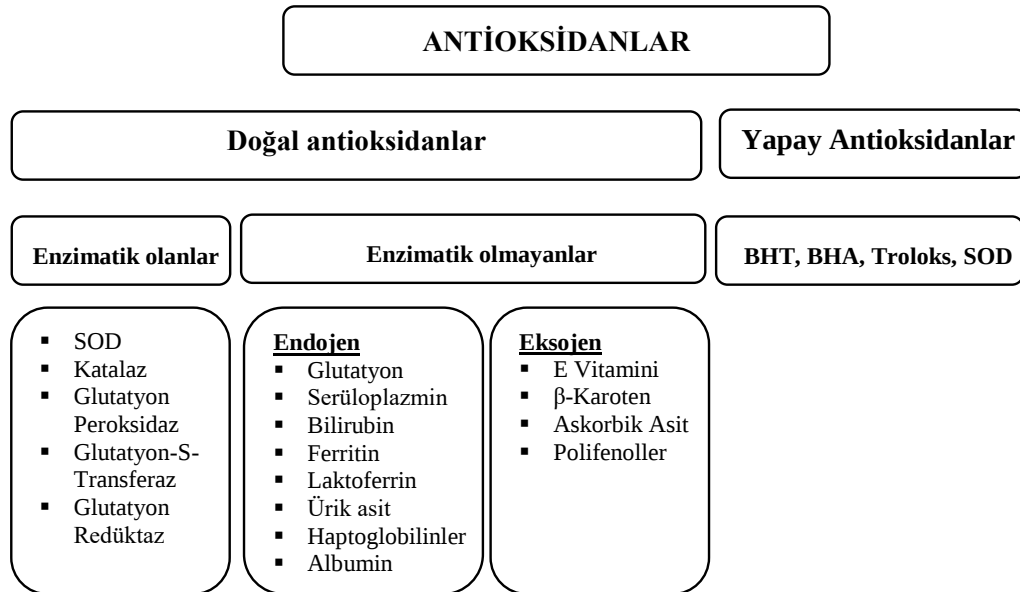
Antioksidanlar, oksidan moleküller oluşumunu engelleyerek ya da oksidan molekülleri nötralize ederek biyolojik hedeflerle reaksiyona girmelerini engelleyen,

yavaşlatan, durduran ve yapısında genellikle fenolik bileşik taşıyan moleküllerdir. Oksidan ve prooksidanların varlığı sağlıklı bir yaşam için antioksidanları elzem kılmaktadır. Çünkü antioksidanlar bu maddeleri etkin bir şekilde indirgeyerek daha az reaktif ya da reaktif olmayan ürünlere dönüştürürler (37, 38).

Antioksidanların insan sağlığı üzerindeki yerini belirleyen en önemli faktörler, doğal kaynaklardan elde edilebilmeleri, çözünürlükleri, kimyasal yapıları ve aktivite ilişkileridir (39). Antioksidanlar vücut tarafından üretildiği gibi dışarıdan ikincil metabolit olarak bitkiler, sentetik ilaçlar yoluyla da alınabilir. Bu moleküller serbest radikallerin yapılarını değiştirerek yahut etkilerini azaltarak vücut direncini artırırlar. Ayrıca hastalıkların oluşumunun engellenmesinde veya tedaviye yardımcı olarak kullanılabilirler (40).

Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi (detoksifikasyon), oluşan hücre deformasyonunun onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitesinin artırılması olarak tanımlanan beş değişik şekilde etki gösterir (41).

Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve yapay (eksojen kaynaklı) antioksidanlar olarak 2 grup altında, doğal antioksidanlarda enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar şeklinde sınıflandırılabilir (41,42).

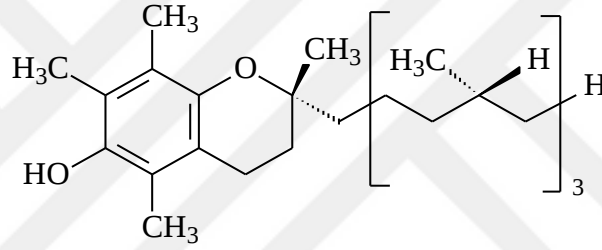


Şekil 3. Antioksidanların Sınıflandırılması

4.3.1. Bitkiler Tarafından Üretilen Bazı Antioksidanlar

4.3.1.1. E Vitamini (α -tokoferol)

Biyolojik membranlarda bulunan yağda çözünebilen bir vitamin ve aynı zamanda antioksidandır. Hücredeki antioksidan görevi, yapısında bulunan fenolik hidroksil grubundaki aromatik halkadan kaynaklanır (41). Eşleşmemiş elektronlarla reaksiyona girebilen bir hidroksil grubu içerir (43). Zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinen E vitamini, membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. Kolay bir şekilde membran fosfolipitlerine diffüze olarak, bu bileşikleri doymamış yağ asitlerine indirger ve serbest radikallerin membranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırır (42).



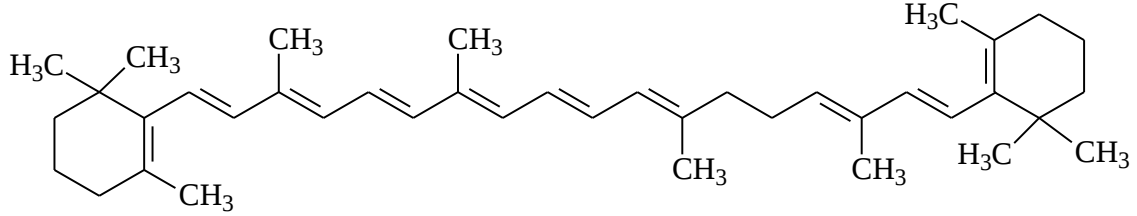
Şekil 4. E Vitamini (α -tokoferol)

Özellikle yer fıstığı, kuruyemiş, lifli yeşil besinler, badem, pamuk gibi bitkilerin yağlarında ve keten tohumlarında bol miktarda bulunan E vitamininin antioksidan özellik göstermesinin yanı sıra hücrede sinyal iletim mekanizmasındaki bazı basamaklar üzerinden hücre çoğalmasını da etkilemektedir. Ayrıca bir çok araştırma ile E vitamininin kalp hastalığı oluşma riskini azalttığı bilinmektedir (44).

4.3.1.2. Karotenoidler

Karotenoidler, çeşitli araştırmalarla da ortaya konulduğu gibi, bilinen çok iyi radikal tutucu, zincir reaksiyonlarını sonlandırıcı ve lipid peroksitlerin oluşmasını önleyici ve yok edici bir antioksidan doğal renk pigment molekülüdür (45). Üzerinde en çok çalışılan, A vitamininin metabolik ön maddesi olan ve radikal yakalayıcı olarak görev yapan β -karoten (şekil 5) bileşiğidir. Singlet oksijenin toksik etkisini baskılayarak, süperoksit radikallerini temizler ve oksijen oranının yeterli olmadığı

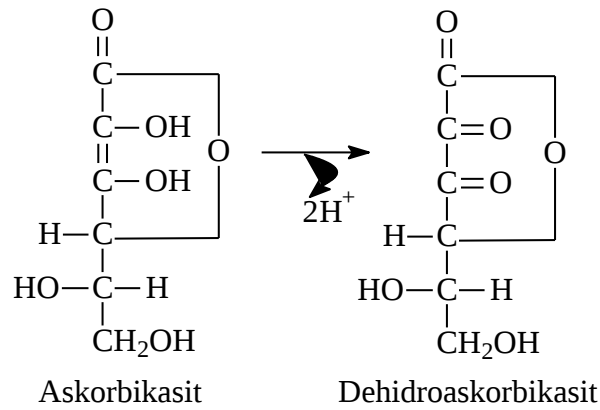
durumlarda peroksit serbest radikallerinin dokulara hapsedilmesi yoluyla antioksidan etki gösterir (44).



Şekil 5. β -karotenin Yapısı

4.3.1.3. C Vitamini (Askorbik Asit)

Organizmanın en çok ihtiyaç duyduğu vitaminlerden olan C-vitamini (Şekil 5), diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunup, suda çözünebilir ve serbest radikallere doğrudan etki eden güçlü bir antioksidan kaynağıdır (46). İnsan vücudunda sentezlenemeyen ve idrarla vücuttan atılan C vitamini depolanamaz dolayısıyla yeterli miktarda dışarıdan alınması gerekir.



Şekil 6. Askorbik Asidin (C vitamini) Yapısı

Askorbik asidin çok yönlü antioksidan aktivitesi olup, bu vitamin lipid oksidasyonunu aşağıda ifade edildiği şekilde farklı mekanizmalarla önlemektedir:

- Okside olabilir bazı bileşikler serbest radikal ve oksijen yok edici olarak koruyarak,

- Daha az reaktif olan semihidro askorbat ve dehidro askorbik asit (DHAA) radikaline dönüşerek oksijen ve karbon merkezli radikalleri indirgeyerek,
- Bazı antioksidanları rejenere ederek (47).

4.4. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler

Doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Bu bileşiklerin bir kısmı bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolizma ürünleri olarak adlandırılan fitokimyasallardır. Fitokimyasalların antioksidan, antimikrobiyal, insektisit gibi koruyucu rolleri bulunmaktadır. Dünya üzerindeki bitkiler sınırsız sayıda aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahiptirler ve bu bileşiklerin çoğu da fenolik bileşikler ya da bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir.

4.4.1. Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılması

Oksijenli aromatik bileşikler olan fenoller, bir veya daha fazla hidroksil grubunun aromatik bir halkaya (benzen) bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bir veya daha fazla aromatik halkaya fenolik hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşan moleküllere ise polifenoller adı verilir. Bitkiler için karakteristik öneme sahip olan fenolik bileşikler genelde serbest halde olmayıp ester veya glikozit formlarda bulunur (52). Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Yapısı	Sınıfı
C ₆	Basit fenolikler
C ₆ -C ₁	Fenolik asitler ve benzer bileşikler
C ₆ -C ₂	Asetofenonlar ve fenilasetik asitler
C ₆ -C ₃	Sinnamik asitler, sinnamil aldehytler, sinnamil alkoller, kumarinler, izokumarinler ve kromonlar
C ₁₅	Kalkonlar, avronlar, dihidrokalkonlar, flavanlar, flavonlar, flavononlar, flavonoller, antosiyaninler, antosiyanidinler
C ₃₀	Biflavoniller
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	Benzofenonlar, ksantonlar, stilbenler
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Kinonlar
C ₁₈	Betasiyaninler
Lignanlar, neolignanlar	Dimerler ve oligomerler
Lignin	Polimerler
Taninler	Oligomerler ve polimerler
Flobafenler	Polimerler

Beslenmede meyve ve sebze tüketimi artması ile kanser hastalığına yakalanma oranının azaldığı ortaya konmuştur (53). Bu durum meyve ve sebzelerin kalori değerlerinin karbonhidrat ve yağlara göre daha düşük olması ve içerdiği fenolik asitler, flavanoidler, antosiyaninler, karotenoidler gibi bileşenlerin biyolojik olarak aktif moleküller olması şeklinde açıklanabilir. Fitokimyasalların çoğunluğunu oluşturan fenolik bileşiklerin bir çoğunun potansiyel olarak antioksidan, antikarsinogenik, antimutagenik, antibakterial, antiviral ve antiinflamatuvar etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (54-58). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi genel olarak hidroksil gruplarının sayısına ve pozisyonuna; bileşen ve flavonoid moleküllerin glikolizasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (59, 60). Antioksidan özellik gösteren flavonoidler insan vücudu tarafından üretilemezler bu yüzden diyetle günlük alınan besinlerden sağlanmalıdır.

Peroksil ve hidroksil radikallerinin güçlü bir antioksidanı da flavonoidlerdir. Ancak flavonoidlerin süper oksit anyonuna etkisi tam olarak bilinmemektedir. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu aktif oksijen radikalleri oluşur. Metal bağlayıcısı olan polifenoller de bu reaksiyonları durdurarak oksijen radikali oluşumunu engellemektedir. Polifenollerinde organizma içerisindeki antioksidan etkileri plazmada dolaşan formlarının (konjuge, metoksi formu) etkinliklerine, absorpsiyonuna ve metabolizma derecesine göre değişmektedir (61).

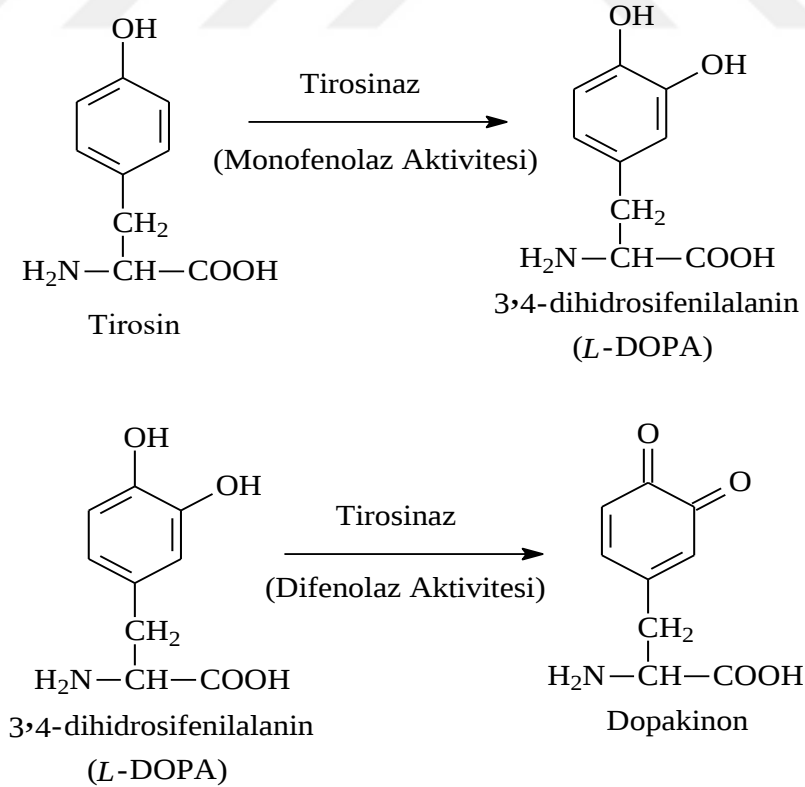
Flavonoidler farklı mekanizmalar ile de antioksidan etki gösterirler. Antioksidan enzim sistemini aktifleştirirler ve doğrudan reaktif oksijen türlerini, azot ve klor türlerini yakalarlar. Oksidatif hasara karşı koruyucu oldukları da son yapılan çalışmalarda hücre içerisindeki bileşenlerde ve DNA (mutasyon, kromozomal ayrılma, şeker ve baz kalıntılarının oksidasyonu, DNA zincir kırığı gibi) üzerinde gösterilmiştir (62).

4.5. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibitörleri (baskılayıcıları) enzimatik reaksiyonları yavaşlatır ya da sonlandırırlar. Bu sebeple enzim inhibitörlerinin oldukça önemli farmasötik maddeler olması sürpriz değildir. Enzim inhibitörlerinin çalışılması enzim mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlar. Hastalıkların tedavisi amacıyla genellikle bir enzimin inhibitörü kullanılır (48).

Nörobilim alanındaki yoğun araştırmalar neticesinde son zamanlarda literatürde nöroprotektif yani nöron koruyucu etkisi olduğu öne sürülen bileşikler ve bunların farklı serebral hasarlanmalardaki koruyucu etkileri ile ilgili yoğun çalışmalar yer almaktadır. Nöroproteksiyon terim olarak meydana gelmiş nöronal hasarı onarma veya sonraki nöronal hasarlanmayı önleyecek bir ajanın uygulanmasıdır (49).

Bilişsel anormallik ve nörodejeneratif görülen hastalarda Alzheimer ve Parkinson hastalıklarıyla sıklıkla karşılaşılır. Parkinson, beyinde dopamin eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır. Oksidoredüktaz sınıfı bir enzim (EC 1.14.18.1) olan tirozinaz, monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu ve o-difenollerin de o-kinonlara oksidasyonunu katalizler. Bir başka ifadeyle tirozinaz, tirozinin L-DOPA hidroksilasyonunu ve ardından L-DOPA oksidasyonunu katalizler (Şekil 7). Oluşan o-dopakinonlar hızla melaninleşir ve pigmentleri meydana getirirler (50). Sonuç olarak, tirozinaz enzimi nöromelanin üretiminde ve Parkinson ile ilişkili nöronların hasarında önemli rol oynar ve bu sebeple tirozinaz inhibisyonu, Parkinson hastalığı için ilaç araştırmalarında önemli bir hedef durumuna gelmiştir (51).

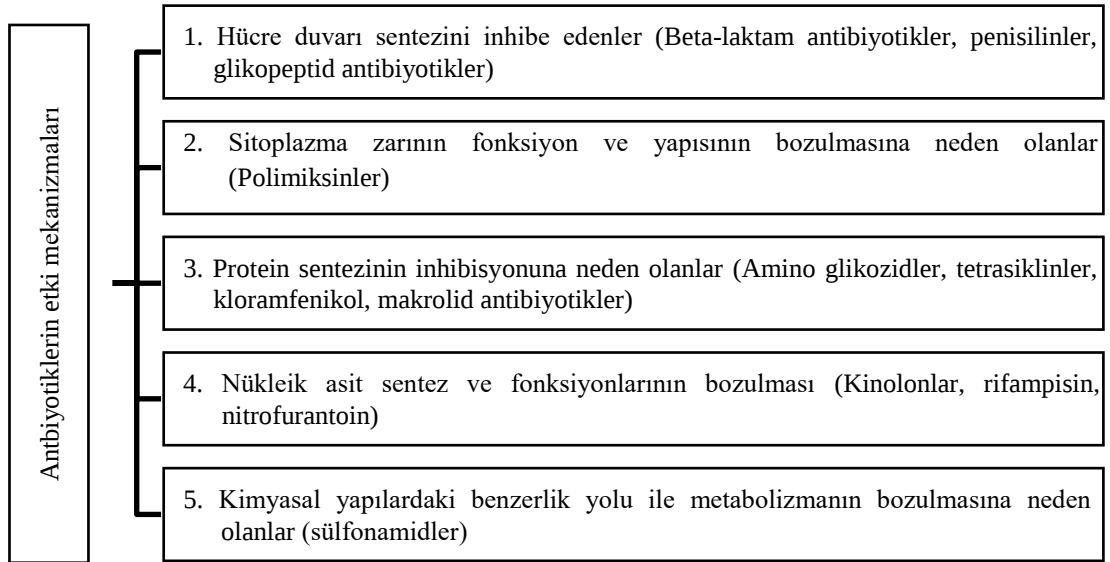


Şekil 7. Tirozinden Dopakinon Sentezi

4.6. Antimikrobiyal Maddeler Hakkında Bilgi

Antimikrobiyaller bir takım mekanizmalar ile mantar ve bakteri türlerinin üremesini durduran ya da direkt öldüren maddelerdir. Bu maddeler etki mekanizmasına göre ikiye ayrılırlar. Mikrobiyostatik olarak adlandırılanlar etki edeceği mikroorganizmanın üremesini durdurur, çoğalmasını engeller. Mikrobisid olanlar ise direkt hedef mikroorganizma üzerinde toksik etki ederek onu öldürmeye yönelik olanlardır. Belirtilen bu iki mekanizmaya sahip doğal antibiyotikler örnek alınarak üretilen benzer kimyasal yapıdaki bütün maddeler de kemoterapötikler olarak adlandırılmaktadır.

Canlı hücreler temel yapıları bakımında da iki grupta incelenirler. Az gelişmiş ama diğerinden farklı özellikler bulunduran prokaryotik hücreler, daha çok gelişmiş ökaryotik hücreler. Memeli hücreleri ökaryot iken bakteriler ise prokaryot tek hücreden oluşan canlılardır. Mikroorganizmaların memeli hücrelerden farklı olması, hücre yapısının kendine has özellikler bulundurması sayesinde de özgün ilaçlar üretilmekte (örneğin; penisilinler, sefalosporinler, sülfonamidler) ve seçici toksisite sağlanmaktadır. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Bakteriyel enfeksiyonların yaygın olması, etkin tedavi sağlaması ve birazda toplum tarafından suistimal edilmesi gibi birçok nedenden dolayı antibiyotikler en sık kullanılan ilaçlardır. İlaç giderlerinin yaklaşık %25'ini oluştururlar ve hastaneye yatan her üç hastadan biri tarafından kullanılırlar. Etki ettikleri mikroorganizmaya spesifik olma ve yine etki ettikleri mikroorganizma sayısının az ya da çok olmasına göre antibiyotikler sınıflandırılırlar. Dar spektrumlu diye adlandırılan antibiyotikler az sayıda mikroorganizmaya etki eden antibiyotiklerdir ve enfeksiyon nedeninin ortaya koyulduğu hastalıklarda direkt etkene yönelik tedavide etkin bir şekilde kullanılırlar.

Geniş spektrumlu antibiyotikler (karbapenemler, kinolonlar) ise çok sayıda mikroorganizmaya etki ederler ve bu antibiyotikler daha çok etkenin henüz belli olmadığı enfeksiyonlarda bir çok bakteriyi kapsayacak şekilde bir an önce tedaviye başlamak için kullanılırlar. Bununla beraber bu antibiyotikler çoğu bakteriye etki ettiği için yararlı diye nitelendirilen ve konağın doğal bağışıklığında önemli rol oynayan, ekolojik dengeyi sağlayan flora bakterilerine etki etmekte ve yan etkiler ortaya çıkarmaktadır (44).

Günümüzde antibiyotik kullanımının yukarda anlatıldığı gibi bu kadar yaygınlaşması beraberinde bir takım sorunları da getirmektedir. Bunlardan en önemlisi mevcut antibiyotiklere direnç gelişmesidir. Öyle ki bazı bakterilerde çoklu antibiyotik direncine varan durumlar ortaya çıkmaktadır ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi mevcut antibiyotikler ile oldukça güçleşmektedir. Bu durum araştırmacıları yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesine yönlendirmektedir. Yapılan çalışmaların önemli bir kısmı da bitkiler üzerinde yoğunlaşmakta, bazı tıbbi ve geleneksel bitkiler bu araştırmalarda kullanılmaktadır (63). Elde edilen verilere göre de bitkilerin içerdiği birden çok etken madde sinerjik etki ile mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Bunun da tek etken maddeli ilaç formlarına göre dirençli mikroorganizmalarda daha faydalı olabileceği düşünülmektedir (64-66).

4.7. Kanser

Normal hücre fizyolojisi göz önüne alındığı zaman bir hücre kendisini oluşturan hücrenin kontrollü bölünmesi ile meydana gelir, büyür, farklılaşır ve işlevini yerine getirince de yine kontrollü bir şekilde ölür (hücrel apoptozis). Bazı grup hücreler ise bu fizyolojik döngü içerisinde devam ederken bir takım etkenler sonucu genetik yapıları

da değişerek gereğinden fazla çoğalan, fenotipik ve morfolojik farklılıklar gösteren hücre grubu haline gelirler. Hem kendi işlevlerini yerine getiremez hem de çevre hücre ve doku gruplarını işlev yapamaz hale getirirler. İşte bu şekilde meydana gelen hücre topluluğuna primer tumor (neoplazi) denir. Aynı hücre grubu zaman içerisinde çevresinden bağımsız hareket etme, bir dokudan başka dokuya geçme, yayılma özelliği kazandığı zaman da bu hücreler kanser hücresi, ortaya çıkardıkları ölümcül hastalığa da kanser denilmektedir. Bu anormal hücreler kendi orijin aldıkları organın veya dokunun işlevini bozduğu gibi vücuda yayılarak bir çok dokuda da işlev kaybına neden olmaktadırlar. Günümüzde tümör sınıflandırması da yapılırken en başta bu özelliğe göre yapılmaktadır. Yani bulunduğu dokudan yayılmayan (metastaz yapmayan) tümöre benign (iyi huylu), metastaz yapan tümör ise malign (kötü huylu, kanser) denilmektedir (67).

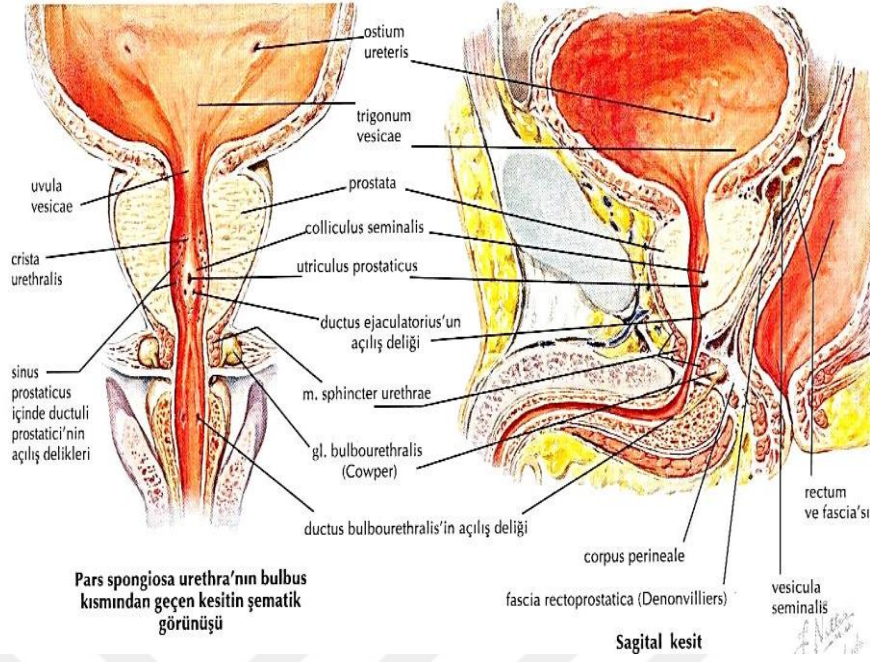
Kanser hücresini daha iyi anlayabilmek için normal hücre ile karşılaştırdığımızda bir takım farklılıklar göze çarpmaktadır. Normal hücreler işlevini yerine getirebilmek için, bir program ve kontrol dahilinde ve yeterli miktarda çoğalmaktadır. Ama kanser hücresi ise geçirdiği değişiklik ile herhangi bir amaca hizmet etmeyen ve zarar veren bir aşırı çoğalma (etrafındaki dokuları öldürecek kadar) sürecine girerler. Bu kontrolsüz çoğalma da beraberinde genetik mutasyonlarda içerdiği için normal orijin aldığı dokuya makro ve mikro düzeyde benzemeyen işlevsiz hücre topluluğu meydana getirmektedir. Normal dokuya göre sitoplazması az ancak nükleusu büyük, morfolojik yapıları değişmiş hücreler kanser hücrelerini oluşturmaktadır. Normal doku hücreleri arasında olan ve kontrolsüz yayılmayı önleyen temas inhibisyonu kanser hücrelerinde ortadan kalkmakta, bu hücrelerin işlevini yapmasını ve haberleşmesini sağlayan antijenik özellikleri değişmektedir. Normal hücrelerin planlı ve normal ölüm mekanizması olan apoptozun yolları bozulduğu için kanser hücrelerinde bu yol işlev dışı kalmıştır. Yine kanser hücrelerinin genetik değişiklik nedeniyle metabolik faaliyetleri de değişmiş, anaerobik solunumu ve glikoz tüketimi de artmıştır. Bulunduğu dokuya özgü işlevlerini yerine getirmesi için gerekli olan enzimleri, salgıları vs değişmiş artık görevini yerine getiremez hale gelmiştir (68).

Günümüz kanser tedavisi; her kanser türünün farklı olması (farklı doku ve hücre kaynaklı), tedavi için geğ kalınması (erken teşhis olmaması), primer odak tedavi edilse bile metastazların ortaya çıkması, mevcut ilaçların kanser dokusuna spesifik olmaması

ve normal dokuya ve hücrelere zarar vermesi, verilen ilaçlara karşı direnç gelişmesi gibi bir takım zorluklar içermektedir. Temel olarak tedavi yöntemleri de üçe ayrılmaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi şeklinde. Bunlardan hücreye etkili tedavilerin çoğunun esas amacı (kemoterapi, radyoterapi gibi) DNA replikasyonunu durdurma, hücre bölünmesinin önüne geçme ve sonuç olarak kanserin çoğalmasını engelleme üzerinedir. Ancak bu şekildeki tedavilerin de bir takım yan etkileri olmakta ve bunlar ciddi seyretmektedir. Mide bulantısı, kusma, saç dökülmesi, mukozit gibi yan etkilerle karşılaşan hastalar destekleyici tedaviler ile bu durumu tolere edebilse de kemik iliği işlevini yitirmesi gibi etkiler ciddi sonuçlar doğurmaktadır (69, 70).

4.7.1. Prostat Kanseri

Prostat bezi erkek üriner sisteminde bulunan yaklaşık olarak 3 cm yüksekliğinde, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında, 18-20 g ağırlığında salgısını üretraya boşaltan ve üretrayı çepeçevre saran bir bezdir. İri bir ceviz veya kestane büyüklüğünde olup mesane boynunu alttan destekleyen, arkadan rectuma komşuluğu olan prostat erkek üreme kanallarının içinden üretraya açıldığı erkek üreme sisteminin en büyük bezidir (Şekil 9). Buradan asit fosfotaz, fibrinolizin ve sitrik asit içeren salgısını üretraya boşaltan prostat bezi incelendiğinde esas yapısını tübüloalveolar bezler ve bunu destekleyen fibromüsküler yapıdaki ara doku oluşturmaktadır (71). Bu prostat dokusu büyüme ve gelişmesinde çok büyük etkiye de sahip olan androjenlerin fetal hayatın on ikinci haftasında ortaya çıkmasıyla gelişmeye başlar ve puberte çağında androjenlerin daha da artmasıyla gelişimini sağlar (72).



Şekil 9. Erkek Üreme Anatomisi (86)

Histolojik olarak prostat her ikisinde de proliferasyon ve hücre ölümünün dengeli bir şekilde gittiği iki kısımdan oluşmaktadır. Esas fonksiyonu yapan glandülerepitel ve destek görevi yapan fibromüskülerstroma. Anatomik olarak bakıldığında zaman ise 1980'lerde yapılan bir çalışma sonucunda prostatın periferalzona vesantral zondan oluştuğu tespit edilmiştir (73). Hayat boyu prostatın fizyolojik gelişimine baktığımızda da doğumda çok küçük olup puberteyle artan androjenlerin etkisi sayesinde aniden büyümeye başlar ve ileri yaşlarda da yine androjenin etkisi altında büyümeye devam eder (74).

Prostatın esas fonksiyonunu yapan glandüler bez yapısında histolojik olarak üçe ayırmak mümkündür. En içte yer alan ve mukus salgılayan “Mukozal Bezler”, ortada yer alan “Submukozal Bezler” ve bezin dış kısmında yer alan “Esas Prostatik Bezler” olarak isimlendirilir. Prostat salgısının esas ve büyük kısmını yapan bu bezler aynı zamanda prostat kanserinin geliştiği kısım olarak bilinmektedir (75, 76).

Prostat kanseri, aşırı hücre çoğalması ve metastaz ile seyreden, genelde prostat içinde birden çok odakta ortaya çıkan, histopatolojik olarak adenokarsinom yapısında olan ileri yaş erkeklerin bir kanser türüdür (77, 78). Her kanser türünde olduğu gibi prostat kanserinde de etiyolojiye yönelik yapılan çalışmalar sonucu birçok etken

saptanmıştır. Etnik ve çevresel özelliklerin yanı sıra hayat tarzı, sigara, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, genetik özellikler, yaş, metabolizma bozuklukları gibi çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir (79). Kanseri etyopatogenezinde son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu oksidatif stresin de önemli olduğu ve prostat kanserinin de gelişiminde etken olduğu saptanmıştır (80).

Prostat kanserinin etyopatogenezine bütüncül bakıldığında iki ana başlık göze çarpmaktadır. Kalıtsal nedenler ve kendiliğinden ortaya çıkan nedenler. Kendiliğinden ortaya çıkan nedenler %85 gibi bir oranla daha önde gelmekte ve önem arz etmektedir (81, 82). Yapılan araştırmalar sonucunda prostat kanseri ve ileri yaşın anlamlı bir korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. 39 yaşın altındaki erkeklerde görülme sıklığı 1/10.000, 40-50 yaş aralığında 1/139 ve 60-79 arasında bu sıklık 1/8 olarak bulunmuştur (83). Prostat kanseri nedenleri ile ilgili kurulan bir başka hipotezde, diyetle alınan yağ oranının fazla olması durumunda vücutta androjen salgısını arttırdığı bunda prostat kanseri patogenezinde önemli rol oynadığı söylenmiştir. Sadece yağlar değil aynı zamanda yağda eriyen vitaminlerin (A, D, E, K), eser elementlerin ve hatta kalsiyum alımının artması ile de prostat kanseri arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (84).

Bütün bu değerlendirmeler ve etkenlerin yanı sıra kanseri patogenezinde önemli rol oynayan oksidatif strese karşı antioksidan mekanizmaların (Likopen, selenyum ve E-vitamini gibi) kanseri gelişimini engellediği ve bu yönde olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (85).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihazlar

Yapılan analizlerde kullanılan cihazlar marka/model olarak Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan Cihazlar ve Marka/Modelleri

CihazAdı	Marka/Model
LC-UV	Elite LaChrom, Hitachi, Japonya
UV-vis spektrofotometre	Spectro UV-Vis Double Beam PC LaboMed Inc., Los Angeles, CA, USA
pH metre	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland
Hassas Terazı	Presica LX 320 A, Dietikon, Switzerland
Saf Su Cihazı	Human, Zeneer Navi UP, Song Pa-Ku, Seoul, Korea
Vorteks karıştırıcı	Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA
Etüv	Nüve, EN 400, Ankara, Türkiye
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR HEI-Standard, Schwabach, Germany
Rotary evaporatör	IKA®-Werke, RV 05 Basic, Staufen, Germany
Vakum Pompası	Buchi Vacuum Pump V-700, Flawil, Switzerland
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf Research® Plus Hamburg, Germany
Laminar akımlı kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Orbital çalkalayıcı	Stuart (SSM1)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific (Heracell 150i)
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotech (Epoch)

5.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan temel kimyasal madde ve malzemeler Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan Kimyasallar ve Satın Alınan Firma

Kullanılan Kimyasal	Satın Alındığı Firma
Gallik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>t</i> -sinnamik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Vanilik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kaffeik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Şiringik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Epikateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Ferulik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Luteolin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetonitril-LC Saflıkta	Merck, Darmstadt, Germany
Metanol-LC Saflıkta	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetik Asit	Merck, Darmstadt, Germany
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
Folin-Ciocalteu's phenol reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Etanol	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany

5.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Çözelti	Hazırlanışı
HPLC-UV ile Fenolik Bileşen Analizleri İçin	
Gallik asit Protokatekuik asit <i>p</i> - hidroksi benzoik asit Vanilik asit Kafeik asit Şiringik asit <i>p</i> -Kumarik asit Ferulik asit	%50-50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltiden, 1- 2- 5-10- 20- 30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%50-50 metanol-saf su) seyreltilir.
Kateşin Epikateşin Rutin	%100 metanolle hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltiden, 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%100 metanol) seyreltilir.
% 2’lik Asetik Asit	20 mL glasiyel asetik asit balon jojede saf su ile 1000 mL’ye tamamlanır
%70-30 Asetonitril-saf su	700 mL asetonitril balon jojede saf su ile 1000 mL’ye tamamlanır.
Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin	
0.2 N Folin-Ciocalteu	2 N Folinden 1:10 oranında saf suyla seyreltilerek kullanılır.
% 10’luk Na ₂ CO ₃	10 g Na ₂ CO ₃ 90 mL suda çözülür, 100 mL’ye tamamlanır.
Gallik Asit (1 mg/mL)	Metanolle hazırlanan stok çözeltiden, 0.5- 0.25- 0.125- 0.0625- 0.03125 mg/mL olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlanır.
Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç -FRAP İçin	
HCl (40 mM)	Yaklaşık 20 mL saf suyun üzerine % 37’lik HCl’den 340 µL ilave edilir ve saf suyla 100 mL’ye tamamlanır.
TPTZ (10 mM)	234.249 mg TPTZ stok maddeden tartıldı, 75 mL 40 mM’lık HCl içinde çözüldü.
FeCl ₃ (20 mM)	324.4 mg FeCl ₃ destile suyla 100 mL’ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2.325 g CH ₃ COONa.3H ₂ O üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edildi. Hacmi 750 mL’ye saf suyla tamamlandı.
FRAP Reaktifi	300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlanır
Troloks® (0.02 mg/mL)	10 mg troloks bir miktar metanolde çözüldü. Hacmi 10 mL’ye tamamlanarak stok çözeltisi hazırlanır. 0.02 mg/mL’lik ara stok çözelti metanolle seyreltilerek kullanılır.
DPPH•Radikal Temizleme Aktivitesi İçin	
DPPH•Reaktifi (0.1 mM)	100 mL’si için; 3.94 mg DPPH•tartılır, bir miktar metanolde çözülerek hacmi 100 mL’ye tamamlanır.
Troloks® (0.02 mg/mL)	10 mg troloks bir miktar metanolde çözüldü. Hacmi 10 mL’ye tamamlanarak stok çözeltisi hazırlanır. 0.02 mg/mL’lik ara stok çözelti metanolle seyreltilerek kullanılır.
Bakır(II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) için	
10 mM CuCl ₂ .2H ₂ O	92.4 mg CuCl ₂ .2H ₂ O bir miktar distile su ile çözülür. Hacmi 50 mL’ye tamamlanır (pH:7’ye NaOH ile ayarlandı.).

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler (Devamı)

1M CH ₃ COONH ₄	3.8 g CH ₃ COONH ₄ bir miktar distile su ile çözülür. Hacmi 50 mL'ye tamamlandı (pH:7'ye NaOH ile ayarlandı.).
7.5 mM Neokuproin Çözeltisi	78 mg neokuproin bir miktar metanolde çözülür. Hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
Troloks® (0.02 mg/mL)	10 mg troloks bir miktar metanolde çözülür. Hacmi 10 mL'ye tamamlanarak stok çözeltisi hazırlanır. 0.02 mg/mL'lik ara stok çözelti metanolle seyreltilerek kullanılır.
Tirozinaz inhibisyonu için	
L- DOPA çözeltisi (2.5 mM)	0.004925g L-DOPA fosfat tampon çözeltisiyle (pH: 6.8) 10 mL'ye tamamlanır.
Kojik asit standardı (500, 100, 50, 25 µg/mL)	2.5 mg kojik asit alınıp tampon çözelti ile 5 mL ye tamamlandı. Hazırlanan 500 µg/mL kojik asit çözeltisi tampon çözelti ile istenilen derişimlere seyreltilerek kullanılır.
Sitotoksite Testi için	
MTT çözeltisi (5 mg/mL)	250 mg MTT, 50mL fosfat tampon çözeltisi (PBS 1X) (pH: 7.4) içerisinde çözündürüldü. Çözelti 4°C'de karanlıkta saklandı.
3T3 hücre hattı için mediyum	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)+ %10 bovine calf serum (Fetal Sığır serumu)
PC-3 hücre hattı için mediyum	F12 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + %10 bovine calf serum (Fetal Sığır serumu)

5.4. Bitkinin Toplanması, Sulu ve Metanollü Ekstrelerinin Hazırlanması

Erzincan Merkez Yalnızbağ'dan Kelkit yönüne 3. km, 1400 m yükseklikteki yamaçlardan 2016 yılının Haziran ayında toplanan *I. cappadocica* bitkisi, Erzincan Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. Ali Kandemir tarafından teşhis edilmiştir. Herbaryum numarası 10861'dir. *I. cappadocica* bitkisinin çiçekli topraküstü kısımları alınarak gölgede kurutuldu ve öğütücü ile toz haline getirildi. Daha sonra bitkinin toz edilmiş çiçekli topraküstü kısmından 200 g tartılarak alınmıştır. Metanollü ve sulu ekstrelerinin hazırlanması için 24 saat boyunca ısıtıcılı çalkalayıcıda tutulmuştur. Çözelti önce normal süzgeç kağıdından daha sonra mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek katı partiküllerden arındırıldı. Son hacimleri (50 mL) ayarlanarak konsantrasyonları belirlenmiştir. Analiz süresine kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Her bir metanol ve su ekstrenin konsantrasyonu (10 mg/mL), belli bir hacimde alınan ekstrenin evaporasyonu sonucu elde edilen kuru toz halinin ağırlığı ile hesaplanmıştır.

5.4.1. Döner Vakum Evaporatörü ile Çözücü Uçurulması

Bir döner vakum evaporatörü ile tek basamaklı destilasyonları hızlıca yapmak mümkündür. Bu yöntemin esası dönen buharlaştırıcı bir balon kullanılarak çözücülerin buharlaştırılabilir ve yoğunlaştırılabilir olmasıdır. Vakum altında kaynama sıcaklığını düşürdüğü için destilasyonların vakum altında yapılması verimi artırır ve ürünleri korumaya yardım eder. Bu sistemde ikinci bir yoğunlaştırıcı ile vakum kontrolörü mevcuttur. Oval şekilli su banyosuyla büyük ve küçük uçurma balonlarının ısıtılması sağlanmaktadır.

5.5. RP- HPLC-UV ile Fenolik BileşenlerinTayini

5.5.1. RP-HPLC-UV Koşulları

HPLC tekniğinde katı sabit bir faz (kolon) ile hareketli bir faz (mobil faz) arasında, bileşenlerin çeşitli yöntemlere göre ayrılması söz konusudur. Katı sabit fazla farklı etkileşime giren bileşenler kolonu farklı zamanlarda terk ederler. RP-HPLC ayırma tekniğinde sabit faz apolarken hareketli faz polardır dolayısıyla polaritesi en yüksek bileşen kolunu ilk önce terk eder. Bileşenleri orta ve yüksek polarlığa sahip analitlerin ayrımı için oldukça uygun bir tekniktir.

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC sisteminde yapılmıştır.

Analizler ters faz C18 kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5µm; Fortis) kullanarak asetonitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirilmiştir (82). *I. cappadocica* bitkisinin çiçekli topraküstü kökleri 12 saat oda sıcaklığında metanol ile ekstre edilmiş, vakum altında çözücüsü uçurulduktan sonra HPLC grade metanol ile 10 ppm konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 0.45 µm'lik membran filtreden süzölmüştür. A: %100 metanol; B: su içinde %2 asetik asit (pH: 2.8) solvan sistemlerinden oluşan 16 dk'lık ters faz kolonun kullanıldığı HPLC analizi ile bitki materyali içersindeki p-hidroksi benozik asit, vanilik asit, syringaldehit, kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit, kersetin fenolik bileşiklerinin taraması gerçekleştirilmiştir.

5.6. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler

I. cappadocica ekstrelerinin toplam antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde üç farklı yöntem kullanılmıştır. Ayrıca spektrofotometrik olarak toplam fenolik madde miktarı ölçülmüştür.

5.6.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Toplam fenolik madde ölçümü için yaygın olarak kullanılan Folin metodu, Folin Ciocalteu reaktifiyle ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$) (fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisi) alkali ortamda fenolik yapıya sahip bileşiklerin renkli kompleks oluşturması ve absorbansın 765 nm'de okunması esasına dayanmaktadır (87). 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.

İşlemler:

- Test çözeltileri hazırlanmıştır (3 paralel çalışılmıştır).
- Test 1, Test 2, Test 3 ve Numune körü tüplerine 50 µL numune çözeltisi, Standart tüplerine ve standart körüne 50 µL gallik asit çözeltileri pipetlenmiştir.
- Reaktif Körüne 50 µL numune ve standardın çözücüsü pipetlenmiştir.
- Tüm tüplere 2.5 mL saf su ilave edilmiştir.
- Test 1, Test 2, Test 3, Standart ve Reaktif Körü tüplerine 250 µL Folin-Ciocalteu Reaktifi pipetlenmiştir. (20 sn arayla)
- Numune Körü ve Standart Körü tüplerine 250 µL saf su pipetlenmiştir. (20 sn arayla)
- 3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Tüm tüplere 750 µL %7.5 lik Na_2CO_3 çözeltisi pipetlenerek vortekslenmiştir.
- Oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir.
- Spektrofotometrede 765 nm'de 20 sn arayla absorbans okunmuştur.

5.6.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Tayini

FRAP metodu, antioksidanlar varlığında (Fe(III)-TPTZ- 2,4,6-tris (2-pyridly)-S-triazin) kompleksinin indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ oluşması ve bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır. Nispeten basit bir yöntem olan FRAP yöntemi kolaylıkla standardize edilebilmektedir. Bitki ekstraktlarındaki antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde FRAP (Fe (III) indirgeme gücü) metodu geçerli bir yöntem olarak görülmektedir (88).

Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen yönteme göre indirgeme kuvveti, numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen Fe^{+2} , 595 nm'de absorbans veren $K_3(Fe)CN_6$ renkli kompleksini oluşturur. Bu yöntem için önce ekstraktların ve standardın (Troloks) belli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Sonra Troloks adım adım metanol ile seyreltilerek 5 farklı konsantrasyon (1000- 500- 250-125-62.5 μM) elde edilerek konsantrasyona karşılık 595 nm'deki absorbans değeri çalışma eğrisi oluşturulmuştur. FRAP değerleri grafikten yararlanılarak g numune başına μM olarak hesaplanmıştır.

İşlemler:

- FRAP reaktifi taze hazırlanmış, kullanılmaya başlayıncaya kadar düşük hızda karıştırılmıştır.
- Test çözeltileri hazırlanmıştır (3 paralel çalışılmıştır).
- Spektrofotometre çalıştırılarak, dalga boyu 595 nm'ye ayarlanmıştır.
- Test 1, Test 2 ve Test 3 ve Numune körü tüplerine 50 μL numune çözeltileri, Standart ve Standart körü tüplerine ise 50 μL Troloks çözeltisi pipetlenmiştir.
- Reaktif körü tüplerine numunenin ve standardın çözücülerinden 50 μL pipetlenmiştir.
- Test 1, Test 2 ve Test 3 Reaktif körü tüplerine 1.5 mL FRAP reaktifi pipetlenmiştir (20 sn arayla).
- Numune körü ve Standart körü tüplerine ise 1.5 mL numune ve standartların çözücülerini 20 sn arayla pipetlenerek vortekslenmiştir.
- Oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir.
- Absorbansları 595 nm'de okunmuştur.

5.6.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

Serbest radikal temizleme aktivitesi tayinlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bu yöntem kolay, ucuz ve kısa sürede sonuç vermektedir. Koyu menekşe rengine sahip serbest bir radikal olan DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 517 nm'de maksimum absorbands oluşturmaktadır. Bu yöntem antioksidan madde varlığında bu absorbands miktarındaki azalıştan faydalanarak bu maddelerin tespit edilmesi esasına dayanmaktadır (90).

Çalışmada DPPH• radikalının 100 µM'lık metanollü çözeltisi kullanıldı. DPPH aktivitesini kontrol etmek için 100 µM DPPH çözeltisi ile deneme yapılmıştır. Belirli konsantrasyondaki numuneden ve DPPH çözeltisinden eşit miktarda alınarak renk değişimi gözlenmiştir. Rengin çok açık pembe olması aktivitenin yüksek olduğunu gösterir. Örneğin; Konsantrasyonu 2 mg/mL olan bitki numunesi için 100 µM DPPH (750 µL) ve bitki numunesi (750 µL) bir tüpte karıştırıldığında rengin sarıya yakın olduğu gözlenmiştir. Bunun için numuneden gerekli seyreltmeler yapılarak aktivite için uygun bitki ekstresi konsantrasyonun 0.25 mg/mL olduğu gözlenmiştir. Gerekli seyreltmeler bitkinin çözücüsü kullanılarak 6 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. Standart olarak Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) 6 farklı konsantrasyonda metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

İşlemler:

- Standart tüplerine ve standart körü tüplerine 750 µL BHT, Reaktif körüne 750 µL BHT çözücüsü pipetlenmiştir.
- Test 1, Test 2, Test 3 ve Numune körü tüplerine 750 µL numune çözeltileri ve Reaktif körüne 750 µL numunenin çözücüsü pipetlenmiştir.
- Standart tüplerine ve Reaktif körü tüplerine 750 µL DPPH ve Standart körüne DPPH çözücüsü olarak 750 µL metanol pipetlenmiştir.
- Test 1, Test 2, Test 3 ve Reaktif körü tüplerine 750 µL DPPH ve Numune körüne DPPH çözücüsü olarak 750 µL metanol pipetlenmiştir.
- Spektrofotometre çalıştırılarak dalga boyu 517 nm'ye ayarlanmıştır.
- Tüpler 50 dk bekletildikten sonra 20 sn arayla absorbands okunmuştur.
- Sonuçlar grafiğe geçirilip SC₅₀ değerleri hesaplandı ve mg/mL olarak ifade edilmiştir.

5.6.3.1. SC₅₀ Değerinin Bulunması

SC₅₀ radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapılmıştır. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapılmış ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı SC₅₀ değerini vermektedir. SC₅₀ değeri mg/mL birimiyle ifade edilmiştir.

5.6.4. CUPRAC (Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite)Yöntemi:

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 yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (89). Bu yöntem kolay kullanılan, hızlı, etkili ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Karmaşık ve yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan kısa sürede doğru sonuç alınmaktadır. Ayrıca alınan sonuçlar da spesifiktir. Bu yöntem için önce ekstrelerin ve standardın (Troloks) belli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Sonra Troloks adım adım metanol ile seyreltilerek 5 farklı konsantrasyon (1000-500-250-125-62.5 µM) elde edilerek konsantrasyona karşılık 450 nm'deki absorbans değerleri çalışma eğrisi oluşturulmuştur. CUPRAC değerleri grafikten yararlanılarak g numune başına µM olarak hesaplanmıştır.

İşlemler:

- Reaktifler ve Test çözeltileri hazırlanmıştır (3 paralel çalışılmıştır).
- Test 1, Test 2 ve Test 3 ve Numune körü tüplerine 500 µL numune çözeltileri, Standart ve Standart körü tüplerine ise 500 µL standart çözeltisi pipetlenmiştir.
- Reaktif körüne 500 µL numune ve standart çözücüleri pipetlenmiştir.
- Spektrofotometre çalıştırılmış, dalga boyu 450 nm'ye ayarlanmıştır.
- Tüm tüplere 1000 µL CH₃COONH₄ ve 1000 µL CuCl₂.2H₂O pipetlenmiştir.
- Test 1, Test 2, Test 3, Standart ve Reaktif körü tüplerine 1000 µL neokuproin reaktifi pipetlenirken numune körü ve standart körü tüplerine 1000 µL reaktif çözücüsü (metanol) 20 saniye arayla pipetlenerek vortekslenmiştir.

- Karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir.
- Absorbans değerleri 450nm`de okunmuştur.

5.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal aktivite testleri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Antimikrobiyal çalışmaların yapılması için insanlarda hastalık etkeni olan başlıca prokaryotik mikroorganizmaların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre model mikroorganizmaları seçildi ve bu mikroorganizmalarda bitki ekstraktları test edilmiştir. Ökaryotik hücre yapılarını temsilen insan patojeni maya mantarı olan *C. albicans* ve non patojen olan *S. cerevisiae* suşları kullanılmıştır. Tüm suşlar Refik Saydam Hıfssıssıhha Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilmiştir. Stok bikti ekstraktları kullanıldığı süreye kadar -20 °C'de bekletilmiştir. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. 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

5.7.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

I. cappadocica bitkisi ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri olup olmadığının belirlenmesinde ilk olarak agar kuyucuk difüzyon metodu kullanılmıştır (96). Bakteriler için Mueller Hinton agar ve sıvı besiyerleri, *M. smegmatis* için Brain heart infusion (BHI) sıvı ve katı besiyeri, mantarlar için maya ekstreli sıvı besiyeri (YEG) (Difco, Detriot, MI) ve Potato Dextrose agar (PDA) (Difco, Detriot, MI) kullanılmıştır. Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden sıvı besiyeri içinde yaklaşık olarak

10⁶ kob/mL (koloni oluşturan birim =colony forming unit) şeklinde dilüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra önceden hazırlanmış katı besiyerlerine yaygın ekimleri yapılmıştır. Ekimleri tamamlanan besiyerlerin üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açılarak her bir kuyucuğa test edilecek ekstrelerin 1 mL’de hazırlanmış stok çözeltilerinden 50 µL damlatılmıştır. Bakteri ihtiva eden petriler 24 saat, maya ihtiva eden petriler ise 48 saat 36 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zonları ölçülmüştür. Standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), mayalar için Flukonazol (5 µg), *M. smegmatis* için Streptomisin ve standart çözücü kontrolü kullanılmıştır.

5.7.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Tayini

Agar kuyucuk difüzyon metodunda *I. cappadocica* bitkisi metanol ekstresinin 500-250 µg/mL miktarlarının 10 mm ve üzeri zon çapı oluşturduğundan bu etkinliğin kantitatif etki değerinin belirlenmesi için sıvı besiyerlerinde mikrodilüsyon sıvı yöntemi uygulanarak, minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değeri µg/mL olarak belirlenmiştir.

MIC yöntemi, “National Committee for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS) standartlarının belirlediği kritere göre uygulanmıştır (96, 97). 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 kullanılmıştır. Antitüberküloz aktivitenin belirlenmesinde *M. smegmatis* suşu ve kültürü üretimi/testi için Brain Heart Infusion (Difco, Detroit, MI) besiyeri kullanıldı. Kültürler 3-5 gün 35 °C’de aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.

Mikrodilüsyon testi için ELISA pleytleri kullanılarak ekstrelerin 0.1 mL’si sıvı besiyerleri ile seri sulandırıldı. İnoküle edilecek mikroorganizmaların bir gecelik kültürlerinden McFarland 0.5 bulanıklılığında (1X10⁸ kob/mL) sulandırım hazırlanıp 1:10 sulandırılarak her bir kuyucuğa 0.005 mL mikroorganizma (son test konsantrasyonu 5X10⁴ kob/kuyucuk) ilave edilmiştir. Pleytler 35°C’de 16-72 saat süre ile aerobik koşullarda etüvde bekletilmiştir. MIC değeri, mikrodilüsyon kuyucuklarındaki mikroorganizmanın üremesi tamamen engellenmiş ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobik madde konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

Standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10µg), mayalar için Flukonazol (5µg), *M. smegmatis* için Streptomisin ve standart çözücü kontrolü kullanılmıştır.

5.8. Enzim İnhibisyonu

5.8.1. Tirozinaz İnhibisyonu Tayini

Erzincan yöresinden toplanmış *I. cappadocica* bitkisinin metanol ekstreleri hazırlanmıştır. 10 mg/mL olarak hazırlanan metanol ekstrelerinin potasyum fosfat tamponuyla (pH: 6.8) ile 25, 50, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde dilüe örnekleri hazırlanmıştır. Ekstrelerin tirozinaz inhibisyon kapasitesi, L-DOPA'nın substrat olarak kullanıldığı Likhitwitayawuid ve Sritularak tarafından geliştirilen yöntem ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (91). 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 µg/mL) kullanılmıştır (92). Ölçümler 96-kuyucuklu mikropak kullanılarak, ELISA okuyucuda gerçekleştirilmiştir. Deney protokolü A, B, C ve D karışımları olarak belirlenmiştir. A, 120 µL fosfat tamponu (pH: 6.8), 40 µL tirozinaz solüsyonu (46 U/mL); B, 160 µL fosfat tamponu (pH: 6.8); C, 80 µL fosfat tamponu (pH: 6.8), 40 µL tirozinaz solüsyonu (46 U/mL), 40 µL örnek solüsyonu; D, 120 µL fosfat tamponu (pH: 6.8), 40 µL örnek solüsyonu eklendi ve karışımlar 23 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir karışıma 40 µL L-DOPA çözeltisi konuldu ve tekrar 23 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında mikropaklar 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.

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

Elde edilen sonuçlar madde miktarının logaritmasına karşı % enzim inhibisyon olacak şekilde grafiğe geçirilmiş ve elde edilen denklemden ekstrelerin enzim üzerine olan IC₅₀ (Enzimin %50'sinin inhibe olduğu gözlenen konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır.

5.9. Sitotoksite Tayini

5.9.1. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Edilmesi

Öncelikle muhafaza edilen İnsan Prostat kanser hücresi olan PC-3 (human prostate cancer celllines) ve 3T3 Fare fibroblast hücreleri (sıvı azot buharı ile soğutulmuş ortamda) çözünmesi ve çalışmaya hazır hale getirilmesi amaçlı vial içinden alınarak (yaklaşık 10^6 hücre/mL) 37 °C'lik su banyosunda çözünmesi için 1-2 dk bekletilmiştir. Sonra hücreler 15 mL'lik falkona alınmıştır. Üzerlerine 5 mL serumlu besiyeri ilave edilmiştir. Pipetajlama işlemi ile süspanse hale getirilmiştir. Elde edilen bu süspanسیون 1200 rpm'de (dakika başına devir sayısı) 3 dk'lık bir sürede santrifüj edilerek oluşan süpernatant atılmıştır. Hücre stoklarında mevcut olan DMSO (dimetil sülfoksit)'nin ortamdan iyice uzaklaştırılması için aynı işlem ikinci kez yapılarak tekrarlanmıştır. Bütün bu işlem sonucunda elde edilen hücre pelletine tekrardan 1 mL serumlu besiyeri eklenmiştir. Ardından pipetajlama yapılarak yeni bir süspanسیون hazırlanmıştır. Oluşan süspanسیون 24 saat süre bekleme için 25 cm²'lik flasklardaki 7 mL serumlu medyum ortama inkübe edildi (%90 bağıl nem, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren ortam). Bu işlem sonrasında yapışmayan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla süpernatant atılmış ve ortama tekrardan serumlu besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin ortamdaki yoğunluğunun %70 konfluent (sıkışıklık) hale ulaşmış olduğu faz-contrast invert mikroskop kullanılarak tespit edilmiştir. Daha sonra bu yoğunluktaki hücreler ya kültürün devamı için pasajlanmış ya da mevcut yapılacak testlerde kullanılmıştır.

Pasajlama işlemi için kullanılacak hücreler süpernatantın alınması ile hazır hale getirilmiştir. Ortamdan hücresel artıkların ve tripsin aktivitesinin azalmasına sebep olan serum fazlalığının kaldırılması için hücre yüzeyleri PBS (fosfat tamponlu salin) (1X) ile yıkanmıştır. Hücrelerin tutundukları ortam yüzeyinden ayrılmaları amacıyla mevcut hücre kültürüne tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek hücreler 37 °C de, %5 CO₂ içeren ortama inkübe edilmiş ve 5-10 dk bekletilerek tripsinize edilmesi sağlanmıştır. Ayrılan bu hücrelerin üzerine serumlu besiyeri eklenerek yeni süspanسیون oluşturulmuş ve 1200 rpm de 3 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Daha sonrasında aynı işlem bir kez daha tekrar edilmiştir.

5.9.2. MTT Testinin Uygulanışı

Abudayyak ve arkadaşlarının uyguladığı yönteme göre yaklaşık olarak 10^3 - 10^4 hücre/100 μ L kuyu yoğunlukta olacak şekilde 96 kuyulu mikropalakalara hücre dizisi dağıtılmıştır. Daha sonra 24 saat süre ile 37  C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletilerek inkübe edilmiştir. Sonrasında ortamda oluşan süpernatant atılarak kuyular 100 μ L PBS (1X) ile yıkanmıştır. Ardından ortama taze serumlu besiyeri ilavesi ve hemen sonrasında bitki ekstreleri katılmıştır. MTT ile sitotoksosite tespitinde maruziyet konsantrasyonları olarak sulu ekstreler için 187 – 5000 μ g/mL, metanollü ekstreler için ise 187–1500 μ g/mL tercih edilmiştir. 24 saatlik maruziyet sonrası 25 μ L/kuyu MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid)   zeltisi ilave edilmiş ve 37  C'de %5 CO₂'li inkübatörde 2 saat süre ile bekletilm ştir. Oluşan süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından her kuyuya 100 μ L DMSO eklenerek mikropalakalar 5 dk süre ile 150 rpm'de çalkalanmıştır. Ardından mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile oluşan çözeltinin 590 nm'deki absorbensı (670 nm referans dalga boyuna karşı)     lm şt r. Deneyler toplamda en az 9 tekrar olacak şekilde, aynı koşullar altında farklı 3 günde her konsantrasyon için en az 3 tekrar şeklinde yapılmıştır. Sulu ve metanollü ekstrelere maruz bırakılmamış hücreler negatif kontrol olarak benzer şekilde analize hazırlanmıştır (93).

Değerlendirme:

%100 canlılığa eşdeğer olarak; enzim aktivitesine bağlı, negatif kontrol hücrelerinden elde edilen absorbens değeri (optik dansite, OD) kabul edilmiştir. Sulu ve metanollü ekstrelere maruz kalan hücrelerdeki   l m oranı enzim aktivitesindeki inhibisyon derecesinin tespitine bağlı olarak negatif kontrolün yüzdesi şeklinde aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

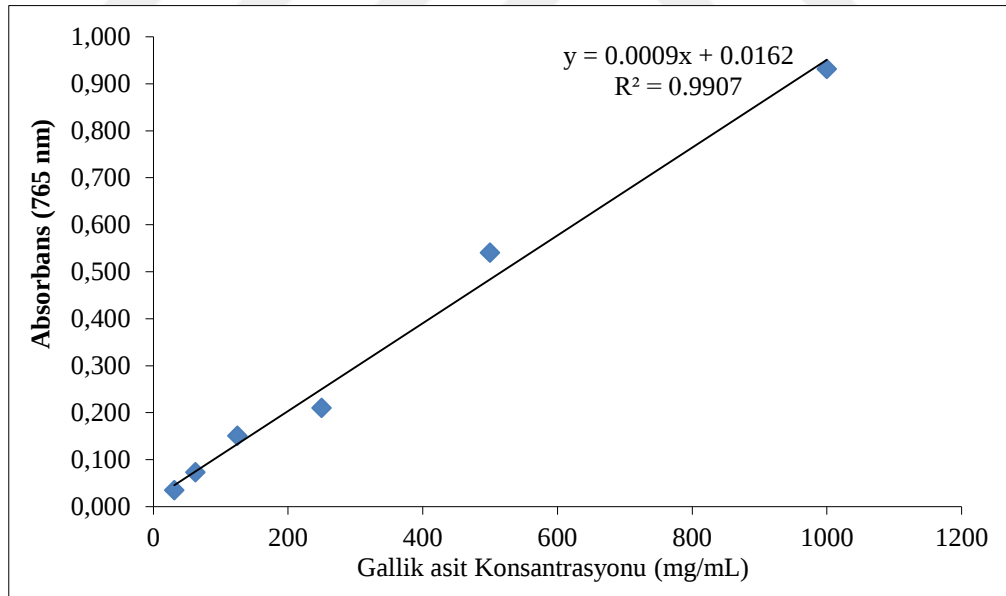
% inhibisyon konsantrasyonu (IC) = $100 - (\text{ort.OD madde} \times 100 / \text{ort.OD negatif kontrol})$

Çalışmada sitotoksik etki potansiyelleri,   l m-konsantrasyon      eğrisinin elde edilmesinin ardından hesaplanan IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu)  zerinden değerlendirilmiştir.

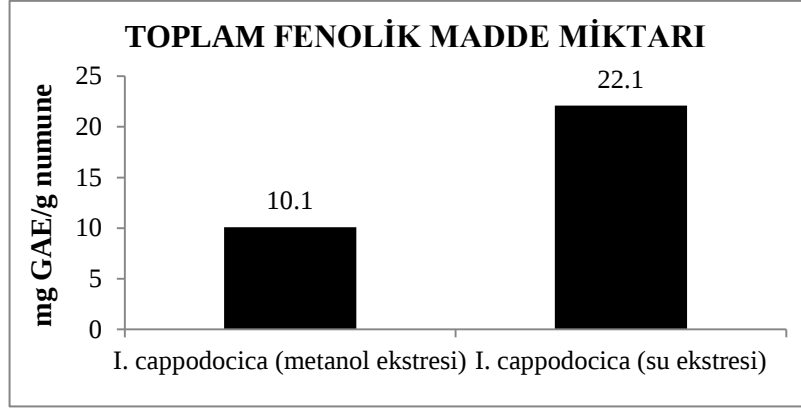
6. BULGULAR

6.1. Toplam Fenolik Madde ile İlgili Bulgular

Toplam fenolik madde ölçümü için yaygın olarak kullanılan Folin metodu Folin reaktifiyle alkali ortamda fenolik yapıya sahip bileşiklerin renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Analizler için hazırlanan metanollü ve sulu ekstraktları gerekli seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarı galik asit standardına göre tayin edildi. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart galik asit çözeltisi ile Bölüm 5.6.1.'de anlatılan metoda göre toplam fenolik madde miktarları tayin edildi. Elde edilen 765 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = 0,0009x + 0,0162$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 10). Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g bitkinin içerdiği mg cinsinden toplam fenolik madde miktarı belirlenmiştir.



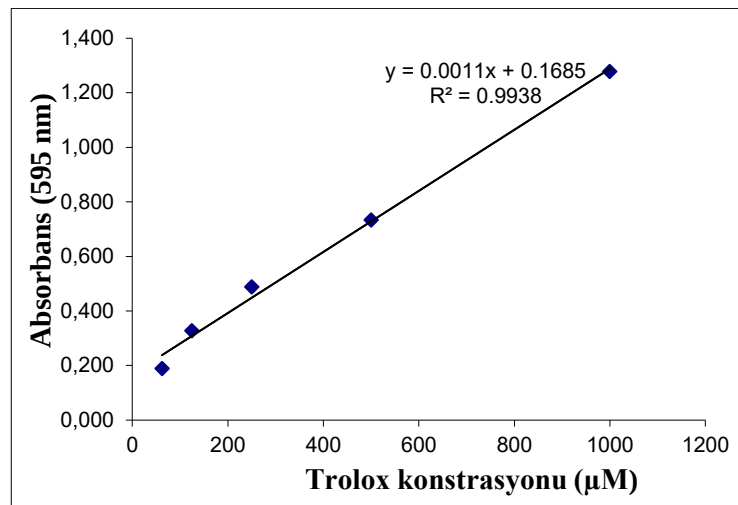
Şekil 10. Toplam Fenolik Madde Tayini İçin Gallik Asit Standardı Kullanılarak Hazırlanan Standart Çalışma Grafiği



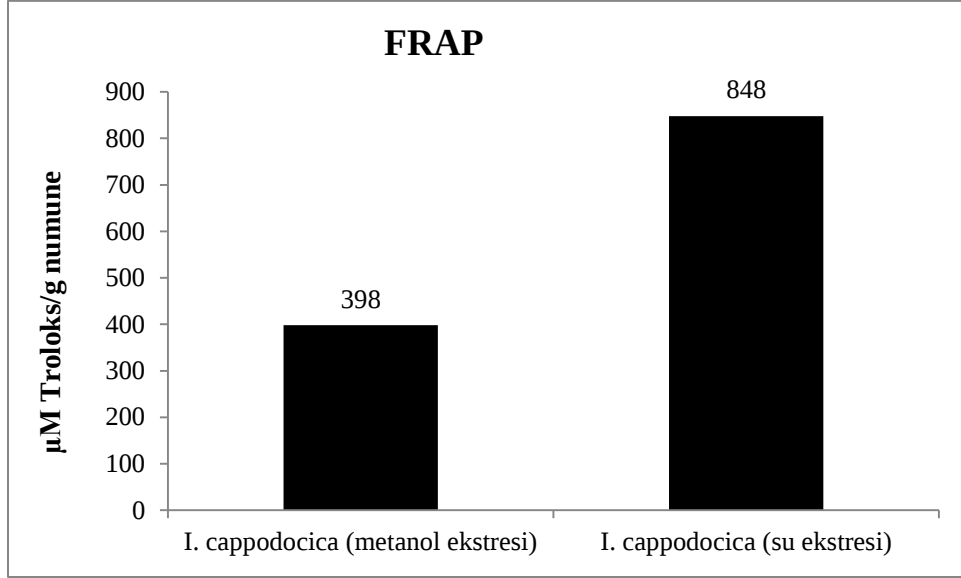
Şekil 11. *I. cappadocica* Bitkisinin Ekstrelerinin (metanol ve su) Toplam Fenolik Madde Miktarı Değerleri

6.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasite Ölçümünün (FRAP) Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarındaki antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde FRAP (Fe (III) indirgeme gücü metodu geçerli bir yöntem olarak görülmektedir. Nispeten basit bir yöntem olan FRAP yöntemi; antioksidan içeren bir örneğin eklenmesi sonucu, oksidan olarak kullanılan ferrik-tripiridiltriazin kompleksinin, renkli formdaki ferro (FeII) formuna indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu analizde standart antioksidan olarak sentetik ve ticari olarak satın alınabilen Troloks bileşiği kullanılmıştır. Kalibrasyon için Troloks değişik konsantrasyonları (31.25-1000 μ M) kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 12’de verilmektedir.



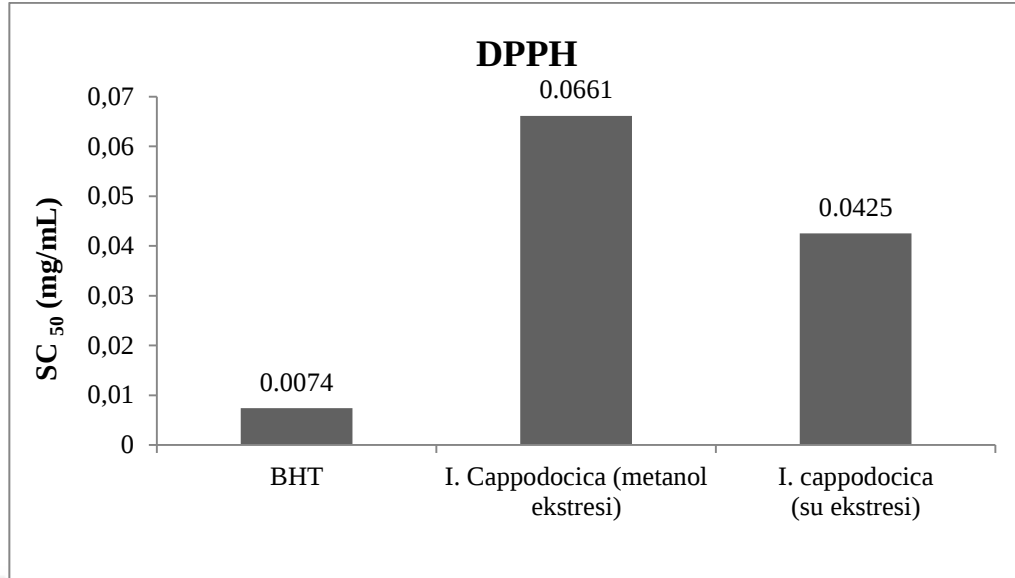
Şekil 12. FRAP Testi İçin Troloks Standardı Kullanılarak Elde Edilen Standart Çalışma Grafiği



Şekil 13. *I. cappadocica* Bitkisinin Ekstrelerinin (metanol ve su) FRAP değerleri

6.3. DPPH• Testi Sonucu

Bileşenlerin radikal süpürme aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla hızlı, kolay ve ucuz bir yöntem olan DPPH radikallerini süpürme aktivitesi incelenmiştir. Yöntemin esası 517 nm'de maksimum absorbans veren koyu menekşe rengine sahip DPPH radikalının, serbest radikal süpürücüler ya da hidrojen verici bileşikler varlığında absorbansının düşmesidir. Bölüm 5.6.3'de anlatıldığı gibi yöntem uygulanmıştır. Tablo 7'de numunelerin SC₅₀ değerleri verilmiştir. Ayrıca sütun grafiği olarak da Şekil 14'de değerler gösterilmiştir. Sonuçlara göre en yüksek radikal temizleme aktivitesine bitkinin sulu ekstresi, en düşük radikal temizleme aktivitesine ise metanollü ekstresi sahiptir.



Şekil 14. *I. cappadocica* Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerindeki DPPH SC₅₀ Değerleri

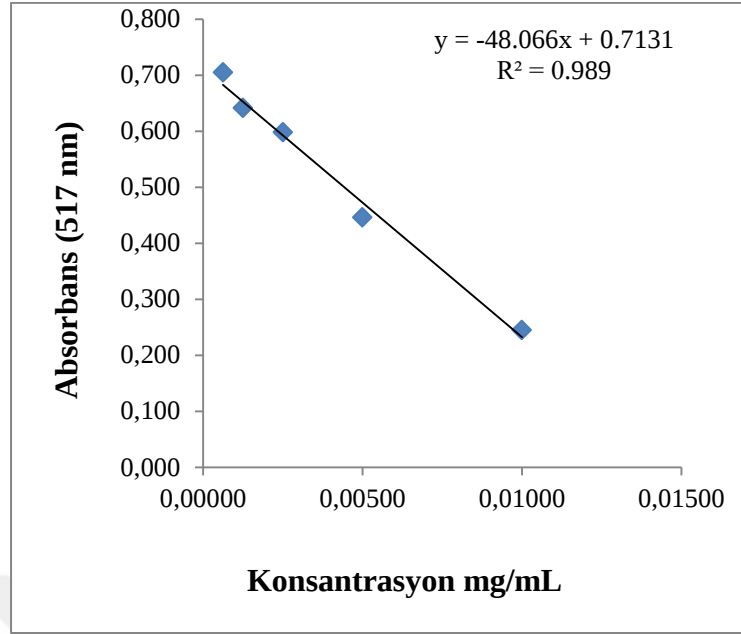
Tablo 7. *I. cappadocica* Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerinde Bulunan Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Değerleri (Ort±SP)

	Toplam Fenolik Madde Miktarı mg GAE/g numune	DPPH SC ₅₀ (mg/mL)	FRAP µM Troloks/g numune	CUPRAC µM Troloks/g numune
<i>I. cappadocica</i> (metanol)	10.1 ± 0.0056	0.0661±0.0014	398±0.057	4377±2.156
<i>I. cappadocica</i> (su)	22.1 ± 0.0144	0.0425±0.0017	848±0.053	2189± 1.141
BHT	-	0.0074 ± 0.0004	-	-

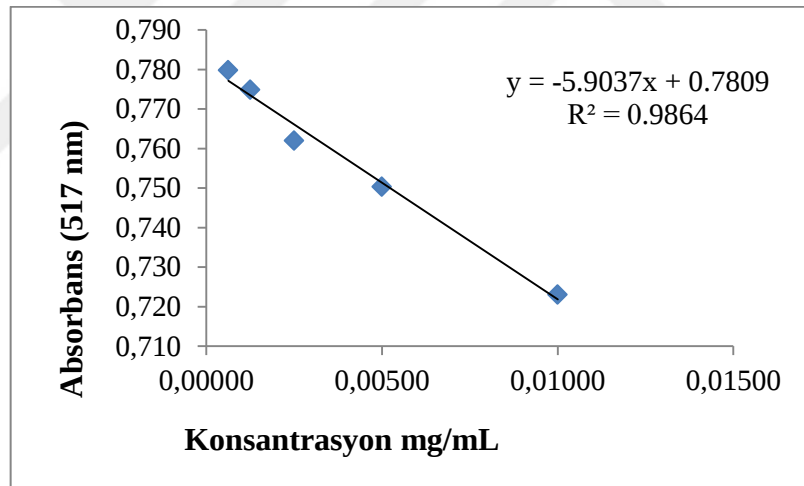
GAE: Gallik asit eşdeğeri

6.3.1. DPPH Aktivitesi İçin SC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

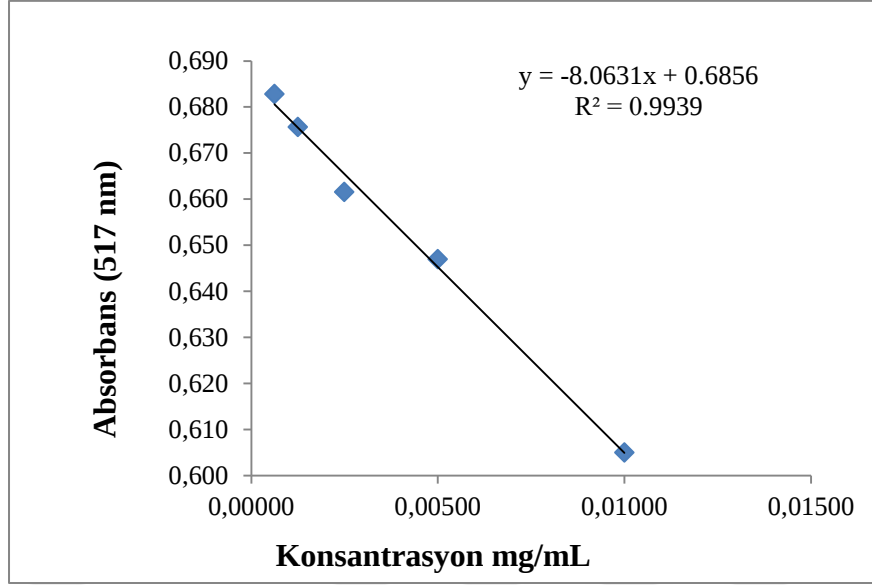
SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda en az 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapılmıştır. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonları hazırlanarak absorbans ölçümleri yapılmıştır ve bu absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. SC₅₀ değeri mg/mL cinsinden ifade edilmiştir. Grafikleri aşağıdaki şekillerde yer almaktadır.



Şekil 15. BHT Standardının DPPH- SC₅₀ Grafiği



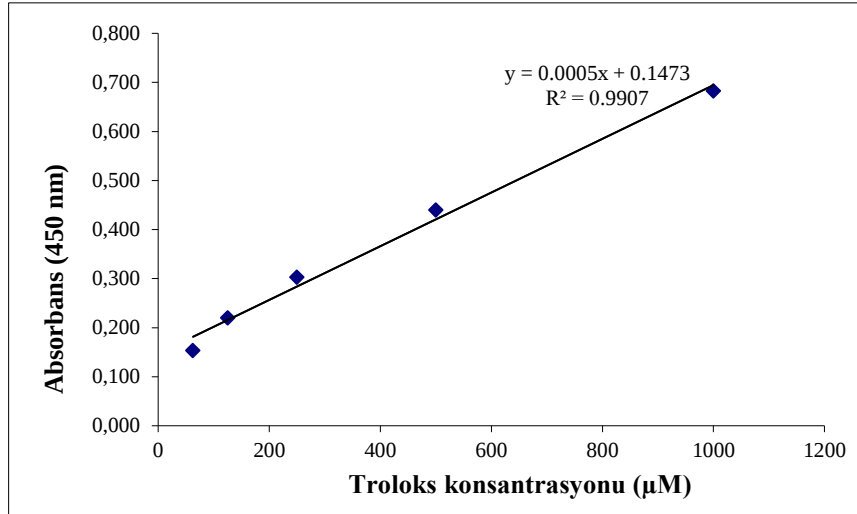
Şekil 16. *I. cappadocica* Bitkisinin Metanollü Ekstresinin DPPH- SC₅₀ Grafiği



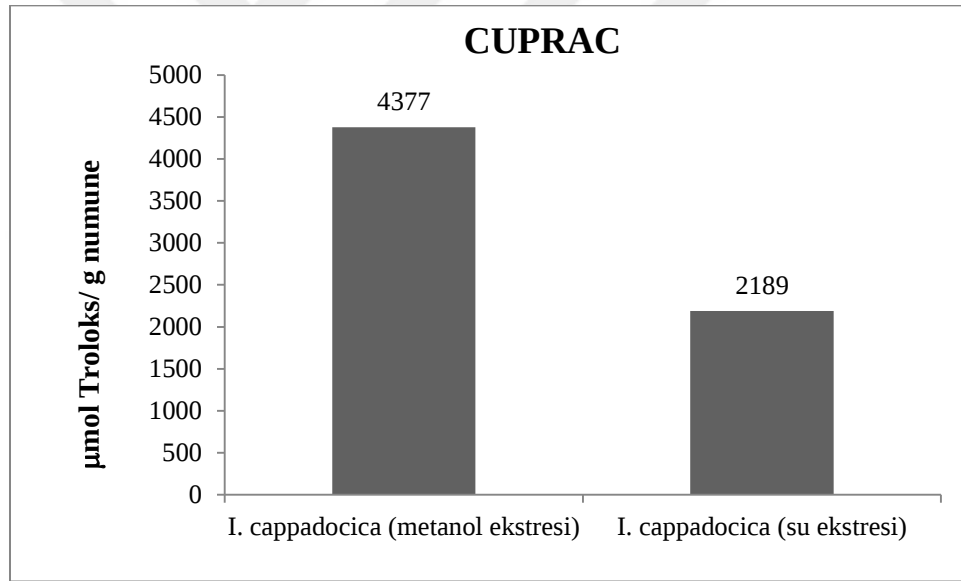
Şekil 17. *I. cappadocica* Bitkisinin Sulu Ekstresinin DPPH- SC₅₀ Grafiği

6.4. CUPRAC Testi Sonucu

CUPRAC yöntemi, gerek aktivite gerekse kapasite ölçümlerinde kullanılan teknikleri bünyesinde toplayan bir yöntemdir. Kapasite yöntemleri genelde örneğin toplam antioksidan değerini, aktivite yöntemleri ise serbest radikaller gibi reaktif oksijen türlerini süpürme etkinliğini ölçmektedir. Bu yöntemin esası 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 sarı renkli bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmasıdır. Ortaya çıkan sarı rengin şiddeti antioksidan kapasiteyi göstermektedir. Yöntem bölüm 5.6.4' de anlatıldığı gibi uygulanmıştır.



Şekil 18. CUPRAC Testi İçin Trolox Standardı Kullanılarak Elde Edilen Standart Çalışma Grafiği



Şekil 19. *I. cappadocica* Bitkisinin Ekstrelerinin (metanol ve su) CUPRAC Değerleri

6.5. Antimikrobiyal Aktivite ile ilgili Bulgular

I. cappadocica ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi Agar Well Difüzyon ve Mikrodilüsyon yöntemiyle test edilmiştir. Yöntem Bölüm 5.7’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. *I. cappadocica* bitkisinin sulu ekstresi test edilen maya ve bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Metanol ekstresinin ise gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa* ; gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *E. faecalis*,

L. monocytogenes, *B. cereus*; gram almayan bakteriden *M. smegmatis* standartlarla karşılaştırıldığında orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ancak her iki ekstrede test edilen maya mantarları için hiçbir aktivite gözlenmemiştir.

Tablo 8. *I. cappadocica* Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerinin Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ile Oluşturduğu Zon Çapları

	Miktar (µg/mL)	Mikroorganizmalar ve İnhibisyon Çapları (mm)									
		Gram negatif			Gram pozitif				Gram almayan	Maya mantarları	
		<i>Ec</i>	<i>Yp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Lm</i>	<i>Bc</i>	<i>Ms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
<i>I.cappadocica</i> (su)	10 000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>I.cappadocica</i> (metanol)	10 000	8	-	6	6	8	6	8	15	-	-
Ampisilin	10	10	10	18	35	10	10	15			
Streptomisin	10								35		
Flukonazol	5									25	25

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

Tablo 9. *I. cappadocica* Bitkisinin Sulu ve Metanollü Ekstrelerinin Mikro Dilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Değerlerinin Hesaplanması

Test Edilen Bileşikler	Mikroorganizmalar ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (µg/mL)									
	Gram negatif			Gram pozitif				Gram almayan	Maya mantarları	
	<i>Ec</i>	<i>Yp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Lm</i>	<i>Bc</i>	<i>Ms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
<i>I.cappadocica</i> (su)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>I.cappadocica</i> (metanol)	350	-	700	700	350	700	350	62.25	-	-
Ampisilin	10	18	>128	35	10	10	15			
Streptomisin								4		
Flukonazol									<8	<8

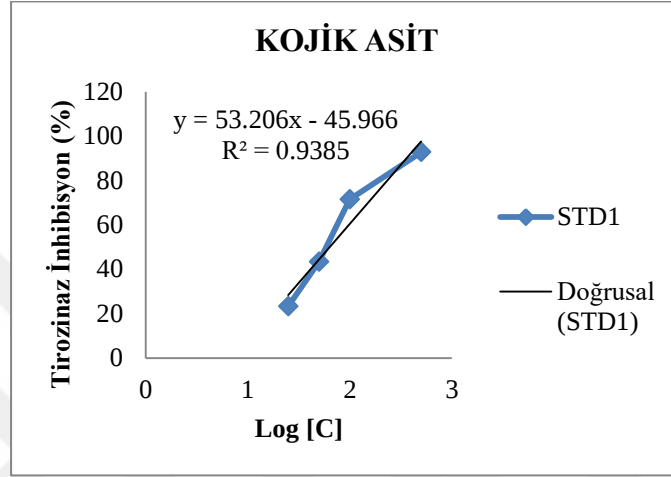
Bc: *Bacillus cereus*, *Ca*: *Candida albicans*, *Ec*: *Escherichia coli*, *Ef*: *Enterococcus faecalis*, *Lm*: *Listeria monocytogenes*, *Ms*: *Mycobacterium smegmatis*, *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Sa*: *Staphylococcus aureus*, *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, *Yp*: *Yersinia pseudotuberculosis*.

6.6. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu ile İlgili Bulgular

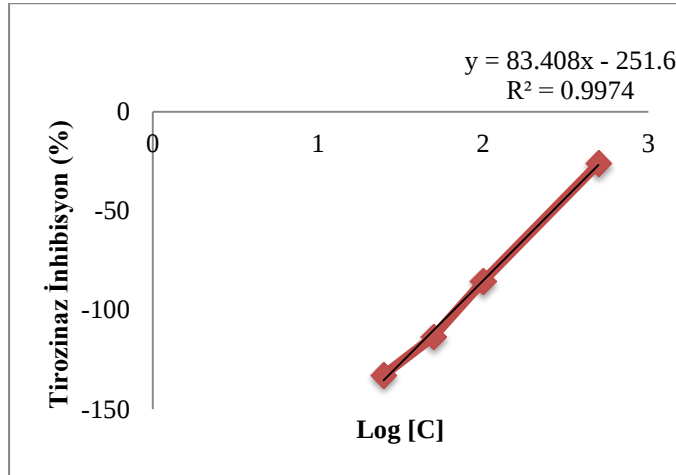
I. cappadocica bitkisinin su ve metanol ekstrelerinin tirozinaz inhibisyonları Masuda ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre incelenmiştir (91). Sonuçlar Tablo 10, Şekil 20-22' de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Tablo 10. *I. cappadocica* Ekstrelerinin ve Standardın IC₅₀ değerleri

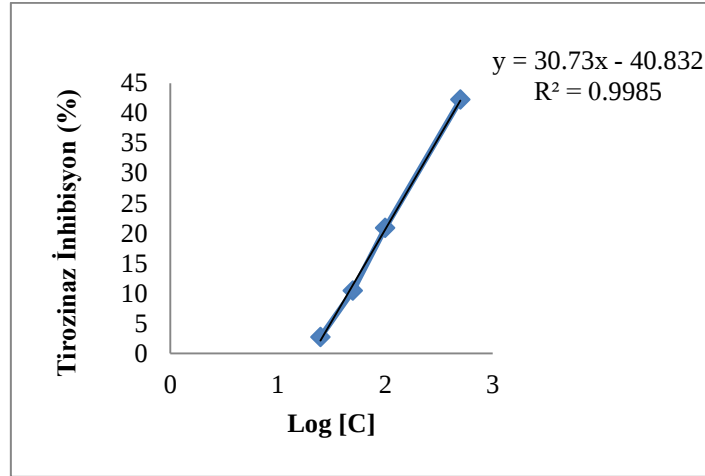
	IC ₅₀ (µg/mL)
Kojik Asit	63.0957
<i>I. cappadocica</i> (su)	>1000
<i>I. cappadocica</i> (metanol)	891.2509



Şekil 20. Kojik Asit Standartının % Tirosinaz İnhibisyonu



Şekil 21. *I. cappadocica* Bitkisinin Sulu Ekstresinin % Tirosinaz İnhibisyonu



Şekil 22. *I. cappadocica* Bitkisinin Metanollü Ekstresinin % Tirozinaz İnhibisyonu

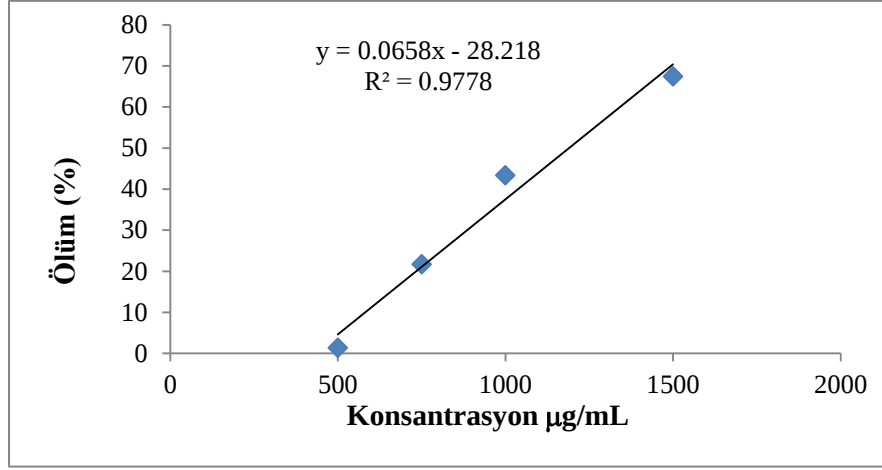
6.7. Sitotoksik Aktivite ile İlgili Bulgular

Çalışma kapsamında *I. cappadocica* bitkisinin sulu ve metanollü ekstraktlarının hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacı ile PC-3 ve 3T3 hücre hattında bölüm 5.9.2’de anlatıldığı gibi MTT yöntemiyle test edilmiştir. Sulu ekstraktlar test edilen konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da sitotoksikiteye neden olmamıştır. Metanollü ekstraktlar ise yüksek konsantrasyonlarda doza bağlı sitotoksikiteye neden olmuştur.

Sonuçlar aşağıdaki Tablo 11, 12 ve Şekil 23, 24’de ayrıntılı şekilde ifade edilmiştir. 3T3 hücrelerde IC₅₀ değeri 1075.99 µg/mL, PC-3 hücrelerde ise IC₅₀ değeri 1188.73 µg/mL olarak bulunmuştur.

Tablo 11. *I. cappadocica* Bitkisinin Metanollü Ekstresinin PC-3 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyonu

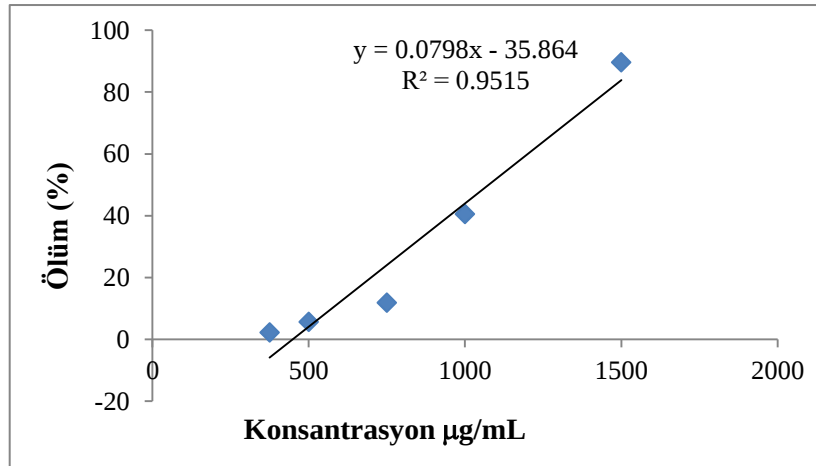
PC-3 Hücresi	
Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon
1500	67.38931
1000	43.29771
750	21.67939
500	1.343511



Şekil 23. *I. cappadoci ca* Bitkisinin Metanollü Ekstresinin PC-3 Hücrelerde IC₅₀ Grafiği

Tablo 12. *I. cappadocica* Bitkisinin Metanollü Ekstresinin 3T3 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyonu

3T3 hücresi	
Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon
1500	89.61732
1000	40.58256
750	11.91923
500	5.629021
375	2.233738



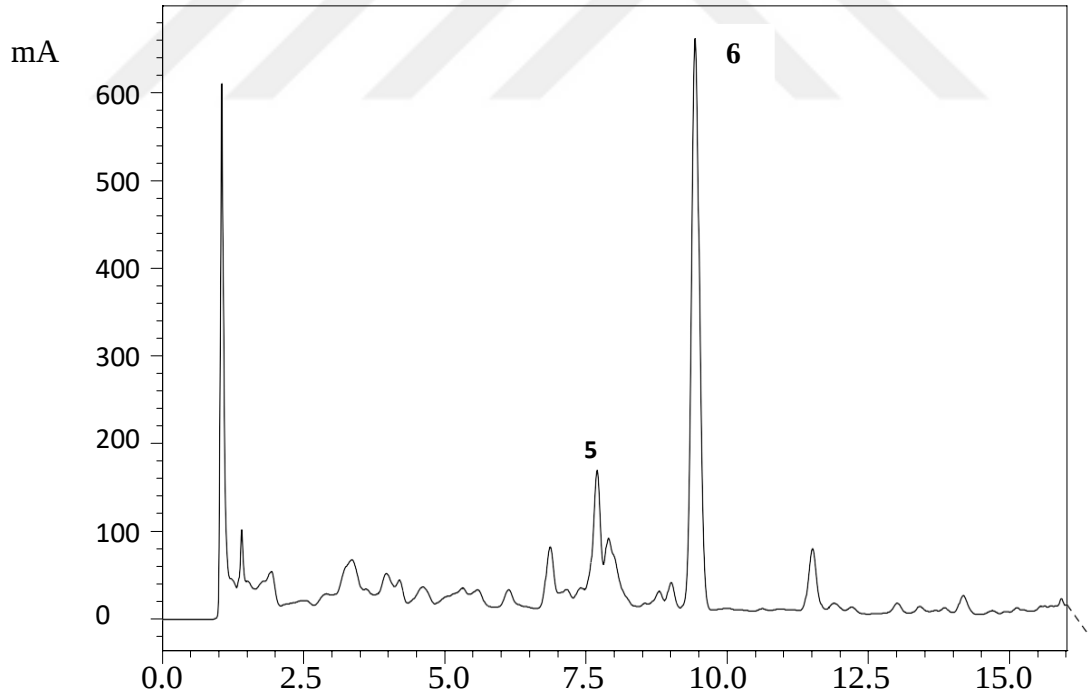
Şekil 24. *I. cappadocica* Bitkisinin Metanollü Ekstresinin 3T3 Hücrelerde IC₅₀ Grafiği

6.8. RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Sonuçları ve Kromatogramları

I. cappadocica bitkisinin analizi 7 ayrı saf fenolik madde standardı kullanılarak gerçekleştirildi ve bitkinin metanollü ekstresinde en çok sinapik asit ve benzoik asit tespit edildi. *p*-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, syringaldehit, kumarik asit, kersetin ise tespit edilememiştir. Fenolik bileşen sonuçları Tablo 13' deki gibidir.

Tablo 13. RP-HPLC-UV ile Numunelerin Fenolik Bileşen Sonuçları

Standart (mg fenolik/g numune)	Alıkönma süresi	Konsantrasyon (mg fenolik/g numune)
1. <i>p</i> -hidroksi benzoik Asit	4.197	-
2. Vanilik Asit	5.318	-
3. Şiringaldehit	6.132	-
4. Kumarik Asit	7.407	-
5. Sinapik Asit	7.894	12.23
6. Benzoik Asit	9.432	48.08
7. Kersetin	14.688	-



Şekil 25. *I. cappadocica* Bitkisinin Metanollü Ekstresinin Kromatogramı (5): Sinapik asit, (6): Benzoik asit.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemiz bulunduğu coğrafik konumu dolayısıyla zengin iklim çeşitliliğine ve bunun sonucu olarak zengin bitki örtüsüne sahiptir. Bitkiler çeşitli amaçlarla Anadolu halkı tarafından kullanılmıştır. Özellikle bir bölümü geleneksel yöntemlerle tedavi amaçlı halen daha kullanılmaktadır. Doğal ilaç kaynağı olan ve henüz yapısı aydınlatılmamış birçok bitki türü de ülkemizde mevcuttur. Bu bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla içeriğinin aydınlatılıp insanlığa kazandırılması için bilim insanları çalışmalarını sürdürmektedirler. Yapılan çalışmalarda ülkemizin sahip olduğu bitki floryasının zengin polifenol ve flavonoid içerdiği tipik fenolik profile sahip olduğu görülmektedir. Bu bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve antikanser gibi birçok aktiviteden sorumlu olan ana faktörler olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada *I. cappadocica* bitkisinin sulu ve metanollü ekstreleri hazırlanarak *in vitro* olarak antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör, sitotoksik aktivite testleri ile biyolojik aktivitesi incelenmiş, ayrıca RP-HPLC yöntemi kullanılarak fenolik profili belirlenmiştir.

I. cappadocica bitkisinin toplam antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde üç farklı yöntem kullanılmıştır. Bitkinin metanollü ve sulu ekstreleri hazırlanarak spektrofotometrik *in vitro* antioksidan analizleri için FRAP, DPPH radikal temizleme aktivitesi ve CUPRAC testleri uygulandı. Ekstrelerdeki toplam fenolik madde içeriği spektrofotometrik olarak çalışılmıştır.

Toplam fenolik madde miktarı tayini için yaygın olarak kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem Folin reaktifiyle alkali ortamda fenolik yapıya sahip bileşiklerin renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Toplam fenolik madde miktarı Folin yöntemi kullanılarak Gallik asit eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir. Çalışmamızda toplam fenolik madde miktarı bitkinin metanollü ekstresinde 10.1 mg GAE/ g numune, sulu ekstresinde ise 22.1 mg GAE/ g numune olarak tespit edilmiştir. *I. cappadocica* bitki ekstrelerinde toplam fenolik madde, FRAP, DPPH radikal temizleme aktivitesi, CUPRAC, antimikrobiyal aktivite ve HPLC ile fenolik profilinin belirlenmesine ait literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple tartışmamızda farklı *Isatis* türleriyle yapılan çalışmalara yer verilmiştir. Kürem'in 2014 yılında yaptığı yüksek lisans tezi çalışmasında Kahramanmaraşta ekilen bazı *Isatis*

türlerinin yaprak kısmından elde edilen toplam fenolik madde miktarını 2010 yılında ekilen ikinci yılında biçilen *I. indigotica*'da 195.07 mg GAE/g, 2011 yılında ekilen ve birinci yıl biçimi yapılan *I. tinctoria* 'da 269.88 mg GAE/g olarak bulmuşlardır (16). Bu miktarlar Erzincan yöresinden 2016 yılında Haziran ayında toplanan *I. cappadocica* bitkisinin metanollü ve sulu ekstrelerinden elde ettiğimiz toplam fenolik madde miktarından çok daha yüksek konsantrasyondadır. Karakoca ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *I. floribunda* bitkisinin çiçek ve köklerinin metanol ve su ektrelerinde toplam fenolik madde içeriğini sırasıyla 37.09±0.96 mg GAE/g ekstre, 93.91±0.34 mg GAE/g ekstre bulmuşlardır (98). Wang'ın 2012 yılında yaptığı bir çalışmada ise *I. indigotica* bitkisinde toplam fenolik madde içeriğini metanol ve su ekstresinde sırasıyla 2.34 mg GAE/g ekstre, 5.94 mg GAE/g ekstre bulmuştur (99). Miceli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *I. tinctoria* bitkisinin etil asetat ekstresinde toplam fenolik madde içeriğini 191.05±2.94 mg GAE/g ekstre bulmuşlardır (101). Sonuçlarda gözlenen bu farklılıklar bitkinin yetiştirildiği bölge, hasat zamanı bitkinin içerdiği bileşenler açısından oldukça önemli olduğu düşünülebilir. Ayrıca farklı ekstrelerde çalışılması da farklı sonuçların bulunmasına yol açabilir.

Yaptığımız çalışmada *I. cappadocica* bitkisinin sulu ve metanollü ekstrelerindeki toplam antioksidan kapasitesini Fe^{+3} iyonlarının indirgenmesi esasına dayanan FRAP yöntemine göre Troloks eşdeğeri cinsinden (Troloks eşdeğeri antioksidan güç) hesaplanmıştır. Bu teste göre bitkinin sulu ekstresinde 848 µmol Troloks/g numune, metanollü ekstresinde ise 398 µmol Troloks/g numune bulunmuştur. Karakoca ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *I. floribunda* bitkisinin çiçek kısmının su ekstresinde metanol ekstresine göre daha yüksek FRAP değeri bulmuşlardır. Ancak kök kısmının metanol ekstresinde su ekstresine göre daha yüksek FRAP değeri bulunmuştur. 31.25 µg/mL konsantrasyonda BHT değeri ile karşılaştırıldığında ekstrelerden daha yüksek indirgeyici güç göstermiştir (98).

Antioksidan kapasiteyi belirlemede kullanılan bir diğer yöntem olan Cu(II)-Nc kompleksinin antioksidan maddeler varlığında Cu(I)-Nc'e indirgenerek 450 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanan CUPRAC yöntemiyle de *I. cappadocica*'nın sulu ve metanollü ekstrelerindeki toplam antioksidan kapasite Troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. Sulu ekstresinde 2189 µM Trolox /g numune, metanollü ekstresinde ise 4377 µM Trolox /g numune olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar

bize CUPRAC yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasitesinin *I. cappadocica* bitkisinin metanollü ekstresinin sulu ekstreye göre daha fazla olduğudur. Karakoca ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *I. floribunda* bitkisinin çiçek kısmının su ekstresinde metanol ekstresine göre daha yüksek CUPRAC değeri tespit etmişlerdir. Bitkinin kök kısmının metanol ekstresinde su ekstresine göre daha yüksek CUPRAC değeri bulmuşlardır. 31.25 µg/mL konsantrasyonda BHT'nin ekstrelerden daha yüksek CUPRAC değerini gösterdiğini belirtmişlerdir (98).

Bileşenlerin radikal süpürme aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla hızlı, kolay ve ucuz bir yöntem olan DPPH radikallerini süpürme aktivitesi incelendi. Yöntemin esası 517 nm de maksimum absorbans veren koyu menekşe rengine sahip DPPH radikalının, serbest radikal süpürücüler ya da hidrojen verici bileşikler varlığında absorbansının düşmesidir (90). DPPH radikalının oluşumunun % 50'sini engelleyen madde miktarı SC₅₀ olarak tanımlanır ve SC₅₀ değerinin düşük oluşu radikal temizleme aktivitesinin yüksek olduğunu gösterir. Çalışmada *I. cappadocica* bitkisinin sulu ekstresi metanollü ekstresine göre düşük radikal temizleme aktivitesine (SC₅₀: 0.0425 mg/mL), metanollü ekstresi ise yüksek radikal temizleme aktivitesine (SC₅₀: 0.0661 mg/mL) sahip olduğu gözlenmiştir. Karakoca ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *I. floribunda* bitkisinin çiçek kısmının su ekstresinde DPPH radikal temizleme aktivitesini 89.58 % (SC₅₀ >100) (2000 µg/mL konsantrasyonda) bulmuşlardır. Bitkinin kök kısmının metanol ekstresinde ise %87.49 (SC₅₀: 747.45 µg/mL) olduğunu tespit etmişlerdir. BHT'nin 200 µg/mL konsantrasyonda radikal yakalama kapasitesini 91.19 % olarak bulmuşlardır (98). Wang'ın yaptığı çalışmada *I. Indigotica* bitkisinin 2 mg/mL su ekstresinde DPPH aktivitesini %34.85 olarak bulmuşlardır (99). Miceli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *I. tinctoria* bitkisinin DPPH aktivitesini (SC₅₀: 0.6657±0.0024 mg/mL), BHT (SC₅₀: 0.0677±0.0002 mg/mL) ile karşılaştırdıklarında SC₅₀ değerlerini daha yüksek bulmuşlardır (101).

Çalışmada *I. cappadocica* bitkisinin sulu ve metanollü ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi Agar Well Difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. *I. cappadocica* bitkisinin sulu ekstresi test edilen bakteri ve mayalara karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Metanol ekstresini ise gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa*; gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monositogenes*, *B. cereus*; gram almayan bakteriden *M. smegmatis* standartlarla

karşılaştırıldığında orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ancak her iki ekstre de maya mantarları için hiçbir aktivite gözlenmemiştir. *I. cappadocica* bitkisinin metanolü ekstrelerinin minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri ise gram negatif bakterilerden *E. coli* için 350 µg/mL ve *P. aeruginosa* için 700 µg/mL; gram pozitif bakterilerden *S. aureus* için 700 µg/mL, *E. faecalis* için 350 µg/mL, *L. monocytogenes* için 700 µg/mL, *B. cereus* için µg/mL; gram almayan bakteriden *M. smegmatis* için ise 62.25 µg/mL olarak bulunmuştur. Karakoca ve arkadaşları *I. floribunda* bitkisinin çiçek ve kök kısımlarının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon metoduyla çalışmışlardır. Bitkinin çiçek kısımlarının metanol ekstresi *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* bakterilerine karşı Ampisilin ile karşılaştırıldığında antimikrobiyal aktivite gösterdiği ancak sulu ekstresinin hiç bir aktivite göstermediği gözlenmiştir. Bitkinin kök kısmının metanol ekstresinde ise sadece *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (98). Yaptığımız çalışma ile karşılaştırdığımızda aynı cinsin farklı türlerinin metanollü ekstrelerinin antimikrobiyal aktivite gösterdiği ancak *I. floribunda* bitkisinin kök ve çiçek kısmında farklı sonuçlar gözlenmiştir. Buradan bitkilerin çiçek ve kök içeriklerinin farklı olduğu sonucuna varabiliriz.

Bitkinin tek tek fenolik madde içeriğinin belirlenmesi amacıyla ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde saf fenolik madde standartları kullanılarak polarlıklarına göre bileşiklerin ayrılmaları ve tanımlanmaları mümkün olmaktadır. *I. cappadocica* bitkisinin metanollü ekstresindeki fenolik bileşenleri belirlemek amacıyla 7 ayrı saf fenolik madde standardı kullanılarak HPLC- DAD ile ayırma ve tanımlamalar yapılmıştır. Ters faz (RP)- HPLC ile C18 kolon kullanılarak ve dedeksiyon fotodiyot (DAD) dedektör kullanılarak değişik UV bölgelerinde fenolik bileşenler belirlenmiştir. Bu amaçla; p-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, syringaldehit, kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit, kersetin standartları kullanılarak tayinler yapılmıştır. Bunun için önce her bir standart için ışığı absorbladıkları maksimum dalga boyları ve alıkonma zamanları hesaplanarak tüm karışım halinde HPLC’de standart kromatogram elde edilmiştir. *I. cappadocica* bitkisinin metanollü ekstratında 12.23 mg/ g numune sinapik asit, 48.08 mg/ g numune benzoik asit tespit edilmiştir. p-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, syringaldehit, kumarik asit, kersetin ise tespit edilememiştir. Karakoca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *I.*

floribunda bitkisinin kök kısmının metanollü ekstresinde kateşin (93.80 µg/g), *p*-hidroksi benzoik asit (106.90 µg/g), klorojenik asit (1980.20 µg/g), kafeik asit (112.20 µg/g), *p*-kumarik asit (136.30 µg/g), ferulik asit (89.90 µg/g), sinnamik asit (47.50 µg/g), kersetin (150.60µg/g) bulunmuştur (98). Emam ve El-Moaty'nın 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada *I. microcarpa* bitki ekstresinde ferulik asit, gallik asit, kafeik asit tespit etmişlerdir (100). Miceli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *I. tinctoria* bitkisinin yapraklarının etil asetat ekstresi HPLC-PDA/ESI-MS ile incelendiğinde neoklorojenik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kumaril kuinik asit, sinapik asit, ferulik asit, luteolin glukuronid, rutin, *p*-kumarik asit, vicienin-2, stellarin-2, izoviteksin, kersetin, izoskoparin, kamferol, apigenin glukozid bileşikleri içerdiğini bulmuşlardır (101).

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu önemli bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir. Birçok ilaç ve toksik bileşik etkisini enzim inhibitörü gibi davranarak göstermektedir (94). Günümüzde enzim ve enzim inhibitörlerinden çok çeşitli alanlarda faydalanılmaktadır. Bunların başında tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, tekstil, kağıt, deterjan ve kozmetik alanları gelmektedir.

Tirozinaz enzimi bir çok alanda kullanılabilen bir enzimdir. Özellikle gıda, sağlık, kozmetik bunların başında gelmektedir. Melanin hiperpigmentasyonu ile ilgili bazı hastalıkların tedavisinde tirozinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Ayrıca bu inhibitörlerin deri beyazlatılması etkisinden kozmetik endüstrisinde ve eczacılıkta da önemli düzeyde yararlanılmaktadır (95). Bu alanlarda kullanılan kimyasalların toksik olması nedeniyle alternatif olarak bitki ekstrelerinin kullanımı araştırma konusudur. Bu kapsamda çalışmamızda tirozinaz inhibisyonunun araştırması yer almaktadır.

Yaptığımız çalışmada *I. cappadocica* bitkisinin dört farklı konsantrasyonda su ve metanol ekstreleri hazırlanmış ve tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Sadece metanol ekstresinin tirozinaz enzimini inhibe ettiği ve artan konsantrasyonlarda bu etkiyi artırdığı saptanmıştır. Fakat standart olarak kullanılan kojik aside göre IC₅₀ değerinin daha yüksek olduğu bunun netice kojik aside göre çok daha düşük oranda inhibe ettiği belirlenmiştir. Hashemi ve Zarei'nin 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada İrandan topladıkları 10 bitkinin hekzan ekstresinde standart olarak kojik asit kullanarak tirozinaz inhibitör aktivitesine bakmışlar ve bu bitkilerden

biri olan *I. cappadocica*'nın tirozinaz inhibitör aktivitesinin %50 den fazla ve IC₅₀ değerinin 1.04 µg/mL olduğunu bulmuşlardır (102).

Yaptığımız çalışmada *I. cappadocica* bitkisinin su ve metanol ekstralarının sitotoksik aktivitesi MTT yöntemiyle PC-3 ve 3T3 hücre hatlarında test edilmiştir. Sulu ekstralar test edilen konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da sitotoksik etki göstermemiştir. Metanollü ekstralar ise yüksek konsantrasyonlarda doza bağlı sitotoksik etkiye neden olmuştur. Hücre ölümü %50 inhibisyon değeri olan IC₅₀ değeriyle ifade edilmektedir. Metanol ekstralarının 3T3 hücrelerde IC₅₀ değeri 1075.99 µg/mL, PC-3 hücrelerde ise IC₅₀ değeri 1188.73 µg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlar yüksek dozda ve metanollü ekstralarında *I. cappadocica* bitkisinin her iki hücre üzerinde *in vitro* sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir. Bu yüzden antioksidan olarak kullanımı güvenlidir. IC₅₀ değerleri arasında 3T3 ve PC-3 hücrelerde anlamlı farklılık bulunmaması ve tedavi amacıyla kullanılması için aşırı dozlarda alınması gerektiği bunun da kanserli olmayan hücrelere de toksik etki göstereceği anlaşılmıştır. Bu yüzden antikanser diyebilmemiz için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Karakoca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *I. floribunda* bitkisinin göğüs hücresi (MCF12A) 'nde sitotoksik aktivitesine bakılmıştır. Bitkinin metanollü ekstresi 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında MCF12A hücresine sırasıyla %5.88, 6.27 ve 13.25 sitotoksik etki gösterdikleri gözlenmiştir (98). Miceli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada antiproliferatif etkiyi MTT testi ile değerlendirmişler ve *I. tinctoria* bitkisinin yaprak kısmının anaplastik insan tiroid karsinoma (CAL-62) hücre hattında büyümeyi %80 azalttığını gözlemlemişlerdir (101). Rehab'ın 2016'da yaptığı bir çalışmada *I. microcarpa* bitkisinin diklorometan, etil asetat, metanol ekstralarının *in vitro* sitotoksik aktivitesini hepatik (HEPG2) ve göğüs karsinoma (T47D) hücre hattında incelemiş ve en aktif ekstrenin diklorometan olduğunu bulmuştur. Diklorometan ekstresi en düşük IC₅₀ değeri göstermiştir. T47D hücre hattı için IC₅₀: 20.8 µg/mL, HEPG2 hücre hattı için IC₅₀: 34.3 µg/mL olarak bulunmuştur (103).

Sonuç olarak şimdiye kadar çalışılmamış bir tür olan *I. cappadocica* bitkisinin antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik ve tirozinaz inhibitör aktivitesinin yüksek olduğu yapılan bu çalışma ile ortaya konmuştur. Sahip olduğu güçlü antioksidan özellikten dolayı, içecek olarak ya da yiyeceklerle kullanımı ile antioksidan savunma sistemimizin serbest radikallerle mücadelesine katkı sağlayacağı açıktır. Günümüzde geleceğe

yönelik sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidan arayışları gittikçe artmaktadır. Bu tip çalışmalarla yüksek antioksidan aktiviteye sahip ekstraler belirlenerek bunların gıda sanayisinde antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması düşünülebilir. Bitkimiz antibakteriyel aktiviteye sahip olması nedeniyle enfeksiyonların ve tirozinaz enzimini inhibe etmesinden dolayı hiperpigmentasyon tedavisinde yardımcı olarak kullanılabilir. Ancak bu sonuçların daha ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. *I. cappadocica*'nın metanol ekstresi yüksek konsantrasyonda doza bağlı olarak PC-3 ve 3T3 hücre hatlarında sitotoksositeye neden oldu. Bu pozitif sonuçlara rağmen bitkimizin tedavilerde güvenli kullanılabilmesi için iyi planlanmış klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği inancındayız.

8. ÖNERİLER

1. Çalışmamızda *I. cappadocica* bitkisinin sulu ve metanollü ekstreleriyle çalışılmıştır farklı çözücüler kullanılarak da bu çalışma zenginleştirilebilir.
2. Çalışmamızda 3 farklı antioksidan test kullanılmıştır, literatürde sık kullanılan diğer antioksidan yöntemler de çalışılsaydı daha kapsamlı bir çalışma olurdu.
3. Çalışmanın devamı niteliğinde biyolojik aktif bileşiklerin belirlenmesi amacıyla izolasyon çalışmaları ve ardından belirlenen aktif bileşiklerin etkinliği deney hayvanları üzerinde *in vivo* olarak araştırılabilir.
4. Çalışmamızda iki farklı hücre hattı kullanılmıştır, ikiden fazla hücre hattı kullanılarak sitotoksik aktivite çalışmasının kapsamı artırılabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Lau CBS, Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chow MSS(2004). Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sci* 75: 797-808.
2. Pan L, Chai H, Kinghorn AD (2010). The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett* 3: 1-8.
3. Gürhan G, Ezer N. (2004). Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler-I. *Hacettepe Univ Ecz Fak Derg* 24: 37-55.
4. Cotton CM (1999). *Etnobotany. Principles and Applications*. John Wiley and Sons, England
5. Bacanlı M, Taner G, Başaran AA, Başaran N (2012). Bitkisel kaynaklı fenolik yapıdaki bileşikler ve sağlığa yararlı etkileri. *Pharm Sci* 1: 83-94.
6. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81: 230-242.
7. Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA (2006). Systematics and phylogeny of thebrassicaceae(cruciferae): an overview. *Pl Syst Evol* 259: 89-120.
8. Al-Shehbaz IA, Mutlu B, Dönmez AA (2007). The brassicaceae (cruciferae) of Turkey, updated. *Turk J Bot* 31: 327-336.
9. Bilgiliyem (2015). *Bitkiler kategorisi*. [online] Availablefrom: <http://www.bitkisininfaydalari.com/bitkiler/civit-otu-nedir-civitotu-bitkisinin-faydalari>. [Accessed 20 October 2015].
10. Moazzeni H, Zarre S, Al-Shehbaz IA, Mummenhoff K (2007). Seed-coat microsculpturing and its systematic application in *Isatis* (Brassicaceae) and allied genera in Iran. *Flora* 202: 447-454.
11. Türkiye Bitkileri Veri Servisi (2015). Hizli arama sonuçları [online] Available from:http://www.tubives.com/index.php?sayfa=hizli_ara [Accessed 16 March 2017].

12. Yıldırım S (1988). Revision of *Isatis* L.(Curciferaceae) genus from west and north part of Turkey. Turk J Bot 12: 332-400.
13. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (2014) Anadoludaki *Isatis* Türleri [online] Available from: <http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxonForm1.jsp?taxon=13340>. [Accessed 22 August 2014]
14. Türkiye Bitkileri Veri Servisi (2017). *Taxon Page* [online] Available from: http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=531 [Accessed 17 July 2017]
15. Davis PH (1972) Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. (10). Edinburgh University Press, Edinburgh
16. Arife K (2014). Kahramanmaraş ili ve yakın çevre florasında yayılış gösteren *Isatis l.* (çivit otu) taksonlarından toplam fenol ve flavonoid miktarının tespiti. Yüksek lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş
17. Koçyiğit M (2005). Yalova ilinde etnobotanik bir araştırma. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
18. Sökmen A, Gürel E(2001). Sekonder metabolit üretimi.bitki biyoteknolojisi 1: bitki doku kültürleri (Ed: Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S). Konya,211-267.
19. Phillipson JD (1990). Plants as source of valuable products from plant tissue culture. Proceedings of the phytochemical society of europe. Clarendon press, Oxford,1-21.
20. Collin F, Edwards S (1998). Plant cell culture-introduction to biotechniques. Scientific publishers limited, Oxford,103-120.
21. Baytop T (1999). Therapy with medicinal plants in turkey. University of Istanbul, Istanbul, 273.
22. Başer KHC (2001). Her derde deva bir bitki kekik. Bilim ve Teknik Dergisi 402: 74-77.
23. Kandemir A, Beyazoğlu O (2002). Köse Dağları'nın (Gümüşhane) Tıbbi ve Ekonomik Bitkileri. S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 6: 148-157.

24. Ertug F (2004). Wild edible plants of the Bodrum Area (Mugla, Turkey). Turk J Bot 28: 161-174.
25. Simsek I, Aytekin F, Yeşilada E, Yıldırım S (2004). An ethnobotanical survey of the beypazarı, ayas and gudul district towns of ankara province (Turkey). Econ Bot 58: 705–720.
26. 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.
27. Halliwell B, Gutteridge JM (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Mol Aspects Med 8: 89-193.
28. Delibas N, Özçankaya R (1995). Serbest radikaller. SDÜ Tıp Fak. Derg 2: 11-17.
29. Kolaylı S, Kucuk M, Duran C, Candan F, Dinçer B (2003). Chemical and antioksidant properties of *laurocerasus officinalis* roem. J Agric Food Chem 51: 7489-94.
30. Sies H (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med 30: 31-37.
31. Dündar Y, Aslan R (2000). Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Birinci baskı, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
32. Winston GW (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. Comp Bio Chem Physiol 100: 173-176.
33. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Bio chem 32: 595-603.
34. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CM (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?. J Lab Clin Med 119: 598-620.
35. Fridovich I (1975). Super oxide dismutases. Annu Rev Bio chem 44: 147-159.
36. Fridovich I (1997). Super oxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), super oxide dismutases and related matters. J Bio Chem 272: 18515-7.

37. Kahk nen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 47: 3954-3962.
38. Cao G, Prior RL (1999). In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radic Biol Med 27: 1173-1181.
39. Kaur C, Kapoor HC (2001). Antioxidants in fruits and vegetables–the millennium’s health. Int J Food Sci Technol 36: 703–725.
40. Erte E (2007). Siyah  z mde (*Vitis vinifera L.*) bulunan resveratrol’ n üretim veriminin artırılmasına ses ötesi dalgaların etkisi. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
41. Akkuş   (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Konya; 4-65
42. Seven A, Candan G. (1996). Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpasa Tıp Derg 27: 41-50.
43. Chopra M, Thurnham D I (1999). Antioxidants and lipoprotein metabolism. Proc Nutr Soc 58: 663-671
44. Ahmet A (2007). Anemone narcissiflora bitkisinin karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
45. Polyakov NE, Leshina TV, Konovalova TA, K spert LD, (2001). Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction:antioxidants or pro-oxidants. Free Radic Biol Med 31:398-404.
46. Güçlü K, S zgen K, T tem E,  zy rek M, Apak R (2005). Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neo cuproinere agent in beveragesand pharmaceutical. Talanta 65: 1226-1232.
47. Gregory JF (1996). Vitamins. In “Food Chemistry”.(EdFennema OR). University of Wisconsin-Madison, New York 531-616.
48. Nelson DL, Cox MM (2013). Lehninger Principles of Biochemistry. Biyokimyanın  lkeleri. 5th ed.  eviren: Elcin YM, Palme yayıncılık, Ankara, 201.

49. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, Mcnamara JO, White LE (2008). *Neuroscience*. 4th ed. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, 471-561.
50. Prota G (1992). *Melanins and melanogenesis*. 1st ed. Academic Press, San Diego
51. Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N (2003). Dopamine- or L-DOPA- induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 5: 165-176.
52. Vermerris W, Nicholson R (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht, Netherlands; 285.
53. Covas MI (2007). Olive oil and cardiovascular system. *Pharmacol Res* 55: 175–186.
54. Alasalvar C, Shahidi F, Liyanapathirana CM, Ohshima T (2003). Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellane* L.). 1. compositional characteristics. *J Agric Food Chem* 51: 3790-3796.
55. Chung KT, Wong TY, Huang YW, Lin Y (1998). Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38: 421–464.
56. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric* 80: 1044-62.
57. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Bio med Pharmacother* 56: 200-207
58. Cai W, Chen X (2006). Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin $\alpha v \beta 3$ antagonism. *Anti cancer Agents Med Chem* 6: 407–28.
59. Pietta PG (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-1042.
60. Erkoç S, Erkoç F, Keskin N (2003). Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers, *J Mol Struct* 631: 141-146.
61. Bravo L (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.

62. Benkovic V, Knezevic AH, Dikic D, Lisicic D, Orsolc N, Basic I, Kosalec I, Kopjar N (2008). Radioprotective effects of propolis and quercetin in gamma-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine* 15: 851-858.
63. Yarnell E, Abascal K(2004). The leading publisher in biotechnology. *Altern Complement Ther* 5: 277- 284.
64. 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.
65. MohdNazri 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.
66. 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.
67. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hall marks of cancer. *Cell* 100:57-70.
68. Dilsiz N (2009). *Moleküler Biyoloji. İkinci baskı. Palme yayıncılık, Ankara; 197-198.*
69. Mesquita ML, Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 123: 439-445.
70. Demirtas I, Sahin A, Ayhan B, Tekin S, Telci I (2009). Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*. *Rec Nat Prod* 3: 104-109.
71. Arııcı K(1993). *Uygulamalı Anatomi. Birinci baskı. Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara.*
72. Balbay MD (2008). *Prostat. Birinci baskı. Güneş Kitap Evi, Ankara; 39-42.*
73. Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9: 437-448.

74. Erkoçak A (1982). Özel Histoloji. Dördüncü baskı. Ankara Tıp Yayını, Ankara
75. Tekelioğlu M (1984). Tıp Embriyolojisi. Er Ajans, Ankara
76. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM (2005). Gray's Anatomy For Students. 3rd ed. Churchill Livingstone
77. Foster CS, Bostwick DG, Bonkhoff H, Damber JE, Kwast TVD, Montironi R, Sakr W (2000). A Cellular and molecular pathology of prostate cancer precursors. Scand J Urol Nephrol Suppl 205: 19-43.
78. Kosova F, Arı Z (2011). Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. J Clin Exp Invest 2: 124-131.
79. William GN, Angelo MDD, William BI (2003). Mechanisms of disease: prostate cancer. N Engl J Med 349: 366-381.
80. Khandrika L, Kumar B, Koul S. Maroni P, Koul HK (2009). Role of oxidative stress in prostate cancer. Cancer Lett 282: 125-136.
81. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 3367-3371.
82. Bratt O (2002). Hereditary prostate cancer: clinical aspects. J Urol 168: 906-913.
83. Stephenson RA, Smart CR, Mineau GP, James BC, Janerich DT, Dibble RL (1995). The fall in incidence of prostate carcinoma. On the down side of prostate specific antigen induced peak in incidence-data from the Utah Cancer Registry. Cancer 77: 1342-8.
84. Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B (2008). Dairy products, dietary calcium and vitamin D intake as risk factors for prostate cancer: a meta-analysis of 26,769 cases from 45 observational studies. Nutr Cancer 60: 421-441.
85. Thompson IM, Tangen CM, Goodman PJ, Lucia MS, Klein EA (2009). Chemoprevention of prostate cancer. The J Urol 182: 499-507.
86. Netter FH (2011). İnsan Anatomisi Atlası. Beşinci baskı. Nobel Kitapevi Yayınları, Ankara, 450.
87. Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic 28: 49-55.

88. Benzie IF, Strain JJ, (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
89. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 52: 7970-7981.
90. Blois MS (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
91. Likhitwitayawuid K, Sritularak B (2001). A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. *J Nat Prod* 64: 1457-1459.
92. 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: 1707-1723.
93. Abudayyak M, Jannuzzi AT, Özhan G, Alpertunga B (2015). Investigation on the toxic potential of *Tribulus terrestris* in vitro. *Pharm Biol* 53: 469-476.
94. Keha EE, KÜFREYİOĞLU Öİ (2010). *Biyokimya*. Yedinci baskı. Aktif Yayınevi, No.65/15, İstanbul; 116
95. Maeda K, Fukuda M (1991). In vitro effectiveness of several whitening cosmetics components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem* 42: 361-368.
96. Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, Hall GS, Heifets L, Pfyffer GE, Ridderhof JC, Wallace RJ Jr., Warren NC, Witebsky FG (2003). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. NCCLS document M24-A, 23 (18).
97. National Committee for Clinical Laboratory Standard (1999) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. NCCLS, Willanova, Pa. M26-A, 19 (18).

98. Karakoca K, Asan Ozusaglam M, Cakmak YS, Erkul Karaman S (2013). Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic properties of *isatis floribunda* boiss. ex bornm. extracts. EXCLI Journal 12:150-167.
99. Wang XH (2012). Ultrasound assisted extraction for analysis of total phenolic content and antioxidant activity of medicinal plants. Afr J Microbiol Res 6: 6847-6852.
100. Emam SS, El-Moaty HIA (2009). Glukosinolates, phenolic acids and anthraquinones of *isatis microcarpa* Boiss an *Pseuderucaria clavate* (Boiss & Reut.) family: Cruciferae. J Appl Sci Res 5: 2315-2322.
101. Miceli N, Filocamo A, Ragusa S, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, Celano M, Maggisano V, Taviano MF (2017). Chemical characterization and biological activities pf phenolic-rich fraction from cauline leaves of *isatis tinctoria* L. (Brassicaceae) growing in sicily: Chem Biodiversty [online]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201700073/abstract> [31.01.2018]
102. Hashemi F, Zarei MA (2014). Tyrosinase inhibitoryactivity within hexane extract of ten screened plants from Kurdistan province of Iran. Int J Biol Res 2: 2795-2799.
103. Rehab LA (2016). *In- vitro* cytotoxic active compounds isolated from *Isatis microcarpa* J. Gay Ex Boiss. Int J Pharm Phytochem Res 8: 1016-1019.

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : LERMİ, Meltem
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : 01.08.1991, Trabzon
Medeni hali : Bekar
E-Posta : meltemlermi91@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
	Karadeniz Teknik Üniv. SABE Eczacılık	-
Yüksek Lisans	Fak. Biyokimya Abd.	
Lisans	Karadeniz Teknik Üniv. Fen Fak. Kimya Bölümü	2011
Lise	Pendik Lisesi	2007

YABANCI DİL

İngilizce