



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*PULICARIA DYSENTERICA'*DAN ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ VE ENZİM İNHİBİTÖR POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özlem KAYACIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Özlem KAYACIK tarafından hazırlanan "*Pulicaria dysenterica*'dan elde edilen özütlerin antioksidan özellikleri ve enzim inhibitör potansiyellerinin değerlendirilmesi" adlı tez çalışması 27/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ~~/oy çokluğu~~ ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Başkan Prof. Dr. Hüseyin DURAL	.....
Danışman Doç. Dr. Gökhan ZENGİN	.....
Üye Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER	.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

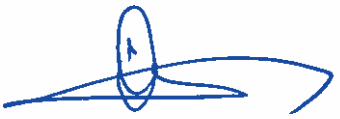
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Özlem KAYACIK

Tarih: 27.12.2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*PULICARIA DYSENTERICA'*DAN ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ VE ENZİM İNHİBİTÖR POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özlem KAYACIK

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gökhan ZENGİN

2019, 72 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Gökhan ZENGİN
Prof. Dr. Hüseyin DURAL
Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Pulicaria cinsi Türkiye'nin dahil olduğu çeşitli ülkelerin geleneksel tıp sistemlerinde büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada, ekstraksiyon metotları ve çözücülerin *Pulicaria dysenterica*'nın fitokimyasal komposizyonu ve biyolojik aktivitesi üzerine etkisi test edildi. Fitokimyasal komposizyon spektrofotometrik metotlar kullanılarak belirlendi. Biyolojik aktiviteler antioksidan ve enzim inhibisyon metotları ile test edildi. Serbest radikal süpürme (DPPH ve ABTS), indirgeme gücü (CUPRAC ve FRAP), fosfomolibdat ve metal şelatlama testlerini içeren farklı test sistemleri ile antioksidan özellikler belirlendi. Enzim inhibisyon etkileri kolinesterazlar, tirozinaz, amilaz ve glukozidaza karşı araştırıldı. Fitokimyasal profil ekstraksiyon metodu ve çözücüden etkilenmiştir. Metanol ekstrakları diğer ekstraklara kıyasla daha yüksek fenolik, flavonoid, flavanol ve fenolik asit içeriği göstermiştir. Ek olarak, methanol ekstrakları daha güçlü antioksidan ve enzim inhibisyon yetenekleri sergilemiştir. Elde edilen bulgular *P. dysenterica*'nın fito-farmasötik özelliklerine bilimsel bir başlangıç noktası oluşturabilir ve mevcut çalışma bu bitki üzerine yapılacak ileriki çalışmalara yeni ufuklar sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Biofarmasötik, Enzim, Fenolikler, *Pulicaria*

ABSTRACT

MS THESIS

EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES AND ENZYME INHIBITORY POTENTIALS OF EXTRACTS OBTAINED FROM *PULICARIA DYSENTERICA*

Özlem KAYACIK

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Gokhan ZENGIN

2019, 72 Pages

Jury
Assoc. Prof. Dr. Gokhan ZENGIN
Prof. Dr. Huseyin DURAL
Prof. Dr. Gokalp Ozmen GULER

The genus *Pulicaria* has great interest in traditional medicine systems of several countries, including Turkey. In the present study, we tested to effect extraction methods and solvents on phytochemical composition and biological activities of *Pulicaria dysenterica*. Phytochemical composition were determined by using spectrophotometric methods. Biological activities were tested by antioxidant and enzyme inhibitory methods. Different chemical assays including free radical scavenging (DPPH and ABTS), reducing power (CUPRAC and FRAP), phosphomolybdenum and metal chelating were used for determining antioxidant properties. Enzyme inhibitory effects were investigated against cholinesterases, tyrosinase, amylase and glucosidase. The phytochemical profiles were dependent on the type of extraction methods as well as on the type of solvent. The methanolic extracts showed higher level of phenolic, flavonoid, flavanol and phenolic acids with compared other extracts. In addition, the methanol extracts exhibited stronger antioxidant and enzyme inhibitory properties. The presented findings could provide a scientific starting point on the phyto-pharmaceutical potential of *P. dysentrica*, thus the study could be opened new avenues for further studies on the plant species.

Keywords: Antioxidant, Biopharmaceutic, Enzyme, Phenolics, *Pulicaria*

ÖNSÖZ

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji-Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yürütülmüş olan bu yüksek lisans tez çalışmasında Türkiye florasında yer alan *Pulicaria dysenterica* türünün antioksidan ve enzim inhibitör özellikleri araştırılmıştır.

Yüksek lisans çalışmalarına başladığım andan itibaren bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım, bu çalışma konusunu veren ve çalışmanın oluşmasında desteğini benden esirgemeyen, tez çalışmamı bitirebilmemde büyük emeği olan kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Gökhan ZENGİN'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü imkânı sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK'e teşekkürlerimi sunarım. Bitkilerin taksonomik olarak teşhislerini yapan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi İsmail ŞENKARDEŞ'e teşekkür ederim. Laboratuvarda numunelerin hazırlanmasında, ekstraksiyon çalışmalarında ve kapasite tayin testlerinde hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen her sorunumda yanımda ve yardımcı olan laboratuvar ekibimizden Öğr. Gör. Dr. Şengül UYSAL'a, doktora öğrencileri Ramazan CEYLAN ve Kouadio Ibrahime SINAN'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Ayrıca bugünlere gelmemde emeği olan maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeden yanımda olan babam Mustafa KAYACIK'a, annem Elif KAYACIK'a ve kıymetli kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Özlem KAYACIK
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar 5
2.1.1. Serbest radikaller 5
2.1.2. Antioksidanlar 10
2.2. Enzim İnhibisyon Aktivitesi 14
2.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivitesi ve Alzheimer hastalığı 15
2.2.2. α-amilaz ve α-glukozidaz inhibitör aktivitesi ve Diabetes mellitus 21
2.2.3. Tirozinaz inhibitör aktivitesi ve deri hastalıkları 25
2.3. Ekstraksiyon Teknikleri 29
2.4. Asteraceae Familyası ve Pulicaria cinsi 30

3. MATERYAL VE YÖNTEM **32**

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan *P. dysenterica* Türünün Toplanması ve Ekstraksiyon Prosedürleri 32
3.2. Toplam Fenolik Madde Tayini 33
3.3. Toplam Flavonoid Madde Tayini 33
3.4. Toplam fenolik asit içeriğinin belirlenmesi 33
3.5. Toplam flavonol içeriğinin belirlenmesi 33
3.6. Serbest Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi 34
3.6.1. DPPH radikal süpürme aktivitenin belirlenmesi 34
3.6.2. ABTS Radikal Süpürme Aktivitenin Belirlenmesi 34
3.7. İndirgeme Gücünün Belirlenmesine Yönelik Testler 34
3.7.1. CUPRAC testi 34
3.7.2. FRAP testi 34
3.8. Fosfomolibdat Testi 35
3.9. Metal Şelatlama Aktivitesi 35
3.10. Enzim İnhibisyonuna Yönelik Testler 35
3.10.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitesi (AChE ve BChE) 35
3.10.2. Amilaz inhibisyon aktivitesi 36
3.10.3. Glukozidaz inhibisyon aktivitesi 36
3.10.4. Tirozinaz inhibisyon aktivitesi 36
3.11. İstatistiksel değerlendirme 36

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **37**

4.1. *P. dysenterica* Ekstraklarının Fitokimyasal Analizi 37

4.2. Antioksidan Özellikler 42
4.3. Enzim İnhibitör Özellikleri 49

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 54

5.1 Sonuçlar 54
5.2 Öneriler 54

KAYNAKLAR 56

ÖZGEÇMİŞ 72

1. GİRİŞ

Eski çağlardan beri insanlar bitkileri beslenme ve sağlık sorunlarına çözüm kaynaklı olarak kullanmışlardır. Elde edilen bilgiler yıllarca değişim ve gelişim göstererek bugüne kadar ulaşmıştır. Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin miktarı, yıllar içerisinde devamlı bir artış göstermektedir. Eski çağlarda kullanılan tıbbi bitkilerin miktarı oldukça az sayıda olmasına karşılık 19. yüzyılda bu sayı yaklaşık 13000 civarına ulaşmıştır (Baytop, 1999).

Tıbbi bitkiler, en kesin ve seçici şekilde biyoaktif doğal ürünlerin zengin kaynaklarıdır. On dokuzuncu yüzyılın ortasından beri, birçok bitkiden izole edilen doğal ürünler çoğu modern ilacın aktif bileşenleri olarak kullanılmaktadır. Doğal bileşik enzim inhibitörü arayışı, dünyadaki ilaç bulma ve strateji araştırması çalışmalarından birisidir (Uddin ve ark., 2011).

Kullanılan sentetik ve kimyasal ilaçların insan sağlığını etkileyen yan etkilerinin görülmesi üzerine insanların tıbbi bitki kullanımına yönelimleri artmaktadır. Bitkisel tıbbın modern tıp ile iç içe etkileşiminin olmaması bitkilerin farmakolojik ve yan etkilerine dair bilgilerin yetersiz olması bitkilerin alternatif tedavide hak ettiği yeri bulmasını kısıtlamıştır (Gürün, 2004). Günümüze kadar gelen halk arasında tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin incelenmesi ve bilimsel araştırmaların yapılması bu noktada oldukça önemlidir (Yücel ve Tülükoğlu, 2000).

Hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonların neticesinde serbest radikal adı verilen bir grup reaktif molekül oluşmaktadır. Bu serbest radikaller vücut fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur ve biyolojik moleküllerin zarar görmelerini sağlar (Sardarodiyan ve Mohamadi Sani, 2016). Serbest radikal türleri içerisinde en aktif grubu reaktif oksijen türleri oluşturmaktadır. Oluşan serbest radikaller hücre zarı, hücrede yer alan DNA, nükleik asit, protein ve lipitlere verdikleri başlıca zararlar ile kanser, diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar ve karaciğer hasarı gibi birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır (Valko ve ark., 2006). Oksijen molekülü insan yaşamı için olmazsa olmazdır, ancak vücudumuzda biyolojik aktiviteler sonucu üretilen reaktif oksijen türlerinin vücudumuz için büyük zararlı etkileri mevcuttur. Reaktif oksijen türleri çiftleşmemiş elektron ve kimyasal enerji yönünden normal oksijen türlerinden daha zengindir. Bu durumdan dolayı oldukça aktif olan bu moleküller yaşlanmaya sebep olmakta ve immün sistemi zayıflatmaktadır (Tan ve ark., 2015). Antioksidanlar vücudumuzda serbest radikallerin meydana getirmiş olduğu zararı ortadan kaldıran,

reaktif oksijen türlerinin oluşmasına engel olan ve hücrede hasar oluşumunu önleyen maddelerdir (Shinde ve ark., 2012). Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olarak iki grupta toplanırlar (Antolovich ve ark., 2002). Doğal antioksidanlar vücudumuzda birçok hastalık oluşumu riskini azaltmaktadır ve serbest radikallerin zararlı etkilerini yok etmektedir (Abdel Moneim, 2015). Günümüzde gıdaların bozulmasını önlemek için kullanılan sentetik antioksidan gıda katkı maddeleri bulunmaktadır. Besinlere ilave edilen sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propilgallat (PG) ve tersiyerbutil hidrokinon (TBHQ) bileşikleridir. Sentetik antioksidanların yüksek toksik etki ve diğer olumsuz etkileri doğal antioksidanlara ve bunların kaynaklarına olan ilginin artmasına yol açmıştır (Nimse ve Pal, 2015). Doğal antioksidanların en önemli kaynaklarından biri bitkilerdir. Yapılan bilimsel çalışmalarda bazı bitki özütlerinin antioksidan düzeylerinin sentetik antioksidanlardan daha güçlü olduğu rapor edilmiştir (Nimse ve Pal, 2015). Doğal antioksidanların en önemli gruplarını fenolik maddeler oluştururlar (Rice-Evans ve ark., 1997).

Enzimler, genellikle protein yapıda olan canlılarda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan katalizörlerdir. Enzimler çok eski zamanlardan beri insanlar tarafından endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Geçmişte enzim kullanım alanları kısıtlı iken yapılan araştırmalar ve elde edilen olgular sonucunda birçok yeni kullanım alanı keşfedilmiştir. Günümüzde bakıldığında tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, tekstil, deterjan, çevre, gıda, kağıt, gibi birçok alanda enzimlerden faydalanılmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler neticesinde elde edilen enzimlerin kullanımının en fazla olduğu yerlerden birisini de ilaç endüstrisi olmuşturmaktadır.

Enzim inhibitörleri, enzimlere bağlanarak onların aktivitelerini düşüren moleküllerdir. Günümüzde kullanılan birçok ilacın yapısını, enzim aktivitesinin bloke edilmesini sağlayan enzim inhibitörleri oluşturmaktadır. Bu nedenle enzim inhibitörlerinin keşfedilmesi biyokimya ve farmakoloji alanında aktif bir araştırma konusunu oluşturmaktadır (Segel, 1976).

Alzheimer hastalığı ilerleyici bilişsel bozukluklar ve davranış bozuklukları ile karakterize edilen yaşın ilerlemesi ile ilişkili olan nörodejeneratif bir hastalık çeşididir (Dastmalchi ve ark., 2007). Alzheimer hastalığının ortaya çıkması ile görülen nöron ve akson kayıpları, düşük seviyede asetilkolin (ACh) sentezlenmesini sağlar. Asetilkolin seviyelerinin artmasını sağlamak için ACh'yi yıkan Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin baskılanması gerekir (Chaudière ve Ferrari-Iliou, 1999). Alzheimer ile ortaya çıkan

nörokimyasal değişikliklerden biri asetilkolinesteraz (AChE) enziminin aktivitesindeki anormal artışa bağlı olarak ortaya çıkan kolinerjik eksikliğidir. Bu sebeple kolinesteraz (ChE) inhibitörleri Alzheimer tedavisi için önemli bir alternatif mekanizma olarak kabul edilmektedir (Hampel ve ark., 2018). Alzheimer tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin'dir (Bassil ve Grossberg, 2009). Kolinesteraz enzimleri iki sınıfa ayrılır. Asetilkolinesteraz (AChE) 'gerçek kolinesteraz' olarak adlandırılırken bütirilkolinesteraz (BChE) psödokolinesteraz olarak bilinmektedir (Du ve ark., 2018). Diabet veya halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen rahatsızlık genel olarak insülin yetersizliği sonucu yüksek kan şekeri ile karakterizedir (Canibano-Hernandez ve ark., 2018). Diabet tüm dünyada en sık görülen endokrin sistem hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2025 yılında 300 milyondan fazla insanın diyabet hastası olacağını ön görmektedir (İnce, 2010). Vücut içerisinde glisemik kontrolü sağlamak için diyabetik ilaçlarda glukoz emilimini inhibe eden alfa-glukozidaz enzim inhibisyonundan yararlanılmaktadır. İlaçlarda ayrıca akarboz enzim inhibitörü olarak kullanılır. Ancak bu sentetik inhibitörler şişkinlik ve gaz gibi gastrointestinal rahatsızlıklar şeklinde yan etkileri rapor edilmiştir (Sharifuddin ve ark., 2015). Tirozinaz enzimi yapısında çift çekirdekli bakır kümeleri yer alan bir polifenoloksidaz enzim üyesidir. Bu enzim melanin sentezinde kilit rol oynamaktadır (Pillaiyar ve ark., 2018). Bu enzim vücutta gereğinden fazla sentezlenen melaninden kaynaklı cilt lekesi, hiperpigmentasyon problemlerinin tedavisinde ana hedef enzim konumundadır (Chang, 2012). Kojik asit tirozinazın en çok çalışılmış inhibitörlerinden biridir ve kozmetik alanında cilt beyazlatıcı, gıda endüstrisinde enzimatik kararmayı önlemek için kullanılmaktadır (Pillaiyar ve ark., 2017). Tirozinaz aktivitesini inhibe etmek için geliştirilen sentetik inhibitörler toksik etkiye sahip olmalarından dolayı bu inhibitörlere karşı şüpheler oluşmuş ve doğal inhibitörler üzerine yapılacak çalışmalar daha önemli hale gelmiştir (Graziella Tocco, 2009).

Pulicaria cinsi özellikle Akdeniz çevresinde, Kuzey Afrika, Asya ve Avrupa'da bir dağılışa sahip olup yaklaşık 100 tür ile temsil edilmektedir (Williams ve ark., 2003). Ülkemizde ise bu cins 7 taksonla temsil edilmekte olup, bunlar İç Anadolu, Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde dağılım göstermektedir (Güner ve ark., 2012). *Pulicaria* cinsi üyeleri çeşitli ülkelerde geleneksel halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Örneğin, *P. crispa*, Güney Mısır ve Suudi Arabistan halkı tarafından böcek kovucu ve iltihap giderici bitkisel çay olarak kullanılmaktadır (Stavri ve ark., 2008). *P. odora*, Fas'da yaygın olarak iltihap giderici, sırt ağrısı, bağırsak bozuklukları ve adet kramplarını tedavi etmek için

kullanılan bir şifalı bitkidir. *P. dysenterica* ise İngiltere'de dizanteri tedavisinde ünlüdür. İran'da ise bitki kaynatılıp ishal önleyici olarak kullanılmaktadır (Williams ve ark., 2000). *Pulicaria* türlerinden elde edilecek bir dizi bileşiğin güçlü biyoaktiviteye sahip olduğu ve potansiyel ilaçların geliştirilmesi için umut verici olabileceği düşünülmektedir ve daha önce bu cinsle yapılan çalışmalarda bu durumu doğrulamaktadır (Marco ve ark., 1992; Basta ve ark., 2007; Mumivand ve ark., 2010).

Literatür taraması yapıldığında *Pulicaria dysenterica* türü için antioksidan kapasite ve enzim inhibitör aktivitesi üzerine yapılan herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu yüzden yapılacak olan tez çalışması ilk olma özelliği taşıyacaktır. Elde edilen sonuçlar bu tür üzerinde yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Normal koşullar altında, yaşam için oksijen hayati önem taşır. Bununla birlikte yüksek reaktif doğası nedeniyle oksijen, reaktif oksijen türlerinin oluşması nedeniyle canlı sistemlerde ciddi hasara neden olur (Davies, 1995).

2.1.1. Serbest radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngede bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküller veya moleküler parçaları olarak tanımlanır. Bu eşleşmemiş elektronlar kararsız ve genellikle serbest radikallere önemli derecede reaktivite kazandırırlar. Reaktif oksijen türleri (ROS); süperoksit (O_2^{-}), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), lipit peroksil ($LOO^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikallerini içerir. Serbest azot radikalleri (RNS); nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$) içerir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$), hipoklorik asit (HOCl), azot asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^{-}$), dinitrojen trioksit (N_2O_3), lipit peroksit (LOOH) serbest radikal değildir. Genellikle oksidanlar olarak adlandırılırlar ve kolayca canlı organizmalarda serbest radikal reaksiyonlara yol açabilirler. Böylece, ROS ve RNS radikal ve radikal olmayan türler içerir. Bu reaktif türler, hayvanlarda ve insanlarda fizyolojik ve patolojik koşullar altında üretilir (Fang ve ark., 2002; Valko ve ark., 2007; Pham-Huy ve ark., 2008; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve serbest radikal olmayan türler Tablo 2.1'de verilmiştir (Gülçin, 2006).

Tablo 2.1. Reaktif oksijen ve radikal olmayan türler

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ		**SERBEST RADİKAL OLMAYAN TÜRLER**	
• Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$	• Singlet oksijen	$^1O_2$
• Hidroksil radikali	$OH^{\cdot}$	• Ozon	O_3
• Hidroperoksil radikali	$HOO^{\cdot}$	• Hidrojen peroksit	H_2O_2
• Lipid radikali	$L^{\cdot}$	• Hipoklorit	HOCl
• Peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$	• Lipid hidroperoksit	LOOH
• Lipid peroksil radikali	$LOO^{\cdot}$	• Nitril klorit	NO_2Cl
• Lipid alkoksil radikali	$LO^{\cdot}$	• Nitröz asit	HNO_2
• Nitrosil katyon	NO^+	• Peroksinitrit	$ONOO^-$
• Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	• Dinitrojen trioksit	N_2O_3
• Nitrojen dioksit	$NO_2^{\cdot}$	• Azot oksit	N_2O
• Protein radikal	$P^{\cdot}$	• Peroksinitröz asit	ONOOH
• Tiyil radikali	$RS^{\cdot}$	• Nitroksil anyonu	NO^-

Serbest radikaller hem endojen hem de eksojen olarak üretilmektedir. Vücudumuzda serbest radikallerin üretimi devamlıdır ve fizyolojimizin içerisinde yer almaktadır. Serbest radikallerin oluşmasına sebep olan biyolojik işlemler şu şekildedir (Bagchi ve Puri, 1998; Pham-Huy ve ark., 2008; Sarma ve ark., 2010; Sen ve ark., 2010).

- Elektron Taşıma Zinciri: Serbest oksijen radikallerinin ana kaynağını elektron taşıma zinciri oluşturmaktadır. Oksijen tam olarak indirgendiğinde meydana gelen son ürün sudur. Oksijen tam olarak indirgenemez ise sırasıyla süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali meydana gelmektedir (Winston, 1991) (Şekil 2.1).

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^{\cdot-} \xrightarrow{e^-} H_2O_2 \xrightarrow{e^-} OH^{\cdot} \xrightarrow{e^-} H_2O$$

Şekil 2.1.Oksijenin suya indirgenmesi ile oksijen radikalleri oluşumu

-Bağışıklık Sistemi: Savunma mekanizmalarımız patojenlere etki ederken serbest radikalleri oluşturabilmektedir.

-Metabolik Süreç: Lipid peroksidasyonu önemli bir serbest radikal kaynağıdır. Arakidonik asit, trombositler, makrofajlar ve düz kas hücrelerinin metabolizması sırasında da serbest radikaller meydana gelebilmektedir.

-İnflamasyon: İnflamasyon sırasında nötrofil ve makrofajlar serbest radikal oluşumu başlatabilmektedir.

-Stres: Vücudumuzda oluşan stres, toksik bir yan ürün olarak serbest radikallerin üretimini tetikleyebilmektedir.

-Kirlenme: Hava kirletici ve su kirletici maddeler, kimyasal çözücülerin etkisi ile serbest radikaller üretilebilmektedir.

-Radyasyon: UV radyasyonları serbest radikal oluşumuna neden olabilir.

-Besin Faktörleri: Katkı maddeleri, kızartılmış ürünler, yüksek oranda şeker ve lipid içeren besinler serbest radikalleri üretebilmektedir.

Tablo 2.2 : Reaktif oksijen ve azot türleri biyolojik ilgisi (Harman, 1956; Halliwell ve Gutteridge, 2015)

Reaktif türler	**Sembol**	**Bazı özellikleri**
Reaktif Oksijen Türleri :		
• Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Mitokondride, kardiyovasküler sistemde ve diğer sistemlerde üretilir.
• Hidroksil radikali	$OH^{\cdot}$	Aşırı demir yüklenmesi ile vücudumuzda bu koşullarda çok yüksek derecede reaktif radikal üretilir.
• Hidrojen peroksit	H_2O_2	Vücudumuzda çok sayıda peroksit reaksiyonu ile oluşur ve OH gibi güçlü türler verir.
• Peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$	Oksidatif hasar sırasında reaktif ve lipitler, proteinler, DNA, şekerler vb.
• Organik hidroperoksit	ROOH	Reaktif türler elde etmek için geçiş metal iyonları ile reaksiyona girer.
• Singlet oksijen	$^1O_2$	Yüksek reaktif, ışığa duyarlılaşma ve kimyasal reaksiyonlar sırasında oluşur.
• Ozon	O_3	Atmosferik bir kirletici olarak mevcut, $^1O_2$ veren çeşitli moleküllerle reaksiyona girebilir.
Reaktif Azot Türleri :		
• Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Nörotransmitter ve kan basıncı regülatörü, patolojik durumlar sırasında güçlü oksidandır.
• Peroksi nitrit	$ONOO^-$	Süperoksit ve yüksek oranda reaktif NO'dan oluşturulmuştur.
• Peroksinitröz asit	ONOOH	$ONOO^-$'nun protonlu formudur.
• Nitrojen dioksit	NO_2	Atmosferik kirlilik sırasında oluşur.

Reaktif oksijen türleri organizmada bağışıklık sisteminin bir parçası olarak üretilir. Nötrofiller, monositler veya makrofajlar gibi fagositik hücreler, öldürme mekanizmalarının bir parçası olarak, büyük miktarlarda (O_2-) veya ($NO^{\cdot}$) sentezleyerek yabancı organizmalara karşı koruma sağlar. Reaktif oksijen türleri, lipitler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi benzeri biyomoleküllere oksidatif hasar verir. Hasarları yaşlanmaya, kansere ve diğer birçok hastalığa neden olur (Aruoma 1994). Serbest radikaller (ROS) zamanla nötralize edilmezse, kalp hastalığı, inme, arteriyoskleroz, diyabet ve kanser dahil olmak üzere 100'den fazla hastalığa sebep olduğu belirtilmektedir (Alho ve Leinonen, 1999).

Serbest radikallerin olası en az bilinen hedefi, enzimatik olmayan glikasyonun erken aşamalarında zarar gören karbohidratlardır. Karbohidratların parçalanması, mutajenik bileşikler olan α ve β-dikarbonillerin oluşumuna yol açabilen küçük zincir türleri üretir (Benov ve Beema, 2003).

Serbet radikallerin en çok etkilediği biyomolekül lipidlerdir ve bu süreç lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu, bir metilen karbonundan bir hidrojen atomu ayırmak için bir yağ asidinin yan zincirine bir radikal tarafından yapılan bir saldırı ile başlatılmaktadır. Yağ asidinde ne kadar fazla çift bağ varsa, hidrojen atomlarını çıkarmak o kadar kolay olur ve sonuç olarak bir radikal oluşturur, böylece tekli doymamış (MUFA) ve doymuş yağ asitlerini (SFA) radikallere karşı, çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) daha dayanıklı hale getirir. Oluşan bu yeni karbon merkezli lipit radikali moleküler olarak yeniden düzenlenebilir ve bir peroksil radikali meydana getiren oksijenle reaksiyona girebilir. Bu yüksek oranda reaktif moleküller, çevreleyen moleküllerden hidrojen atomlarını alabilir ve lipit peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonunu çoğaltabilir (Halliwell ve Chirico, 1993).

ROS üretimi ve antioksidanlar tarafından nötralizasyonu arasındaki denge çok hassastır ve eğer bu denge ROS'un aşırı üretimi ile bozulur ise, hücreler oksidatif stresin etkilerine maruz kalmaya başlar (Wiernsperger, 2003). Oksidatif stres DNA, lipidler ve proteinler gibi önemli organik substratlara zarar verebilir, hücrelerin fizyolojik işlevleri için oldukça tehlikelidir (Nordberg ve Arnér, 2001). Bu durum genel olarak yaşlanma süreci, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, diyabet ve kanser gibi çeşitli kronik durumların başlatılması ve ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir (Valko ve ark., 2007).

Tüm aerobik organizmalar, zarar görmüş molekülleri uzaklaştırmak veya onarmak için endojen antioksidan savunma sistemlerine sahiptir (Davies, 1995). Bu antioksidan savunma mekanizmalarında; Süperoksit dismutaz (SOD) önemli bir endojen antioksidan enzimdir ve çeşitli ortak formlarda bulunabilir. Bu formlar bakır ve çinko yada manganez ve demir veya nikel içeren proteinlerdir. Bunlar süperoksit radikallerini temizleyen ROS'a karşı ilk savunma sistemi olarak görev yaparlar. SOD, (O_2-), (H_2O_2) ve (O_2)'nin parçalanmasını katalize eder. İnsanlar üç süperoksit dismutaz formu içerir: SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride ve SOD3 hücre dışında bulunur. Katalaz (CAT) en yaygın bulunan enzimlerdendir. Dört polipeptit zincirinin bir tetrameridir ve enzimin hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesini sağlayan dört porfirin heme grubunu

kapsamaktadır. Hücre sitoplazmasında bulunan Glutatyon peroksidaz (GPx) hücreyi H_2O_2'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı korur ve H_2O_2'den hidroksil radikal oluşumunu engeller. Dört protein alt biriminden oluşur; bunların her biri aktif bölgesinde selenyum elementinin bir atomunu bulundurur. Glutatyon redüktaz (GR), flavoprotein enzimi ve glutatyonun dönüşümü için gerekli olan önemli hücresel antioksidandır (Fang ve ark., 2002; Valko ve ark., 2007; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

2.1.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe edebilen moleküllerdir. Gıda açısından bir antioksidan, okside edilebilir bir substrat ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlar da mevcut olduğunda bile substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde olarak tanımlanmıştır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Antioksidanların tümü, oksidanların tipine göre değişen etki mekanizmalarından birini takip etmektedir. Bu mekanizmalar:

1) Serbest radikallerin ortamdan ayrılması,

2) Metalik iyonların şelatlanması,

3) Serbest radikal üreten enzimlerin inhibisyonu,

4) Endojen antioksidan enzimlerinin aktivasyonu,

5) Lipit peroksidasyonunun önlenmesi,

6) DNA hasarının önlenmesi,

7) Protein modifikasyonunun ve şeker tahribatının önlenmesi (Halliwell, 1990).

2.1.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması

2.1.2.1.1. Doğal ve sentetik antioksidanlar

Sentetik Antioksidanlar

Gıda katkı maddesi olan sentetik antioksidanlar, gıda işlemede lipit oksidasyon reaksiyonlarının başlamasını geciktirmek veya yavaşlatmak için kullanılır. Sentetik antioksidanların çoğu, bütillenmiş hidroksitolüen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyer butil hidrokinon (TBHQ), propil gallat (PG), gosipol ve tokoferol gibi çeşitli halka sübstitüsyonları (monohidroksi veya polihidroksi fenolik bileşikler) içeren bir fenolik fonksiyonelliğe sahiptir. Bu bileşikler, gıda maddelerini gıda bileşenlerinin oksidatif bozulmasına karşı korumak için güçlü antioksidan özellikler sergiler. Bu bileşikler gıda sistemlerinde lipit oksidasyonunu durdurur veya yavaşlatır. Lipid oksidasyonunda, serbest alkil radikallerinin oluşumunu bloke etme veya serbest radikal zincirinin ilerlemesini engelleyebilmesi bu bileşiklerin antioksidan özelliklerini yansıtır (Shahidi, 2007).

Kullanılan popüler sentetik antioksidanlardan BHA ve BHT toksik ve kanserojen etkileri konusundaki şüphelerinden dolayı kullanımları yasal kurallarla sınırlandırılmıştır (Wichi, 1988; Sherwin, 1990). Bu nedenle, gıda uygulamaları için daha güvenli ve doğal antioksidanlara artan bir ilgi oluşmakta, bunların tümü doğal antioksidanları araştırmaya yönelik girişimlere ivme kazandırmakta ve doğal antioksidanlara yönelik tüketici tercihlerinde artış eğilimi oluşturmaktadır (Gülçin ve ark., 2006; Gülçin, 2007).

Doğal antioksidanlar

İnsan diyeti, antioksidan aktiviteye sahip olan veya yapısal özelliklerine dayanarak ROS'u temizlemesi önerilmiş bir dizi farklı bileşik içermektedir. Diyet antioksidanlarının en önde gelen temsilcileri C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve flavonoidlerdir (Sies ve Stahl, 1995).

C ve E vitaminleri askorbik asit ve tokoferollerin genel isimleridir. Askorbik asit, antioksidan içeren iki bileşik içerir ; L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit. Hem gastrointestinal sistem yoluyla emilir hemde in vivo enzimatik olarak değiştirilebilir. Askorbik asit, süperoksit radikal anyonunun, hidrojen peroksit, hidroksil radikalinin, tekli oksijenin ve reaktif azot oksidin uzaklaştırılmasında etkilidir (Barros ve ark., 2011).

E vitamini sekiz izoformdan oluşmaktadır; dört tokoferol (α-tokoferol, β-tokoferol, δ-tokoferol ve γ-tokoferol) ve dört tokotrienol (α-tokotrienol, β-tokotrienol, δ-tokotrienol ve γ-tokotrienol), α-tokoferol biyolojik sistemlerde en etkili ve bol izoformdur. E Vitamini plazmada, kırmızı hücrelerde ve dokularda bulunan, lipid yapılarının bütünlüğünü, özellikle de zarları koruyan, yağda çözünen tek büyük zincir antioksidandır (Burton ve Traber, 1990).

Doğal antioksidanların ana kaynağı fitokimyasallar veya bitki bileşenleridir. Bitkilerden gelen kimyasallar genellikle bitki metabolizmasındaki rollerine bağlı olarak sekonder metabolitler olarak sınıflandırılmaktadır. Primer metabolitler, nükleik asitler, klorofil vb. ortak şekerler, amino asitler, proteinler, pürinler ve pirimidinlerden oluşur. sekonder metabolitler alkaloidler (amino asitlerden türetilmiştir), terpenler (lipitlerden türetilmiştir) ve fenolikleri (karbonhidratlardan türetilmiştir) içermektedir. Bitkiler, biyomoleküllerin oksidasyonunu önlemek için karotenoidler, flavonoidler, sinnamik asitler, benzoik asitler, folik asit, askorbik asit, tokoferoller gibi son derece etkileyici bir dizi antioksidan bileşik üretir. Serbest radikal temizleme özelliklerine sahip bitki kökenli antioksidanlar, oksidatif strese bağlı çeşitli hastalıklarda profilaktik ve terapötik ajanlar olarak büyük öneme sahip olabilir (Krishnaiah ve ark., 2007; Sen ve ark., 2010).

2.1.2.2. Fenolik bileşikler

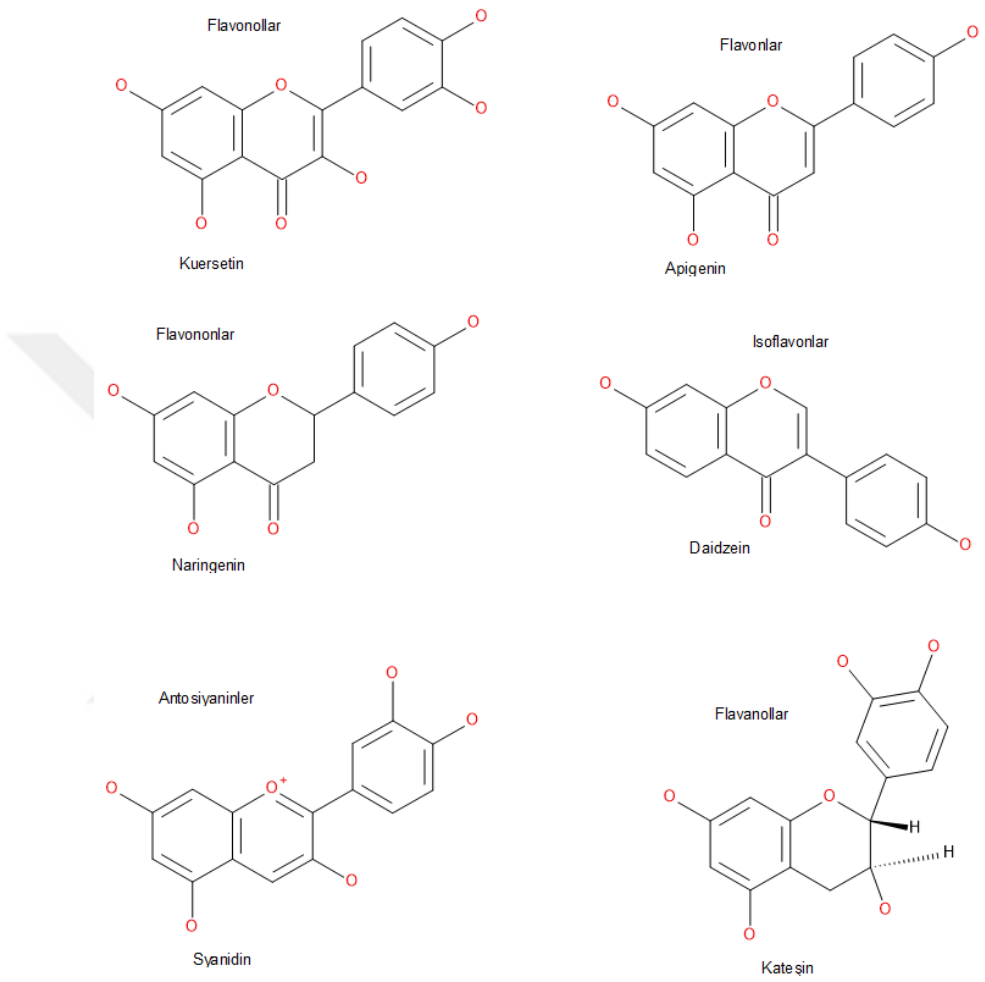
Gıda bileşeni olarak fenolik maddeler; tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri ve enzim inhibitör olmaları gibi etkilerinden dolayı insan sağlığı açısından önemlidir (Çimen, 1999).

Bitkisel polifenoller aromatik hidroksilli yapıda olan ve diyette bulunan biyolojik etkinliğe sahip en güçlü bileşiklerdir (Bennick, 2002).

İçerdikleri halka sayısı ve yapısal unsurlara göre isim alan polifenolik maddeler genellikle bir fenol halkasına sahiptirler. Polifenollerin ana gurupları: flavonoidler, fenolik asitler, taninler, stilbenler (resveratrol) ve lignanlar'dır (D Archivio ve ark., 2007).

Flavonoidler: Günümüze kadar tanımlanan 8000'den fazla polifenol'ün 4000'den fazlasını flavonoidler oluşturmaktadır (Puri ve Hall, 1998). Flavonoidler, C6-C3-C6 konfigürasyonda düzenlenmiş 15 karbon atomunu kapsayan, düşük molekül ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır. Heterosiklik halka şeklinde olan C halkasında meydana

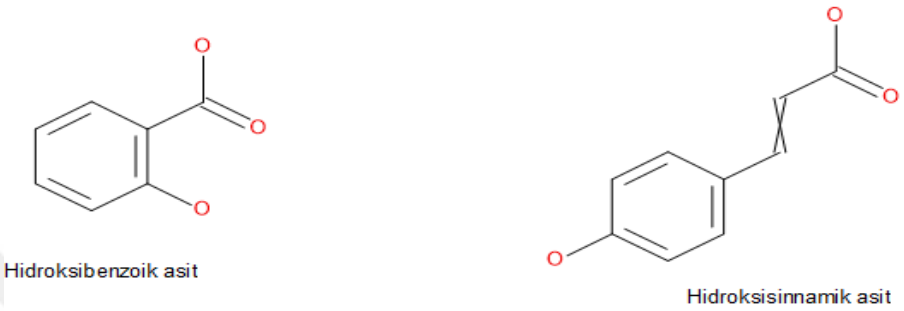
gelen değişmeler flavanoidleri en yaygınları flavonol ve flavonlar olmak üzere, 6 ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller (veya kateşinler), izoflavon ve antosiyanin ana bileşik gruplarıdır (Tsao ve Yang, 2003; D'Archivio ve ark., 2010) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Flavonoidlerin altı ana sınıfı (D'Archivio ve ark., 2007)

Kimyasal olarak flavonoidlerin güçlü antioksidan özellikleri sahip olduğu üç özellikten kaynaklanır; aromatik halka yapılarındaki hidroksil grupları sayesinde hidrojen vererek redoks reaksiyonlarına girebilmektedirler. Bu sayede serbest radikal oluşumlarını ortadan kaldırırlar. Aromatik heterosiklik ve çoklu doymamış bağlardan oluşan yapılarıyla dayanıklı bir kimyasal yapı oluştururlar. Metal şelatlama kapasitesine sahip yapısal grupları vasıtasıyla hidroksil ve süperoksit radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilirler (Cam ve Hışıl, 2003; Naczk ve Shahidi, 2004).

Fenolik asitler: Genel olarak serbest halde bulunmayan fenolik asitler; hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. (Şekil 2.3) Bu bileşiklere - OH ve -OCH3 grupları bağlanarak önemli fenolik asit türevleri oluşmaktadır (Baysal ve Yıldız, 2003). Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısında olup, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Bitkisel gıdalarda genelde az miktarda yer alırlar. Hidroksisinnamik asitler ise C6-C3 fenilpropan yapısındadırlar. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitlerdir



Şekil 2.3. Fenolik asitlerin iki temel gurubu

Fenolik asitlerin antimutajenik, antiproliferatif ve antikarsinojenik etkilerine sahip besinsel antioksidanlar olmalarından dolayı da alımları oldukça önemlidir (Shahidi, 1995).

Stilbenler: C6-C2-C6 yapısına sahiptirler ve yaralanma ve stres gibi durumlar için bitkiler tarafından üretilmektedir (Langcake ve Pryce, 1977). Oldukça minör diyet komponentleri olmasına rağmen en iyi bilinen temel stilben cis ve trans izomerleri bulunan resveratroldür.

Lignanlar: Doğada genellikle serbest halde bulunurlar ve az miktarda glikozit türevleri yer almaktadır. Bitkilerde bulunan temel lignanlar; matairesinol, pinoresinol, larisiresinol ve izolarisiresinol bileşikleridir (Kolaç ve ark., 2017).

2.2. Enzim İnhibisyon Aktivitesi

Enzimler, spesifik biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridir. Enzimlerin kusursuz özgünlüğü, yaşamı sürdürmek için gerekli olan birçok farklı metabolik aktiviteler arasında uyumlu bir etkileşim yaratmak için yüksek koordinasyon sağlayan çok önemli bir biyolojik olaydır (Nelson ve ark., 2008).

Enzim inhibitörleri temel olarak bir enzimle bağlanan ve onun biyoaktivitesini azaltan moleküllerdir. Enzim aktivitesini bloke etmek, bir patojeni öldürebilmekte veya

bir metabolik dengesizliği düzeltebilmektedir. Ayrıca birçok ilaç molekülü yapısı enzim inhibitörleri içermektedir. İnhibitörlerin bağlanması, enzime aktif alandaki bir substratın bağlanmasını engelleyebilir ve enzimi kimyasal reaksiyonda aktivitesini azaltır. Enzim inhibisyonu hem geri dönüşümsüz hem de geri dönüşlü bir işlemdir (Shapiro ve Vallee, 1991).

İnhibitörler genellikle iki gruba ayrılır (WHO, 1999). Birinci grup, enzim yüzeyinin çeşitli kısımlarıyla birlikte nonkovalent etkileşimler oluşturan geri dönüşümlü inhibitörlerden oluşur. İkinci grup ise, enzim yüzeyi üzerindeki farklı fonksiyonel gruplarla etkileşime giren geri dönüşümsüz inhibitörleri içerir. Pek çok ilacın yapısı enzim aktivitesinin bloke edilmesini sağlayan enzim inhibitörlerinden oluşmaktadır. Yeni ilaçların keşfedilmesi temel olarak yeni enzim inhibitörlerinin keşfedilmesine dayanmaktadır.

2.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivitesi ve Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalığı (AD), esas olarak 65 yaşın üzerindeki yaşlı nüfusu etkileyen ve bunama olgularının % 50-60'ını oluşturan progresif ve nörodejeneratif bir hastalıktır (Francis ve ark., 1999). Bu hastalık ilerleyici nörodejeneratif bozukluklar, bilişsel işlevlerin çökmesi, nörofibriler yumaklar ve amiloid plakların oluşumları ile karakterizedir (Suh WH, 2005; Mohamed T, 2011). Bu hastalığın toplumda görülme sıklığı yaşla birlikte artmış olduğu, 65 ile 74 yaş arasındaki hastalarda % 30'dan, 85 yaşlarındakilere göre % 47.2'ye çıktığı bulunmuştur (Wernicke ve Reischies, 1994; Williams ve ark., 2003). Alzheimer hastalığı olguların % 25-30'unda Parkinson hastalığının (PD) varlığıda gözlenmiştir (Aarsland ve ark., 2005).

Alzheimer hastalığı orta ve genç kuşak için en sık görülen bunama nedenidir ayrıca halk sağlığı ve toplum üzerinde yıkıcı bir etkiye sahiptir. AD patogenezi karmaşıktır, genetik ve çevresel faktörleri içerir (Scheuner ve ark., 1996; Williams ve ark., 2011). Bu yüzden Alzheimer hastalığı çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilir. Dünya çapında yaklaşık 36 milyon insanın Alzheimer hastalığı veya diğer bunama tipleri yaşadığına inanılmaktadır. 2030'a kadar, yeni keşifler bulunmadığı takdirde sayının yaklaşık 66 milyona çıkabileceği hatta bu sayının 2050 yılına kadar 115 milyonu bile geçeceği varsayılmaktadır (Puentes ve ark., 2012).

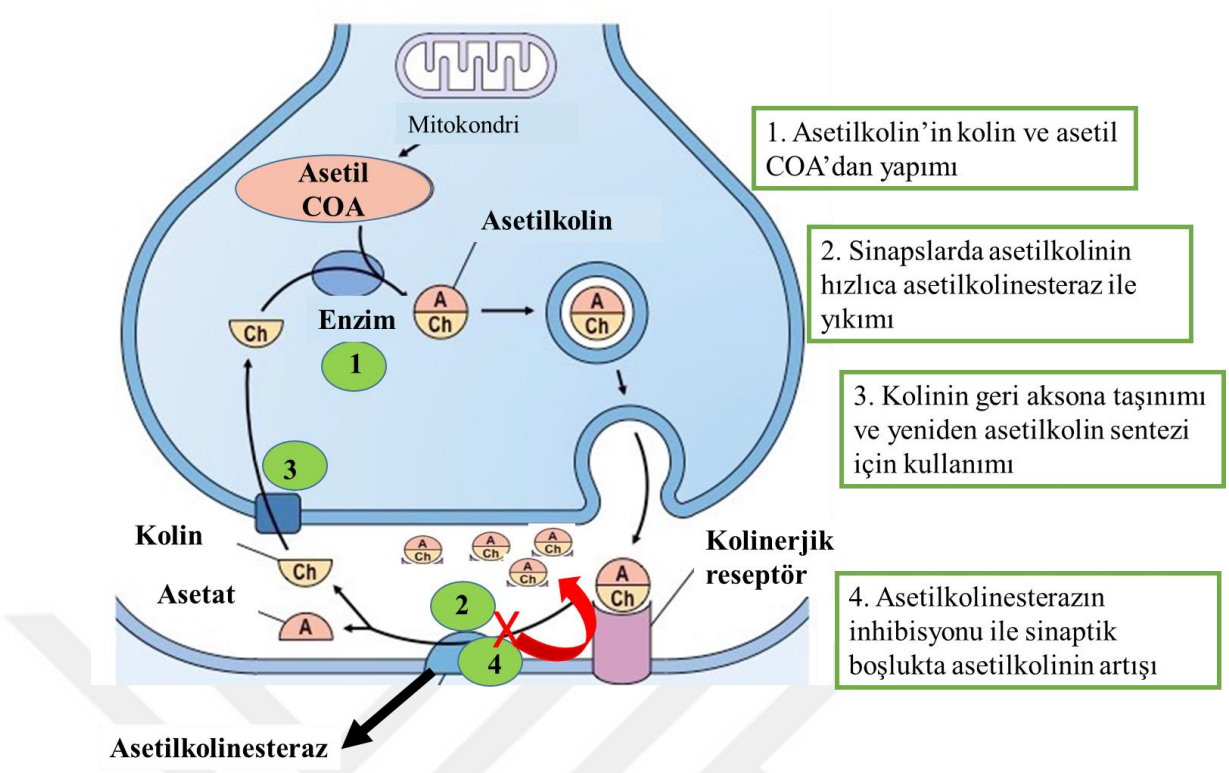
2.2.1.1. Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik yaklaşımlar

Önerilen metotlar, bilişsel, bilişsel olmayan ve davranışsal semptomların tedavisini içerir. AChE inhibitörleri (donepezil, galantamin ve rivastigmin) ve memantin

özellikle Alzheimer tedavisi için kullanılan mevcut ana farmakolojik tedavilerdir (Revadigar ve ark., 2014). Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisi mevcutken, şimdiye kadar AD'yi durdurmaya yarayan bir tedavi bulunamamıştır. AD patolojisi genetik ve genetik olmayan çok faktörlü bir kombinasyondan oluşur. Bunlar arasında asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerinin keşfine yol açan ‘‘kolinerjik hipotez ”olarak adlandırılan bir teori önerilmiştir (Behl ve Moosmann, 2002).

Kolinerjik hipoteze göre, beyinde kolinerjik fonksiyonlarda geri dönüşümsüz bir eksiklik vardır ve bu da bu hastalarda hafıza bozukluğuna yol açar (Tougu, 2001). AD hastalarında gözlenen en önemli değişiklikler, hipokampus ve korteks seviyelerindeki nörotransmiter asetilkolinin (ACh) azalmasıdır. Alzheimer hastalığına uygulanan çoğu tedavi stratejisi, bu hastalıktan şikayetçi olan hastalarda hafıza bozulmalarının beyindeki kolinerjik fonksiyonun yetersizliğinden kaynaklandığı yönündeki yaklaşımlardır. Bu hastalığın tedavisi için en umut verici yaklaşımlardan biri, asetilkolinesteraz inhibitörleri kullanılarak beyindeki asetilkolin (ACh) seviyesinin arttırılmasıdır (Enz ve ark., 1993).

Kolinerjik sistem, nörotransmitter asetilkoline (ACh) dayanır. ACh ilk olarak 1920'lerde Loewi tarafından tanındı ve santral ve periferik sinir sistemleri her ikisinde de yaygın olarak kullanılır (McCormick, 1989). Bu nedenle en etkili tedavilerden biri, hastalığın başlangıç evresinde önemli ölçüde azalan asetilkolin seviyelerini arttırmaya çalışan yaklaşımlardır. Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri, asetilkolini yıkan bir enzim olan AChE ile etkileşime girerek çalışır.



Şekil 2.4. Kolinesteraz inhibitorleri ve etki mekanizmaları (Mukherjee ve ark., 2007)

Beyindeki ACh seviyesini artırmak ve kolaylaştırmak için kolinerjik nörotransmisyon, ACh'nin parçalanmasında rol alan kolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla yapılır. Kolinesteraz inhibitörleri (ChE), ACh'nin parçalanmasından sorumlu olan enzimleri (asetil ve bütiril-kolinesteraz) inhibe ederek etki eder, bu nedenle sinaptik boşlukta kullanılabilirliğini arttırır. AD'li veya diğer bunama biçimli hastalarda ACh seviyesinin artması veya restorasyonu, bu hastalarda semptomatik tedavi sağladığı görülmektedir (Giacobini, 2004). Alzheimer hastalığının primer histopatolojik lezyonları amiloid plaklar, nörofibril oluşumu ve nöron kaybıdır. Bu nedenle, geçmiş yıllarda amiloid plak toplanmasına ve toksisitesine karşı koyma kabiliyetleri bakımından çok çeşitli doğal ve sentetik moleküller araştırılmıştır (Cheng ve ark., 2013).

Şu anda, FDA tarafından onaylanan AD'nin semptomatik tedavisinde kullanılan dört reçeteli ilaç vardır (Guzior ve ark., 2015). Bunlar: donepezil, galantamin, memantin ve rivastigmin şeklindedir.

2.2.1.2. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar, ACh'nin hidrolizini katalize eden bir enzim ailesidir. Kolinesterazlar ikiye ayrılır: asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7.) ve bütirilkolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8) (Ollis ve ark., 1992). Asetilkolin, birinci olarak asetilkolinesteraz (AChE) ve ikinci olarakda AD'nin patolojisinde rol oynadığı düşünülen butirilkolinesteraz (BChE) tarafından inhibe edilmektedir (Hebert ve ark., 1995).

AD'deki ana nörokimyasal eksiklik, ACh'nin azalmış seviyesidedir. Bundan dolayı mantıklı bir yaklaşım, kaybedilen asetilkolinin yerine yenisiyle doldurulması veya Parkinson hastalığı hastalarındaki dopamin replasman tedavisine benzer güçlendirme tedavileri uygulanmasıdır. Bununla birlikte ACh öncüleri ve kolinerjik reseptör agonistleri klinik çalışmalarda kullanılmış, ancak etkinlik eksikliği veya yan etkileri için terk edilmiştir (Patel, 1995; Bodick ve ark., 1997). AD'nin erken evrelerinde kolinesteraz inhibitör tedavisinin başlatılması tercih edilir. Korunmuş bilişsel işlevi olan hafif AD'li hastalarla aynı zamanda bilişsel durumu belirgin bir şekilde kötüleşen tedavi edilmeyen hastalar karşılaştırıldığında, kolinesteraz inhibitörü olan rivastigmin ile yapılan 12 aylık tedaviden sonra olumlu sonuçlar gözlenmiştir (Almkvist ve ark., 2004).

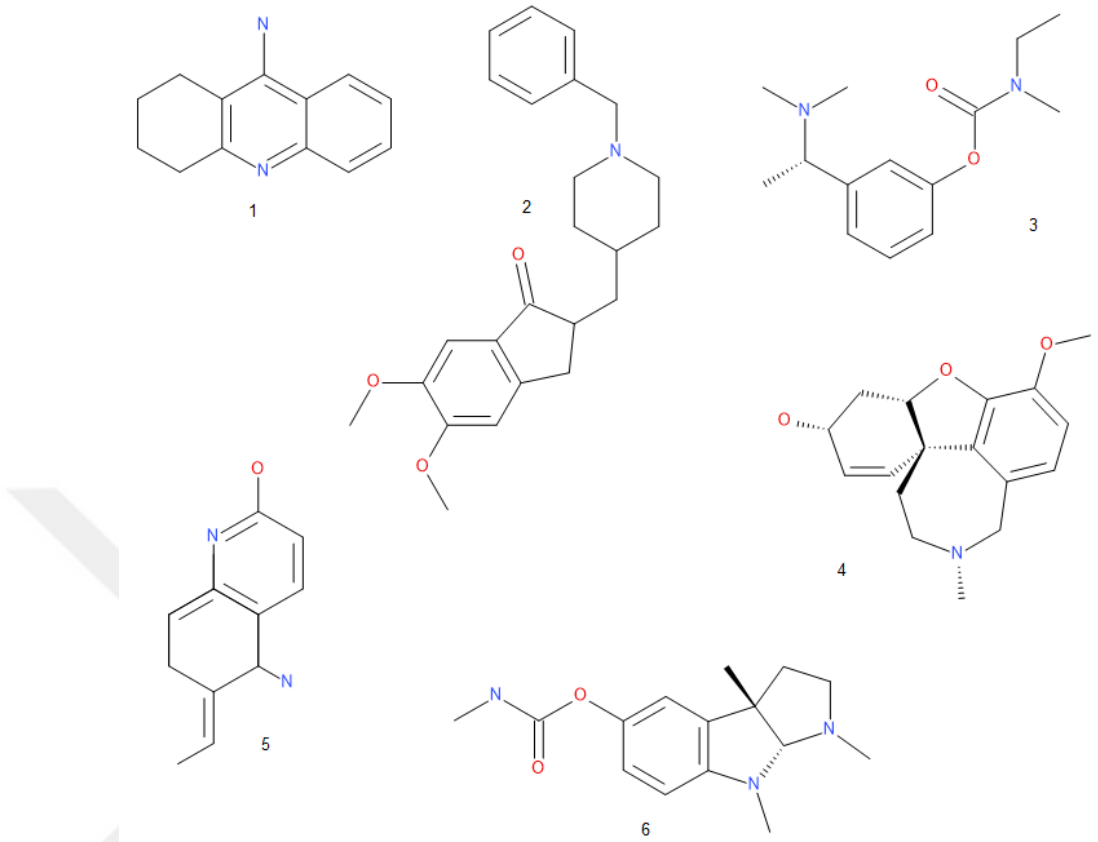
BChE plazma kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak bilinir. BChE, yapay substrat butirilkolin içerdiği için bu şekilde adlandırılır. BChE asetilkolini hidrolize edebilir, ancak bu AChE'den çok daha yavaş olabilmektedir. BChE eksikliği olan bireyler genellikle hastalık belirtisi olmaksızın sağlıklıdır (Manoharan ve ark., 2007). BChE temelde glial hücrelerde, ayrıca plazma ve karaciğerde de bulunmaktadır (Thompson ve ark., 2004).

BChE inhibitörlerine asetilkolin parçalanmasında muhtemelen AChE'ye göre daha az ilgi duyulduğu gözlenmektedir. BChE inhibitörlerinin fizyolojik rolleri iyi tanımlanamamıştır, bu da onu zor hale getirir ve olası olumsuz etkilerini tahmin etmeyi gerektirmektedir (Birks, 2006). BChE inhibitörleri son zamanlarda AD için potansiyel ilaçlar olarak da araştırılmaktadır (Giacobini, 2001).

2.2.1.3. Kolinesteraz enzim inhibitörleri

Kolinesteraz inhibitörü, hafif veya orta şiddetteki AD tedavisi için düşünülen planın bir parçası olarak kullanılan bir ilaç grubudur. En çok kullanılan üç enzim inhibitörü donepezil, rivastigmin ve galantamindir (Şekil 2.5). Enzimatik fonksiyon kaybı ve bozulma, hafıza kaybı ve diğer bilişsel bozulmalarla sonuçlanan nöropsikiyatrik semptomlar gibi bilinmeyen fonksiyonlar da oluşmaktadır. Bu inhibitör tedavileri aynı

zamanda, antidepresan ve antipsikotik tedavileri modüle etmek için de kullanılır (Bartus ve ark., 1982; Cummings ve Back, 1998).



Şekil 2.5. 1)Takrin 2)Donepezil 3)Rivastigmin 4)Galantamin 5)Huperzine A 6)Fizostigmin Asetilkolinesteraz enzim inhibitörlerinin sentetik (1-3) ve doğal (4-6) inhibitörlerinin örnekleri (Barbosa Filho ve ark., 2006)

AD'de kullanım için onaylanmış birçok ilaç sınırlı terapötik etkinliğe sahiptir. Zayıf biyoyararlanımdan dolayı uzun süreli tolere edilebilirlik, hepatotoksisite, baş dönmesi, ishal, mide bulantısı ve kusma gibi yan etkilere yol açtığı bilinmektedir. Takrin, AD'yi tedavi etmek için onaylanmış ilk kolinesteraz inhibitörü ilacı olsada, hepatotoksisitesi nedeniyle artık kullanımı tavsiye edilmemektedir (Watkins ve ark., 1994; Lou ve ark., 2015). Şu anda, AD'nin ilerlemesini tedavi eden, geciktiren veya durdururan herhengi bir ilaç yoktur. AD'nin karmaşık ve heterojen etiyolojisi nedeniyle, tek hedef molekül veya "tek bir ilaç tek hedef" yaklaşımı AD tedavisinde yarar açısından sınırlı terapötik etki sunar (Tariot, 2006).

Donepezil oldukça güçlü ve son derece seçici olan bir AChE inhibitörüdür. Takrin ve donepezil sentetik ilaçları AD ile ilişkili bilişsel işlev bozukluğu ve hafıza kaybı tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu bileşiklerin düşük biyoyararlanım ve

gastrointestinal rahatsızlık gibi bazı olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Oh ve ark., 2004). Rivastigmin, preklinik biyokimyasal çalışmalarda önemli bir sinir sistemi seçiciliği gösteren önemli bir karboküle edici, yalancı geri dönüşümlü asetilkolinesteraz inhibitörüdür (Racchi ve ark., 2004). İncelendiğinde bu ilaç bulantı, kusma, iştahsızlık ve bağırsak hareket sıklığı gibi yan etkiler göstermektedir (Feldman ve ark., 2007).

Uzun etkili, seçici, geri dönüşümlü ve rekabetçi bir AChE inhibitörü olan Galantamin, AD tedavisinde daha etkili olduğu ve daha az sınırlamaya sahip olduğu düşünülmektedir (Rhee ve ark., 2001). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hasarınların Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere birçok hastalığa katkıda bulunan bir faktör olduğu bilinmektedir (Giordani ve ark., 2008). Galantamin, ROS temizleyicidir ve oksidatif nöronal hasarı azaltarak nöroprotektif etkiler uygulamaktadır (Egea ve ark., 2012). Bu ilaçla ilişkili en yaygın yan etkiler bulantı, kusma, ishal, anoreksiya ve kilo kaybıdır (Hickey ve Bourgeois, 2011).

Bitkiler, yeni aktif bileşik arayışında oldukça zengin hammaddelerdir. Birçok sentetik ilaç tamamlayıcı olarak bitkisel kökenlidir. Dünyadaki en yaygın ölüm nedenlerinden biri olan AD, halk sağlığına yönelik bir tehdit haline geldiğinden, tıbbi bitkilere dayalı yeni tedavi stratejileri üzerinde durulmaktadır (Howes ve ark., 2003; Orhan ve ark., 2004). Bitki kaynaklarından AChE inhibitörleri ve farklı yapısal özelliklere (terpenoitler, steroller, flavonoidler ve fenolik bileşikler, vs.) sahip bileşikler anti-Alzheimer ajanları olarak umut verici kabul edilmiştir (Houghton ve ark., 2006; Orhan ve ark., 2009). Bu bağlamda Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılacak yeni kaynakların keşfedilmesi ve araştırılması oldukça önemlidir.

2.2.1.4. Bazı doğal kolinesteraz inhibitörleri

Doğa biyolojik ve kimyasal çeşitliliğin zengin bir kaynağıdır. Doğal ürünlerin benzersiz ve karmaşık yapıları kimyasal sentez ile kolayca elde edilemez. Dünyadaki bir dizi bitki geleneksel tıp ilaçlarında kullanılmıştır. Huperzin A, 1986 yılında Çin tıbbı *Huperzia serrata'*dan (Thumb.) izole edilen doğal bir bileşiktir, AChE'nin güçlü, geri dönüşümlü ve seçici bir inhibitörüdür. Huperzin A yüksek seçiciliğe sahiptir ve butirilkolinesteraz üzerinde neredeyse hiçbir etkisi yoktur. Çin'de, huperzin A, Alzheimer tedavisi için bir ilaç olarak onaylanmıştır (Högenauer ve ark., 2001).

Kolinesteraz inhibitörlerinden birkaçı doğal ürünlerden elde edilmektedir. Azot içeren bileşiklerin alkaloitleri genellikle AChE ve BChE'nin güçlü bir inhibisyonuna sahiptirler. İzokinolin alkaloitleri güçlü anti-AChE aktivitesi gösterirler ve bu sınıfın en ünlü anti-AChE örneği galantamindir. Üç onaylı kolinesteraz inhibitöründen biri olan

Galantamin, kardelenden (*Galanthus* spp.) izole edilmiştir (Heinrich ve Teoh, 2004). Fizostigmin kolinesteraz inhibitörü, bir çeşit fasulyeden (*Physostigma venenosum*) izole edilmiştir (Zhao ve ark., 2004). Fizostigmin enzimatik deneylerde referans bir bileşik olarak kullanılır. Bununla birlikte, Alzheimer hastalarını tedavi etmek için bir fizostigmin karbamat analoğu olan rivastigmin kullanılır (Polinsky, 1998).

Bitkisel bileşiklerin en önemli gruplarından olan fenolik bileşiklerinde yapılan çalışmalarda kolinesteraz inhibisyon potansiyeline sahip olduğu ve Alzheimer hastalığından tedavisinde oldukça umut verici bileşikler oldukları rapor edilmiştir. Bu noktadan hareketle özellikle şimdiye kadar araştırılmamış bitki örneklerinin bu potansiyellerinin değerlendirilmesi büyük insan kitlelerini etkileyen hastalıkları kontrol altına almada bize yeni bileşikler sağlayabilir (Jayasena ve ark., 2013).

2.2.2. α-amilaz ve α-glukozidaz inhibitör aktivitesi ve Diabetes mellitus

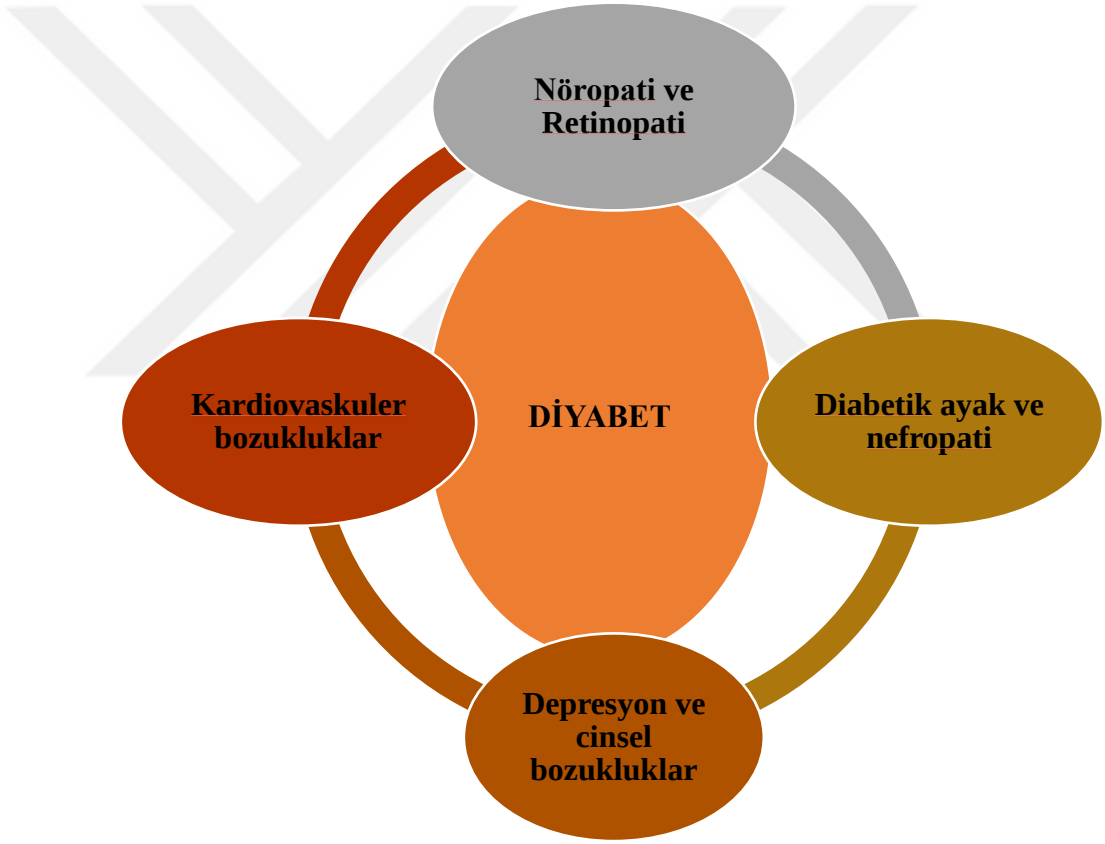
Diabetes mellitus, vücut yeterince insülin üretemediğinde veya insülini etkin bir şekilde kullanamadığı zaman oluşan, dengeli hiperglisemiye (yüksek kan şekeri konsantrasyonu) yol açan bir metabolik bozukluktur (Berezin ve ark., 2018). Diyabet klinik olarak hiperglisemi (yüksek kan şekeri konsantrasyonu) ve kronik rahatsızlık nedeniyle karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması ve / veya insülin salgılanmasında ve eyleminde nispi yetersizlik ile karakterize edilir (Bastaki, 2005).

Şu anda Dünya çapında 451 milyondan fazla kişi diyabetten şikayetçi ve Uluslararası Diyabet Federasyonu bu sayının artacağı konusunda uyarılar yapmaktadır ve 2045 ile bu sayının yaklaşık 693 milyon olacağı düşünülmektedir (Cho ve ark., 2018). Orta ve düşük gelirli ülkelerde şu andaki durumda küresel prevalansı yetişkinler arasında % 8.5 olarak hesaplanmıştır ki bu sayının daha hızlı artacağı düşünülmektedir (Mathers ve Loncar, 2006).

Diabetes Mellitus; tip 1 diabetes mellitus (T1DM) ve tip 2 diabetes mellitus (T2DM) olarak sınıflandırılmıştır. T2DM'nin bireylerin yaklaşık % 95'ini oluşturduğu gözlenmiştir (Thomas ve Philipson, 2015). Tip 1 diyabet (T1DM) veya insüline bağımlı diabetes mellitus, vücudun yeterli insülin üretmemesinden kaynaklanır. T1DM' nin kesin mekanizması bilinmemektedir ve dolayısıyla bunun için bilinen bir önleyici tedbir bulunmamaktadır. Öte yandan, Tip 2 diyabet (T2DM) veya insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus genellikle glukoz homeostazını korumak için salınan insülinin yetersizliği veya etkin kullanılmaması ile karakterizedir (Kahn ve ark., 2006). T2DM

varlığı birçok komplikasyon sayısında artışa neden olabilmektedir (Forbes ve Cooper, 2013).

T2DM esas olarak insülin direnci, β hücre disfonksiyonu ve yüksek hepatik glikoz çıkışı ile karakterizedir (Zhou ve ark., 2017). Kronik hiperglisemi, T2DM'nin sonucu olarak retinopati, nefropati, nöropati, ateroskleroz ve kalp hastalıkları gibi ciddi komplikasyonlar ortaya çıkarır (Danaei ve ark., 2011; Forbes ve Cooper, 2013). Ayrıca, T2DM depresyon hastalarında yüksek morbiditeye neden olabilir (Semenkovich ve ark., 2015) , cinsel işlev bozukluğuna da sebebiyet verir (Tamler ve Deveney, 2010). Tedavi edilmeyen bir diyabet hastalığı insan vücudunun birçok yerinde komplikasyonu beraberinde getirir. Gözleri, sinirleri, böbrekleri ve kan damarlarını etkiler ve hatta erken ölüme yol açar (Forbes ve Cooper, 2013).



Şekil 2.6. T2DM'nin akut ve kronik komplikasyonları (Labazi ve Trask, 2017)

Sağlık sistemi olarak tip 2 diabetes mellitus (T2DM) kronik hastalar ve aileleri için de pahalı bir hastalık haline gelmektedir (Domingueti ve ark., 2016). Tip 2 diyabetin artan küresel prevalansı glukoz konsantrasyonlarını normale yakın tutmak, hiperglisemiyi tedavi etmek ve mümkün olduğunca komplikasyonların gelişmesini önlemek için birçok yeni yaklaşımın gelişmesini gerektirmektedir (Kahn, 2014).

T2DM'yi yönetmek için uygulanan kilo kaybı ve yaşam tarzı değişiklikleri kısmen hiperglisemiyi baskılayabilmektedir (Franz ve ark., 2015). İnsülin tedavisi ile birlikte anti-diyabetik özelliklere sahip ilaçlar, uygun diyet ve egzersizler, diyabet tedavisinde ana yaklaşım olarak kalır. Bununla birlikte, mevcut farmasötik tedaviler ve bunların uzun süreli kullanılmaları ile toksik yan etkileri olduğu gözlenmektedir (Hollander, 2007). Yaygın olarak tüketilen bitki bazlı gıdalarda bulunan fenolik bileşikler son zamanlarda diyabete karşı koruyucu bileşikler olarak dikkat çekmektedir (Perera ve Handuwalage, 2015).

Diyabette reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesindeki artış enzimatik savunma mekanizmasında tahribata neden olabilir. Bu antioksidan enzimlerin seviyesi, çeşitli dokuların oksidatif strese duyarlılığını kritik bir şekilde etkiler ve diyabette komplikasyonların gelişimi ile ilişkilidir (Cooper ve ark., 2001). Oksidatif stres sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu DNA hasarı, organel hasarı ve hücre disfonksiyonuna sebep olur (Kim ve ark., 2014; Maiese, 2015).

İnsülin antidiyabetik tedavi protokolleri ana birimini oluşturur. Bu tedaviler doğal olabilir yada sentetik olarak hazırlanmaktadır. Tip 1 diyabetin tedavisi için insülin esastır ancak tip 2 diyabet, sekresyon veya düşük glikoz seviyeleri için insüline yardımcı olan ilaçlar gerektirir Ancak bu ilaçlara ömür boyu gereksinim duyulduğu için yan etkileri insan vücuduna tehdit oluşturur. Antidiyabetik ilaçlar enjekte edilebilir veya oral olarak alınabilir (Caicedo, 2013; Shah ve ark., 2016). Hastalar T2DM tedavisinde genel olarak oral ilaç tedavisini tercih ederler; Böylece, oral hipoglisemik ajanlara olan talepte gün geçtikçe artmaktadır (Brietzke, 2015). Bununla birlikte, glisemik seviyeyi kontrol etmek için bazı anti-diyabetik ilaçlara ihtiyaç vardır. Ancak hipoglisemi, ödem, osteoporoz ve kalp yetmezliği de dahil olmak üzere bazı istenmeyen yan etkiler, anti-diyabetik ajanların uygulanmasında kaygılara yol açmıştır (Van Staa ve ark., 1997; Ghosh ve Parida, 2016). Böylece, hiperglisemi, hiperinsülinemi ve hipertrigliseridemi kontrol etmek için yeni anti-diyabetik adaylar geliştirmek gereklidir.

2.2.2.1. Sentetik antidiyabetik ajanlar

Günümüzde klinikte kullanımı devam eden anti-diyabetik sentetik ilaçların kullanılabilirlikleri oldukça sınırlıdır. Çok sayıda kanıt, bitkisel ilaçların ve aktif bileşenlerinin, daha az toksisite ve daha az yan etki ile anti-diyabetik özelliklerde olduğunu göstermektedir (Xu, 2018).

Diyabet tedavisi için terapötik bir yaklaşım, tokluk kan şekerini azaltmaktır. Bu, glikozun sindirimini ve emilimini, sindirim sisteminde α- glukosidaz ve α- amilaz gibi

karbonhidrat hidrolize edici enzimlerin inhibe edilmesi yoluyla geciktirmek ve azaltmak suretiyle yapılır. Bu enzimlerin inhibisyonu, karbonhidratların sindirimini geciktirerek, glikoz emilim oranında bir azalmaya neden olur (Rabasa-Lhoret ve Chiasson, 2004). Kan glukozunun stabilizasyonu, hiperglisemiyi ve diyabetle ilişkili komplikasyonları önler (Mai ve Chuyen, 2007).

α-Amilaz, nişasta ve glikojen, glukoz ve maltoz dahil olmak üzere büyük, α-bağlı polisakkaritlerin α- bağlarını hidrolize eden bir enzimidir (EC 3.2.1.1) (Ramasubbu ve ark., 1996). α-Amilazın inhibisyonu karbonhidrat sindirimini geciktirir ve genel karbonhidrat sindirim süresini uzatır ve dolayısıyla glukoz emme hızında bir azalmaya neden olur (Rabasa-Lhoret ve Chiasson, 2004). Nişasta parçalanmasını ve absorpsiyonu önleme yetenekleri nedeniyle, α-amilaz inhibitörleri insanlarda kilo kaybı için de kullanılmaktadır (Bailey, 2003).

α-Glukosidaz (α-D-glukozit glukohidrolaz), mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvan dokularında yaygın olarak dağıtılan ekzo tip bir karbonhidrazdır (Skeggs ve ark., 1956). Oligosakkaritlerin hidrolitik bölünmesini ve dolayısıyla emilebilir monosakaritlere dönüşümünü katalize ederek ince bağırsakta glukozun emilimini kolaylaştırmaya çalışan bir enzimdir (Baig, 2002). α-glukosidazın temel rolü, yalnız bir α- glukoz molekülünü serbest bırakmak için indirgeyici olmayan α-(1-4) bağlı glikozu hidrolize etmektir (Mehrani ve Storey, 1993). 1960'lardan bu yana, glikoz emiliminin geciktirilmesi ve kan glukoz seviyelerinin düşürülmesi yoluyla diyabet tedavisi için güçlü glukosidaz inhibitörlerinin keşfedilmesini amaçlayan glukozidaz inhibisyonu çalışmalarına önemli çabalar sarfedilmiştir (Yang, 2015).

Antidiyabetik ilaçlarla ilgili sorunlar yüksek maliyet, daha az kullanılabilirlik, uzun süreli gereksinim duyulması ve kullanıma bağlı oluşan yan etkilerdir. Antidiyabetik ilaçlar gastrointestinal, kardiyovasküler, idrar, hematopoetik, sinir sistemi ve cildi etkilemektedir. Bununla birlikte, α-glukozidaz inhibitörleri gaz şişkinliğine ve ishale neden olur (Fisman ve ark., 2008; Stein ve ark., 2013). Akarboz ve vigliboz şu anda α-amilaz ve α-glukosidaz inhibitörleri olarak sıkça kullanılır, ancak hipotansiyon, şişkinlik, gaz ve ishal gibi yan etkilere neden olmaktadır (Chakrabarti ve Rajagopalan, 2002). T2DM'yi tedavi etmek için giderek daha fazla doğal ürünler üzerine uygulama araştırılmaktadır (Xie ve Du, 2011; Pang ve ark., 2014). Antidiyabetik ilaçlar için, bugün bile alternatif tedavi ve ilaç geliştirme alanlarında daha yeni gelişmeler ve yenilikler için araştırmalarının yapılmasını gerekli kılmaktadır.

2.2.2.2. Doğal antidiyabetik ajanlar

Bitkisel kaynaklar hem profilaktik hem de diyabetin terapötik yönetimi için kullanılmaktadır. Polifenoller α-glukosidaz inhibitörlerinin aktif bir sınıfı olarak, glukosidaz inhibisyonunun etki mekanizmalarını anlamak, diyabet ve obeziteyi önlemek ve tedavi etmek için alternatif ilaçlar geliştirmek için büyük ilgi çekmektedir. Polifenoller geleneksel Çin tıbbında kullanılan şifalı bitkilerin aktif ilkeleri olarak bir dizi sağlık yararı ile de ilişkilidir ve α-glukozidazların inhibisyonu yoluyla kan glukoz seviyelerini düzenleyebilir (Soobrattee ve ark., 2005; Cohen ve Kennedy, 2010; D'Archivio ve ark., 2010; Rastija ve ark., 2012). Yaygın olarak tüketilen bitki bazlı gıdalarda bulunan fenolik bileşikler son zamanlarda diyabete karşı koruyucu bileşikler olarak dikkat çekmektedir (Perera ve Handuwalage, 2015).

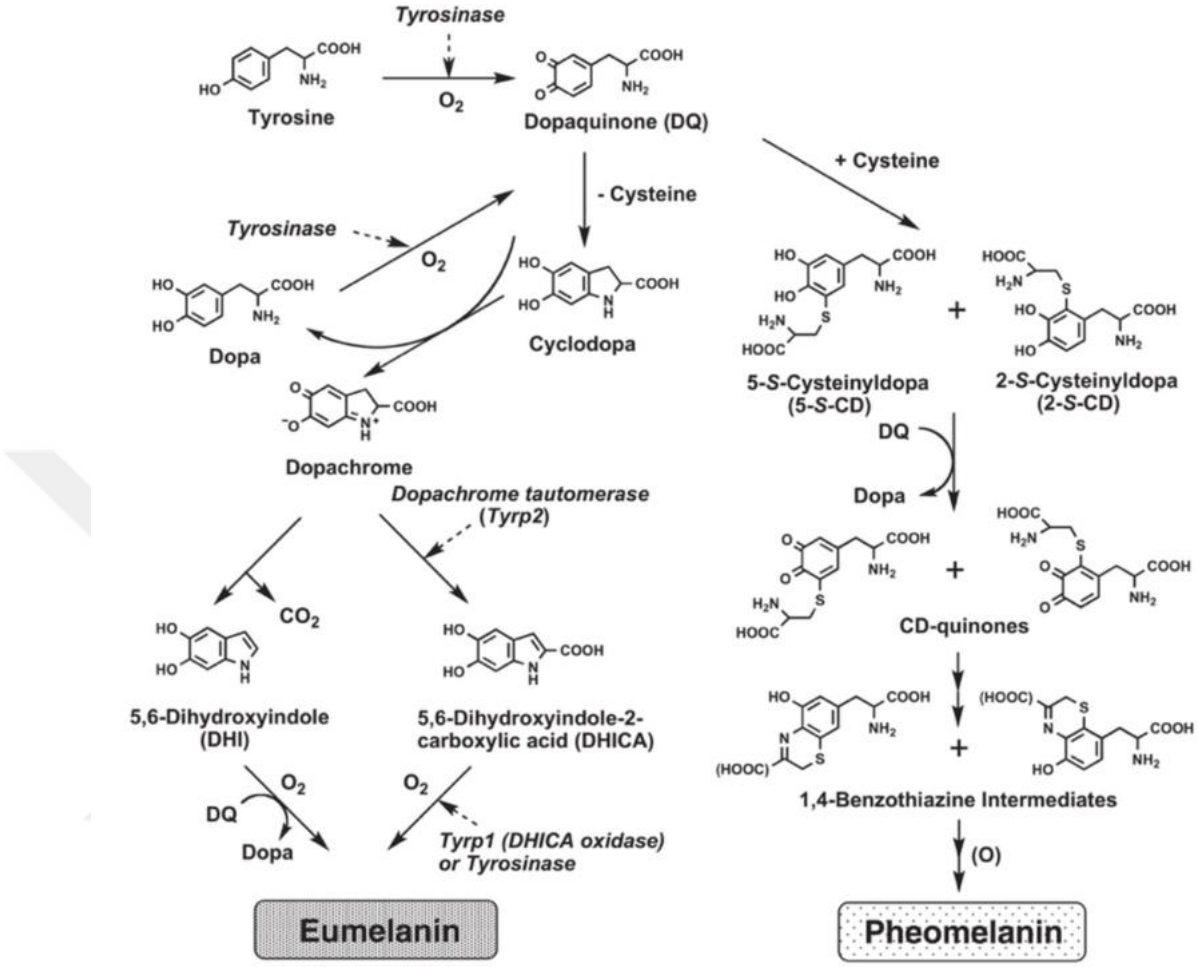
2.2.3. Tirozinaz inhibitör aktivitesi ve deri hastalıkları

Günlük yaşamımız içerisinde ultraviyole (UV) ışınlarına uzun süre maruz kalmak cilt üzerinde bir çok hasara sebep olmaktadır. Sürekli UV ışınlaması DNA hasarına, gen mutasyonuna, kanser gelişimine ve bağışıklık sisteminin bozulmasına veya yaşlanmaya neden olabilir (Yang ve ark., 2006). Melanin, cilt renginden sorumlu bir pigment olup UV ışınlarının hasarına karşı cildin korunmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Melanin insanlar haricinde mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlara kadar birçok canlıda bulunan önemli pigmentlerden birisidir. Melanosit adlı hücrelerde üretilerek melanozomlarda depolanmakta ve keratinosit adlı hücrelerin çekirdekleri üzerinde bulunmaktadır. Cildi, güneş ışınlarını absorbe ederek ve reaktif oksijen türlerini (ROS) uzaklaştırarak fotokarsinojeneze karşı korumaktadırlar (Briganti ve ark., 2003; Gupta ve ark., 2006).

Melanin cilt, saç ve göz renginin birincil belirleyicisidir ve insan derisi homeostazisinde, toksik ilaçların ve kimyasalların temizlenmesi gibi önemli savunma rollerinide üstlenmektedir (Videira ve ark., 2013). Melanojenez, enzimatik ve kimyasal katalizli reaksiyonların bir kombinasyonunu içeren karmaşık bir yoldur. Melanositler iki tip melanin üretmektedir: sistein veya glutatyonun eşlenmesinden oluşan eumelanin (kahverengi-siyah) ve pheomelanin (kırmızı-sarı) (Slominski ve ark., 2004; Pillaiyar ve ark., 2015).

Melanojenez, L-tirozinin dopakinona (DQ) oksidasyonu işlemin anahtar enzim olan tirozinaz tarafından başlatılır. Elde edilen kinon, eumelanin ve pheomelanin sentezi için bir substrat görevi görmektedir. Dopakinon oluşumu melanin sentezinde hız

sınırlandırıcı bir adımdır, çünkü reaksiyon dizisinin geri kalanı fizyolojik olarak kendiliğinden gelişebilmektedir (Hearing ve Jiménez, 1987; Halaban ve ark., 2002).



Şekil 2.7. Melanogenez reaksiyonları

Melanin biyosentezi L-tirozin veya L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA)'dir. L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonu hem eumelanin hem de pheomelanojenik yollar için ortaktır (Videira ve ark., 2013). Melanositlerin fonksiyonlarının bozulması sonucu melanin biyosentezinde değişiklikler meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak hiperpigmentasyon veya depigmentasyon denilen durumlar ortaya çıkmaktadır. Melanin pigmentasyonunun aşırı düzeyleri, hiperpigmentasyon içeren yaşa bağlı lentigo, melazma, postinflamatuvar melanoderma, çil ve yaşlılık lekeleri gibi estetik sorunları da beraberinde getiren çeşitli dermatolojik bozuklukları oluşturmaktadır (Curto ve ark., 1999; Briganti ve ark., 2003).

Tirozinaz ilk olarak Bourquelot ve Bertrand tarafından 1895 tarihinde mantardan izole edilmiştir (Bourquelot ve Bertrand, 1895). Tirozinaz (EC 1.14.18.1), çok fonksiyonlu bakır içeren bir enzimdir. Bu enzim hem monofenolaz aktivitesine hem de di fenolaz aktivitesine sahiptir (Cooksey ve ark., 1997). Tirozinaz sadece melanosit hücreleri tarafından üretilmektedir. Endoplazmik retikulum ve Golgi üretimi sonucunda işleme tabi tutulduktan sonra, melanozomlarda pigment melanin sentezlenir. Yapısal açıdan bakıldığında, iki bakır iyonu tirozinazın katalitik aktivitesinden sorumlu olan üç histidin artıkları ile çevrilidir (Matoba ve ark., 2006; Bijelic ve ark., 2015).

Tirozinaz gıda endüstrisinde meyve ve sebzelerin kalitesini ve raf ömrünü kontrol etmede çok önemli bir enzimdir (Mayer, 1986; Friedman, 1996). Tirozinaz, fenolik oksidasyonu katalize eder ve kinonlara karşılık gelen bileşikler meyve ve sebzelerin enzimatik esmerleşmesinden sorumludur. Bu açıdan tirozinazı inhibe eden bileşikler ekonomik anlamda da değerlidir.

Bilinen anti-melanogenez ajanlarının çoğunluğu doğal ve sentetik kaynaklardan elde edilen tirozinaz inhibitörleridir. Tirozinaz inhibitörleri pigmentasyon bozuklukları önlemek ve tedavi etmek için kullanılan tıbbi ve kozmetik ürünler açısından giderek daha önemli hale gelmiştir (Mosher ve ark., 1983; Maeda ve Fukuda, 1991).

2.2.3.1. Sentetik tirozinaz inhibitörleri

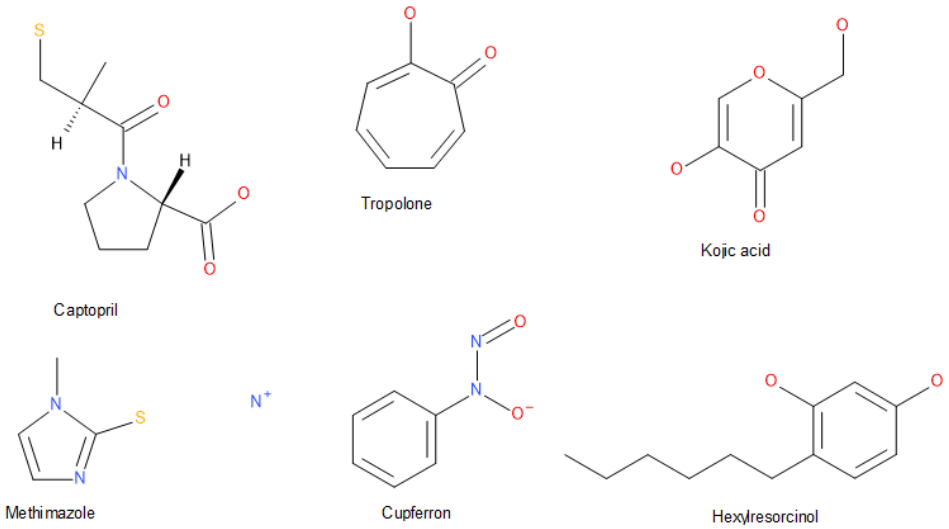
Hidrokinon ve kojik asit deri hastalıkları tedavisinde en çok kullanılan sentetik anti tirozinaz inhibitör örnekleridir.

Bu sentetik inhibitörlerin uzun süreli kullanımından kaynaklı çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Hidrokinon, memeli hücrelerine potansiyel olarak mutajeniktir ve ayrıca kontakt dermatit, tahriş, geçici eritem, yanma, karıncalanma hissi, lökoderma, tırnaklarda kestane lekeleri, hipokrom ve sarkoz dahil olmak üzere bir dizi ters reaksiyonla ilişkilidir (Engasser, 1984; Curto ve ark., 1999). Uzun süreli kullanımdan kaynaklanan kalıcı depigmentasyon gibi yan etkiler nedeniyle hidrokinon kozmetiklerde çoğu ülke tarafından yasaklanmıştır (Xiaoying ve ark., 1998). Hidrokinonun ön ilacı olan Arbutin, doğal bir üründür ve tirozinazı inhibe ederek melanin sentezini azaltır veya inhibe eder. Bununla birlikte, doğal arbutin formları kimyasal olarak kararsızdır ve kemik iliği kanseri için potansiyel toksisite etkisine sahiptir (Zhou ve ark., 2009).

Kojik asit, cilt beyazlatıcı bir kozmetik olarak kullanılan ayrıca gıda sektöründe de kullanılan enzimatik esmerleşmenin önlenmesini sağlayan yavaş bağlayıcı bir tirozinaz inhibitördür (Burdock ve ark., 2001; Bentley, 2006). Kojik asit Cu^{+2} ve Fe^{+3} gibi metal iyonlarının geçişi için bakır şelatörü olarak davranır ve monofenolaz aktivitesi ve

mantar tirozinazının difenolaz aktivitesi ürün üzerindeki rekabetçi engelleyici etkiyi gösterir. Ancak onun kozmetiklerde kullanımı, ışık altındaki kararsızlığı nedeniyle sınırlı hale gelmiştir (Kahn ve ark., 1997; Kim ve Uyama, 2005).

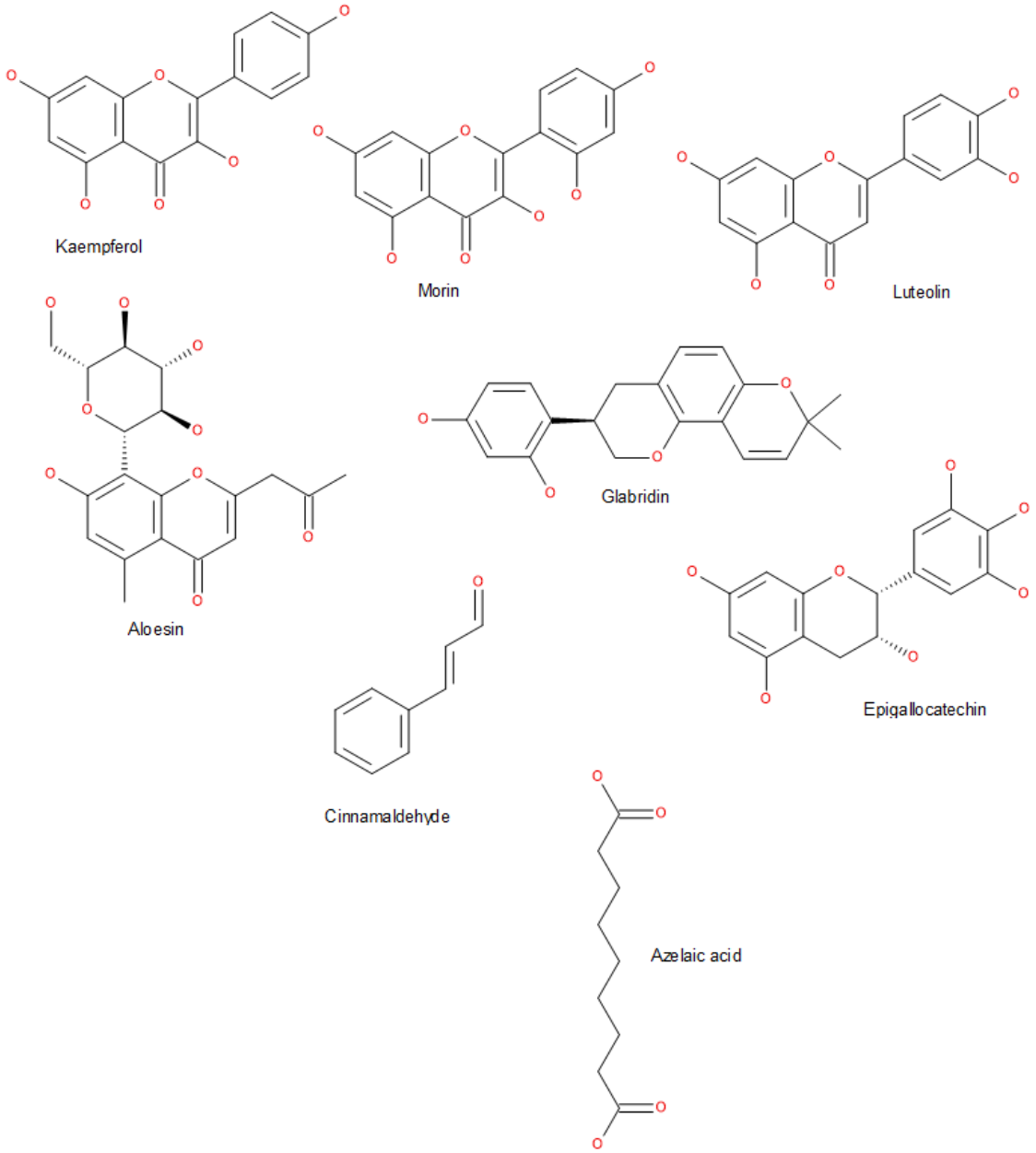
Tropolon (2-hidroksi-2,4,6-sikloheptatrien), bugüne kadar test edilen tüm inhibitörler arasında en güçlü tirozinaz inhibitörlerinden biridir (Kahn ve Andrawis, 1985).



Şekil 2.8. Tirozinaz inhibitörlerinin sentetik kaynaklardan ve doğal bileşiklerin türevlerinden yapıları (Kim ve Uyama, 2005)

2.2.3.2. Tirozinaz inhibitörleri olarak bitki polifenolleri

Bitkiler, bakteriler ve mantarlar da dahil olmak üzere son zamanlarda doğal kaynaklardan üretilen anti-tirozinaz aktivitesi olan biyoaktif bileşikler yer almaktadır. Gıda, kozmetik ve tıbbi uygulamalar için daha az toksisitesi sahip ve daha iyi biyoyararlanımı olan doğal kaynaklardan gelen inhibitörler oldukça önemlidir. Bitki polifenolleri genellikle çok yölü fonksiyonlara sahip bir bileşik grubu olarak adlandırılır (Tückmantel ve ark., 1999). Yapılan çalışmalarda fenolik bileşikler tirozinaz inhibisyonu noktasında oldukça önemli aktiveteler sergiledikleri belirlenmiş ve bu sayede sentetik inhibitörlerin yerini alacak doğal ve güvenilir anti-tirozinaz ajanları raporlanmıştır. Şekil 2.9'da bazı doğal tirozinaz inhibitörlerinin yapıları verilmiştir.



Şekil 2.9. Doğal kaynaklardan gelen tirozinaz inhibitörlerinin yapıları (Kim ve Uyama, 2005)

2.3. Ekstraksiyon Teknikleri

Ekstraksiyon biyoaktif bileşenleri elde etmek için fitokimyasal çalışmaların akış şemasındaki en önemli adımlardan biridir. İstenilen bileşenlerin çıkarılması için uygun bir özütleme yönteminin (çözücüler ve standart işlem ile) seçilmesi gerekmektedir (Dhanani ve ark., 2017; Chaturvedi, 2018). Geleneksel olarak sekonder metabolitler, maserasyon, süzülme, çözücü ve soxhlet özütleme gibi teknikler kullanılarak ekstraksyionları yapılır. Son on yılda, süperkritik CO_2 ekstraksiyonu, ultrason destekli

ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) gibi yeşil ekstraksiyon teknikleri, daha az zahmetli, hızlı ve geleneksel yöntemlere kıyasla ekstraksiyon verimini arttırdığı için küresel olarak hızla ilgi kazanmıştır (Sánchez-Valdepeñas ve ark., 2015; Ahmad ve ark., 2017; Dhanani ve ark., 2017). Ayrıca bu teknikler, düşük çözücü ve enerji tüketimini içerdikleri için çevre dostudur (Chaturvedi, 2018).

Ekstraksiyon, biyoaktif bileşiklerin bitkilerden ayrılması ve geri kazanılması için uygulanan bir süreçtir. Gerçek matrisi, sonraki analitik prosedür için uygun bir örneğe dönüştürür. Antik çağlardan günümüze kadar örnek hazırlarken dünya çapında çeşitli etnik gruplar tarafından kaynatma, maserasyon, demleme, sindirme ve süzme yöntemleri kullanılarak ekstrak yapılmakta ve bitkiler tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Modernleşme ve endüstriyel büyüme dönemine devam ederken, 18. yüzyılda, sindirim ve kaynatma yöntemlerinin gelişmiş bir şekli olan gelişmiş bir ekstraksiyon tekniği "Sokslet Ekstraksiyonu" keşfedildi. Bununla birlikte, Sokslet dahil bu geleneksel ekstraksiyon teknikleri, dezavantaj olarak çok miktarda solvent kullanımına sahiptir ve ayrıca etkili bir ekstraksiyon için daha uzun zaman almaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, çeşitli zaman aralıklarında ortaya konan alternatif ve geleneksel olmayan ekstraksiyon tekniklerine yönelik artan bir talep vardır. Bunlar arasında mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), süperkritik sıvı ekstraksiyon (SFE), basınçlı sıvı ekstraksiyon (PLE), ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE), darbeli elektrik alan destekli ekstraksiyon (PEF), enzim destekli ekstraksiyon (EAE) ve diğerleri sayılabilir. Bu teknikler kısa zamanlı ekstraksiyon teknikleri olarak bilinir. Zaman, çözücü hacmini düşürmesi ve düşük enerji tüketimi ile daha yüksek ekstraksiyon verimi elde etmek için oldukça basittir; bu sebeple bu teknikler 'Yeşil Ekstraksiyon' teknikleri altında sınıflandırılır (Khoddami ve ark., 2013).

2.4. Asteraceae Familyası ve *Pulicaria* cinsi

Türkiye farklı iklimlere sahip olması ve üç floristik bölgenin kesişme noktasında yer alması sebebiyle bitki türlerinin çokluğu bakımından dünyanın zengin ülkelerinden birisidir (Atalay, 1994). Türkiye florasında 63 familyaya ait yaklaşık 3000 endemik bitki türü vardır ve Türkiye florası yaklaşık % 34 civarında endemizm oranına sahiptir (Kaya ve Aksakal, 2005). Dünyada tıbbi amaçla kullanılan bitki türlerinin sayısı hakkında kesin bilgi olmayıp, tahminler 20.000 ile 70.000 arasındadır (Leaman, 2006). 1979 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan araştırma sonuçlarına göre, kullanılan ve ticareti yapılan bitkisel drogların sayısının 1.900 olduğu belirtilmektedir (WHO, 1979).

Asteraceae, en büyük çiçekli bitki ailesidir. Tahminlere bağlı olarak bu familya 22.500-30.000 tür sayısı ile tüm çiçekli bitkilerin % 10'unu oluşturmaktadır (Funk ve ark., 2009). Asteraceae familyası ülkemizde yaklaşık 133 cins, 1186 tür içermekte ve Türkiye florasının en büyük familyası olarak Asteraceae (Compositae) familyası kabul edilmektedir. Bu flora dünyada yaklaşık 1535 cins ve 23000 tür ile tohumlu bitkilerin en geniş familyaları arasındadır (Uysal, 2006).

Asteraceae familyasına ait türlerin ekolojik toleransları oldukça yüksektir ve tohumları kolayca dağılabilme yeteneğine sahip olduğundan çok geniş alanlara yayılabilmektedir. Asteraceae familyasına ait bir cins olan *Pulicaria*, Avrupa'dan Kuzey Afrika ve Asya'ya, özellikle de Akdeniz'in çevresine dağılan yaklaşık 100 tür içerir (Khan ve ark., 2013).

Pulicaria dysenterica 100 cm boyunda, sarı çiçekleri olan, nemli yerlerde yetişen çok yıllık bir bitkidir. Avrupa, Anadolu, Irak, İran, Türkmenistan, Afganistan, Pakistan, Kafkasya ve Kuzey Afrika'da yetişmektedir (Mumivand ve ark., 2010). İran'da *Pulicaria dysenterica* genellikle şiddetli sıcak çarpması, ishal, enflamatuar ve leishmaniasis (Şark Çıbanı) hastalıklarını tedavi etmek için tıbbi bir bitki olarak kullanılır (Zahabi ve ark., 2012). Bu cins içindeki çeşitli türler, iltihaplanmayı, diüretik, antihelmintik, antimikrobiyal ve antimalaryal aktivite ile bağırsak bozukluklarını tedavi etmek için geleneksel ilaç olarak kullanılır. Fitokimyasal çalışmalar fenolik türevleri, monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, flavonoidler, triterpenler, stroidler ve uçucu yağların, *Pulicaria* türlerinin bileşenleri olarak bildirmiştir (Liu ve ark., 2010).

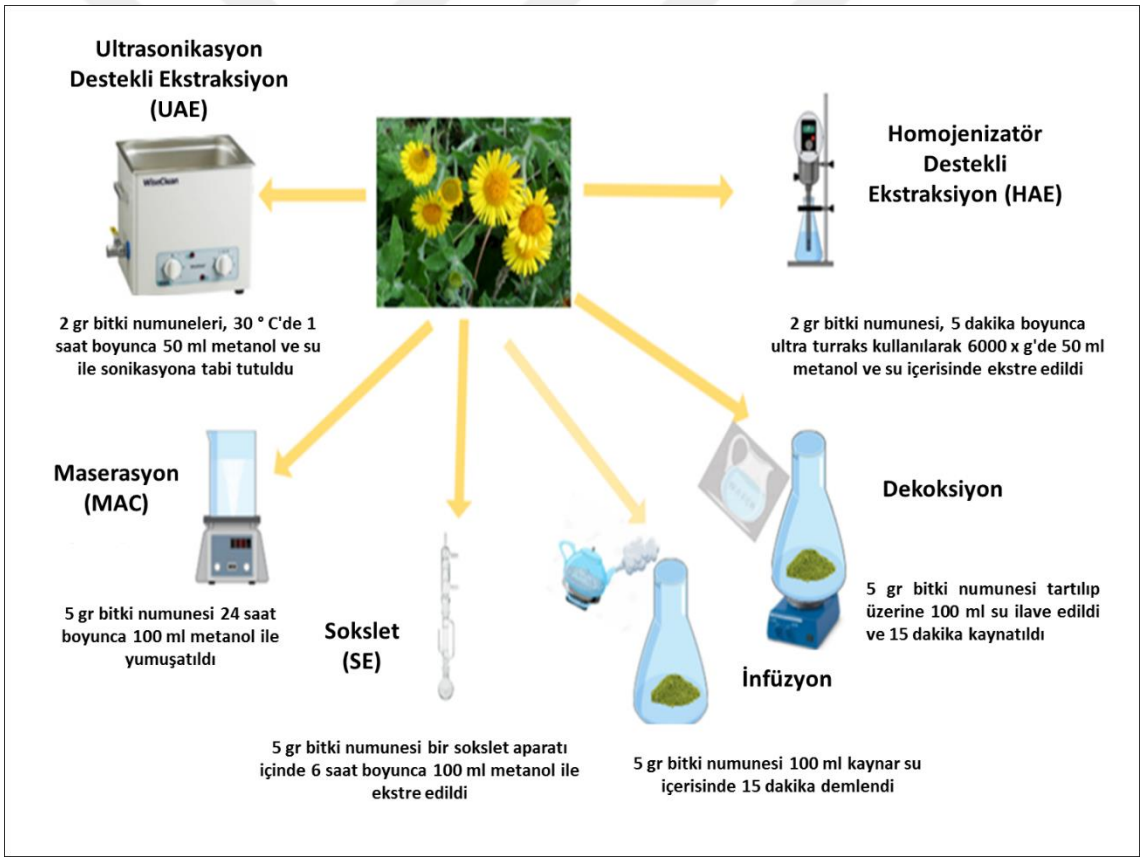
Tablo 2.3. *Pulicaria* cinsine ait bazı türlerin kullanımları

***Pulicaria* türleri**	**Tıbbi Özellikleri**	**Kaynak**
P. dysenterica	İshal ve dizanteri tedavisinde kullanılır ve böcek öldürücü özelliğine sahiptir	(Marco ve ark., 1992; Basta ve ark., 2007)
P. inuloides	Çiçek ve yaprakların baharat olarak ve bitkisel çaylarda kullanılır	(Al-Hajj ve ark., 2014)
P. incisa	Kalp hastalıklarını tedavi etmek için geleneksel bir ilaç olarak kullanılır	(Nabiel, 2003)
P. undulata	Antiinflamatuar ve çay olarak kullanımları mevcut olup böcek ilacı olarak da kullanılır	(Boumaraf ve ark., 2016)
P. gnaphalodes	Şiddetli dehidrasyon, inflamasyon için kullanılmaktadır	(Chitsazi ve ark., 2016)
P. jaubertii	İnflamasyon, ateş düşürücü ve böcek kovucu olarak kullanılmaktadır	(Ragab ve Raafat, 2016)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan *P. dysenterica* Türünün Toplanması ve Ekstraksiyon Prosedürleri

Pulicaria dysenterica örnekleri 2018 yılında Kastamonu (Hanönü)'da gerçekleştirilen arazi çalışması sırasında toplanmıştır. Bitki örneklerinin taksonomik olarak teşhisleri Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi İsmail Şenkardeş tarafından gerçekleştirilmiştir (Herbaryum No: MARE-19136). Bitki örnekleri gölgede kurutularak toprak üstü kısımları öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen bitki örnekleri aşağıda Şekil 3.1.'de gösterilen ekstraksiyon çeşitlerine farklı solventler kullanılarak tabii tutulmuştur.



Şekil 3.1. Tez kapsamında kullanılan ekstraksiyon teknikleri

3.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Deney tüplerine bitkisel özütlerden 250 µl alındı. Her bir tüpe seyreltilmiş 1 ml Folin-Ciocalteu ayracı (1:9) ilave edildi. Daha sonra tüplere 750 µl Na_2CO_3 çözeltisi (%1) eklendi ve tüpler 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Benzer işlemler gallik asit içinde yapıldı ve bu süre sonunda absorbanslar 765 nm'de ölçüldü. Toplam fenolik madde içeriği gallik asit eşdeğer (mg GAE/g) olarak değerlendirildi (Slinkard ve Singleton, 1977).

3.3. Toplam Flavonoid Madde Tayini

Toplam flavonoid içerik için %2'lik $AlCl_3$'ün metanolik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 1 ml alındı ve içinde 1 ml bitki ekstraktı bulunan tüpe aktarıldı. Tüp iyice karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu test için standard olarak rutin kullanıldı ve benzer işlemler rutin içinde yapıldı. Absorbanslar 415 nm'de ölçüldü ve sonuçlar rutin eşdeğeri (mg RE/g) olarak verildi (Berk ve ark., 2011).

3.4. Toplam Fenolik asit içeriğinin belirlenmesi

Ekstraklardaki toplam fenolik asit içerikleri Arnow metodu ile mikroplate kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle taze olarak Arnow reaktifi (%10'luk sodyum nitrit ve sodyum molibdat) hazırlandı. Ekstrakt'lardan 50 µL alındı ve üzerine 50 µL Arnow reaktifi ilave edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µL HCl (0.5 M) ve 100 µL NaOH (%8.5) eklendi. Aynı işlemler standard olarak kullanılan kafeik asit içinde yapıldı. Mikroplate 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve absorbanslar 490 nm'de kaydedildi. Sonuçlar kafeik asit eşdeğer (mg CAE/g) olarak verildi (Vladimir-Knežević ve ark., 2011).

3.5. Toplam Flavonol içeriğinin belirlenmesi

Ekstraklardaki toplam flavonol içerikleri dimetilaminosinnamaldehit (DCMA) ile mikroplate kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle taze olarak DCMA reaktifi (% 0.1 DCMA metanolde) hazırlandı. Ekstrakt'lardan 200 µL alındı ve üzerine 100 µL DCMA reaktifi ilave edildi. Aynı işlemler standard olarak kullanılan kateşin içinde yapıldı. Mikroplate 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve absorbanslar 630 nm'de kaydedildi. Sonuçlar kateşin eşdeğer (mg CE/g) olarak verildi (Quettier-Deleu ve ark., 2000).

3.6. Serbest Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

3.6.1. DPPH radikal süpürme aktivitenin belirlenmesi

Bu testte öncelikler DPPH çözeltisi (%0.004 metanolde) hazırlandı. Özütlerin 1ml'si ile hazırlanan DPPH çözeltisinin 4 ml'si karıştırıldı ve bu karışım 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Aynı işlemler standart olan troloks içinde yapıldı ve absorbanslar 517 nm'de kaydedildi. DPPH süpürme aktivitesi troloks eşdeğeri (mg TEs/g) olarak değerlendirildi (Sarikurkcu, 2011).

3.6.2. ABTS Radikal Süpürme Aktivitenin Belirlenmesi

Bu metotta öncelikle $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonu radikali hazırlandı. Bunun için 7.4 mM ABTS solusyonu ile 2.45 mM potasyum persülfat karıştırıldı ve oda sıcaklığında 12-16 saat inkübasyona tabii tutuldu. Oluşan radikalin 734 nm'deki absorbansı 0.700±0.02 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra bu karışımın 2 ml'si 1 ml bitkisel ekstrakt ile karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Standard olarak troloks kullanıldı ve absorbanslar 734 nm'de ölçüldü. Özütlerin ABTS katyon radikalini süpürme aktiviteleri troloks eş değer (mg TEs/g) olarak verildi (Re ve ark., 1999).

3.7. İndirgeme Gücünün Belirlenmesine Yönelik Testler

3.7.1. CUPRAC testi

Bitkisel özütlerden 0.5 ml alındı ve her bir deney tüpüne 3 ml CUPRAC reaktifi ilave edildi (CUPRAC reaktifi: 1 ml $CuCl_2.2H_2O$, 1 ml amonyum asetat ile 1 ml neokuproin). Ele geçen karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Standard olarak troloks kullanıldı ve absorbanslar 450 nm'de okundu. Sonuçlar troloks eşdeğeri (mg TE/g) olarak değerlendirildi (Apak ve ark., 2006).

3.7.2. FRAP testi

FRAP testini uygulamak için ilk önce FRAP reaktifi hazırlandı. Bu reaktif 0.3 M, pH 3.6 asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl3'ün 10:1:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Tüplere 0.1 ml bitkisel özüt ve 2 ml FRAP reaktifi eklendi ve karıştırıldı. Son olarak tüpler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 593 nm'de karışımların absorbansları ölçüldü. Standart olarak kullanılan troloks için de aynı işlemler

yapıldı. *P. Dysenterica* özütlerinin FRAP aktivitesi troloks eşdeğer olarak değerlendirildi (mg TE/g) (Benzie ve Strain, 1996).

3.8. Fosfomolibdat Testi

Fosfomolibdat testinde öncelikle reaktif çözeltisi hazırlandı. Reaktif çözeltisinin içeriği 0.6 M H_2SO_4, 28 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$, ve 4 mM amonyum molibdat şeklindedir. Bitkisel ekstrakların 0.3 ml'si ile reaktif çözeltisinin 3 ml'si karıştırıldı ve 95 °C'de 90 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tüpler soğutuldu ve 695 nm'de absorbansları kaydedildi. Standard olarak troloks kullanıldı ve sonuçlar troloks eşdeğeri (mmol TE/g) olarak değerlendirildi (Prieto ve ark., 1999).

3.9. Metal Şelatlama Aktivitesi

Özütlerin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi Dinis ve ark. (1994) yöntemine göre belirlendi. Tüplere 2 ml bitkisel özüt ve 2 mM 0.05 ml $FeCl_2$ çözeltisi eklendi. 0.2 ml 5 mM ferrozin eklenmesiyle tepkime başlatıldı. Tüpler karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Standart olarak kullanılan ve şelatlayıcı bir ajan olan EDTA için de aynı işlemler gerçekleştirildi. Daha sonra özütlerin 562 nm'de absorbansları ölçüldü. Metal şelatlama aktivitesi EDTA eş değer olarak değerlendirildi (mg EDTA/g).

3.10. Enzim İnhibisyonuna Yönelik Testler

3.10.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitesi (AChE ve BChE)

Özütlerin kolinesteraz inhibisyon kapasiteleri Ellman's yöntemi ile değerlendirildi (Ellman ve ark., 1961). 96 kuyucuklu mikroplakalarda gerçekleştirilen bu metotda bitkisel özüt (50 µl), DTNB (5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid) (125 µl), AChE veya BChE enzim çözeltisi (pH 8.0 Tris-HCl tamponunda, 25 µl) ile karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra 25 µl substrat çözeltileri (asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya butiriltiyokolin iyodür (BTCI)) ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen karışımların absorbansları 405 nm'de okundu. Standard olarak galantamin kullanıldı ve sonuçlar galatamine eşdeğer (mg GALAE/g) olarak değerlendirildi.

3.10.2. Amilaz inhibisyon aktivitesi

Bitkisel özütlerin amilaz inhibisyon yetenekleri Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemi ile değerlendirilmiştir (Zengin ve ark., 2014). Mikroplakalarda yapılan bu testte 50 µl örnek ile enzim çözeltisi (pH 6.9 fosfat tamponunda) 37 ºC de 10 dakika ön inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra kuyucuklara substrat çözelitisi olarak 50 µl nişasta çözeltisi (% 0.05) eklendi. Karışım 37 ºC de 10 dakika bekletildi ve reaksiyon 1 M HCl (25 µl) ilavesi ile durduruldu. Daha sonra renk ayracı olarak iyot-potasyum iyodür (100 µl) eklendi ve absorbanslar 630 nm'de okundu. Standard inhibitör olarak akarboz kullanıldı ve aktiviteler akarboza eşdeğer (mmol AKAE/g) olarak değerlendirildi.

3.10.3. Glukozidaz inhibisyon aktivitesi

Bitkisel özütlerin 50 µl'si, 50 µL α- glukozidaz çözeltisi (pH 6.9 fosfat tamponunda) ve substrat çözeltisi PNPG (4-p-nitrofenil-α-D-glukopiranozid) (50 µL) kuyucuklarda karıştırıldı ve 37 ºC de 10 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyon sodyum karbonat (0.2 M, 50 µl) ilavesi ile durduruldu. Absorbanslar 405 nm'de kaydedildi. Standard inhibitör olarak akarboz kullanıldı ve aktiviteler akarboza eşdeğer (mmol AKAE/g) olarak değerlendirildi (Palanisamy ve ark., 2011).

3.10.4. Tirozinaz inhibisyon aktivitesi

Tirozinaz inhibisyon yeteneği dopachrome metodu ile değerlendirildi ve bu metotta substrat olarak L-DOPA kullanıldı. Ön inkübasyon için bitki ekstrakları (25 µl) ve enzim çözeltisi (pH 6.8, fosfat tamponunda, 100 µl) karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda 40 µL L-DOPA konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Standard inhibitör olarak kojik asit kullanıldı ve aktiviteler kojik asit eşdeğer (mg KAE/g) olarak değerlendirildi (Orhan ve ark., 2014).

3.11. İstatistiksel değerlendirme

Analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama ve standard sapma şeklinde tablolarda sunulmuştur. Çalışılan ekstraklar arasında fark olup olmadığını belirlemek için Tukey testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerin ortaya çıkarılmasında GraphPad 8.0 paket programı kullanılmıştır. Testler arasındaki korelasyon analizleri Pearson korelasyon testi kullanılarak gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *P. dysenterica* Ekstraklarının Fitokimyasal Analizi

Biyolojik olarak aktif bileşikler genellikle bitkilerde düşük konsantrasyonda bulunur. Optimum verim üreten ve ilgilenilen bileşiklerin fonksiyonel özelliklerinde minimum değişikliklerle birlikte uygun bir ekstraksiyon tekniğinin belirlenmesi oldukça önemli bir aşamadır (Dhanani ve ark., 2017). Ekstraksiyon süresi, sıcaklık, çözücü / besleme oranı ve kullanılacak ekstraksiyon solventleri ekstraksiyon verimini etkileyen çok önemli parametrelerdir (Do ve ark., 2014; Brglez Mojzer ve ark., 2016). Bitkilerden fito bileşenlerini çıkarmak için kaynatma, infüzyon, maserasyon, soxhlet ekstraksiyonu ve ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) gibi modern ekstraksiyon teknikleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ekstraksiyon verimi ve biyoaktiviteleri sadece ekstraksiyon tekniğine değil, aynı zamanda kullanılan çözücülere ve polaritelerine de bağlıdır. Çeşitli araştırmalar, farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstraktların biyolojik yeteneklerinde farklılıklar göstermiştir (Do ve ark., 2014; Złotek ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında, dekoksiyon, infüzyon, maserasyon, soxhlet ekstraksiyonu (SE), homojenizatör destekli ekstraksiyon (HAE) ve ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon (UAE) tekniği ile elde edilen ekstraktların ve farklı çözücülerin *P. dysenterica*'nın biyokimyasal özellikleri ve biyoaktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. *P. dysenterica* ekstraklarinin toplam fenolik içeriği (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFC), toplam fenolik asit içeriği (TPaC) ve toplam flavonol içerikleri (TFvlC) ilk önce değerlendirildi ve sonuçlar Tablo 4.1'de verildi.

Toplam fenolik içerik bakımından çalışılan ekstraklardan en yüksek içerik HAE-MeOH'de 119.40 mg GAE/g olarak belirlenmiş ve bunu sırasıyla infüzyon (107.31 mg GAE/g) ve dekoksiyon (105.56 mg GAE/g) takip etmiştir. En düşük fenolik içerik ise HAE-Su'da belirlenmiştir. Sonuçlar toplam fenolik içeriğin açık bir şekilde çalışılan metot ve çözücüye bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (Şekil 4.1).

Toplam flavonoid içerik bakımından, çalışılan ekstraklar 26.25-50.60 mg RE/g arasında değişen flavonoid içeriklerine sahip oldukları belirlenmiştir. En yüksek toplam flavonoid içerik UAE-MeOH'de belirlenmiş ve bunu sırasıyla HAE-MeOH (48.94 mg RE/g) ve Maserasyon (40.17 mg RE/g) takip etmektedir. Bu sonuçlar flavonoidler için en

uygun solventin metanol olduğu sonucunu göstermektedir (Şekil 4.2). Benzer şekilde yapılan çeşitli çalışmalar da metanolun flavonoidler için en iyi çözücülerden biri olduğunu raporlamışlardır (Do ve ark., 2014; Dhawan ve Gupta, 2017).

Toplam fenolik asit içeriği bakımından çalışılan özütler değerlendirildiğinde, içeriğin 4.87 ile 9.38 mg CAE/g arasında değiştiği bulunmuştur. En yüksek toplam fenolik asit içeriği HAE-MeOH'da belirlenmiş ve bunu sırasıyla UAE-MeOH (8.35 mg CAE/g) ve infüzyon (6.33 mg CAE/g) takip etmiştir. En düşük içerik ise HAE-Su'da 4.87 mg CAE/g olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

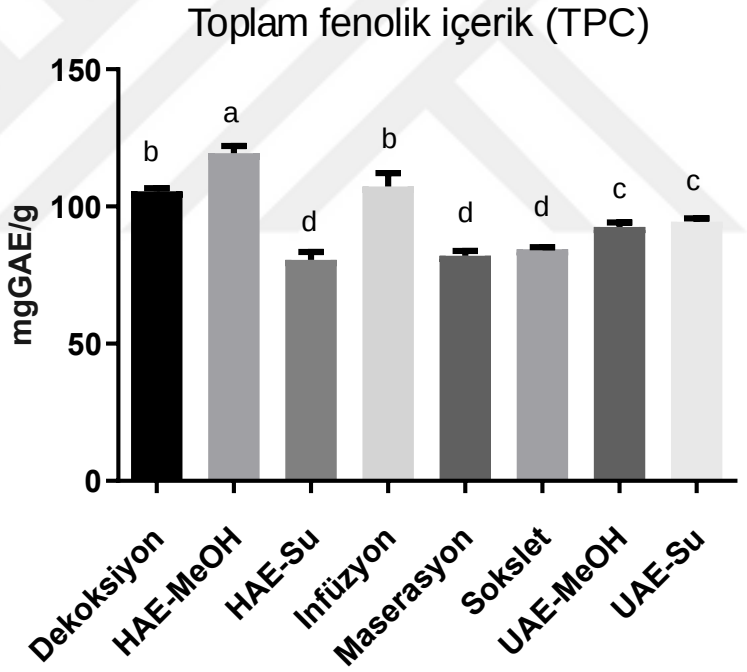
Flavonoidlerin küçük bir grubu olan flavanolların çalışılan ekstraklara ve metotlara bağlı olarak değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. En yüksek flavonol içeriği HAE-Su'da 1.39 mg CE/g olarak belirlenmiştir ve bunu sırasıyla infüzyon (0.90 mg CE/g) ve UAE-Su (0.80 mg CE/g) takip etmiştir. Bu şekilde, flavonol içeriği bakımından çalışılan örneklerden su özütlerinin metanol özütlerine kıyasla daha yüksek içeriğe sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).

P. dysenterica ekstraklarının fitokimyasal sonuçları tümüyle değerlendirildiğinde açık bir şekilde kullanılan teknik ve çözücüye bağlı olarak içeriğin değiştiği ve bu anlamda çalışmamızda kullanılan yeşil ektraksiyon teknikleri olarak nitelendirilen homojenizatör ve ultrasonikasyon destekli ekstraklar geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek aktiviteler sergilemişlerdir. Bu sonuçları doğrular nitelikte son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda da yeşil ekstraksiyon tekniklerinin daha verimli olduğu ve daha yüksek fitokimyasalın elde edilebilirliğini sağladığı rapor edilmiştir (Veličković ve ark., 2017; Sut ve ark., 2019; Zengin ve ark., 2019). Ayrıca kullanılan çözücüler değerlendirildiğinde genel olarak metanolun daha yüksek etkinliğe sahip olduğu belirlenmiş (Thouri ve ark., 2017; Ali ve ark., 2019) ve birçok çalışmada da metanolun çözücü olarak yüksek verime sahip olduğu raporlanmıştır. Bu durumu doğrular nitelikte bioaktivite çalışmalarında metanol en çok kullanılan çözücülerin başında gelmektedir.

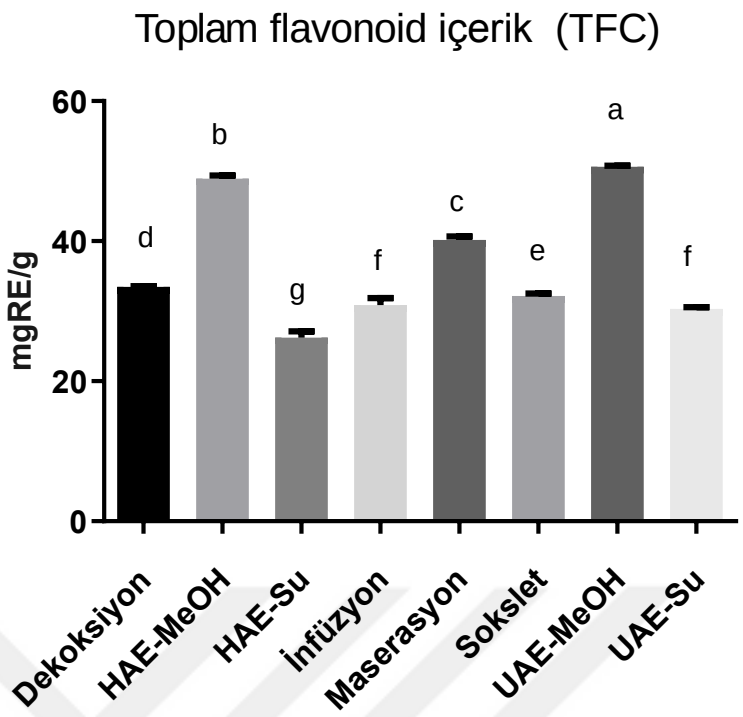
Tablo 4.1. Ekstraklardaki toplam bioaktif bileşenler

Metot/Solvent	**Toplam fenolik içerik (mg GAE/g)**	**Toplam flavonoid içerik (mgRE/g)**	**Toplam fenolik asit içerik (mgCAE/g)**	**Toplam flavanol içerik (mgCE/g)**
Dekoksiyon	105.56±1.07^{b}	33.46±0.11^{d}	5.90±0.07^{d}	0.74±0.01^{d}
HAE-MeOH	119.40±2.67^{a}	48.94±0.44^{b}	9.38±0.51^{a}	0.64±0.02^{g}
HAE-Su	80.62±2.87^{d}	26.25±0.88^{g}	4.87±0.06^{f}	1.39±0.03^{a}
Infüzyon	107.31±4.84^{b}	30.86±1.01^{f}	6.33±0.06^{c}	0.90±0.01^{b}
Maserayon	82.04±1.78^{d}	40.17±0.49^{c}	6.32±0.16^{c}	0.69±0.01^{e}
Sokslet	84.49±0.76^{d}	32.19±0.35^{e}	6.14±0.03^{cd}	0.67±0.02^{ef}
UAE-MeOH	92.59±1.57^{c}	50.60±0.15^{a}	8.35±0.14^{b}	0.65±0.02^{fg}
UAE-Su	94.46±1.24^{c}	30.34±0.21^{f}	5.30±0.25^{e}	0.80±0.01^{c}

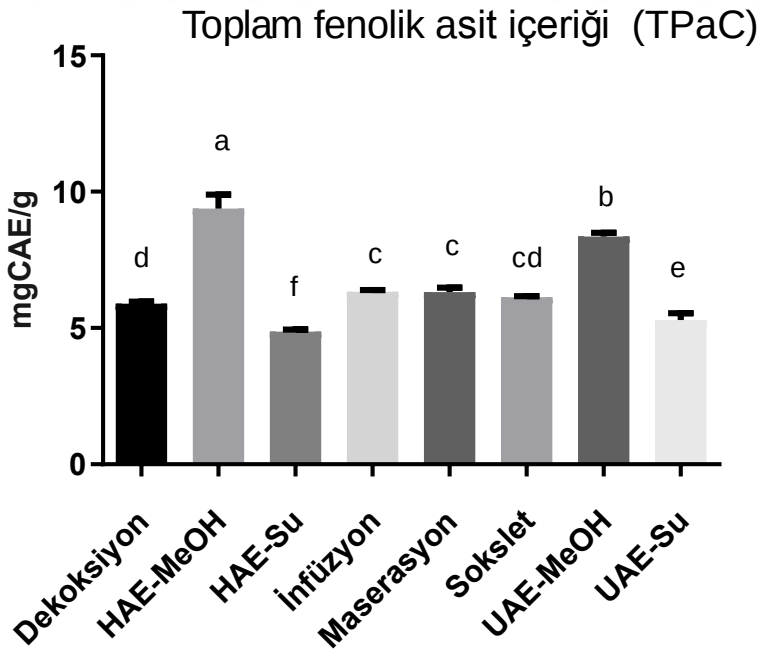
* Ortalama±Standart Sapma (n=3). GAE: Gallik asit eşdeğeri; RE: Rutin eşdeğeri; CAE:Kaffeik asit eşdeğeri; CE: Kateşin eşdeğeri. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade eder (*p*< 0.05).



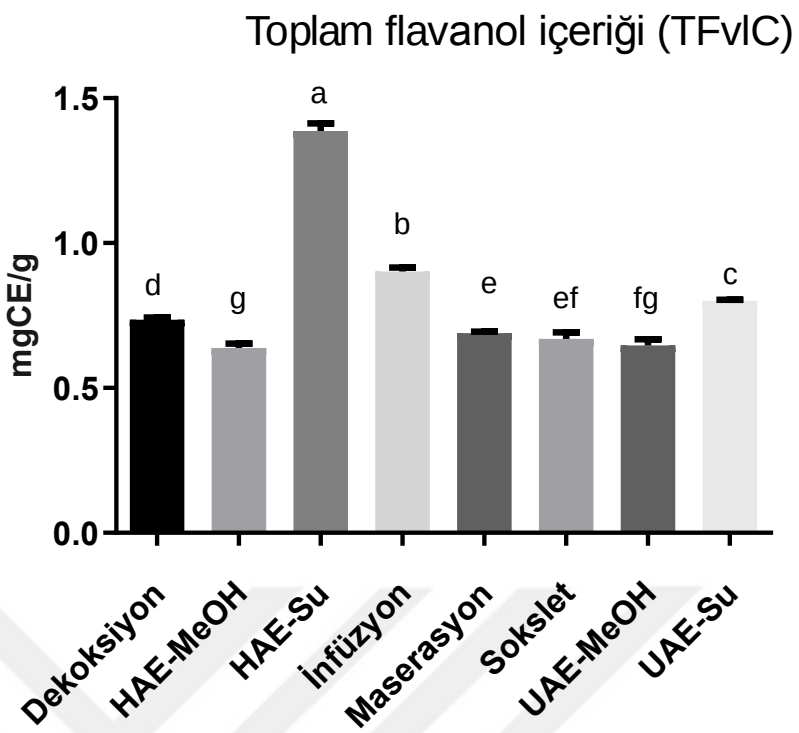
Şekil 4.1. Çalışılan ekstrakların toplam fenolik içerikleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir (*p*< 0.05).



Şekil 4.2. Çalışılan ekstrakların toplam flavonoid içerikleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).



Şekil 4.3. Çalışılan ekstrakların toplam fenolik asit içerikleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).



Şekil 4.4. Çalışılan ekstrakların toplam flavanol içerikleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).

4.2. Antioksidan Özellikler

Artan sayıda kanıt, oksidatif stresle ilişkili komplikasyonların patogenezinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) doğrudan etkisini desteklemektedir. Bütillenmiş hidroksitolüen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve üçüncül bütil hidrokinon (TBHQ) gibi çeşitli sentetik antioksidanlar, ROS'un neden olduğu zararlı etkileri önlemek için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sentetik antioksidanların yan etkileri olduğu kanıtlandığından, gıda, kozmetik ve terapötik endüstrilerde bitkilerden elde edilen doğal antioksidanlar giderek daha fazla aranmaktadır (Mehta ve Gowder, 2015).

Antioksidan bileşikler çok farklı şekillerde etki gösterdikleri için bitki ekstraktlarının antioksidan potansiyelinin kapsamlı bir şekilde tahmin edilmesi için birden fazla metot gerekmektedir. Bu bağlamda, *P. dysenterica'nın* farklı ekstraktlarının antioksidan özellikleri, metal şelatlama, fosfomolibden, indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC), serbest radikal süpürme (DPPH ve ABTS radikalleri) deneyleri kullanılarak değerlendirildi.

DPPH ve ABTS radikalleri biyoaktivite çalışmalarında en sık kullanılan radikaller olup, bitkisel ekstrakların radikaller üzerine etkinliklerinin değerlendirilmesinde bu radikaller oldukça önemlidir. DPPH radikali stabil bir radikal olup bitkisel ekstraktın aktivitesi sonucunda mor olan rengi sarıya dönüşmekte ve bu değişim 517 nm'de izlenmektedir. Çalışılan ekstrakların DPPH süpürme yetenekleri incelendiğinde bu aktivitenin 187.25 mg TE/g ve 303.95 mg TE/g arasında değiştiği bulunmuştur. En yüksek aktivite HAE-MeOH'de tespit edilmiş ve bunu sırasıyla infüzyon (240.07 mg TE/g) ve dekoksiyon (220.43 mg TE/g) takip etmektedir (Tablo 4.2). DPPH radikali süpürme bakımından en zayıf özüt olarak ise sokslet tespit edilmiştir (Şekil 4.5). ABTS radikali stabil bir radikal olmayıp hazırlandıktan sonra 12-16 saat içerisinde kullanılmalıdır. ABTS radikal süpürme etkinliği bakımından *P. dysenterica* ekstrakları güçlü aktiviteden düşük aktiviteye şu şekilde sıralanır: HAE-MeOH>Infüzyon>Dekoksiyon>UAE-Su>UAE-MeOH>HAE-Su>Maserasyon>Sokslet (Şekil 4.6). Bu sonuçlar DPPH ve ABTS radikal süpürme yetenekleri arasında bir korelasyonun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, radikal süpürme etkinlikleri ve toplam fenolik içerikleri birlikte değerlendirildiğinde, belirlenen sonuçlar arasında bir korelasyonun olduğu ve çalışılan özütlerdeki fenolik bileşiklerin radikal süpürmede etkili oldukları görülmüştür. Bu yaklaşımı doğrular nitelikte birçok çalışmada toplam fenolik

içerik ve radikal süpürme aktiviteleri arasında güçlü bir korelasyonun olduğu rapor edilmiştir (Fettach ve ark., 2019; Lim ve ark., 2019; Sim ve ark., 2019).

İndirgeme gücü antioksidan bileşiklerin elektron verme yeteneklerini yansıtma bakımından oldukça önemli bir antioksidan parametredir. Bu amaçla çalışmamız kapsamında indirgeme gücünü belirlemek için CUPRAC ve FRAP testleri uygulanmıştır. CUPRAC testi basitliği, kullanılan reaktiflerin ucuz olması ve fizyolojik pH'ya yakın ortamlarda gerçekleşmesinden ötürü son zamanlarda en sık kullanılan metotlardan birisidir ve Cu^{+2}'nin Cu^{+}'ya indirgenmesi izlenmektedir. Çalışılan ekstrakların bakır indirgeme yetenekleri incelendiğinde en yüksek etkinliğin HAE-MeOH'de olduğu gözlenmiş ve bunu sırasıyla dekoksiyon (574.91 mg TE/g) ve UAE-MeOH (568.75 mg TE/g) izlemiştir. En düşük aktivite ise birçok testte olduğu gibi HAE-Su'da gözlenmiştir. FRAP testi asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Fe^{+3}-TPTZ kompleksinin Fe^{2+}-TPTZ'ye dönüşümünü içermektedir. Çalışılan ekstrakların demir indirgeme güçleri incelediğinde en yüksek etkinlik HAE-MeOH'de 367.49 mg TE/g olarak belirlenmiş ve bunu sırasıyla infüzyon (325.41 mg TE/g) ve dekoksiyon (316.88 mg TE/g) takip etmektedir. İndirgeme gücü sonuçları bütün olarak değerlendirildiğinde, sonuçların genel olarak ekstrakların toplam fenolik içerikleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu durum ekstraklardaki fenolik bileşiklerin etkili bir elektron verme yeteneklerine sahip olduklarını göstermektedir. Bu bulguları destekler nitelikte, çeşitli çalışmalarda bitkisel ekstrakların toplam fenolik içerikleri ve indirgeme güçleri arasında güçlü bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir (Sheng ve ark., 2018; Aryal ve ark., 2019; Ulewicz-Magulska ve Wesolowski, 2019). Ayrıca bazı araştırmacılar doğrudan bazı fenolik asitleri ve flavonoidleri FRAP ve CUPRAC testlerinde indirgeme güçlerini araştırmışlar ve oldukça güçlü etkinliklere sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Badhani ve ark., 2015; Sevgi ve ark., 2015).

Fosfomolibdat testi, asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Mo (VI)'yı Mo (V)'e indirgemesine ve oluşan mavi renkli fosfat-molibdat kompleksinin absorbansının 695 nm'de ölçülmesine dayanır. Bu testte tüm antioksidan bileşiklerin rol oynayabileceği düşünülerek bu test bir toplam antioksidan kapasite testi olarak değerlendirilir. *P. dysenterica* ektsraklarının fosfomolibdat testindeki aktivitileri Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Testin sonuçları dikkate alındığında en yüksek etkinlik UAE-MeOH'de 2.97 mmol TE/g olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla HAE-MeOH (2.83 mmol TE/g) ve dekoksiyon (2.72 mmol TE/g) izlemektedir. En düşün aktivite ise Sokslet'de 2.10 mmol

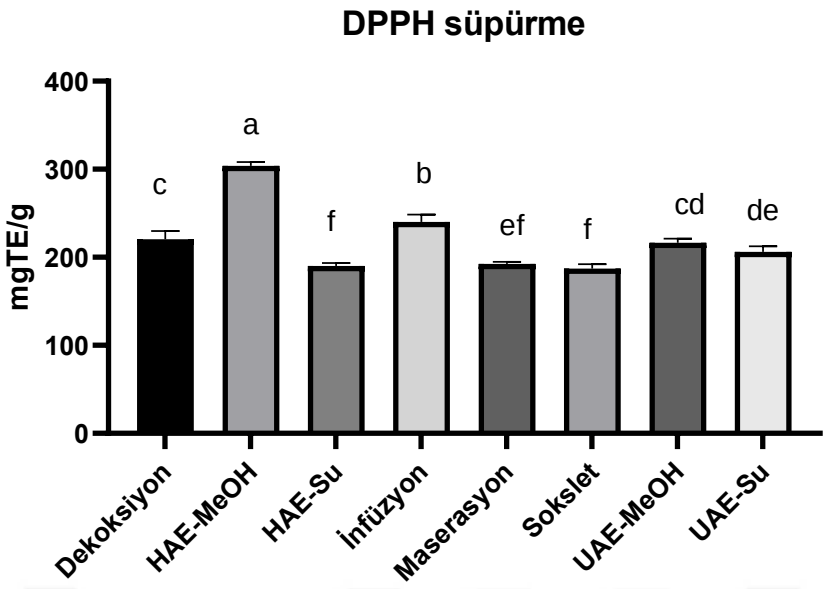
TE/g olarak belirlenmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda fosfomolibdat testi için farklı sonuçlar bulunmuştur. Bazı çalışmalarda toplam fenolik içerik ile güçlü bir korelasyon bulunmasına karşılık (Kirkan ve ark., 2018; Arumugam ve ark., 2019), bazı çalışmalarda ise zayıf bir korelasyon gözlenmemiştir (Zengin ve ark., 2018; Benabderrahim ve ark., 2019). Bu durum spektrofotometrik testlerin çok hassas olmaması veya askorbik asit, tokoferol veya karotenler gibi fenolik olmayan antioksidanların varlığı ile açıklanabilir.

Geçiş metalleri özellikle Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikalinin oluşumuna yol açması bakımından antioksidan-oksidan dengesinin sağlanmasında bu metallerin şelatlanması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla literatürde çeşitli metotlar olmasına rağmen en yaygını ferrozin metodudur. Çalışmamız kapsamında değerlendirilen ekstrakların metal şelatlama yetenekleri Tablo 4.4'de verilmiştir. Sonuçlara göre en yüksek etkinlik dekoksiyon'da 18.92 mg EDTAE/g olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla UAE-Su ve Infüzyon takip etmektedir. Diğer metotların aksine en düşük etkinlik ise HAE-MeOH'de belirlenmiştir. Bu durum ekstraklardaki gözlenen bu aktivitenin fenolik olmayan şelatlayıcı ajanlardan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu yaklaşımı doğrular nitelikte yapılan çalışmalarda toplam fenolik içerik ve şelatlama yetenekleri arasında zayıf bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir (Arumugam ve ark., 2019; Sarikurkcu ve ark., 2019). Ayrıca bazı araştırmacılar fenoliklerin metal şelatlama yeteneklerinin onların antioksidan etkinliklerinde oldukça minor bir yol olduğunu belirtmişlerdir (Rice-Evans ve ark., 1996; Yerlikaya ve ark., 2017).

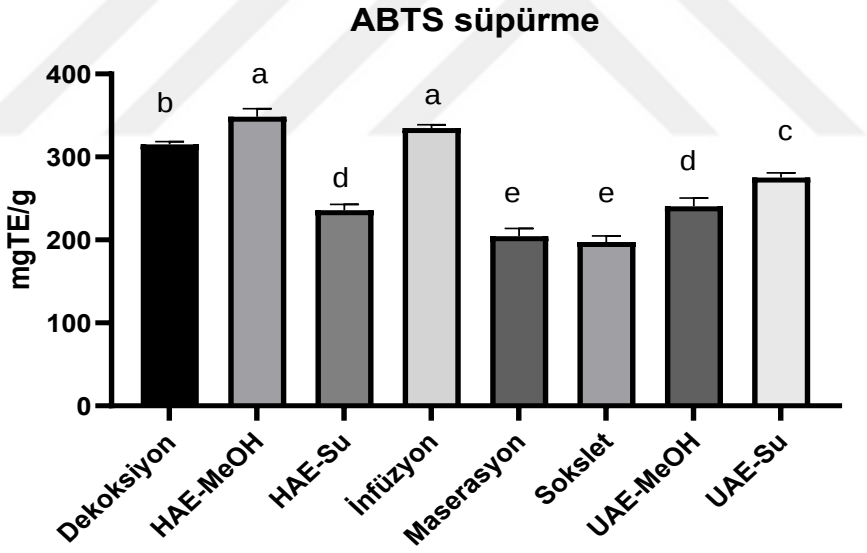
Tablo 4.2. Çalışılan ekstrakların serbest radikal süpürme etkinlikleri

Metot/Solvent	**DPPH (mgTE/g)**	**ABTS (mgTE/g)**
Dekoksiyon	220.43±9.42^{c}	315.29±3.18^{b}
HAE-MeOH	303.95±4.10^{a}	348.47±9.72^{a}
HAE-Su	190.17±3.39^{f}	235.76±7.11^{d}
Infüzyon	240.07±8.49^{b}	334.96±3.92^{a}
Maserayon	192.56±2.35^{ef}	204.43±9.28^{e}
Sokslet	187.25±4.90^{f}	197.63±7.18^{e}
UAE-MeOH	216.64±4.44^{cd}	240.35±10.04^{d}
UAE-Su	206.08±6.48^{de}	275.22±5.50^{c}

[*] Ortalama±Standart Sapma (n=3). TE: Troloks eşdeğeri. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade eder ($p< 0.05$).



Şekil 4.5. Çalışılan ekstrakların DPPH radikali süpürme etkinlikleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir (p< 0.05).

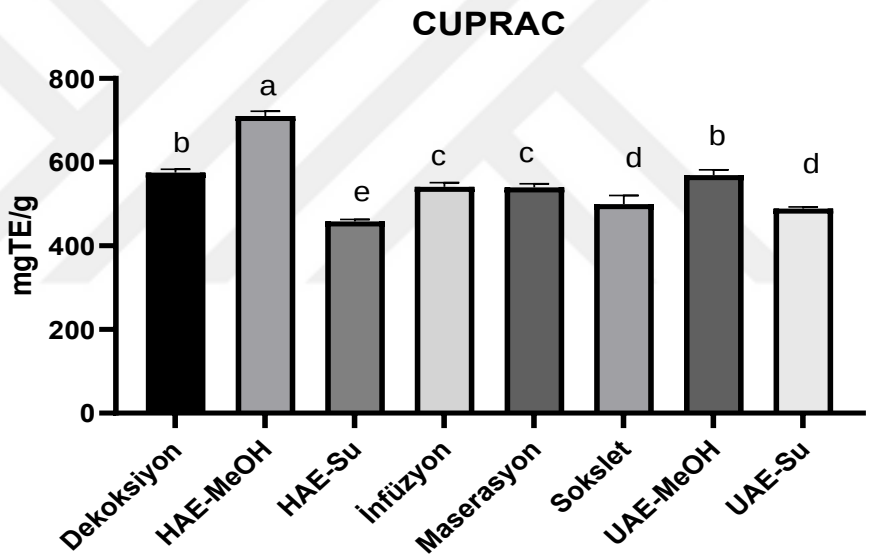


Şekil 4.6. Çalışılan ekstrakların ABTS radikali süpürme etkinlikleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir (p< 0.05).

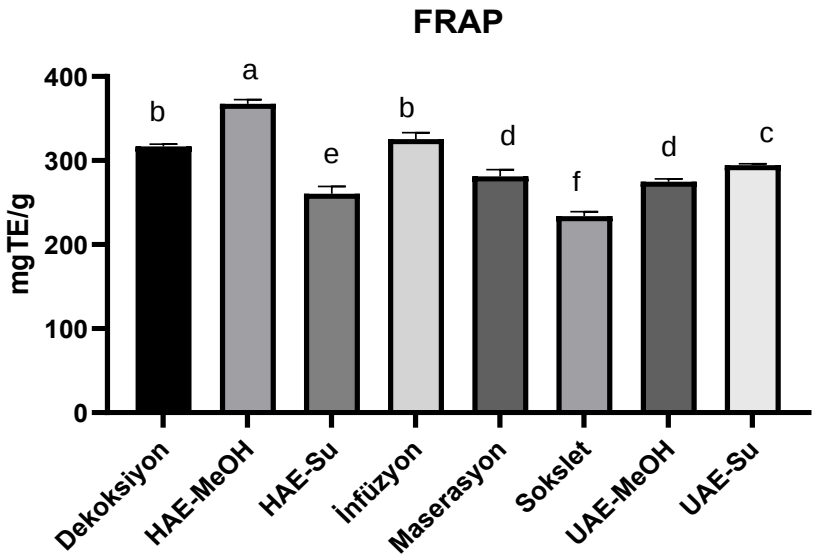
Tablo 4.3. Çalışılan ekstrakların serbest radikal süpürme etkinlikleri

Metot/Solvent	**CUPRAC (mgTE/g)**	**FRAP (mg/TE)**
Dekoksiyon	574.91±8.05^{b}	316.88±2.59^{b}
HAE-MeOH	710.57±11.03^{a}	367.49±5.16^{a}
HAE-Su	458.22±4.73^{e}	260.63±8.39^{e}
Infüzyon	541.23±9.76^{c}	325.41±7.59^{b}
Maserayon	539.68±8.95^{c}	281.28±8.04^{d}
Sokslet	499.94±20.37^{d}	233.99±5.14^{f}
UAE-MeOH	568.75±13.00^{b}	274.84±3.24^{d}
UAE-Su	488.75±4.07^{d}	294.55±1.60^{c}

*Ortalama±Standart Sapma (n=3). TE: Troloks eşdeğeri. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade eder (p< 0.05).



Şekil 4.7. Çalışılan ekstrakların CUPRAC testindeki indirgeme yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir (p< 0.05).



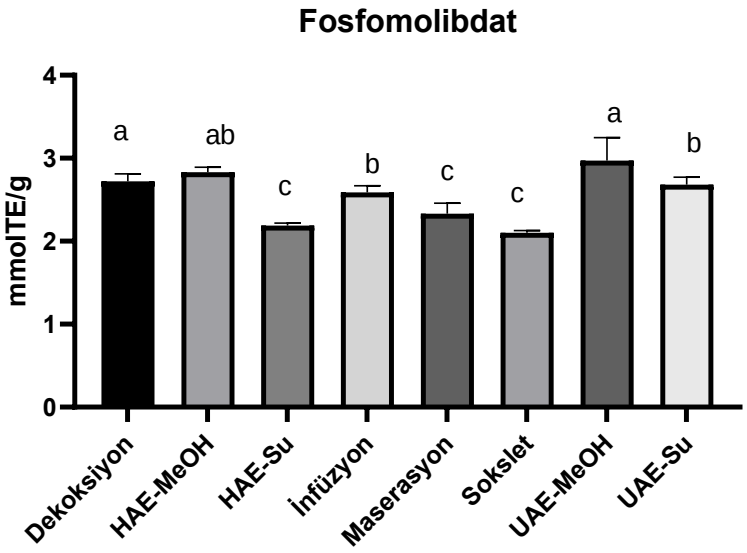
Şekil 4.8. Çalışılan ekstrakların FRAP testindeki indirgeme yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).

Tablo 4.4. Çalışılan ekstrakların fosfomolibdat testi ile toplam antioksidan kapasitesi ve metal şelatlama yetenekleri

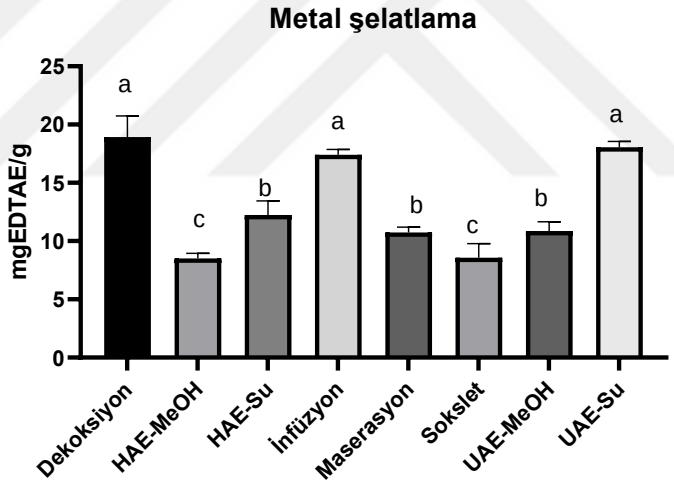
*

Metot/Solvent	**Fosfomolibdat (mmolTE/g)**	**Metal şelatlama (mgEDTAE/g)**
Dekoksiyon	2.72 ± 0.09^{b}	18.92 ± 1.81^{a}
HAE-MeOH	2.83 ± 0.06^{ab}	8.50 ± 0.45^{c}
HAE-Su	2.19 ± 0.03^{c}	12.23 ± 1.22^{b}
Infüzyon	2.59 ± 0.08^{b}	17.41 ± 0.46^{a}
Maserayon	2.33 ± 0.13^{c}	10.74 ± 0.45^{b}
Sokslet	2.10 ± 0.03^{c}	8.58 ± 1.21^{c}
UAE-MeOH	2.97 ± 0.28^{a}	10.86 ± 0.80^{b}
UAE-Su	2.68 ± 0.09^{b}	18.05 ± 0.50^{a}

Ortalama±Standart Sapma (n=3). TE: Troloks eşdeğeri; EDTAE: EDTA eşdeğeri. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade eder ($p< 0.05$).



Şekil 4.9. Çalışılan ekstrakların fosfomolibdat testindeki aktiviteleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).



Şekil 4.10. Çalışılan ekstrakların metal şelatlama yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).

4.3. Enzim İnhibitör Özellikleri

Sekonder metabolitler gibi tıbbi bitkilerden doğal olarak oluşan bileşikler, geniş spektrumlu enzim inhibe edici potansiyellere sahiptir. Yüksek özgüllük ve etki gücü, doğal kaynaklardan gelen ilaçların çok az yan etkiye sahip olacağını ve düşük toksisiteye sahip olacağını göstermektedir (Murray ve ark., 2013; Rauf ve Jehan, 2017).

Alzheimer hastalığının tedavisinde en etkili yollardan olan kolinesteraz inhibisyonuna yönelik çalışılan ekstraktlar AChE ve BChE enzimlerine karşı test edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5'de sunulmuştur. Çalışılan ekstrakların tümü AChE enzimine karşı inhibisyon yeteneğine sahipken, BChE üzerine dört ekstraktın inhibisyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Hem AChE hemde BChE enzim aktivitesi bakımından en güçlü ekstrakt HAE-MeOH olarak belirlenmiştir. Bu ekstraktı sırasıyla soxhlet (3.50 ve 1.98 mg GALAE/g), UAE-MeOH (3.47 ve 1.67 mg GALAE/g) ve maserasyon (3.17 ve 1.54 mg GALAE/g) izlemektedir (Şekil 4.11 ve 4.12). Yapılan çalışmalarda kolinesteraz inhibisyon aktivitesi ile ekstratların fenolik içerikleri arasında ilişki bakımından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar fenolik bileşikler ve kolinesteraz inhibisyonları arasında sıkı bir ilişki rapor ederken (Bahadori ve ark., 2019; Colizzi, 2019) bazıları bu aktivitenin fenoliklerden ziyade alkaloitlere atfedilebileceğini belirtmişlerdir (Ozer ve ark., 2018; Rocchetti ve ark., 2020).

Melanin sentezinin anahtar enzimi olan tirozinazın inhibisyonu deri hastalıkları ve melanogenezle ilişkili bozuklukların tedavisinde hedef konumundadır. Çalışmamız kapsamında değerlendirilen *P. dysenterica* ekstraklarının tirozinaz inhibisyon yetenekleri Tablo 4.5'de verilmiştir. Tirozinaz inhibisyonu bakımından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek etkinlik UAE-MeOH'da 126.91 mg KAE/g olarak belirlenmiş ve bu özütü sırasıyla maserasyon (126.42 mg KAE/g) ve soxhlet (123.84 mg KAE/g) izlemektedir. En zayıf tirozinaz aktivitesine sahip özüt ise HAE-Su'dur. Sonuçlardan açık bir şekilde metanol özütlerinin su özütlerine kıyasla daha güçlü aktivite sergilediği gözlenmiştir. Bu sonuç aynı zamanda çeşitli araştırmacılar tarafında da doğrulanmıştır (Wu ve ark., 2018; Farràs ve ark., 2019).

Küresel sağlık problemlerinin başında gelen diyabetin tedavisine yönelik günümüzde son zamanlarda yeni stratejiler geliştirilmiş ve bunların başında karbohidrat katabolizmasının anahtar enzimleri olan amilaz ve glukozidaz inhibisyonları gelmektedir. Bu anlamda *P. dysenterica* ekstraklarının anti-diyabetik potansiyellerinin değerlendirilmesi için amilaz ve glukozidaz inhibisyon yetenekleri test edilmiştir.

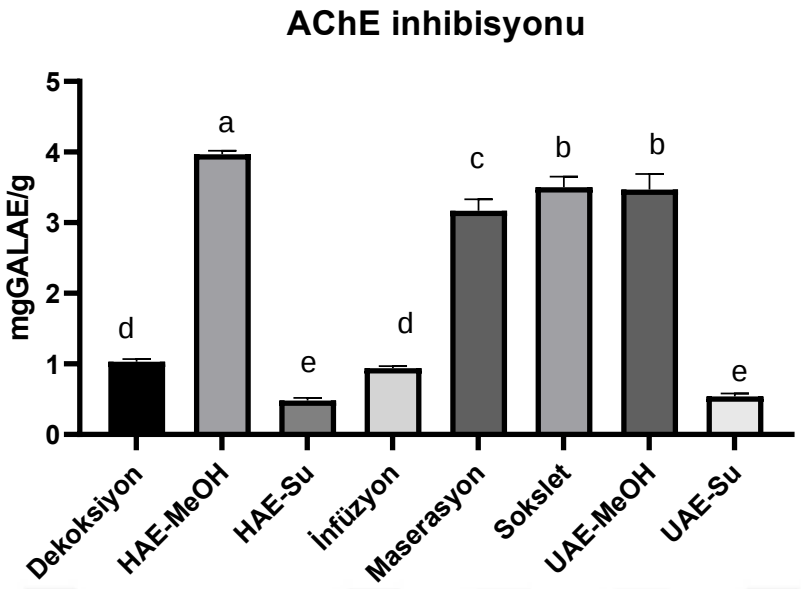
Sonuçlar Tablo 4.5'de verilmiştir. Amilaz inhibisyon sonuçlarına göre metanol özütleri su özütlerine kıyasla daha güçlü aktivite sergilemiş ve aktivite Maserasyon>HAE-MEOH=UAE-MeOH>Sokslet>Dekoksiyon=UAE-SU>İnfuzyon şeklinde sıralanmıştır. Benzer şekilde glukozidaz inhibisyonu içinde metanol ekstrakları daha güçlü etkinlik sergilemiş ve en yüksek aktivite yine Maserayon'da kaydedilmiştir. Ek olarak, glukozidaz inhibisyonu bakımından infüzyon inaktif olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar *P. dysenterica* ekstraklarının anti-diyabetik olarak önemli potansiyele sahip olduklarını göstermektedir.

Çalışmamızda gerçekleştirilen Pearson korelasyon testi sonuçlarına göre enzim inhibisyon yetenekleri ile özellikle toplam flavonoid ve fenolik asit içeriği arasında önemli korelasyonlar tespit edilmiştir. Bu durum özellikle sağlık üzerine önemli etkinliklere sahip olan bu bileşiklerin enzim inhibitörü olarak da oldukça önemli özelliklere sahip olduklarını göstermiştir. Çalışmamızın sonuçlarını doğrular nitelikle son yıllarda flavonoidlerin enzim inhibisyonuna yönelik çok sayıda çalışma rapor edilmiştir (Goncalves ve Romano, 2017; Ghani ve ark., 2019; Panzella ve Napolitano, 2019; Proença ve ark., 2019).

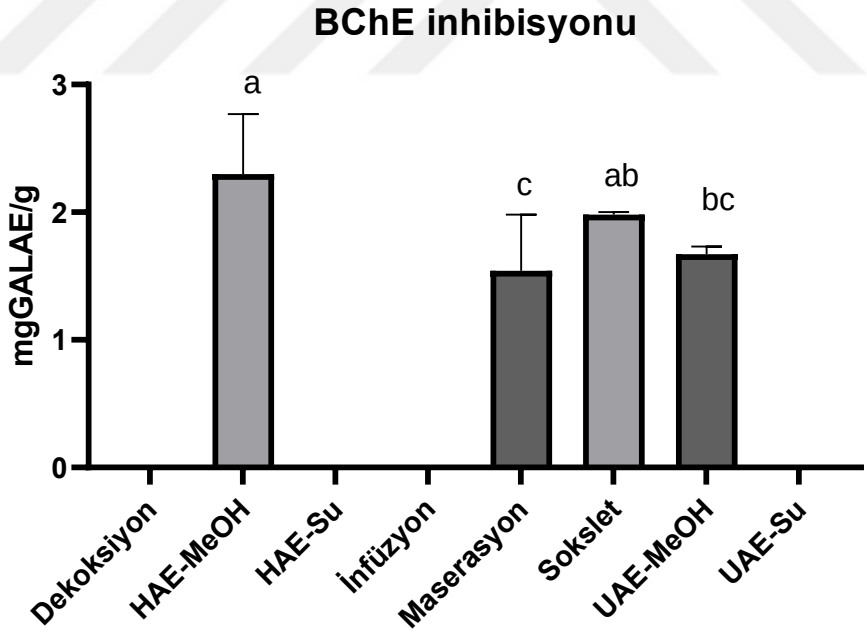
Tablo 4.5. Çalışılan ektraktların enzim inhibitor özellikleri

Metot/Solvent	**AChE inhibisyonu (mg GALAE/g)**	**BChE inhibisyonu (mg GALAE/g)**	**Amilaz inhibisyonu (mmol ACAE/g)**	**Glukozidaz inhibisyonu (mmol ACAE/g)**	**Tirozinaz inhibisyonu (mg KAE/g)**
Dekoksiyon	1.03 ± 0.04^{d}	na	0.10 ± 0.01^{d}	0.63 ± 0.05^{d}	71.50 ± 1.95^{e}
HAE-MeOH	3.97 ± 0.05^{a}	2.30 ± 0.47^{a}	0.56 ± 0.05^{ab}	1.49 ± 0.05^{b}	120.05 ± 1.12^{c}
HAE-Su	0.48 ± 0.04^{e}	-	0.18 ± 0.01^{c}	0.78 ± 0.07^{c}	63.46 ± 1.42^{f}
İnfüzyon	0.94 ± 0.03^{d}	-	0.09 ± 0.01^{d}	-	75.26 ± 0.82^{d}
Maserayon	3.17 ± 0.16^{c}	1.54 ± 0.44^{c}	0.58 ± 0.03^{a}	1.65 ± 0.03^{a}	126.42 ± 1.09^{ab}
Sokslet	3.50 ± 0.15^{b}	1.98 ± 0.22^{ab}	0.50 ± 0.02^{b}	1.60 ± 0.02^{a}	123.84 ± 0.99^{b}
UAE-MeOH	3.47 ± 0.22^{b}	1.67 ± 0.06^{bc}	0.56 ± 0.05^{ab}	1.46 ± 0.05^{b}	126.91 ± 1.04^{a}
UAE-Su	0.54 ± 0.04^{e}	-	0.10 ± 0.01^{d}	0.69 ± 0.05^{d}	73.00 ± 2.03^{de}

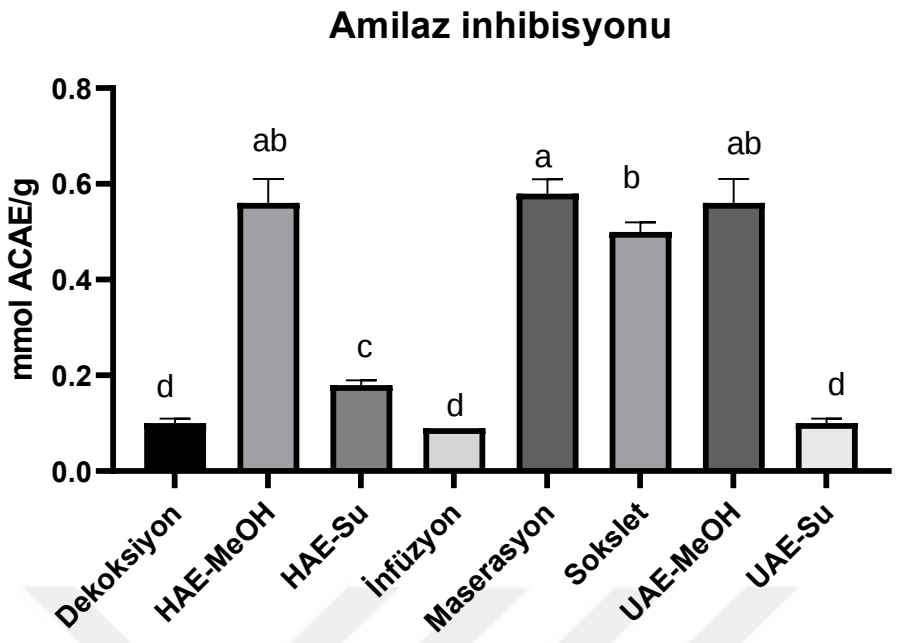
* Ortalama±Standart Sapma (n=3). GALAE: Galatamine eşdeğeri; KAE: Kojik asit eşdeğeri; ACAE: Akarboz eşdeğeri; - inhibisyon gözlenmedi. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade eder ($p< 0.05$).



Şekil 4.11. Çalışılan ekstrakların AChE enzimini inhibe etme yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).



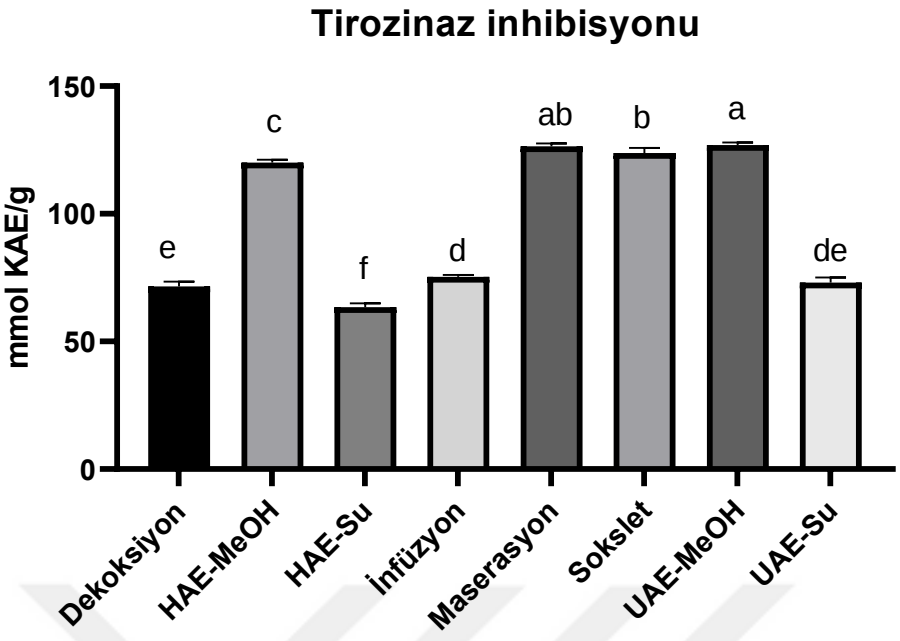
Şekil 4.12. Çalışılan ekstrakların BChE enzimini inhibe etme yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir ($p< 0.05$).



Şekil 4.13. Çalışılan ekstrakların amilaz enzimini inhibe etme yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir (p< 0.05).



Şekil 4.14. Çalışılan ekstrakların glukozidaz enzimini inhibe etme yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir (p< 0.05).



Şekil 4.15. Çalışılan ekstrakların tirozinaz enzimini inhibe etme yetenekleri. Farklı harfler ekstraklar arasındaki farkı göstermektedir (p< 0.05).



Şekil 4.16. Toplam fitokimyasal bileşenler ve çalışılan aktiviteler arasındaki Pearson korelasyon değerleri (p <0.05) (MCA: metal şelatlama; PPBD: fosfomolibdat)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışma, *P. dysenterica*'dan elde edilen ekstraktların kayda değer bir antioksidan içerdiğini, bu nedenle aktivite derecesinin, kullanılan ekstraksiyon tekniklerine ve solventlere bağlı olduğunu göstermiştir. Homojenizator destekli metanol özütü ve infüzyon özütü, iyi indirgeme yetenekleri, serbest radikal temizleme faaliyetleri ve toplam antioksidan kapasiteler sergilerken, dekoksiyon ve ultrasonik su özleri için en yüksek metal şelatlama aktiviteleri sergilemişlerdir. *P. dysenterica* özleri tip II diyabet, Alzheimer hastalığı ve cilt hiperpigmentasyon bozukluklarının yönetimi için umut verici sonuçlar göstermiştir. Fitokimyasal çalışmalar, *P. dysenterica* ekstraklarının, içerdiği antioksidan ve inhibitör kapasite potansiyelini haklı çıkarabilecek önemli biyolojik aktif bileşikler içerdiği sonucuna varmıştır. Bu çalışma, yeni bitkisel ilaçlar ve kozmetik ürünler geliştirmeye yönelik yeni ufuklar açabilecek daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu garanti eden *P. dysenterica*'nın terapötik özelliklerine ilişkin umut verici temel veriler sunmaktadır.

5.2 Öneriler

Bitkiler ve bitkisel ürünler tüm dünyada hastalıkları tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ancak onların tedavi etkileri ve insan sağlığı üzerindeki riskleri hakkında bilimsel veri sayısı oldukça azdır. Bu tez çalışmasında literatürde antioksidan aktivite ve enzim inhibitör aktivite üzerine herhangi bir çalışma bulunmayan *P. dysenterica* ekstraktları çalışılmıştır. Bu aktiviteler üzerine farklı metodların ve çözücülerin etkisi araştırılmıştır. Çalışmada geleneksel metodların yanında modern ekstraksiyon teknikleri kullanılarak değerlendirilmiş ve gelecek çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde *P. dysenterica* ekstraktlarının antioksidan içeriğinin ve aktivite derecesinin kullanılan ekstraksiyon tekniklerine ve solventlere bağlı olduğunu göstermektedir. *P. dysenterica* önemli enzim inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan *P. dysentrica* özütleri Alzheimer, tip II Diyabet ve cilt hiperpigmentasyon bozuklukları için umut verici sonuçlar göstermektedir. Ele geçen veriler, *P. dysenterica* özlerinin içerdiği antioksidan ve enzim inhibitör kapasitesi ile yeni bitkisel ilaçlar ve kozmetik ürünler geliştirmeye yönelik daha fazla araştırılmasının

gereğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda yapılan tez çalışması *P. dysenterica* özleri üzerine yapılacak yeni çalışmalara bir başlangıç noktası oluşturacak ve bu çalışmalara yeni ufuklar açacaktır.

KAYNAKLAR

Aarsland, D., Zaccai, J. ve Brayne, C., 2005, A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease, *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 20 (10), 1255-1263.

Ahmad, I., Yanuar, A., Mulia, K. ve Mun'im, A., 2017, Application of Ionic Liquid as a Green Solvent for Polyphenolics Content Extraction of Peperomia pellucida (L) Kunth Herb, *Journal of Young Pharmacists*, 9 (4), 486.

Al-Hajj, N. Q. M., Wang, H. X., Ma, C., Lou, Z., Bashari, M. ve Thabit, R., 2014, Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of some aromatic medicinal plants (Pulicaria inuloides-Asteraceae and Ocimum forskolei-Lamiaceae), *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (8), 1287-1293.

Alho, H. ve Leinonen, J., 1999, [1] Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, In: Methods in enzymology, Eds: Elsevier, p. 3-15.

Ali, Z., Ma, H., Rashid, M. T., Wali, A. ve Younas, S., 2019, Preliminary study to evaluate the phytochemicals and physiochemical properties in red and black date's vinegar, *Food Science & Nutrition*, 7 (6), 1976-1985.

Almkvist, O., Darreh-Shori, T., Stefanova, E., Spiegel, R. ve Nordberg, A., 2004, Preserved cognitive function after 12 months of treatment with rivastigmine in mild Alzheimer's disease in comparison with untreated AD and MCI patients, *European journal of neurology*, 11 (4), 253-261.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. ve Robards, K., 2002, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, 127 (1), 183-198.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S. ve Erçağ, E., 2006, The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57 (5-6), 292-304.

Arumugam, R., Kirkan, B. ve Sarikurkcu, C., 2019, Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of *Astragalus ponticus* Pall, *South African Journal of Botany*, 120, 268-273.

Aruoma, O., 1994, Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, Food and Chemical Toxicology, 32 (7), 671-683

Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R. ve Koirala, N., 2019, Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal, *Plants*, 8 (4), 96.

Atalay, İ., 1994, Türkiye vejetasyon coğrafyası, İ. Atalay, p.

Badhani, B., Sharma, N. ve Kakkar, R., 2015, Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications, *RSC Advances*, 5 (35), 27540-27557.

Bagchi, K. ve Puri, S., 1998, Free radicals and antioxidants in health and disease: A review.

Bahadori, M. B., Kirkan, B. ve Sarikurkcu, C., 2019, Phenolic ingredients and therapeutic potential of Stachys cretica subsp. smyrnaea for the management of oxidative stress, Alzheimer's disease, hyperglycemia, and melasma, *Industrial Crops and Products*, 127, 82-87.

Baig, I., 2002, Phytochemical studies on Ferula mongolica and other mongolian medicinal plants, *Unıversıty of Karachi, Karachi*.

Bailey, CJ., 2003, New approaches to the pharmacotherapy of diabetes., In: Pickup, J.C., William, G. (Eds.), Textbook of Diabetes, Vol. 2, 3rd ed. Blackwell Science Ltd., 73.71-73.21.

Barbosa Filho, J. M., Medeiros, K. C. P., Diniz, M. d. F. F., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., da Cunha, E. V., Almeida, J. R. ve Quintans-Júnior, L. J., 2006, Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (2), 258-285.

Barros, A. I., Nunes, F. M., Gonçalves, B., Bennett, R. N. ve Silva, A. P., 2011, Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (Castanea sativa Mill.), *Food Chemistry*, 128 (1), 165-172.

Bartus, R. T., Dean, R. r., Beer, B. ve Lippa, A. S., 1982, The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*, 217 (4558), 408-414.

Bassil, N. ve Grossberg, G. T., 2009, Novel regimens and delivery systems in the pharmacological treatment of Alzheimer's disease, *CNS drugs*, 23 (4), 293-307.

Basta, A., Tzakou, O., Couladis, M. ve Pavlović, M., 2007, Chemical composition of Pulicaria dysenterica (L.) Bernh. from Greece, *Journal of Essential Oil Research*, 19 (4), 333-335.

Bastaki, A., 2005, Diabetes mellitus and its treatment, *International journal of Diabetes and Metabolism*, 13 (3), 111.

Baysal, T. ve Yıldız, H., 2003, Bitkisel fenoliklerin kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 7 (14), 29-35.

Baytop, T., 1999, Turkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Gecmiste ve Bugun), *Nobel Tip Kitabevleri, Istanbul*.

Behl, C. ve Moosmann, B., 2002, Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach, *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (2), 182-191.

Benabderrahim, M. A., Elfalleh, W., Sarikurkcu, C. ve Sarikurkcu, R. B., 2019, Biological activities and phytochemical composition of organs from Loranthus europaeus, *Industrial Crops and Products*, 141, 111772.

Bennick, A., 2002, Interaction of plant polyphenols with salivary proteins, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13 (2), 184-196.

Benov, L. ve Beema, A. F., 2003, Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (4), 429-433.

Bentley, R., 2006, From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid, *Natural product reports*, 23 (6), 1046-1062.

Benzie, I. F. ve Strain, J. J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical biochemistry*, 239 (1), 70-76.

Berezin, A. E., Kremzer, A. A., Petrovich, D., Mozos, I. ve Berezin, A. A., 2018, Association of growth-differentiation factor-15 with the number of circulating proangiogenic endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes mellitus, *Biomedical Research and Therapy*, 5 (7), 2480-2492.

Berk, S., Tepe, B., Arslan, S. ve Sarikurkcu, C., 2011, Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of Asplenium ceterach DC, *African Journal of Biotechnology*, 10 (44), 8902-8908.

Bijelic, A., Pretzler, M., Molitor, C., Zekiri, F. ve Rompel, A., 2015, The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of "Substrate-Guiding Residues" for enzymatic specificity, *Angewandte Chemie International Edition*, 54 (49), 14677-14680.

Birks, J. S., 2006, Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Cochrane database of systematic reviews* (1).

Bodick, N. C., Offen, W. W., Levey, A. I., Cutler, N. R., Gauthier, S. G., Satlin, A., Shannon, H. E., Tollefson, G. D., Rasmussen, K. ve Bymaster, F. P., 1997, Effects

of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease, *Archives of neurology*, 54 (4), 465-473.

Boumaraf, M., Mekkiou, R., Benyahia, S., Chalchat, J.-c., Chalard, P., Benayache, F. ve Benayache, S., 2016, Essential oil composition of Pulicaria undulata (L.) DC.(Asteraceae) growing in Algeria, *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res*, 8, 746-749.

Bourquelot, E. ve Bertrand, G., 1895, Le bleuissement et le noircissement des champignons, *CR Soc Biol*, 47, 582-584.

Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž. ve Bren, U., 2016, Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects, *Molecules*, 21 (7), 901.

Brietzke, S. A., 2015, Oral antihyperglycemic treatment options for type 2 diabetes mellitus, *Medical Clinics*, 99 (1), 87-106.

Briganti, S., Camera, E. ve Picardo, M., 2003, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment cell research*, 16 (2), 101-110.

Burdock, G. A., Soni, M. G. ve Carabin, I. G., 2001, Evaluation of health aspects of kojic acid in food, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 33 (1), 80-101.

Burton, G. W. ve Traber, M. G., 1990, Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability, *Annual review of nutrition*, 10 (1), 357-382.

Caicedo, A., 2013, Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye, *Seminars in cell & developmental biology*, 11-21.

Cam, M. ve Hışıl, Y., 2003, Gıdalardaki flavonoidler ve önemleri, 3, *Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara*, 2-4.

Canibano-Hernandez, A., del Burgo, L. S., Espona-Noguera, A., Ciriza, J. ve Pedraz, J. L., 2018, Current advanced therapy cell-based medicinal products for type-1-diabetes treatment, *International journal of pharmaceutics*, 543 (1-2), 107-120.

Chakrabarti, R. ve Rajagopalan, R., 2002, Diabetes and insulin resistance associated disorders: disease and the therapy, *Current science*, 1533-1538.

Chang, T., 2012, Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors, 1, 2.

Chaturvedi, A. K., 2018, Extraction of neutraceuticals from plants by microwave assisted extraction, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 9 (1), 31-35.

Chaudière, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999, Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms, *Food and chemical toxicology*, 37 (9-10), 949-962.

Cheng, B., Gong, H., Xiao, H., Petersen, R. B., Zheng, L. ve Huang, K., 2013, Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: a therapeutic strategy for protein misfolding diseases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830 (10), 4860-4871.

Chitsazi, M. R., Korbekandi, H., Asghari, G., Bahri Najafi, R., Badii, A. ve Iravani, S., 2016, Synthesis of silver nanoparticles using methanol and dichloromethane extracts of Pulicaria gnaphalodes (Vent.) Boiss. aerial parts, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44 (1), 328-333.

Cho, N., Shaw, J., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J., Ohlrogge, A. ve Malanda, B., 2018, IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045, *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271-281.

Cohen, S. D. ve Kennedy, J. A., 2010, Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics, *Critical reviews in food science and nutrition*, 50 (7), 620-643.

Colizzi, C., 2019, The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review, *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 5, 184-196.

Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. ve Smit, N. P., 1997, Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (42), 26226-26235.

Cooper, M. E., Bonnet, F., Oldfield, M. ve Jandeleit-Dahm, K., 2001, Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview, Oxford University Press.

Cummings, J. L. ve Back, C., 1998, The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease, *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 6 (2), S64-S78.

Curto, E. V., Kwong, C., Hermersdörfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing Jr, V. J. ve Dooley, T. P., 1999, Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors, *Biochemical pharmacology*, 57 (6), 663-672.

Çimen, M. B. Y., 1999, Flavonoidler ve antioksidan özellikleri, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 19 (5), 296-304.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. ve Masella, R., 2007, Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43 (4), 348.

D'Archivio, M., Filesi, C., Varì, R., Scazzocchio, B. ve Masella, R., 2010, Bioavailability of the polyphenols: status and controversies, *International journal of molecular sciences*, 11 (4), 1321-1342.

Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Lin, J. K., Farzadfar, F., Khang, Y.-H. ve Stevens, G. A., 2011, National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2· 7 million participants, *The Lancet*, 378 (9785), 31-40.

Dastmalchi, K., Dorman, H. D., Vuorela, H. ve Hiltunen, R., 2007, Plants as potential sources for drug development against Alzheimer's disease, *Int J Biomed Pharm Sci*, 1 (2), 83-104.

Davies, K. J., 1995, Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochemical Society Symposia*, 1-31.

Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. ve Kumar, S., 2017, Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of Withania somnifera, *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1193-S1199.

Dhawan, D. ve Gupta, J., 2017, Research Article Comparison of Different Solvents for Phytochemical Extraction Potential from Datura metel Plant Leaves, *Int. J. Biol. Chem*, 11, 17-22.

Dinis, T. C., Madeira, V. M. ve Almeida, L. M., 1994, Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers, *Archives of biochemistry and biophysics*, 315 (1), 161-169.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. ve Ju, Y.-H., 2014, Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica, *Journal of food and drug analysis*, 22 (3), 296-302.

Domingueti, C. P., Dusse, L. M. S. A., das Graças Carvalho, M., de Sousa, L. P., Gomes, K. B. ve Fernandes, A. P., 2016, Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications, *Journal of Diabetes and its Complications*, 30 (4), 738-745.

Du, X., Wang, X. ve Geng, M., 2018, Alzheimer's disease hypothesis and related therapies, *Translational neurodegeneration*, 7 (1), 2.

E Abdel Moneim, A., 2015, Oxidant/antioxidant imbalance and the risk of Alzheimer's disease, *Current Alzheimer Research*, 12 (4), 335-349.

Egea, J., Martin-de-Saavedra, M., Parada, E., Romero, A., Del Barrio, L., Rosa, A., Garcia, A. ve Lopez, M., 2012, Galantamine elicits neuroprotection by inhibiting iNOS, NADPH oxidase and ROS in hippocampal slices stressed with anoxia/reoxygenation, *Neuropharmacology*, 62 (2), 1082-1090.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V. ve Featherstone, R. M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical pharmacology*, 7 (2), 88-95.

Engasser, P. G., 1984, Ochronosis caused by bleaching creams, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 10 (6), 1072.

Enz, A., Amstutz, R., Boddeke, H., Gmelin, G. ve Malanowski, J., 1993, Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease, In: Progress in brain research, Eds: Elsevier, p. 431-438.

Fang, Y.-Z., Yang, S. ve Wu, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18 (10), 872-879.

Farràs, A., Másedas, G., Les, F., Terrado, E. M., Mitjans, M. ve López, V., 2019, Evaluation of anti-tyrosinase and antioxidant properties of four fern species for potential cosmetic applications, *Forests*, 10 (2), 179.

Feldman, H. H., Ferris, S., Winblad, B., Sfikas, N., Mancione, L., He, Y., Tekin, S., Burns, A., Cummings, J. ve del Ser, T., 2007, Effect of rivastigmine on delay to diagnosis of Alzheimer's disease from mild cognitive impairment: the InDDEx study, *The Lancet Neurology*, 6 (6), 501-512.

Fettach, S., Mrabti, H. N., Sayah, K., Bouyahya, A., Salhi, N., Cherrah, Y. ve El Abbes, F. M., 2019, Phenolic content, acute toxicity of Ajuga iva extracts and assessment of their antioxidant and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects, *South African Journal of Botany*, 125, 381-385.

Fisman, E. Z., Motro, M. ve Tenenbaum, A., 2008, Non-insulin antidiabetic therapy in cardiac patients: current problems and future prospects, In: Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets, Eds: Karger Publishers, p. 154-170.

Forbes, J. M. ve Cooper, M. E., 2013, Mechanisms of diabetic complications, *Physiological reviews*, 93 (1), 137-188.

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. ve Wilcock, G. K., 1999, The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66 (2), 137-147.

Franz, M. J., Boucher, J. L., Rutten-Ramos, S. ve VanWormer, J. J., 2015, Lifestyle weight-loss intervention outcomes in overweight and obese adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials, *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115 (9), 1447-1463.

Friedman, M., 1996, Food browning and its prevention: an overview, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 44 (3), 631-653.

Funk, V., Susanna, A., Stuessy, T. ve Bayer, R., 2009, Systematics, *Evolution, and Biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy, Vienna*, 777.

Ghani, U., Nur-e-Alam, M., Yousaf, M., Ul-Haq, Z., Noman, O. M. ve Al-Rehaily, A. J., 2019, Natural flavonoid α-glucosidase inhibitors from Retama raetam: Enzyme inhibition and molecular docking reveal important interactions with the enzyme active site, *Bioorganic Chemistry*, 87, 736-742.

Ghosh, D. ve Parida, P., 2016, Drug Discovery and Development of Type 2 Diabetes Mellitus: Modern-Integrative Medicinal Approach, *Current drug discovery technologies*, 13 (2), 60-67.

Giacobini, E., 2001, Selective inhibitors of butyrylcholinesterase, *Drugs & aging*, 18 (12), 891-898.

Giacobini, E., 2004, Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives, *Pharmacological research*, 50 (4), 433-440.

Giordani, R. B., Pagliosa, L. B., Henriques, A. T., Zuanazzi, J. A. S. ve Dutilh, J. H., 2008, Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de Hippeastrum (Amaryllidaceae), *Química Nova*.

Goncalves, S. ve Romano, A., 2017, Inhibitory properties of phenolic compounds against enzymes linked with human diseases, In: Phenolic compounds-biological activity, Eds: InTech. London, p. 581-770.

Graziella Tocco, A. F., Gabriele Meli, Michela'nın Begala, Gianni Podda, M.Benedetta Fadda, Marcella Corda, Orazio A. Attanasi, Paolino Filippone, Stefano Berretta 2009, Bazı kardol-kumarin türevlerinin kardol ve çözünür polimer destekli sentezinin PEG-immobilizasyonu: Mantar tirozinaz inhibitör aktivitelerinin ön değerlendirmesi, 19 (1), 36-39.

Gupta, A. K., Gover, M. D., Nouri, K. ve Taylor, S., 2006, The treatment of melasma: a review of clinical trials, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 55 (6), 1048-1065.

Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D. ve Malawska, B., 2015, Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease, *Current Medicinal Chemistry*, 22 (3), 373-404.

Gülçin, I., 2007, Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa, *Amino acids*, 32 (3), 431.

Gülçin, İ., 2006, Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life sciences*, 78 (8), 803-811.

Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A. ve Elias, R., 2006, The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of Hedera colchica: 3-O-(β-d-glucopyranosyl)-hederagenin, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20 (2), 130-134.

Güner, A. ve Aslan, S., 2012, Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler), Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, p.

Gürün, M. S., 2004, BİTKİSEL TIP, *Ankem Derg*, 18 (2), 133-136.

Halaban, R., Patton, R. S., Cheng, E., Svedine, S., Trombetta, E. S., Wahl, M. L., Ariyan, S. ve Hebert, D. N., 2002, Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (17), 14821-14828.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J., 1989, Free radicals in biology and medicine, Clarendon, Oxford.

Halliwell, B. ve Chirico, S., 1993, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57 (5), 715-725.

Halliwell, B., 1990, How to characterize a biological antioxidant, *Free radical research communications*, 9 (1), 1-32.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M., 2015, Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, USA, p.

Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E. ve Snyder, P. J., 2018, The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease, *Brain*, 141 (7), 1917-1933.

Harman, D., 1956, Free radical theory of againg, *J. Gerontol.*, 12, 257-263.

Hearing, V. J. ve Jiménez, M., 1987, Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *International Journal of Biochemistry*, 19 (12), 1141-1147.

Hebert, L. E., Scherr, P. A., Beckett, L. A., Albert, M. S., Pilgrim, D. M., Chown, M. J., Funkenstein, H. H. ve Evans, D. A., 1995, Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population, *Jama*, 273 (17), 1354-1359.

Heinrich, M. ve Teoh, H. L., 2004, Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge, *Journal of ethnopharmacology*, 92 (2-3), 147-162.

Hickey, E. ve Bourgeois, M. S., 2011, Dementia: From diagnosis to management-A functional approach, Psychology Press, p.

Hollander, P., 2007, Anti-diabetes and anti-obesity medications: effects on weight in people with diabetes, *Diabetes Spectrum*, 20 (3), 159-165.

Houghton, P. J., Ren, Y. ve Howes, M.-J., 2006, Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi, *Natural product reports*, 23 (2), 181-199.

Howes, M. J. R., Perry, N. S. ve Houghton, P. J., 2003, Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17 (1), 1-18.

Högenauer, K., Baumann, K., Enz, A. ve Mulzer, J., 2001, Synthesis and acetylcholinesterase inhibition of 5-desamino huperzine A derivatives, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11 (19), 2627-2630.

İnce, M., 2010, Diyabet Hastalarının Beslenmesinde Besin Destek Ögesi Olarak Kullanılan Bitki Ve Baharatlar, Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Ünv.*, Afyon.

Jayasena, T., Poljak, A., Smythe, G., Braidy, N., Muench, G. ve Sachdev, P., 2013, The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease, *Ageing research reviews*, 12 (4), 867-883.

Kahn, S. E., Hull, R. L. ve Utzschneider, K. M., 2006, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, 444 (7121), 840.

Kahn SE, C. M., Del Prato S., 2014, Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future., 383(9922): 1068-9983.

Kahn, V. ve Andrawis, A., 1985, Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone, *Phytochemistry*, 24 (5), 905-908.

Kahn, V., Ben-Shalom, N. ve Zakin, V., 1997, Effect of kojic acid on the oxidation of N-acetyldopamine by mushroom tyrosinase, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 45 (11), 4460-4465.

Kaya, Y. ve Aksakal, Ö., 2005, Distribution of endemic plants in the World and Turkey, *Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi; Vol 7, No 1 (2005); 85-99*.

Khan, M., Khan, M., Adil, S. F., Tahir, M. N., Tremel, W., Alkhathlan, H. Z., Al-Warthan, A. ve Siddiqui, M. R. H., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles mediated by Pulicaria glutinosa extract, *International journal of nanomedicine*, 8, 1507.

Khoddami, A., Wilkes, M. A. ve Roberts, T. H., 2013, Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*, 18 (2), 2328-2375.

Kim, K.-A., Shin, Y.-J., Akram, M., Kim, E.-S., Choi, K.-W., Suh, H., Lee, C.-H. ve Bae, O.-N., 2014, High glucose condition induces autophagy in endothelial progenitor cells contributing to angiogenic impairment, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37 (7), 1248-1252.

Kim, Y.-J. ve Uyama, H., 2005, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 62 (15), 1707-1723.

Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Ozer, M. S., Cengiz, M., Atılgan, N., Ceylan, O. ve Tepe, B., 2018, Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of Onosma tauricum var. tauricum, *Industrial Crops and Products*, 125, 549-555.

Kolaç, T., Gürbüz, P. ve Yetiş, G., 2017, Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği ve Antioksidan Özellikleri, *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 5 (1), 26-42.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R. ve Bono, A., 2007, Phytochemical antioxidants for health and medicine a move towards nature, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2 (4), 97-104.

Labazi, H. ve Trask, A. J., 2017, Coronary microvascular disease as an early culprit in the pathophysiology of diabetes and metabolic syndrome, *Pharmacological research*, 123, 114-121.

Langcake, P. ve Pryce, R., 1977, A new class of phytoalexins from grapevines, *Experientia*, 33 (2), 151-152.

Leaman, D. J., 2006, Sustainable wild collection of medicinal and aromatic plants: development of an international standard, *Frontis*, 97-107.

Lim, Y. P., Pang, S. F., Yusoff, M. M., Abdul Mudalip, S. K. ve Gimbun, J., 2019, Correlation between the extraction yield of mangiferin to the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of Phaleria macrocarpa fruits, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 14, 100224.

Liu, L. L., Yang, J. L. ve Shi, Y. P., 2010, Phytochemicals and biological activities of Pulicaria species, *Chemistry & biodiversity*, 7 (2), 327-349.

Lou, Y.-H., Wang, J.-S., Dong, G., Guo, P.-P., Wei, D.-D., Xie, S.-S., Yang, M.-H. ve Kong, L.-Y., 2015, The acute hepatotoxicity of tacrine explained by 1 H NMR based metabolomic profiling, *Toxicology Research*, 4 (6), 1465-1478.

Maeda, K. ve Fukuda, M., 1991, In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *J Soc Cosmet Chem*, 42 (2), 361-368.

Mai, T. T. ve Chuyen, N. V., 2007, Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr and Perry, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71 (1), 69-76.

Maiese, K., 2015, New insights for oxidative stress and diabetes mellitus, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.

Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S. ve Lockridge, O., 2007, A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India, *Clinica chimica acta*, 378 (1-2), 128-135.

Marco, J. A., Sanz, J. F. ve Albiach, R., 1992, Caryophyllene derivatives from *Pulicaria dysenterica*, *Phytochemistry*, 31 (7), 2409-2413.

Mathers, C. D. ve Loncar, D., 2006, Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030, *PLoS medicine*, 3 (11), e442.

Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H. ve Sugiyama, M., 2006, Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis, *Journal of Biological Chemistry*, 281 (13), 8981-8990.

Mayer, A. M., 1986, Polyphenol oxidases in plants-recent progress, *Phytochemistry*, 26 (1), 11-20.

McCormick, D. A., 1989, Acetylcholine: distribution, receptors, and actions, *Semin Neurosci*, 1, 91-101.

Mehrani, H. ve Storey, K. B., 1993, Characterization of α-glucosidases from rainbow trout liver, *Archives of biochemistry and biophysics*, 306 (1), 188-194.

Mehta, S. K. ve Gowder, S. J. T., 2015, Members of antioxidant machinery and their functions, *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, 59-85.

Mohamed T, R. P., 2011, Alzheimer's disease: Emerging trends in small molecule therapies., 4299–4320.

Mosher, A.M., Pathak. M.A., Fitzpatrick., T.B., 1983, (Dermatology in General Medicine), 205–225.

Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. ve Houghton, P. J., 2007, Acetylcholinesterase inhibitors from plants, *Phytomedicine*, 14 (4), 289-300.

Mumivand, H., Rustaii, A.-R., Jahanbin, K. ve Dastan, D., 2010, Essential oil composition of Pulicaria dysenterica (L.) Bernh from Iran, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13 (6), 717-720.

Murray, A. P., Faraoni, M. B., Castro, M. J., Alza, N. P. ve Cavallaro, V., 2013, Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy, *Current Neuropharmacology*, 11 (4), 388-413.

Nabiel, A. M. S., 2003, Global phytochemistry: the Egyptian expe-rience, 239–241.

Naczk, M. ve Shahidi, F., 2004, Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, 1054 (1-2), 95-111.

Nelson, D. L., Lehninger, A. L. ve Cox, M. M., 2008, Lehninger principles of biochemistry, Macmillan, p.

Nimse, S. B. ve Pal, D., 2015, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Advances*, 5 (35), 27986-28006.

Nordberg, J. ve Arnér, E. S., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (11), 1287-1312.

Oh, M., Houghton, P., Whang, W. ve Cho, J., 2004, Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity, *Phytomedicine*, 11 (6), 544-548.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I. ve Schrag, J., 1992, The α/β hydrolase fold, *Protein Engineering, Design and Selection*, 5 (3), 197-211.

Orhan, D. D., Senol, F. S., Hosbas, S. ve Orhan, I. E., 2014, Assessment of cholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant properties of Viscum album L. samples collected from different host plants and its two principal substances, *Industrial Crops and Products*, 62, 341-349.

Orhan, G., Orhan, I., Subutay-Oztekin, N., Ak, F. ve Sener, B., 2009, Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues

for the treatment of Alzheimer's disease, *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 4 (1), 43-51.

Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M. ve Khalid, A., 2004, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants, *Journal of ethnopharmacology*, 91 (1), 57-60.

Ozer, M. S., Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Ceylan, O., Atılgan, N. ve Tepe, B., 2018, Onosma heterophyllum: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities, *Industrial Crops and Products*, 111, 179-184.

Palanisamy, U. D., Ling, L. T., Manaharan, T. ve Appleton, D., 2011, Rapid isolation of geraniin from Nephelium lappaceum rind waste and its anti-hyperglycemic activity, *Food Chemistry*, 127 (1), 21-27.

Pang, B., Zhou, Q., Li, J.-L., Zhao, L.-H. ve Tong, X.-L., 2014, Treatment of refractory diabetic gastroparesis: Western medicine and traditional Chinese medicine therapies, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20 (21), 6504.

Panzella, L. ve Napolitano, A., 2019, Natural and Bioinspired Phenolic Compounds as Tyrosinase Inhibitors for the Treatment of Skin Hyperpigmentation: Recent Advances, *Cosmetics*, 6 (4), 57.

Patel, S. V., 1995, Pharmacotherapy of cognitive impairment in Alzheimer's disease: a review, *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 8 (2), 81-95.

Perera, H. K. I. ve Handuwalage, C. S., 2015, Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices, *BMC complementary and alternative medicine*, 15 (1), 175.

Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C., 2008, Free radicals, antioxidants in disease and health, *International journal of biomedical science: IJBS*, 4 (2), 89.

Pillaiyar, T., Manickam, M. ve Jung, S.-H., 2015, Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009–2014), *Expert opinion on therapeutic patents*, 25 (7), 775-788.

Pillaiyar, T., Manickam, M. ve Jung, S.-H., 2017, Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis, *Cellular Signalling*, 40, 99-115.

Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M. ve Jung, S.-H., 2018, Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review, *Journal of Medicinal Chemistry*, 61 (17), 7395-7418.

Polinsky, R. J., 1998, Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease, *Clinical therapeutics*, 20 (4), 634-647.

Prieto, P., Pineda, M. ve Aguilar, M., 1999, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E, *Analytical biochemistry*, 269 (2), 337-341.

Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Tomé, S. M., Oliveira, E. F. T., Viegas, M. F., Araújo, A. N., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A. ve Fernandes, E., 2019, Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic α-amylase towards a structure–activity relationship, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34 (1), 577-588.

Puentes, W. J., Bradway, C. K. ve Aselage, M., 2012, Older adult mental health: Teaching senior-level baccalaureate nursing students what they need to know, *Journal of gerontological nursing*, 36 (7), 44-53.

Puri, B. ve Hall, A., 1998, Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants, CRC press, p.

Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.-C., Bailleul, F. ve Trotin, F., 2000, Phenolic compounds and antioxidant

activities of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour, *Journal of ethnopharmacology*, 72 (1-2), 35-42.

Rabasa-Lhoret, R. ve Chiasson, J., 2004, Alpha-glucosidase inhibitors. W: De Fronzo RA, Ferrannini E., Keen H., Zimmet P.(red.) International textbook of diabetes mellitus. Wyd. 3, Wiley and Sons, Chichester.

Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C. ve Govoni, S., 2004, Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules, *Pharmacological research*, 50 (4), 441-451.

Ragab, E. A. ve Raafat, M., 2016, A new monoterpene glucoside and complete assignments of dihydroflavonols of *Pulicaria jaubertii*: potential cytotoxic and blood pressure lowering activity, *Natural Product Research*, 30 (11), 1280-1288.

Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D. ve Levine, M. J., 1996, Structure of human salivary α-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 52 (3), 435-446.

Rastija, V., Bešlo, D. ve Nikolić, S., 2012, Two-dimensional quantitative structure–activity relationship study on polyphenols as inhibitors of α-glucosidase, *Medicinal chemistry research*, 21 (12), 3984-3993.

Rauf, A. ve Jehan, N., 2017, Natural products as a potential enzyme inhibitors from medicinal plants, In: Enzyme Inhibitors and Activators, Eds: InTech, Rijeka, p. 165-177.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.

Revadigar, V., Ghalib, R. M., Murugaiyah, V., Embaby, M. A., Jawad, A., Mehdi, S. H., Hashim, R. ve Sulaiman, O., 2014, Enzyme inhibitors involved in the treatment of Alzheimer's disease, In: Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease, Eds: Elsevier, p. 142-198.

Rhee, I. K., van de Meent, M., Ingkaninan, K. ve Verpoorte, R., 2001, Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining, *Journal of Chromatography A*, 915 (1-2), 217-223.

Rice-Evans, C., Miller, N. ve Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in plant science*, 2 (4), 152-159.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. ve Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7), 933-956.

Rocchetti, G., Pagnossa, J. P., Blasi, F., Cossignani, L., Hilsdorf Piccoli, R., Zengin, G., Montesano, D., Cocconcelli, P. S. ve Lucini, L., 2020, Phenolic profiling and in vitro bioactivity of Moringa oleifera leaves as affected by different extraction solvents, *Food Research International*, 127, 108712.

Sánchez-Valdepeñas, V., Barrajon, E., Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Valero, M. ve Saura, D., 2015, Effect of instant controlled pressure drop (DIC) pre-treatment on conventional solvent extraction of phenolic compounds from grape stalk powder, *Industrial Crops and Products*, 76, 545-549.

Sardarodiyan, M. ve Mohamadi Sani, A., 2016, Natural antioxidants: sources, extraction and application in food systems, *Nutrition & Food Science*, 46 (3), 363-373.

Sarikurkcu, C., 2011, Antioxidant activities of solvent extracts from endemic Cyclamen mirabile Hildebr. tubers and leaves, *African Journal of Biotechnology*, 10 (5), 831-839.

Sarikurkcu, C., Eskici, M., Karanfil, A. ve Tepe, B., 2019, Phenolic profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of two endemic Nepeta species: Nepeta nuda subsp. glandulifera and N. cadmea, *South African Journal of Botany*, 120, 298-301.

Sarma, A. D., Mallick, A. R. ve Ghosh, A., 2010, Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview, *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1 (3), 185-192.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T., Hardy, J., Hutton, M. ve Kukull, W., 1996, Secreted amyloid β–protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease, *Nature medicine*, 2 (8), 864.

Segel, I. H. v. Segel., A. H., 1976, Biochemical calculations: how to solve mathematical problems in general biochemistry.

Semenkovich, K., Brown, M. E., Svrakic, D. M. ve Lustman, P. J., 2015, Depression in type 2 diabetes mellitus: prevalence, impact, and treatment, *Drugs*, 75 (6), 577-587.

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. ve De, B., 2010, Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3 (1), 91-100.

Sevgi, K., Tepe, B. ve Sarikurkcu, C., 2015, Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids, *Food and chemical toxicology*, 77, 12-21.

Shah, R. B., Patel, M., Maahs, D. M. ve Shah, V. N., 2016, Insulin delivery methods: Past, present and future, *International journal of pharmaceutical investigation*, 6 (1), 1.

Shahidi, F., Naczk, M., 1995, Food phenolics, *Lancaster and Basel: Technomic Publishing, Lancaster*, 566.

Shahidi, F. H., C.-T. (Eds), 2007, Antioxidant Measurement and Applications, *American Chemical Society, Washington, DC, USA.*

Shapiro, R. ve Vallee, B. L., 1991, Interaction of human placental ribonuclease with placental ribonuclease inhibitor, *Biochemistry*, 30 (8), 2246-2255.

Sharifuddin, Y., Chin, Y.-X., Lim, P.-E. ve Phang, S.-M., 2015, Potential bioactive compounds from seaweed for diabetes management, *Marine drugs*, 13 (8), 5447-5491.

Sheng, Z., Zhao, J., Muhammad, I. ve Zhang, Y., 2018, Optimization of total phenolic content from Terminalia chebula Retz. fruits using response surface methodology and evaluation of their antioxidant activities, *PLOS ONE*, 13 (8), e0202368.

Sherwin, E., 1990, Food Additives. Ed. by L. Branen, Marcel Dekker, New York.

Shinde, A., Ganu, J. ve Naik, P., 2012, Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review, *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1 (2), 63.

Sies, H. ve Stahl, W., 1995, Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants, *The American journal of clinical nutrition*, 62 (6), 1315S-1321S.

Sim, Y. Y., Jess Ong, W. T. ve Nyam, K. L., 2019, Effect of various solvents on the pulsed ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from Hibiscus cannabinus L. leaves, *Industrial Crops and Products*, 140, 111708.

Skeggs, L. T., Kahn, J. R. ve Shumway, N. P., 1956, The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme, *Journal of Experimental Medicine*, 103 (3), 295-299.

Slinkard, K. ve Singleton, V. L., 1977, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American journal of Enology and Viticulture*, 28 (1), 49-55.

Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. ve Wortsman, J., 2004, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiological reviews*, 84 (4), 1155-1228.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I. ve Bahorun, T., 2005, Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579 (1-2), 200-213.

Stavri, M.K. T. M., A. Gordon, S. D. Shnyder, R. A. Falconer, S. Gibbons 2008, Phytochemistry, 69, 1915.

Stein, S. A., Lamos, E. M. ve Davis, S. N., 2013, A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs, *Expert opinion on drug safety*, 12 (2), 153-175.

Suh WH, S. K., Suh YH, 2005, Therapeutic agents for Alzheimer's disease. Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents., 259–269.

Sut, S., Dall'Acqua, S., Zengin, G., Senkardes, I., Bulut, G., Cvetanović, A., Stupar, A., Mandić, A., Picot-Allain, C. ve Dogan, A., 2019, Influence of different extraction techniques on the chemical profile and biological properties of Anthemis cotula L.: Multifunctional aspects for potential pharmaceutical applications, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 173, 75-85.

Tamler, R. ve Deveney, T., 2010, Hypogonadism, erectile dysfunction, and type 2 diabetes mellitus: what the clinician needs to know, *Postgraduate medicine*, 122 (6), 165-175.

Tan, L.-H., Zhang, D., Yu, B., Zhao, S.-P. ve Cao, W.-G., 2015, Antioxidant activity of the different polar solvent extracts of Magnolia officinalis leaves and purification of main active compounds, *European Food Research and Technology*, 240 (4), 815-822.

Tariot, P. N., 2006, Contemporary issues in the treatment of Alzheimer's disease: tangible benefits of current therapies, *The Journal of clinical psychiatry*, 67, 15-22; quiz 23.

Thomas, C. C. ve Philipson, L. H., 2015, Update on diabetes classification, *Medical Clinics*, 99 (1), 1-16.

Thompson, S., Lanctôt, K. L. ve Herrmann, N., 2004, The benefits and risks associated with cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease, *Expert opinion on drug safety*, 3 (5), 425-440.

Thouri, A., Chahdoura, H., El Arem, A., Omri Hichri, A., Ben Hassin, R. ve Achour, L., 2017, Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti), *BMC complementary and alternative medicine*, 17 (1), 248-248.

Tougu, V., 2001, Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition, *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 1 (2), 155-170.

Tsao, R. ve Yang, R., 2003, Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1018 (1), 29-40.

Tückmantel, W., Kozikowski, A. P. ve Romanczyk, L. J., 1999, Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 1. Preparation of Building Blocks from (+)-Catechin. Procyanidin Formation. Synthesis of the Cancer Cell Growth Inhibitor, 3-O-

Galloyl-(2 R, 3 R)-epicatechin-4β, 8-[3-O-galloyl-(2 R, 3 R)-epicatechin], *Journal of the American Chemical Society*, 121 (51), 12073-12081.

Uddin, G., Rauf, A., Siddiqui, B. S. ve Shah, S. Q., 2011, Preliminary comparative phytochemical screening of Diospyros lotus Stewart, *Middle-East J Sci Res*, 10 (1), 78-81.

Ulewicz-Magulska, B. ve Wesolowski, M., 2019, Total Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Herbs Used for Medical and Culinary Purposes, *Plant Foods for Human Nutrition*, 74 (1), 61-67.

Uysal, T., 2006, Türkiye centaurea (asteraceae) cinsi cheirolepis (boiss.) o. hoffm. seksiyonunun morfolojik, karyolojik ve moleküler, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-biological interactions*, 160 (1), 1-40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. ve Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39 (1), 44-84.

Van Staa, T., Abenhaim, L. ve Monette, J., 1997, Rates of hypoglycemia in users of sulfonylureas, *Journal of clinical epidemiology*, 50 (6), 735-741.

Veličković, V., Đurović, S., Radojković, M., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Vujić, J., Trifunović, S. ve Mašković, P. Z., 2017, Application of conventional and non-conventional extraction approaches for extraction of Erica carnea L.: Chemical profile and biological activity of obtained extracts, *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 331-337.

Videira, I. F. d. S., Moura, D. F. L. ve Magina, S., 2013, Mechanisms regulating melanogenesis, *Anais brasileiros de dermatologia*, 88 (1), 76-83.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Bival Štefan, M., Alegro, A., Kőszegi, T. ve Petrik, J., 2011, Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected Micromeria species from Croatia, *Molecules*, 16 (2), 1454-1470.

Watkins, P. B., Zimmerman, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I. ve Lewis, K. W., 1994, Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease, *Jama*, 271 (13), 992-998.

Wernicke, T. F. ve Reischies, F. M., 1994, Prevalence of dementia in old age: clinical diagnoses in subjects aged 95 years and older, *Neurology*, 44 (2), 250-250.

WHO, 1979, Science and technology for health promotion in developing countries, Geneva: World Health Organization.

WHO, 1999, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, Geneva: World health organization.

Wichi, H., 1988, Enhanced tumor development of butylated hydroxyanisol (BHA) from the prospective of effect on fore stomach and oesophageal squamous epithlium, *Food Chem Toxicol*, 26, 717-723.

Wiernsperger, N., 2003, Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy, *Diabetes & metabolism*, 29 (6), 579-585.

Williams, B. R., Nazarians, A. ve Gill, M. A., 2003, A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor, *Clinical therapeutics*, 25 (6), 1634-1653.

Williams, C. A., Harborne, J. B. ve Greenham, J., 2000, Geographical variation in the surface flavonoids of Pulicaria dysenterica, *Biochemical systematics and Ecology*, 28 (7), 679-687.

Williams, P., Sorribas, A. ve Howes, M.-J. R., 2011, Natural products as a source of Alzheimer's drug leads, *Natural product reports*, 28 (1), 48-77.

Winston, G. W., 1991, Oxidants and antioxidants in aquatic animals, *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 100 (1-2), 173-176.

Wu, L., Chen, C., Cheng, C., Dai, H., Ai, Y., Lin, C. ve Chung, Y., 2018, Evaluation of Tyrosinase Inhibitory, Antioxidant, Antimicrobial, and Antiaging Activities of Magnolia officinalis Extracts after Aspergillus niger Fermentation, *BioMed research international*, 2018, 5201786-5201786.

Xiaoying, R. C. W. J. M., Hongbo, H. R. C. S. S. ve Maibach, Z. D. Q. H. I., 1998, Human in vivo and in vitro hydroquinone topical bioavailability, metabolism, and disposition, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 54 (4), 301-317.

Xie, W. ve Du, L., 2011, Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13 (4), 289-301.

Xu, L.,Y. L., Yan Dai, Jinyong Peng, 2018, Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms.

Yang, J. y., Koo, J. h., Song, Y. g., Kwon, K. b., Lee, J. h., Sohn, H. s., Park, B. h., Jhee, E. c. ve Park, J. w., 2006, Stimulation of melanogenesis by scoparone in B16 melanoma cells 1, *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 (11), 1467-1473.

Yerlikaya, S., Zengin, G., Mollica, A., Baloglu, M. C., Celik Altunoglu, Y. ve Aktumsek, A., 2017, A multidirectional perspective for novel functional products: in vitro pharmacological activities and in silico studies on Ononis natrix subsp. hispanica, *Frontiers in pharmacology*, 8, 600.

You Yang, G. L., Biao Yu, 2015, Naturally Occurring Polyphenolic Glucosidase Inhibitors, *Israel Journal of Chemistry*, 55, 268– 284.

Yücel, E. ve Tülükoğlu, A., 2000, Gediz (Kütahya) çevresinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 9 (36), 12-14.

Zahabi, F., Asghari, G., Eskandarian, A. ve Yousefi, H., 2012, Leishmanicidal activity of Pulicaria gnaphalodes, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7 (5), 801.

Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R. ve Ceylan, O., 2014, A comprehensive study on phytochemical characterization of Haplophyllum myrtifolium Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes, *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.

Zengin, G., Mollica, A., Aumeeruddy, M. Z., Rengasamy, K. R. R. ve Mahomoodally, M. F., 2018, Phenolic profile and pharmacological propensities of Gynandriris sisyrinchium through in vitro and in silico perspectives, *Industrial Crops and Products*, 121, 328-337.

Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Stupar, A., Bulut, G., Senkardes, I., Dogan, A., Seebaluck-Sandoram, R., Rengasamy, K. R. ve Sinan, K. I., 2019, Chemical composition and bio-functional perspectives of Erica arborea L. extracts obtained by different extraction techniques: Innovative insights, *Industrial Crops and Products*, 142, 111843.

Zhao, B., Moochhala, S. M. ve Tham, S.-y., 2004, Biologically active components of Physostigma venenosum, *Journal of Chromatography B*, 812 (1-2), 183-192.

Zhou, H., Kepa, J. K., Siegel, D., Miura, S., Hiraki, Y. ve Ross, D., 2009, Benzene metabolite hydroquinone up-regulates chondromodulin-I and inhibits tube formation in human bone marrow endothelial cells, *Molecular pharmacology*, 76 (3), 579-587.

Zhou, T.-T., Ma, F., Shi, X.-F., Xu, X., Du, T., Guo, X.-D., Wang, G.-H., Yu, L., Rukachaisirikul, V. ve Hu, L.-H., 2017, DMT efficiently inhibits hepatic gluconeogenesis by regulating the Gαq signaling pathway, *Journal of molecular endocrinology*, 59 (2), 151-169.

Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M. ve Świeca, M., 2016, The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (Ocimum basilicum L.) extracts, *Saudi journal of biological sciences*, 23 (5), 628-633.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Özlem KAYACIK
Uyruğu	**:**	T.C
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya 15.08.1994
Telefon	**:**	05073738663
Faks	**:**	
e-mail	**:**	ozlem42251@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Erbil Koru Lisesi, Selçuklu, Konya	2012
Üniversite	:	Uşak Üniversitesi, Merkez, Uşak	2016
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2017	Pratik Özel Öğretim Kursu	Fen Bilimleri Öğretmeni
2018	Genç Hedef Özel Öğretim Kursu	Fen Bilimleri Öğretmeni
2019	Tedem Koleji	Fen Bilimleri Öğretmeni

UZMANLIK ALANI: Fen Bilgisi Eğitimi

YABANCI DİLLER: İngilizce

YAYINLAR

de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Zengin, G., Kayacık, O., Lobine, D., Mahomoodally, M. F., Leyva-Jiménez, F. J., & Segura-Carretero, A. 2019. Innovative perspectives on *Pulicaria dysenterica* extracts: Phyto-pharmaceutical properties, chemical characterization and multivariate analysis. Journal of the Science of Food and Agriculture. 99, 6001-6010.