



T.C.

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI MEŞE GALLERİNİN KOLİNESTERAZ,
TİROZİNAZ VE ÜREAZ ENZİM
İNİBİSYONU İLE ANTİOKSİDAN
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Merve DOĞAN ABDİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

**Haziran-2019
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Merve DOĞAN ABDİOĞLU tarafından hazırlanan "Bazı meşe gallerinin kolinesteraz, tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyonu ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi" adlı tez çalışması 24/6/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan
Doç. Dr. Mehmet BOĞA

Danışman
Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Üye
Dr. Öğr. Üyesi İ. Selçuk KURU

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Prof. Dr. Şahnaz TIGREK
FBE Müdürü


Bu tez çalışması Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18.001 nolu proje ile desteklenmiştir.

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.

Merve DOĞAN ABDİOĞLU

24.06.2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI MEŞE GALLERİNİN KOLİNESTERAZ, TİROZİNAZ VE ÜREAZ ENZİM İNHİBİSYONU İLE ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Merve DOĞAN ABDİOĞLU

Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ

2019, 60 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Doç. Dr. Mehmet BOĞA

Dr. Öğr. Üyesi İ. Selçuk KURU

Bu çalışmada, *Quercus brantii* L. üzerinde, oluşumu *Andricus quercustozae*, *Andricus cecconii* tarafından indüklenen ve *Quercus infectoria* üzerinde, oluşumu *Andricus quercusramuli* tarafından indüklenen gallerin metanol ekstralarının enzim inhibisyon ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır.

Enzim inhibisyon aktivitesi; asetil ve bütiril kolinesteraz, tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyonlarının spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. Ekstrelerin toplam fenolik miktarları galik asite, toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildikten sonra antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikali giderim, ABTS katyon radikali giderimi ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak belirlendi.

Kolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarına göre; ekstraların asetilkolinesteraz enzim inhibisyonunda aktif olmadığı, bütiril kolinesteraz enzim inhibisyonunda ise aktivite gösterdikleri sonucuna varılmıştır. En yüksek aktiviteyi 31.33 ± 1.25 inhibisyon oranı ile *A. quercustozae* gal ekstresi göstermiştir. Tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçlarına göre en yüksek aktiviteyi 61.16 ± 0.72 inhibisyon oranı ile *A. quercustozae* gal ekstresi göstermiştir. Üreaz inhibisyon aktivite sonucunda, *A. quercustozae* gal ekstresinin 40.98 ± 1.41 oranında aktivite gösterdiği, *A. quercusramuli* ve *A. cecconii* gal ekstralarının ise aktivite göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik içeriklerinin toplam flavonoid içeriklerinden yüksek olduğu saptanmıştır. Ekstreler genel olarak yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Öyle ki; bazı ekstralar pozitif kontrollerden daha yüksek aktivite göstermiştir.

Bu tez çalışması ile *A. quercustozae*, *A. cecconii* ve *A. quercusramuli* gal ekstralarıyla söz konusu biyolojik aktiviteler açısından ilk kez araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Andricus*, antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu, gal, *Quercus*

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF CHOLINESTERASE, TYROSINASE, UREASE ENZYME INHIBITORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME OAK GALLS

Merve DOĞAN ABDİOĞLU

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE / DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MECHANICAL ENGINEERING

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nesrin HAŞİMİ

2019, 60 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Assoc. Prof. Dr. Mehmet BOĞA

Asst. Prof. Dr. İ. Selçuk KURU

In the current study, the enzyme inhibition and antioxidant activity of the methanol extract of galls induced by the *Andricus quercustozae* and *Andricus. ceconii* on *Quercus brantii* L. and *Andricus quercusramuli* on *Quercus infectoria* were investigated.

The enzyme inhibition activity was determined by spectrophotometric measurement of acetylbutyryl cholinesterase, tyrosinase and urease enzyme inhibitions. Total phenolic and total flavonoid contents of the extracts were determined as gallic acid and quercetin equivalents, respectively and their antioxidant activity was carried out by using three different methods; DPPH free radical scavenging activity, ABTS cation radical scavenging activity and CUPRAC assays.

As a result of the cholinesterase inhibition activity, while the extracts were not active on acetylcholinesterase enzyme inhibition, they showed activity in the inhibition of butyrylcholinesterase enzyme. According to the results, the highest activity showed by *A. quercustozae* gall extract with an inhibition rate of $31.33 \pm 1.25\%$. The highest tyrosinase enzyme inhibition activity recorded by *A. quercustozae* gal extract with an inhibition rate of $61.16 \pm 0.72\%$. As a result of the urease inhibition activity, *A. quercustozae* gal extract showed activity ($40.98 \pm 1.41\%$), whereas *A. quercusramuli* and *A. ceconii* gal extracts did not show activity. Total phenolic contents of the extracts were found to be higher than total flavonoid contents. Extracts showed high antioxidant activity in general. That is, some extracts showed higher activity than positive controls.

In this thesis, *A. quercustozae*, *A. ceconii* and *A. quercusramuli* gall extracts were investigated for the first time in terms of mentioned biological activities.

Key Words: *Andricus*, antioxidant activity, enzyme inhibition, gall, *Quercus*

ÖNSÖZ

Çalışmam süresince benden bilgi ve ilgisini esirgemeyen, sevgi, hoşgörü ve güvenini her an duyumsadığım çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ'ye emekleri için içtenlikle teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim hayatım boyunca benden her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen, her zaman sevgilerini hissettiğim, yanımda olan canım anneme, babama ve bu süreçte aile olduğumuz canım eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve DOĞAN ABDİOĞLU
BATMAN-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Botanik Bilgiler.....	4
2.1.1. <i>Quercus</i> (Meşe) Cinsi	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Bitkisel Materyal ve Ekstraksiyon Yöntemi.....	18
3.2. Ekstrelerin Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi	19
3.2.1. Asetil ve Bütiril Kolinesteraz Enzim İnhibisyon Aktivitesi	19
3.2.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi.....	20
3.2.3. Üreaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi.....	21
3.3. Ekstrelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi	23
3.3.1. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi	23
3.3.2. DPPH Serbest Radikalı Giderim Aktivitesi Yöntemi.....	25
3.3.3. ABTS Katyon Radikal Giderim Aktivitesi Yöntemi.....	26
3.3.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)...	27
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Ekstraksiyon Yöntem Bulguları.....	29
4.2. Enzim İnhibisyon Aktivitesi Bulguları	29
4.2.1. Asetil ve Bütiril Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Bulguları.....	29
4.2.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Bulguları	30
4.2.3. Üreaz Enzim İnhibisyonu Bulguları	30
4.3. Antioksidan Aktivite Bulguları.....	31
4.3.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini Bulguları.....	31
4.3.2. DPPH Serbest Radikalı Giderim Aktivitesi Yöntemi Bulguları.....	31
4.3.3. ABTS Yöntemi (Katyon Radikalı Giderim Aktivitesi) Bulguları	34
4.3.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Bulguları	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µl : Mikrolitre

µg: Mikrogram

kDa: Kilodalton

M : Molar

mg: Miligram

ml : Mililitre

mM: Milimolar

nm : Nanometre

Kısaltmalar

AA: Askorbik asit

Ab: Beta-amiloid

ABTS : 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)

ACh: Asetilkolin

AChE : Asetilkolinesteraz

AcI: Asetil tiyokolin iyodür

AH: Alzheimer hastalığı

AHA: Asetohidoksamik asit

BCh: Bütirilkolin

BChE : Bütirilkolinesteraz

BcI : Butiril tiyokolin iyodür

BHA : Bütillenmiş hidroksianisol

BHT : Bütil hidroksitoluen

ChEI: Kolinestrez inhibitörleri

DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

DTNB: 5,5- ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)

FCR : Folin-Ciocalteu reaktifi

MEM: Memantin

MIK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

NFT: Nörofibril yumakları

ROS: Reaktif oksijen türleri

1. GİRİŞ

Türkiye'nin sahip olduğu flora zenginliği, türlerin sahip olduğu genetik varyasyonun yayılış alanı, iklimsel değişiklikler, habitatların çeşitliliği ve alanın jeolojik tarihi gibi birçok etken tarafından belirlenir. Gal; oluşumu bitki üzerinde virüsler, bakteriler, mantarlar, nematodlar, eklembacaklılar ve hatta diğer bitkiler tarafından tetiklenen anormal büyümelerdir. Gal indüklemesi, bitki hücrel mekanizmalarını ele geçirerek tamamen farklı özellik ve fonksiyonlara sahip yeni bitki yapıları oluşumunu içerir. Böcekler (eşek arısı, tatarcık sineği, sinekler, yaprak bitleri, akarlar, haşarat böcekleri, asma biti, ağaç biti vb.) yumurtalarını bitki kısımlarına bırakarak gal oluşumunu indüklerler. Ortaya çıkan larvalar bitki parçalarıyla beslenir ve gal oluşumuna neden olur.

Zengin flora içinde birçok yüksek yapılı bitkilerin doğal içeriği, sentetik antioksidan maddelerin yan etkilerine karşı önemli bir alternatif olmuştur. Doğal kaynakların kullanımına dönüş ile birlikte doğal antioksidan madde arayışları hız kazanmış bilim adamları doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya önem vermiştir. Ayrıca enzim inhibitörü potansiyeline sahip doğal bileşikler de ilaç endüstrisi açısından ilgi çekici olmuştur. Enzim inhibitörleri bulaşıcı, metabolik, kardiyovasküler, nörolojik hastalıklar ve kanser gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan çok çeşitli ilaçlara dahil edilmiştir (Copeland ve ark., 2007).

Demansın en sık görülen türü Alzheimer hastalığıdır (AH). AH, bilişsel yetenek kayıpları ve ağır davranış bozuklukları şeklinde tanımlanır. Kişinin ölümüne yol açan ilerleyici nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır (Xie ve ark., 2013). Son yıllarda, AH'nin gerçek nedeni hakkındaki belirsizlik, AH'nin tedavisi için çok çeşitli deneysel ilaçların geliştirilmesine, AH'nin karmaşıklığı da birçok farklı terapötik stratejinin geliştirilmesine yol açmıştır. Kolinesteraz inhibitörleri (ChEI) ve Memantin (MEM) semptomları geçici olarak iyileştiren AH için onaylanmış ilaçlardır. AH tedavisi için şu anda dört ilaç mevcuttur: galantamin, rivastigmin, donepezil ve memantin. İlk üçü asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleridir. Halen, AH'nin tedavisi ve önlenmesi açısından etkili bir tedavi yoktur. Popülasyonda AH'nin yükselmesi göz önünde bulundurulduğunda, hastalık düzenleyici ajanların geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır.

Tirozinaz, bakır içeren bir enzim olup deri ve saç rengini belirleyen melanin biyosentezinde kilit rol oynamaktadır. Melanin hiperpigmentasyonu ile ilişkili deri hastalıklarının tedavisinde tirozinaz inhibisyonunun klinik olarak kullanımı söz

konusudur. Ayrıca kozmetikte cilt rengini açma etkisi ile de önem arz etmektedir. Tirozinaz aktivitesini inhibe etmek için kojik asit gibi birçok sentetik inhibitör geliştirilmiş olmasına rağmen bunların uzun periyotta toksik etkilerinin bulunması, alternatif olarak doğal inhibitörlerin belirlenmesine yönelik çalışmaları hızlandırmıştır (Tocco ve ark., 2009).

Üre, zirai uygulamalarda en yaygın kullanılan gübredir. Üreaz inhibitörlerinin tarımsal uygulamalarda kullanımı, gıda arzını yeterli miktarlarda sağlama stratejilerinden biri olarak uzun süredir araştırılmaktadır. Bunun nedeni, dünya çapında en çok kullanılan azotlu (N) gübrelerden biri olan üre, hızlı bir şekilde toprak yüzeyinde üreazla hidrolize olan ve çevreye % 70 N kayıp veren bir hidrolize maruz kalmasıdır. Üreaz aktivitesi tarım endüstrisi yanında tıpta da önemli viral bir belirteçdir. Üreazlar, böbrek taşları ve enfeksiyonların oluşmasına ayrıca hepatik komaya da neden olmaktadır (Mobley, 1995). Bu tür hastalıkların tedavisinde üreaz enzimini inhibe edebilecek üreaz inhibitörleri üzerinde çalışılmaktadır (Onado ve ark., 1990). İnsanlarda ve hayvanlarda üreaz içeren patojenlerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların geliştirilebilmesi için üreaz inhibitörü üzerinde yapılacak çalışmalar oldukça önemlidir (Amtul ve ark., 2002). Son yıllarda bu amaç için çeşitli bitki ekstraktlarının üreaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmaktadır (Hemminga ve Duarte, 2000).

Serbest radikal, bir atomik yörüngede eşleşmemiş bir elektron içeren bağımsız varlığa sahip herhangi bir moleküler tür olarak tanımlanabilir. Eşleşmemiş bir elektronun varlığı çoğu radikalın sahip olduğu bazı ortak özelliklerle sonuçlanır. Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir. Bir moleküle elektron verebilir veya molekülden elektron alabilir, bu nedenle oksidan veya indirgeyici görevi görürler (Cheeseman ve Slater, 1993). Serbest radikallerin hedefleri vücuttaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipitler, nükleik asitler ve proteinler ana hedeflerdir. Serbest radikallerin hücre içinde önemli makro moleküllere saldırısı sonucu hücre hasarı ve homeostatik bozulma gelişir. İki ana ölüm nedeni olan kanser ve ateroskleroz belirgin “serbest radikal” hastalıklarıdır. Oksidatif stresin şimdi tüm enflamatuar hastalıklara (artrit, vaskülit, glomerülonefrit, lupus eritematöz, yetişkin solunum yolu hastalıkları sendromu), iskemik hastalıklar (kalp hastalıkları, inme, intestinal iskemi), hemokromatoz, kazanılmış immün yetmezlik sendromu, afiziye önemli bir katkı yaptığı düşünülmektedir.

Antioksidanlar, düşük miktarlarda, oksitlenebilir bir substrat ile karşılaştırıldığında, substratın oksitlenmesini geciktirebilen veya önleyebilen moleküller olarak tanımlanabilir (Becker ve ark., 2004). Serbest radikallere karşı koruma, diyet antioksidanlarının bolca alınmasıyla arttırılabilir. Antioksidan içeren yiyeceklerin ve özellikle de antioksidan besinlerin hastalıkların önlenmesinde büyük öneme sahip olabileceğini gösteren önemli kanıtlar vardır. Bununla birlikte, bilim adamları arasında, tek bir antioksidandan ziyade, antioksidanların bir kombinasyonunun uzun vadede daha etkili olabileceğine dair bir fikir birliği vardır. Antioksidanlar dejeneratif hastalıkların başlangıcını erteleyerek veya önleyerek yaşam kalitesini iyileştirmede büyük yarar sağlayabilirler.

Lipid oksidasyonu, istenmeyen gıda maddeleri ve potansiyel olarak toksik bileşiklerin oluşumu nedeniyle gıda endüstrisi için bir öneme sahiptir. Gıda oksidasyonunu önlemenin bir yolu, antioksidanların kullanılmasıdır. Günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan sentetik antioksidanların birkaç zararlı sağlık etkisine sahip olduğu bulunmuştur. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksil toluen (BHT) gibi sentetik antioksidanların, laboratuvar hayvanlarında kanserojen ve karaciğer hasarından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Bu değişiklikler kansere, ateroskleroza ve kardiyovasküler hastalıklara katkıda bulunur (Braca ve ark., 2002). Bu anlamda, doğal antioksidanlara, özellikle bitki kaynaklı antioksidan bileşiklere artan bir ilgi vardır. Bitkilerin tıbbi yararları arasındaki antioksidan özellikleri, vücuttaki serbest radikallerin neden olduğu sayısız oksidatif hasarın önlenmesinde veya azaltılmasındaki rollerinden dolayı artan ilgi görmüştür (Abiy, 2005).

Bu çalışmada; Şirvan/Siirt çevresinde *Andricus quercusramuli*, *Andricus quercustozae*, *Andricus ceconii* arılarının *Quercus infectoria* ve *Quercus brantii* L. bitki türleri üzerinde oluşturduğu gallerin metanol ekstratlarının enzim inhibisyon ve antioksidan aktiviteleri araştırılması amaçlanmıştır. Literatüre baktığımızda galler ile yapılmış bu tarz çalışmalarda yüksek biyolojik aktiviteler dikkat çekmektedir. Seçmiş olduğumuz türler ile ilgili daha önce hiçbir araştırma yapılmamış olması çalışmamızın özgün değerini arttırmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. *Quercus* (Meşe) Cinsi

Türkiye, sadece tür zenginliğinden değil aynı zamanda yüksek genetik çeşitliliğinden dolayı Akdeniz'in en önemli bölgelerinden biridir. Bunun nedenleri, Anadolu'nun çok karmaşık jeolojik tarihi, heterojen topoğrafya, çeşitli iklimler, çeşitli fitocoğrafik bölgelerin varlığı ve Avrupa ile Asya arasındaki yeri ile açıklanmıştır (Çıplak ve ark., 1993; Avcı, 1993; Çıplak, 2003, 2004; Korkmaz ve ark., 2010).

Fagaceae familyasına üye olan *Quercus* cinsi dünyada 531 türle temsil edilmektedir. Bu türlerin 250'si Amerika, 125'i Asya, geri kalanı ise Avrupa, Kuzey Afrika ve Mikronezya habitatında yetişir (Govaerts ve Frodin, 1998). Türkiye'de yetişen 18 farklı türü ve ayrıca birçok alttür çeşidi ve melezleri vardır.

Meşe türleri ahşabın anatomik yapılarına, meyve olgunlaşma dönemlerine, yaprak ve kabukların özelliklerine göre üç ana gruba ayrılır. Bunlar;

- Ak meşe
- Kırmızı meşe
- Herdem yeşil meşe

Çalışmamıza konu olan *Quercus infectoria* ve *Quercus brantii* L. iki çenekliler (Dicotyledonae) sınıfına Kayıngiller (Fagaceae) ailesine ve Meşeler (*Quercus*) cinsine aittir. Akmeşeler grubu içinde yer alan *Q. infectoria* (mazı meşesi) ılıman kışlarda yaprağını tamamen dökmeyen, 10 metre yüksekliğe kadar erişebilen küçük ağaç ya da çalı görünümündedir (**Şekil 2.1.**). Türkiye dışındaki doğal yayılış alanı Güney Avrupa, Suriye ve İran'dır. Türkiye'de yetişen iki alttüründen biri olan *Quercus infectoria* subsp. *infectoria* Trakya, Marmara ve Batı Karadeniz Bölgeleri'nde yayılış gösterirken; *Quercus infectoria* subsp. *boissieri* alttürü ise Batı, Güney, Orta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yayılış göstermektedir (Mamıkoğlu, 2011).

Kırmızı Meşeler grubu içinde yer alan *Q. brantii* (Doğu Anadolu meşesi) bazı kaynaklarda İran palamut meşesi olarak da adlandırılmaktadır. Kışın yaprağını döken, geniş tepeli, kalın dallı, 10 metre yüksekliğe kadar erişebilen bir ağaçtır (**Şekil 2.2.**). İran, Kafkasya, Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da 350-1700 metre yükseklikler arasında doğal yayılım gösterir. Malatya, Elazığ, Siirt, Şanlıurfa, Bitlis, Diyarbakır, Mardin,

Hakkari ve Kahramanmaraş İnan palamut meşesinin yetiştiği illerdir (Mamıkoğlu, 2011, Kılıç, 2015).



Şekil 2.1. *Q. infectoria* (Kılıç, 2015)

Şekil 2.2. *Q. brantii* (Kılıç, 2015)

2.1.2. Gal Nedir?

Gal; oluşumu bitki üzerinde virüsler, bakteriler, mantarlar, nematodlar, eklembacaklılar ve hatta diğer bitkiler tarafından tetiklenen anormal büyümelerdir. Gal indüklemesi, bitki hücrel mekanizmalarını ele geçirerek tamamen farklı özellik ve fonksiyonlara sahip yeni bitki yapıları oluşumunu içerir. Bitkilerde gal oluşumuna sebep olan birçok virüs, bakteri (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*) mantarlar (*Puccinia*, *Exobasidium*, *Ustilago*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Hyaloperonospora*, *Albugo*, *Taphrina* vs.) ve nematodlar (*Meloidogyne* spp.) tanımlanmıştır (Bhattacharya ve ark., 2010; Uhlíkova ve ark., 2016). Ayrıca, böcekler de (eşek arısı, tatarcık sineği, sinekler, yaprak bitleri, akarlar, haşarat böcekleri, asma biti, ağaç biti vb.) yumurtalarını bitki kısımlarına bırakarak gal oluşumunu indüklerler. Ortaya çıkan larvalar bitki parçalarıyla beslenir ve gal oluşumuna neden olur. Çeşitli formlarda ortaya çıkan galler, fitokimyasal olarak normal bitki dokularından farklıdır. Gal oluşumuna neden olan eklembacaklılar, konak bitkinin normal şartlarda üretmeyeceği bir dizi fitokimyasalların salgılanmasına sebep olur. Bu ikincil

metabolitlerin, işgalcilere karşı savunma amaçlı salgılandığı düşünülmektedir. Meşe, çınar, karaağaç, söğüt, pongam yağı, açelya, aloe, fesleğen ve şeftali gal oluşumuna yatkın bitkilerdendir (Martinson ve ark., 2015; Patela ve ark., 2018). Birçok etnobotanik çalışma gallerin çeşitli hastalıkların hafifletilmesinde kullanıldığını rapor etmektedir. Meşe, fıstık, sumak gibi bitkilerin yaygın galleri teröpatik uygulamalarda kullanılır. Çoğu galler düzensiz, çomak, küre, kavisli, kırmızıbiber, karnabahar şekillidirler. Bazılarının görünüşleri ise meyveyi andırdığından 'elma' olarak yanlış isimlendirilmektedir (Patela ve ark., 2018).

Gal oluşturan mikroorganizmalar arasında böcekler 13.000 tür ile temsil edilip, afit, tatarcık sineği, yaprak arısı, mazi arısı türlerini içine almaktadır (Shorthouse ve ark., 2005). Tüm bunların arasında en kompleks gal yapısı tatarcık sineği ve meşe mazi arıları tarafından oluşturulur (Stone ve ark., 2003). Meşe mazi arıları Hymenoptera takımı ve 1400 tür ile temsil edilen Cnicipidae familyasına aittir. Türk Cynicipidae fauna çalışmaları çok sınırlıdır. Bugüne kadar; Alkan (1952), Cynicipidae familyasının beş cinsinden 24 tür, Baş (1973), beş cins ve 348 tür, Kıyak ve Katılmış (2008) 7 cinsinden 30 tür kaydetmiştir. Melika ve ark. (2001), İran ve Türkiye'den yeni bir Cynicipidae türü ve Melika ve ark. (2004) Türkiye, Yunanistan ve İran'dan yeni bir tür bildirmiştir. Türkiye'nin Cynicipidae faunasının kontrol listesi Katılmış ve Kıyak (2008) tarafından yayınlanmış olup, Türkiye'de 81 türün varlığı belirtilmiştir. Kemal ve Kocak (2010) Van ve çevresindeki Cynicipidae faunasını incelemişler ve yakın zamanda Mutun ve Dinç (2011) tarafından yapılan bir araştırmada, Cynicipidae faunasına yeni bir Cynipid türü eklenmiş ve sayıları 90'a çıkmıştır.

Cnicipidae familyası 300 *Andricus* türü, 150 *Callirhytis* türü ve 100 *Neuroterus* türü ihtiva eder. *Andricus* cinsi ise Türkiye'de 21 türle temsil edilmektedir (Kıyak ve ark., 2008). Bu cins, hem konak-bitki kullanımında hem de gal formunda varyasyon boyunca gal bölgesinde önemli bir çeşitlilik göstermektedir. Farklı *Andricus* türleri, yüksek karakteristik ve kompleks gal yapısını indükler ve cinsin, esas olarak *Quercus* ve *Fagaceae* familyasındaki ilgili cinsler üzerinde konakçı bitkilerinde çok çeşitlilik gösteren galler oluşturduğu bilinmektedir (Cook ve ark., 2002).

Çalışmamıza konu olan *Andricus quercustozae* ve *Andricus cecconii* meşe türlerinden *Quercus brantii* L. üzerinde; *Andricus quercusramuli* ise *Quercus infectoria* üzerinde gal oluşumunu indüklemektedir.

Gal ekstreleri üzerine yapılan bilimsel araştırmalar, biyoaktif bileşenleri tanımlayarak, altta yatan biyolojik mekanizmaları açıklamıştır. Gallerdeki baskın

fitokimyasallar, triterpen, gallik asit, etil gallat, kateşin, epikateşin, tanik asit ve reçinedir. Gal dokuları normal bitki dokularından daha yüksek oksidatif stresle karşılaşır. Yüksek polifenollerin, antosiyaninlerin, flavonoidlerin ve tanenlerin üretilmesi oksidatif stresi gidermek için çaba olarak nitelendirilir (Huang ve ark., 2015).

Meşe türleri yaban arıları tarafından gal oluşumuna yatkın bitkilerdir. *Q. infectoria* gallerinin alkolik ekstralarının, oral veya topikal uygulamadan sonra in vivo anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Enflamasyon sürecinde artan parametrelerin (histamin, serotonin, prostaglandin E2 (PGE2), makrofajlar, nötrofiller) ekstre uygulamasından sonra azaldığı bildirilmiş olup ekstrelerin NO[·] ve O₂⁻ radikallerini süpürdüğü ifade edilmiştir (Kaur ve ark., 2004).

Q. infectoria gal ekstrelerinin ise antioksidan aktiviteye sahip olduğu MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Makrofajların ekstre ile inkübasyonu, hücreleri oksidatif strese karşı korumuş ve antioksidatif etki, tanik asit ve gallik asit gibi polifenollere atfedilmiştir (Kaur ve ark., 2008).

Meşe gallerinin tanenleri halk arasında kadın sağlığı ile ilgili konularda kullanılır. *Q. infectoria*'nın metanol ekstrelerinin hastane enfeksiyonuna sebep olan *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiş olup MİK değerinin 16.6 µg/ml olduğu bildirilmiştir (Nagesh ve ark., 2012).

Q. infectoria galeri doğum enfeksiyonları, diş ağrısı ve diş eti iltihabı tedavilerinde kullanılır. Galin metanol ve aseton ekstralarının agar-kuyucuk difüzyon yönteminde, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 13419, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 ve *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 gibi oral patojenler üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiş olup MİK değerleri 0.16 ila 0.63 mg/ml arasında olduğu ifade edilmiştir (Basri ve ark., 2012).

Durna Daştan ve ark. (2012) bazı meşe ve gül türlerinin galli ve galsiz bireylerindeki total protein içeriğini araştırmışlardır. Çalışmalarında galli bireylerdeki total protein miktarının, galsiz bireylere göre anlamlı derecede fazla olduğunu saptamışlardır. Aylara göre protein içeriğindeki farklılıkları ise meşenin eylül, kuşburnunun ise ağustos ayında daha fazla protein içeriğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Ferreira ve ark. (2014), *Clusia lanceolata* bitkisinin galli ve galsiz yapraklarından elde edilen uçucu yağların kimyasal içeriği ve antioksidan aktivitesini

araştırmışlardır. Buna göre galli yapraklarda antiokidan aktivitesinin galsiz yapraklara göre daha yüksek olduğu ve yine toplam fenol ve flavonoit içerik açısından da galli yaprakların daha yüksek değerde olduğu sonucuna ulaşmıştır.

2.2. Alzheimer Hastalığı ve Kolinesteraz İnhibitörleri

Yaşlılarda demansın en yaygın problemi olan Alzheimer hastalığı (AH), öğrenme ve hafıza, dil becerileri, okuma ve yazma, çevre, etkileşim gibi çeşitli alanlarda entelektüel kapasitenin karakteristik olarak bozulmasına neden olan kronik, yavaş ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalıkta davranışsal rahatsızlıklara yol açan kişilik değişiklikleri yaygındır. Hastalar günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirme yeteneklerini kaybeder, daha ileri evrelerde temel biyolojik fonksiyonlarda bozukluk ve nörolojik değişiklikler görülür (Tariot, 1994). AH, adını 1906'da Alman bir psikiyatrist olan Alois Alzheimer'den almıştır. Akıl hastalığına benzeyen semptomlar gösteren elli yaşlarında Auguste D adlı bir hastanın ölümünden sonra yapılan beyin otopsis, günümüzde amiloid plaklar olarak adlandırılan yoğun birikintileri ve nörofibriler yumaklar (NFT'ler) adı verilen bükülmüş lifleri ortaya çıkardı (Mufson ve ark., 2015; Kuo ve Rajesh, 2017). Alzheimer derneği raporunda, gelişmiş ülkelerde 65 yaşın üzerindeki kişilerde hastalık %13'lük bir yaygınlık göstermektedir. Bu yaş grubunda beşinci en büyük ölüm nedenidir. Avrupa'da, tedaviye ihtiyaç duyan hastaların tahmini sayısı 7-8 milyon, ABD'de 4-5 milyon ve dünya çapında 24 milyondur. 2020 yılında yaşlanmaya bağlı olarak 42 milyon kişinin bu hastalıktan muzdarip olacağı beklenmektedir (Leon ve ark., 2013). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, önümüzdeki on yıl içinde yaygınlığın 2050 yılında 114 milyon hastaya ulaşması beklenmektedir (Folch ve ark., 2016).

Kolinesteraz inhibitörleri (ChEI) ve Memantin (MEM) semptomları geçici olarak iyileştiren AH için onaylanmış ilaçlardır. AH tedavisi için şu anda dört ilaç mevcuttur: galantamin, rivastigmin, donepezil ve memantin. İlk üçü asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleridir. Halen, AH'nin tedavisi ve önlenmesi açısından etkili bir tedavi yoktur. Popülasyonda AH'nin yükselmesi göz önünde bulundurulduğunda, hastalık düzenleyici ajanların geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Tanım gereği bu ajanlar, hastalığın patofizyolojisinde meydana gelen kritik olayları inhibe ederek nörodejenerasyonun ilerlemesini azaltan ilaçlardır (Aprahamian ve ark., 2013).

AH, beyin bölgelerinde öğrenme, hafıza, davranış ve duygusal tepkilerle ilgili asetilkolin seviyelerinin azalmasıyla kolinerjik sistem kaybıyla ilişkilidir. Nöropatolojik olarak AH, beta-amiloid (Ab) plaklarının, nörofibril yumakların ve bazal ön beyin

kolinerjik nöronlarının dejenerasyon / atrofisinin varlığı ile karakterize edilir (Roberson ve Harrell, 1997). Bazal ön beyin kolinerjik hücrelerinin kaybı, asetilkolinin (ACh) sinaptik mevcudiyetinde azalma ile sonuçlanır ve AH'de bilişsel bozulmaya neden olur (Bartus ve ark., 1982; Dunnett ve Fibiger, 1993). Farklı beyin bölgelerinde Ab birikimi AH'nin indüksiyonu için kritiktir ve birikimi serbest radikal oluşumu, iltihaplanma, kalsiyum bozukluğu ve nöronal fonksiyon bozukluğuna yol açan nöronal hücre zarı hasarını içeren bir dizi biyokimyasal olay ile sonuçlanır.

AH yönetimi için çeşitli terapötik yaklaşımlar, Ab üretimini veya agregasyonunu azaltmaya veya çıkarılmasını arttırmaya yöneliktir (Hardy ve Selkoe, 2002)

Vücudumuzda asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) olmak üzere iki tip kolinesteraz vardır. AChE öncelikle kanda ve sinir sinapslarında bulunurken BChE öncelikle karaciğerde bulunur. İkisi arasındaki en büyük fark substratlarıdır. AChE, asetilkolini (ACh), BChE ise bütirilkolini (BCh) daha hızlı hidrolize eder. BCh, AChE reseptörlerini BChE reseptörlerinden ayırt etmek için kullanılan sentetik bir bileşiktir. AH tedavisi için mevcut olan ilaçların çoğu hem AChE'yi hem de BChE'yi hedef alır, ancak bazıları diğerlerinden daha seçicidir (Vasconcelos ve ark., 2007). Çalışmalar, AChE'nin Ab'nın toplanma aktivitesi de dahil olmak üzere birçok katalitik olmayan eylemden de sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, AChE inhibisyonunun, beyin bölgelerinde ACh'nin sinaptik mevcudiyetinde bir artış ve Ab birikiminde azalma nedeniyle AH'nin etkili yönetimi için kritik bir hedef olduğu belgelenmiştir. Buna göre, AChE'ye, yani katalitik ve periferik bölgelere çift bağlanma gösteren bileşikler, AH'nin etkin yönetimi için yeni terapötik ajanları temsil eder (Castro ve Martinez, 2001; Giacobini, 2003; Preet ve ark., 2012). Kognisyonda önemli olan kolinerjik sinyalleme, AH'da yavaş yavaş kaybolur, bu nedenle ilk basamak tedavisi, asetilkolin düzeylerini arttırmak için asetilkolinesteraz inhibitörleri ile semptomları tedavi etmektir (Snezana ve ark., 2018).

Literatürü incelediğimizde AChE inhibe edici aktivitesi olan ve bununla bağlantılı olarak AH gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili olabilecek birçok bitki olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmaların bir kısmı **Çizelge 2.1.**'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesine sahip bitkiler (Mukherjee ve ark., 2007)

Bitkinin adı	Kullanılan kısım	Ekstre çeşidi	Aktivite (%inhibisyon, ve konsantrasyon)	Referans
<i>Bacopa monniera</i> Linn.	Tüm bitki	Etanol	42.9±1.2 (0.1 mg/ml)	Das ve ark. (2002)
<i>Corydalis solida</i> Linn.	Tüm bitki	Kloroform: metanol(1:1)	87.56±1.24 (1 mg/ml)	Orhan ve ark. (2004)
<i>Fumaria vaillantii</i> Lois.	Tüm bitki	Kloroform: metanol(1:1)	94.23±0.47(1 mg/ml)	Orhan ve ark. (2004)
<i>Fumaria capreolata</i> Linn.	Tüm bitki	Kloroform: metanol(1:1)	96.89±0.17 (1 mg/ml)	Orhan ve ark. (2004)
<i>Glaucium corniculatum</i> (Linn.) J.H.Rudolph.	Tüm bitki	Kloroform: metanol(1:1)	86.55±0.67 (1 mg/ml)	Orhan ve ark. (2004)
<i>Myricaria elegans</i> Royle	Anten	Metanol	%74.8 (0.2 mg/ml)	Ahmad ve ark. (2003)
<i>Rhododendron luteum</i> Sweet.	Tüm bitki	Kloroform: metanol(1:1)	76.32±0.58(1mg/ml)	Orhan ve ark. (2004)
<i>Rhododendron ponticum</i> Linn.	Tüm bitki	Kloroform: metanol(1:1)	93.03±1.12 (1 mg/ml)	Orhan ve ark. (2004)
<i>Rhodiola rosea</i> Linn.	Tüm bitki	Metanol	42.00±3.20 (10 g/l)	Hillhouse ve ark. (2004)
<i>Salvia officinalis</i> Linn.	Tüm bitki	Etanol %95 Uçucu yağ	68.2±15.6 (2.5 mg/ml) 52.4±0.8 (0.1 mg/ml)	Perry ve ark. (1996,2000,2001)
<i>Stephania suberosa</i> Forman.	Kök	Metanol	91.93±10.80 (0.1mg/ml)	Ingkaninan ve ark. (2003)
<i>Tabernaemontana divaricata</i> (Linn.) R. Br. Ex	Kök	Metanol	93.50±0.37 (0.1 mg/ml)	Ingkaninan ve ark. (2003)

2.3. Melanin Pigmenti ve Tirozinaz Enzimi

Cilt ve saç renklenmesi melanin pigmentinden kaynaklanır. Melanin üretimi, deri, saç folikülleri ve retinanın pigment epitelyumunda dağılmış melanositlerde tirozinaz, tirozinaz ilişkili protein (TRP) -1 ve 2 gibi melanojenik enzimler tarafından düzenlenir (Hearing, 1999; Costin ve Hearing, 2007).

Melanin ışığa karşı korunumda önemli rol oynar (Riley, 2003). Derideki melanin, UV absorbe etme yeteneğinden dolayı insan cildinin UV'ye karşı savunmasında önemlidir (Lukiewicz, 1972; Todd ve ark., 1993; Archambault ve ark., 1995; Chakraborty ve ark., 1996; Hengshan, 2006). İnsan vücudunda melanin içeriğinin aşırı üretimi, epidermiste çeşitli cilt sorunlarına yol açan hiperpigmentasyona neden olmaktadır (Ahn, 2006; Unver ve ark., 2006). Buna karşılık, melanin üretiminin eksikliği cilt yaşlanması ve gri saçlara neden olur. Deri veya saç pigmentasyon süreci

deri yüzeyinde keratinositlerin UV ile uyarılmasıyla başlatılır (Yoshida ve ark., 2000). Ardından keratinositlerin habercileri (histamin, α -melanositipzilleme hormon (α -MSH) ve prostaglandin) serbest bırakmasıyla haberciler melanosit üzerindeki reseptörlerle bağlanırlar. Melanozomda biyosentez edilen melanin, keratinositlere taşınır ve burada biriktirilir. Buna paralel olarak, saç pigmentasyonu melanositin dışına salınan ve saç matriksinde biriken melanine bağlı olarak gelişir. Melanosit, saç kılı gövdesinin pigmentasyonunu sağlamak için saç kökünde lokalize olur (Slominski ve Paus, 1993; Slominski ve ark., 2005; Yamauchi ve Mitsunaga, 2016).

Cilt beyazlatma ajanları, insan cildindeki melaninin fazla birikmesinin neden olduğu deri hastalıklarının tedavisinde tercih edilir. Tirozinaz aktivitesini ve ekspresyonunu inhibe etmek, cilt beyazlatıcı ajan geliştirme çalışmalarında hedefdir. Şimdiye kadar doğal kaynaklardan çok sayıda aktif beyazlatıcı ajanlar izole edilip tanımlanmıştır.

Tirozinaz aktivitesi çeşitli yöntemler ile ölçülebilir (Munoz ve ark., 2006).

Bunlar;

- O-Kuinonları yakalayan ve kromoforik yapılar üreten nükleofilik reaktiflerin kullanılması

- Askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar kullanarak, kuinonların oksidasyonun ölçülmesi

- Oksijen tüketiminin ölçülmesi

- Doğrudan o-kuinonların veya ürünlerinin oluşumunun ölçülmesi

Fenollerin tirozinaz substratı gibi davranıp kinon oluşumunu sağlayarak depigmentasyona sebep olabileceği keşfedildikten sonra bu sistemin antimelanomada hedef terapötik strateji olarak irdelenmesine yol açmıştır (Riely ve ark., 1975; Morgan ve ark., 1981; Naish ve ark., 1988; Riely, 1991;).

Kamferol, kersetin ve morin gibi bazı flavonoidler tirozinaza karşı inhibitör aktivite gösterirken kateşin ve ramnetin gibi diğer flavonoidler kofaktör veya substrat gibi davranırlar (Kim ve Uyama, 2005).

Jung ve ark. (1995) tirozinaz inhibisyon aktivitesine sahip doğal inhibitörleri tanımlamak adına 129 yenilebilir bitki ile 15 kimyasal bileşiğin taramasını yapmışlardır. Test edilen bitkiler arasında turp tomurcuğu, kırmızı hindiba, çoban çantası ve yeşil soğan %50 ve altı; Çin turpu, sarımsak, nameko, shiitake, oyster mantarları, kırmızıbiber ve avokado %50 ve üzeri tirozinaz inhibisyon aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir.

Sabudak ve ark. (2013) *Trifolium echinatum* Bieb.'ten izole ettikleri fenolik bileşiklerin tirozinaz inhibisyon aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullandıkları kojik asit ve L-mimosinden daha yüksek aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Larik ve ark. (2017) kendilerinin sentezlediği yeni mantar kaynaklı tirozinaz inhibitörünün aktivitesini kojik asit ile kıyasladıklarında çarpıcı oranda yüksek aktivite tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yeni sentezlenen bileşiğin IC₅₀ değerini 1.586±0.01 mM, kojik asitin IC₅₀ değerini ise 16.051±1.27 mM olarak belirlemişlerdir.

Fu ve ark. (2014) *Artokarpus communis* ekstresinin melanin içeriğini düşürdüğü ve tirozinaz inhibisyon aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Oh ve ark. (2010) *Schisandra chinensis*'ten elde ettikleri 1-O-metil-fruktofuranozun melanin sentezini ve tirozinaz aktivitesini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır.

2.4. Üre ve Üreaz Enzimi

Tarihte benzersiz bir role sahip olan üre, Friedrich Wohler tarafından inorganik bileşenlerden sentezlenen ilk organik bileşiktir (Wöhler, 1828). Üre, protein ve amino asit katabolizmasının endojen bir ürünüdür. Örneğin, insan idrarında günde yaklaşık 20 - 35 g üre atılır. Bitkiler için eksojen bir amonyak kaynağı olan üre ayrıca gübre olarak büyük miktarlarda kullanılır. Bu bileşik hidrolitik olarak stabil olup enzimatik olmayan hidroliz yarı ömrü 3.6 yıldır ve bu basit sürecin mekanizması hala tartışmalıdır (Krajewska, 2009; Yao ve ark., 2013). Doğada üre, birçok alt üniteli nikel bağımlı metalloenzim olan üreaz enzimi (üre aminohidrolaz EC3.5.1.5) katalizi ile hidrolize edilir. Bu tepkime katalizsiz gerçekleşen reaksiyona oranla 10¹⁴ kat daha hızlı gerçekleşir (Callahan ve ark., 2005; Real-Guerra ve ark., 2013). Küresel nitrojen döngüsünün bu en önemli enzimi, üreyi amonyak ve daha sonra kendiliğinden karbondioksit'e dönüşecek olan karbamata dönüştürür. Üreaz, 1926'da James B. Sumner tarafından kristalize edilerek saf bir proteinin bir enzimi olarak işlev görebileceği bildirilen ilk enzimdir (Sumner, 1926).

Bakteriler, mantarlar, mayalar ve bitkiler büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan azot kaynağını temin etmek üzere üreaz sentezlerler. Üreaz aynı zamanda çeşitli patojenik bakterilerde bulunan bir virülans faktörüdür. Bu nedenle, bir konakçı organizmada kolonileşmede ve dokularda bakteri hücrelerinin idame edilmesinde esas olması şaşırtıcı değildir. Enzimin aktivitesi, idrarda taş görünümü, kateterde bloke, piyelonefrit, amonyak ensefalopati, hepatik koma ve gastrit gibi çeşitli sonuçlara yol

açmaktadır (Konieczna ve ark., 2012). En çok çalışılan bakteriyel üreazlardan biri, gastrit ve peptik ülserasyon ve mide kanserine neden olan *Helicobacter pylori* üreazıdır (Moblely, 2001; Hassan ve Sudomova, 2017).

Üreazın çeşitli ve önemli rolleri bu enzimin, genetik, biyokimya ve fizyoloji alanlarında dünyanın dört bir yanındaki araştırmacıların odak noktası olmasını desteklemektedir (Maroney ve Ciurli, 2014; Hausinger ve Karplus, 2016; Krajewska, 2016). Üreaz inhibisyonuna dayanan stratejiler, üreaz sentezleyen bakterilerin neden olduğu hastalıkları tedavi etmek ve gübre olarak kullanılan üreden azot kaybını azaltmak için ümit verici bir araç olarak kabul edilir. Bu nedenle, üreaz inhibitörleri üzerine yapılan araştırmaların yakın zamanda artmış olması şaşırtıcı değildir (Amtul ve ark., 2002; Kosikowska ve Berlicki, 2011; Upadhyay, 2012; Macegoniuk, 2013; Modolo ve ark., 2015).

Bitki ve fungal üreazları, 90 kDa ağırlığında özdeş alt birimlerin oluşturduğu homo-oligomerik proteinler iken, bakteri üreazları, farklı moleküler kütledeki iki (ab) veya üç (abc) alt biriminin oluşturduğu çeşitli komplekslerin multimeridir. Üreaz alt birimlerinin sayısı, kaynaklarına göre değişmektedir. Enzimin yapısının aydınlatması üzerine yapılan çalışmalar enzimin alt birimlerinin sayısındaki farklılığa rağmen, nikel (II) iyonlarının yakınındaki aktif merkez yapısının korunduğunu ve aynı katalitik aktivite mekanizmasını indüklediğini ortaya koymuştur (Khan ve ark., 2009; Benini ve ark., 2013; Mazzei ve ark., 2016).

Üreazın mikrobiyal patojenlerin virülansındaki önemi göz önüne alındığında, özellikle mide ve idrar enfeksiyonlarının tedavisi için ilaçların geliştirilmesinde en önemli hedeflerden biri olduğu düşünülmektedir (Follmer, 2010; Flores Mireles ve ark., 2015). Şimdiye kadar, üreaz inhibitörleri yalnızca nikel (II) iyonlarının yakınındaki aktif merkeze saldırarak veya üreazların substratını taklit edecek şekilde tasarlanmıştır (Benini ve ark., 2004; Follmer, 2010; Kosikowska ve Berlicki, 2011). Muazzam çaba gösterilmesine rağmen, idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için antibiyotiklerle birlikte klinik olarak sadece anti üreaz aktiviteye sahip bir bileşik olan asetohidroksamik asit (AHA) kullanılmıştır (Fishbein ve ark., 1965; Kosikowska ve Berlicki, 2011). Ne yazık ki bu bileşiğin kemik iliğinin biosentezinin inhibisyonu ve yüksek dozlarda embriyoların malformasyonu gibi olumsuz yan etkileri bildirilmiştir (Williams ve ark., 1984). Bu nedenle, antimikrobiyal ajanlar için bir hedef olarak üreazın potansiyeli henüz tam olarak araştırılmamıştır.

Bilgin Sökmen ve ark. (2016)'nın, Cystoseiraceae ailesine ait *Cystoseira barbata* (Stackhouse) *C. agardh* (*C. barbata*) deniz yosununun anti-ürez ve anti-elastaz inhibisyon özelliklerinin belirlenmesini amaçladıkları çalışmalarında, *C. barbata* yosununun elastaz ve ürez inhibitör araştırmaları ile ilgili ilk kayıt olup, çalışmada elde edilen sonuçlara göre *C. barbata* yosununun alternatif bir anti-elastaz ve anti-ürez kaynağı olarak kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Nabati ve ark. (2012) İran'da ürez aktivitesine karşı yaygın olarak kullanılan şifalı bitkileri incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda *Sambucus ebulus* (IC₅₀:57 µg/ml) ve *Rheum ribes* (IC₅₀:92 µg/ml) bitki ekstrelerinin ürez enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Shabana ve ark. (2010) Japonya'nın Osaka kentinden toplamış oldukları 125 çeşit bitki ve sebzelerin farklı çözücülerdeki ürez inhibisyonlarını araştırmışlar ve beş örneğin (maş fasulyesi, ananas, tarçın, avokado kabuğu ve guava) %71-100 aralığında üreza karşı yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.5. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikal, bir atomik yörüngede eşleşmemiş bir elektron içeren bağımsız varlığa sahip herhangi bir moleküler tür olarak tanımlanabilir. Eşleşmemiş bir elektronun varlığı çoğu radikalın sahip olduğu bazı ortak özelliklerle sonuçlanır. Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir. Bir moleküle elektron verebilir veya molekülden elektron alabilir, bu nedenle oksidan veya indirgeyici görevi görürler (Cheeseman ve Slater, 1993). Birçok hastalık durumunda; oksijen içeren serbest radikallerin çoğu hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, singlet (tekli) oksijen, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Bunlar DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi önemli makro moleküllere zarar veren oldukça reaktif türlerdir (Young ve Woodside, 2001). Serbest radikallerin önemli makro moleküllere saldırısı sonucu hücre hasarı ve homeostatik bozulma gelişir. Serbest radikallerin hedefleri vücuttaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipitler, nükleik asitler ve proteinler ana hedeflerdir.

ROS ve serbest radikaller, insan vücudundaki normal temel metabolik süreçlerde veya X ışınları, ozon, sigara dumanı, hava kirleticileri ve endüstriyel kimyasallar gibi dış kaynaklar sebebiyle türeyebilirler (Bagchi ve Puri, 1998). Serbest radikal oluşumu, hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonların bir sonucu olarak sürekli meydana gelir. Solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde yer alan enzimatik reaksiyonlar vücutta serbest radikal kaynağı olarak

bilinmektedir (Liu ve ark., 1999). Aşağıda serbest radikal üreten bazı içsel ve dışsal kaynaklar sıralanmıştır (Ebadi, 2001).

İçsel Kaynaklar	Dışsal Kaynaklar
✓ Mitokondri	✓ Sigara dumanı
✓ Ksantin oksidaz	✓ Çevresel kirleticiler
✓ Peroksizomlar	✓ Radyasyon
✓ İltihap	✓ Bazı ilaçlar, pestisitler
✓ Fagositoz	✓ Endüstriyel çözücüler
✓ Arşidonat yolakları	✓ Ozon
✓ Egzersiz	
✓ İskemi / reperfüzyon hasarı	

Serbest radikal reaksiyonlarının vücutta yaşla birlikte biriken progresif olumsuz değişiklikler üretmesi beklenir. Yaşla ilgili bu “normal” değişiklikler herkes için oldukça yaygındır. Bununla birlikte, bu ortak düzende üst üste binen genetik ve serbest radikal hasarını modüle eden çevresel farklılıklar tarafından etkilenen modellerdir. Bunlar, belirli yaşlarda ortaya çıkan, genetik ve çevresel faktörler tarafından belirlenen hastalıklar olarak kendini gösterir. İki ana ölüm nedeni olan kanser ve ateroskleroz belirgin “serbest radikal” hastalıklarıdır. Oksidatif stresin şimdi tüm enflamatuar hastalıklara (artrit, vaskülit, glomerülonefrit, lupus eritematöz, yetişkin solunum yolu hastalıkları sendromu), iskemik hastalıklar (kalp hastalıkları, inme, intestinal iskemi), hemokromatoz, kazanılmış immün yetmezlik sendromu, afiziye önemli bir katkı yaptığı düşünülmektedir. Süper oksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve nitrik oksit gibi reaktif oksijen ve azot türleri ile bunların biyolojik metabolitleri kanserojenezde de önemli bir rol oynar. Serbest radikallerin DNA ile reaksiyonu sonucu zincir kırıkları, baz modifikasyonu ve DNA protein çapraz bağ oluşumunu içeren DNA hasarına neden olur. Çok sayıda araştırmacı, serbest radikallerin karsinojenez, mutasyon ve transformasyonda rol oynadığını savunmaktadır.

Mekanik anlamda, bir antioksidan bir hidrojen vericisi veya bir elektron vericisi olarak tanımlanabilir (MacDonald ve ark., 2006). Termodinamik olarak, bir antioksidanın etkisi bağ enerjilerine ve standart indirgeme potansiyellerine bağlıdır. Bu parametreler, belirli bir radikalın belirli bir antioksidan tarafından söndürülüp söndürülemeyeceğini düşündürür (Becker ve ark., 2004).

Gıda endüstrisinde, antioksidan 'küçük miktarlarda, yağlar gibi kolayca oksitlenebilen maddelerin oksidasyonunu önemli ölçüde önleyecek veya geciktirebilecek bir madde' olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, lipitler okside olabilecek tek makro molekül değildir. Biyolojik sistemlerde, DNA ve proteinler de oksidasyon işlemlerine karşı duyarlıdır. Sonuç olarak, antioksidanlar, düşük miktarlarda, oksitlenebilir bir substrat ile karşılaştırıldığında, substratın oksitlenmesini geciktirebilen veya önleyebilen moleküller olarak tanımlanabilir (Becker ve ark., 2004). Diğer bir tanım ile, bir antioksidan, spesifik oksitleyici bir enzimi veya diğer moleküllere zarar veren oksitleme ajanları ile reaksiyona giren bir maddeyi ifade eder.

İnsan vücudu, serbest radikallerin ve diğer oksidantların zararlı etkilerine karşı koyan, doğal enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Serbest radikallere karşı koruma, diyet antioksidanlarının bolca alınmasıyla artırılabilir. Antioksidan içeren yiyeceklerin ve özellikle de antioksidan besinlerin hastalıkların önlenmesinde büyük öneme sahip olabileceğini gösteren önemli kanıtlar vardır. Bununla birlikte, bilim adamları arasında, tek bir antioksidandan ziyade, antioksidanların bir kombinasyonunun uzun vadede daha etkili olabileceğine dair bir fikir birliği vardır. Antioksidanlar dejeneratif hastalıkların başlangıcını erteleyerek veya önleyerek yaşam kalitesini iyileştirmede büyük yarar sağlayabilirler. Ayrıca, sağlık hizmeti sunumunun maliyetinde önemli bir tasarruf potansiyeline sahiptir.

Antioksidanların etki mekanizmalarını aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz;

- Lokalize oksijen konsantrasyonlarının azaltılması
- Başlatıcı radikalleri (HO^\cdot , O_2^\cdot) temizleyerek zincir başlatmayı önlemek
- Metal iyonlarına bağlanarak; HO^\cdot iyonları, $\text{Fe}_2^+ / \text{Fe}_3^+ / \text{O}_2^\cdot$ gibi türler üretmeyecek duruma getirmek
- Peroksitleri, alkoller gibi radikal olmayan ürünlere dönüştürerek ayrıştırmak
- Sürekli hidrojen transferini önlemek için peroksil ve alkoksil radikalleri gibi ara radikalleri süpürerek zincir kırma reaksiyonu

Zincir kırma antioksidanları genellikle fenoller veya aromatik aminlerdir. İlk üç mekanizma ile hareket eden antioksidanlar “önleyici antioksidanlar” olarak adlandırılırken, son iki mekanizma tarafından etkilenenler “birincil antioksidanlar” olarak kabul edilir (Deshpande ve ark., 1995).

Lipid oksidasyonu, istenmeyen gıda maddeleri ve potansiyel olarak toksik bileşiklerin oluşumu nedeniyle gıda endüstrisi için bir öneme sahiptir. Gıda oksidasyonunu önlemenin bir yolu, antioksidanların kullanılmasıdır. Günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan sentetik antioksidanların birkaç zararlı sağlık etkisine sahip olduğu bulunmuştur. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksil toluen (BHT) gibi sentetik antioksidanların, laboratuvar hayvanlarında kanserojen ve karaciğer hasarından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Bu değişiklikler kansere, ateroskleroza ve kardiyovasküler hastalıklara katkıda bulunur (Braca ve ark., 2002). Bu anlamda, doğal antioksidanlara, özellikle bitki kaynaklı antioksidan bileşiklere artan bir ilgi vardır. Bitkilerin tıbbi yararları arasındaki antioksidan özellikleri, vücuttaki serbest radikallerin neden olduğu sayısız oksidatif hasarın önlenmesinde veya azaltılmasındaki rollerinden dolayı artan ilgi görmüştür (Abiy, 2005).

Bitkiler çok zengin fenolik bileşik kaynağı olarak bilinir. Doğada çoğunlukla glikozitler olarak görülürler. Fenoller, fenolik asitler ve flavonoidlerin en önemli olduğu devasa doğal bileşikler grubunu temsil eder. Bitki fenolleri, in vitro antioksidan aktivite sergiler; zincir kırıcı, peroksil radikal toplayıcılar olarak hareket ederek lipid peroksidasyonunu inhibe eder. İki bitişik hidroksil grubu olan fenoller demir ve bakır gibi geçiş metali iyonlarını bağlayabilir. Ayrıca, fenoller reaktif oksijen türlerini (hidroksil radikalleri, peroksinitrit ve hipokloröz asit) doğrudan sarar. Bazen fenoller, geçiş metali iyonlarını azaltarak pro-oksidan olarak hareket edebilirler (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal ve Ekstraksiyon Yöntemi

Andricus quercusramuli, *Andricus quercustozae*, *Andricus cecconii* arılarının *Quercus infectoria* ve *Quercus brantii* L. türleri üzerinde oluşturduğu gal örnekleri Ekim 2016'da Nergizli'den (Şirvan/Siirt) Entomolog Dr. Erdem SEVEN tarafından toplanıp teşhis edildi. Laboratuvara getirilen örnekler (Şekil 3.1.) larva ve böcek kalıntılarından temizlendikten sonra kurutulup toz haline getirildi.



Şekil 3.1. Gallerin görünümü

Ardından metanol ile masere edilerek (6 kez), evaporatör yardımıyla çözücü uzaklaştırılıp ekstreler elde edildi. Her örneğin kuru ağırlıkları Çizelge 3.1. de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Gallere ait kuru ağırlıklar

Meşe türü	Gal oluşumunu indükleyen arı türü	Kuru ağırlık (g)
<i>Quercus infectoria</i>	<i>Andricus quercusramuli</i>	33
<i>Quercus brantii</i> L.	<i>Andricus quercustozae</i>	30
<i>Quercus brantii</i> L.	<i>Andricus cecconii</i>	11

3.2. Ekstrelerin Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ekstrelerin, asetil ve bütiril kolinesteraz, tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyon aktiviteleri literatürde belirtilen yöntemler kullanılarak belirlendi.

3.2.1. Asetil ve Bütiril Kolinesteraz Enzim İnhibisyon Aktivitesi

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak (Ellman ve ark., 1961) bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçüldü (Kıvrak ve ark., 2009). Enzim olarak asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetil tiyokolin iyodür ve butiril tiyokolin iyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5- ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), kontrol olarak etanol, pozitif kontrol olarak ise galantamin kullanıldı.

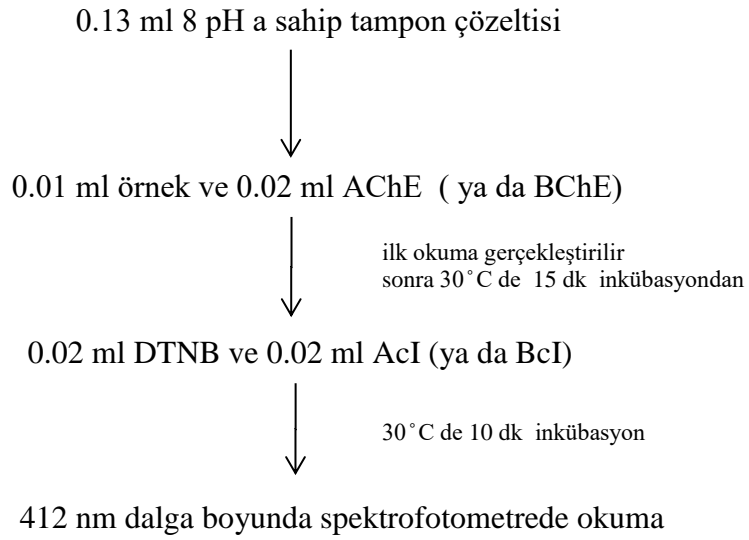
Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- *0.1 M H₂PO₄⁻ çözeltisi:* 1.56 g H₂PO₄⁻ tartılıp 100 ml distile suda çözüldü.
- *0.1 M HPO₄²⁻ çözeltisi:* 3.556 g HPO₄²⁻ tartılıp 200 ml distile suda çözüldü.
- *0.1 M pH=8 tampon çözeltisi:* 94.7 ml HPO₄²⁻ ve 5.3 ml H₂PO₄⁻ çözeltilerinden alındıktan sonra 100 ml distile su eklenerek hazırlandı.
- *0.1 M pH=7 tampon çözeltisi:* 3.9 ml H₂PO₄⁻ ve 6.1 ml HPO₄²⁻ çözeltilerinden alınarak 10 ml distile su eklenerek hazırlandı.
- *5,5- ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) çözeltisi:* 16 mg DTNB 1 ml pH=7 tampon çözeltisinde ve 7.5 mg NaHCO₃ 1 ml pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 ml pH=7 tampon çözeltisi ile 4 ml'ye tamamlandı. Kullanma aşamasında 4 ml pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi.
- *Asetil tiyokolin iyodür (AcI):* 32.8 mg AcI alınarak, 8 ml distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.
- *Butiril tiyokolin iyodür (BcI):* 4 mg BcI alınarak, 8 ml distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.
- *Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimleri:* 1.17 mg AChE enzimi alınarak 5 ml pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 1'er ml'lik beş bölüme ayrıldı. Her biri için 0.235 mg/ml'lik konsantrasyon sağlanmış oldu. Her birinden de, 125 µl'lik hacimler şeklinde 8 eşit enzim çözeltileri elde edildi. Her bir 125 µl'lik örnekte 0.02925 mg enzim bulunur. 125 µl'lik enzim çözeltisine 460 µl pH=8 tampon çözeltisi eklendi. 585 µl çözelti 25 µl'lik 23 küçük şişelere doldurulup ve daha

sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 2150 µl'ye tamamlandı.

- *Bütirikolinesteraz (BChE) Enzimleri*: 1 mg BChE enzimi alınarak 5 ml pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü. Bu çözeltiden 300 µl'lik stoklar oluşturulup küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1800 µl pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

Yöntem:



Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\%I = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

3.2.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi

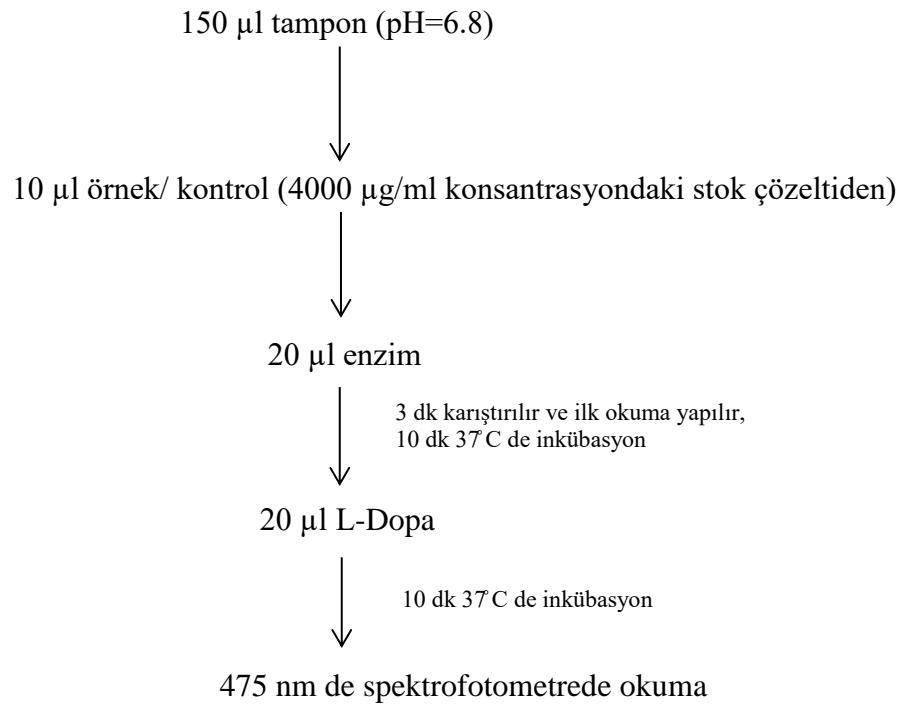
Tirozinaz inhibitörleri genel olarak tirozin gibi bir monofenolik substrat varlığında veya L-dopa gibi bir difenolik substrat varlığında incelenir ve inhibisyon aktivitesi dopakrom oluşumuna dayanarak değerlendirilir.

Tirozinaz enzim inhibisyon aktiviteleri Hearing metodu olarak (Hearing, 1987) bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçüldü. Pozitif kontrol olarak kojik asit kullanıldı.

Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- *Tirozinaz enzimi*: 1mg enzim 250 µl'de (pH=6,8 tamponu) çözülür. 50 µl'lik porsiyonlara ayrılarak kullanılacağı zaman 2000-3000 µl aralığında uygun seyreltme yapılır.
- *L-dopa*: 8.4 mg DOPA 5ml distile suda çözülür.

Yöntem:



3.2.3. Üreaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi

Üreaz inhibisyon aktivitesini belirlemek için Mobley'in metodu kullanıldı (Mobley ve Hausinger, 1989). Üreaz enzim inhibisyon aktivitesi için, ekstreler üreaz enzimi ile etkileştirildikten sonra substrat olarak üre kullanıldı ve reaksiyon sonucunda oluşan amonyak spektroskopik olarak belirlendi. Pozitif kontrol olarak tiyoüre kullanıldı.

Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- *0.01 M Fosfat tamponu (pH=8.2)*: 0.01 M NaH₂PO₄ ve 0.01 M Na₂HPO₄ tampon çözeltileri uygun oranlarda karıştırılarak pH 8.2'ye ayarlanır.
- *Üreaz enzimi*: 1mg üreaz enzimi 1 ml tampon çözeltilde çözülür. 50 µl'lik porsiyonlara ayrılarak kullanılacağı zaman 2000-3000 µl aralığında uygun seyreltme yapılır.

- *Substrat:* Substrat olarak 0.1 M üre çözeltisi (pH= 8.2 fosfat tamponunda) kullanılır.
- *Fenol reaktifi:*

%1'lik fenol reaktifi için; 200 mg fenol tartılarak 10 ml distile suda çözülür ve %2'lik fenol reaktifi elde edilmiş olur. Sonraki seyreltmelerle son konsantrasyon %1 'lik olacaktır.

%0.005'lik sodyum nitroprussid için; 1 mg sodyum nitroprussid tartılarak 10 ml distile suda çözülür ve %0.01'lik çözelti elde edilmiş olur. Sonraki seyreltmelerle son konsantrasyon %1 'lik olacaktır.

Hazırlanan iki çözelti bire bir (1:1) oranında karıştırılır.

- *Alkali reaktifi:*

%0.5 NaOH için; 100 mg NaOH tartılarak 10 ml suda çözülür.

%0.1 NaOCl için; %10'luk NaOCl'den 0.1105 ml alınarak 10 ml distile suya eklenir.

Hazırlanan iki çözelti bire bir (1:1) oranında karıştırılır.

Yöntem:

10 µl örnek (4000 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltilerden)



25 µl üreaz (pH 8.2 fosfat tamponunda)



50 µl üre (substrat pH=8.2 fosfat tamponunda)



İlk okuma



15 dk 30°C de inkübasyon

45 µl fenol reaktifi



70 µl alkali reaktifi



20 dk 30°C'de inkübasyon

630 nm'de kinetik okuma

3.3. Ekstrelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi, ABTS yöntemi (katyon radikali giderim aktivitesi) ve CUPRAC yöntemi (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) olmak üzere üç farklı yöntem çalışılmıştır. Ayrıca ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri uygun yöntemlerle belirlenmiştir.

3.3.1. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstrelerin içerdiği toplam fenolik madde miktarını tayin etmek için Folin-Ciocalteu Fenol reaktifi (FCR) kullanılarak gallik asite eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton, 1977).

Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- % 2'lik Sodyum karbonat çözeltisi: 2 g Na_2CO_3 , son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.
- Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO_4): Satın alındığı şekilde kullanıldı.
- Gallik asit çözeltisi: Belli miktarda gallik asit tartılarak etanolde çözülüp konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/ml}$ 'ye ayarlanmıştır.

Yöntem:

Farklı hacimlerde alınan gallik asit çözeltisi/ekstre



Distile su ile hacim 4.7 ml'ye tamamlanır



0.1 ml FCR



3 dk sonra

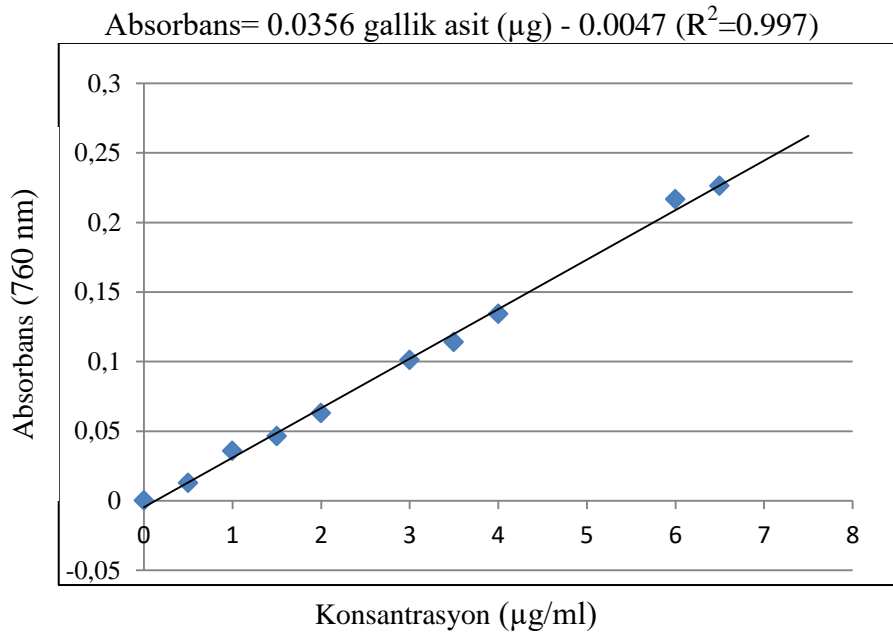
0.3 ml Na_2CO_3 çözeltisi



2 saat sonra

760 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma

Analiz sonrasında gallik asite ait absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki standart gallik asit eğrisi çizildi. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı egriden elde edilen denklemden yararlanılarak belirlendi.



Şekil 3.2. Gallik asit ölçü grafiği

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve ark., 2000).

Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- *% 10' luk Alüminyum nitrat çözeltisi:* 17.6 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 100 ml'lik balon jøjeye koyuldu ve bir miktar distile su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra distile su ile hacmine tamamlandı.
- *1 M Potasyum asetat çözeltisi:* 9.6150 g CH_3COOK 100 ml'lik balon jøjeye koyuldu ve bir miktar distile su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra distile su ile hacmine tamamlandı.
- *Kersetin çözeltisi:* 25.8 mg kersetin 25 ml etil alkolde çözümlenerek 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.

Yöntem:

Farklı hacimlerde alınan kersetin çözeltisi/ekstre



%80'lik etanol ile hacim 4800 μl 'ye tamamlanır



100 μl 1 M potasyum asetat çözeltisi



1 dk sonra

100 μl %10'luk Alüminyum nitrat çözeltisi



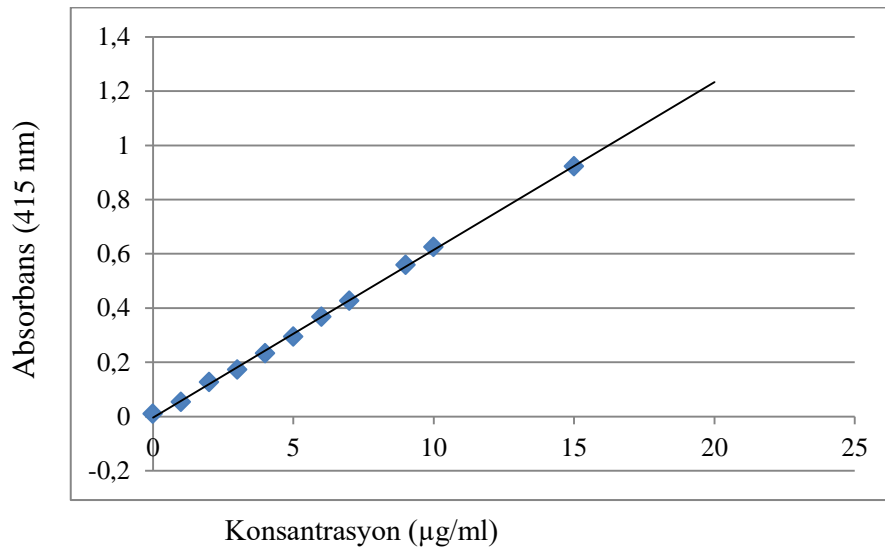
40 dk sonra

415 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma

Analiz sonrasında kersetine ait absorbanans değerleri kullanılarak aşağıdaki standart kersetin eğrisi çizildi. Ekstrelerin toplam flavonoit madde miktarı eğriden elde edilen denklemden yararlanılarak belirlendi.

$$\text{Absorbans} = 0.0619 \text{ kersetin } (\mu\text{g}) - 0.0043$$

$$(R^2=0.9991)$$



Şekil 3.3. Kersetin ölçü grafiği

3.3.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

DPPH yöntemi antioksidan bileşiklerinin kararlı bir serbest radikal olan DPPH radikalini tutuculuğunun ölçülmesine dayanmaktadır. DPPH radikalinin maksimum absorbanans yaptığı 515 nm'deki absorbanans değerleri UV görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. DPPH radikalinin belirli bir dalga boyundaki absorbanans değerlerindeki düşüő miktarlarının antioksidan kapasitesi ile doğru orantılı olmasından yola çıkılarak toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmıştır. Absorbans değerindeki düşüőle paralel olarak çözeltiler rengi koyu mor renkten sarı renge dönmektedir. Yöntem düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

DPPH serbest radikal giderim aktivitesini belirlemede Blois'in (1958) geliőtirdięi yöntem kullanıldı.

Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- *0.1 mM DPPH çözeltisi*: 4 mg DPPH tartılarak 100 ml metanolde çözüldü.
- *BHT (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisi*: 10 mg BHT 10 ml etanol içinde çözümlenerek 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik BHT çözeltisi hazırlandı.

- *BHA (2- t-bütül-4-hidroksianisol) çözeltisi:* 10 mg BHA 10 ml distile suda çözülerek 1000 µg/ml 'lik BHA çözeltisi hazırlandı.
- *AA (Askorbik asit) çözeltisi:* 10 mg askorbik asit 10 ml distile suda çözülerek 1000 µg/ml 'lik askorbik asit çözeltisi hazırlandı.

-

Yöntem:

1 ml farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstre/pozitif kontrol



4 ml DPPH çözeltisi



30 dk karanlıkta bekletilir

517 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma yapılır

Aynı işlem pozitif kontrol olarak kullanılan BHT, BHA ve askorbik asit için de uygulandı. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine yerleştirilerek inhibisyon yüzdesi (%I) hesaplandı.

$$\%İnhibisyon = (A_{kontrol} - A_{örnek}/A_{kontrol}) \times 100$$

$A_{kontrol}$:kontrol tüpünün (test bileşikleri dışında tüm reaktifleri içeren tüp) absorbans değerini, $A_{örnek}$ ise her bir konsantrasyon için hazırlanan tüpün absorbans değerini ifade etmektedir.

3.3.3. ABTS Katyon Radikal Giderim Aktivitesi Yöntemi

Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS [2,2'-azinobis(3- etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)] aynı zamanda kararlı bir radikaldir. ABTS hem suda hem organik çözücülerde çözüldüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayininde kullanılabilir bir renk giderimi yöntemidir. Orijinal yöntemde ABTS radikal katyonu, H_2O_2 ile metilmiyoglobinin reaksiyona girmesiyle oluşan ferrilmiyoglobin ile ABTS arasındaki etkileşimden oluşmaktadır (Rice Evans ve Miller, 1984). $ABTS^{*+}$ radikal çözeltisi mavi-yeşil renklidir ve karakteristik absorbsiyon spektrumu 414, 645, 734 ve 815 nm'de maksimum absorbans vermektedir (Re ve ark., 1999).

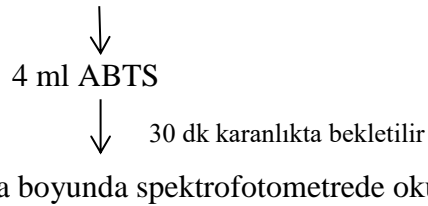
Ekstrelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlenir (Re ve ark., 1999).

Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- *7 mM ABTS katyon radikali*: 19.2 mg ABTS tartılarak 5 ml suda çözüldü. Üzerine toz halinde 3.3 mg potasyum peroksi disülfat ($K_2S_2O_8$) eklenip karıştırıldı. Karanlıkta oda sıcaklığında 12-16 saat beklendi. Bekleme süresi sonunda çözelti kullanılmaya başlamadan önce 734 nm'de absorbans değeri ~0.70 olacak şekilde seyreltildi.
- *BHT (2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisi*: 10 mg BHT 10 ml etanol içinde çözülerek 1000 µg/ml 'lik BHT çözeltisi hazırlandı.
- *BHA (2- t-bütil-4-hidroksianisol) çözeltisi*: 10 mg BHA 10 ml distile suda çözülerek 1000 µg/ml 'lik BHA çözeltisi hazırlandı.
- *(AA) Askorbik asit çözeltisi*: 10 mg askorbik asit 10 ml distile suda çözülerek 1000 µg/ml 'lik askorbik asit çözeltisi hazırlandı.

Yöntem:

1 ml farklı konsantrasyonlardaki ekstre/pozitif kontrol



Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA ve askorbik asit kullanıldı.

3.3.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)

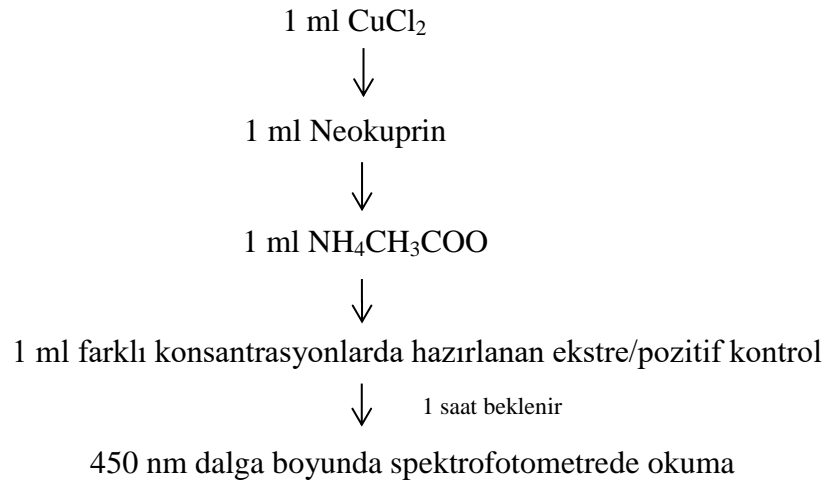
Apak ve çalışma arkadaşları tarafından kromojenik bir yükseltgen olan Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifi kullanılarak, plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenoller, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş alanda uygulanabilen bir antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu reaktif, kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara cevap verebilen bir reaktiftir. Toplam antioksidan kapasite (TAC) tayininde kullanılan bu yöntem dünya literatürüne CUPric Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) adıyla 2004 yılında kazandırılmıştır. Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller,

CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı, 450 nm’de maksimum absorbands verir. Oluşan renk, metal→ligand yönünde bir yük aktarımının sonucudur (Apak ve ark., 2004).

Analiz için gerekli çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

- *Bakır (II) klorür dihidrat çözeltisi:* 42.62 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 25 ml suda çözüldü.
- *Amonyum asetat tamponunu:* 1.927 g NH_4OAc tartılarak 25 ml suda çözüldü, pH= 7’ye ayarlandı.
- *Neokuproin çözeltisi:* 76.6 mg neokuproin tartılarak 50 ml %96’lık etanolde çözüldü.
- *BHT (2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisi:* 10 mg BHT 10 ml etanolde çözülerek 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ’lik BHT çözeltisi hazırlandı.
- *BHA (2- t-bütil-4-hidroksianisol) çözeltisi:* 10 mg BHA 10 ml distile suda çözülerek 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ’lik BHA çözeltisi hazırlandı.
- *(AA) Askorbik asit çözeltisi:* 10 mg askorbik asit 10 ml distile suda çözülerek 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ’lik askorbik asit çözeltisi hazırlandı.

Yöntem:



Örneklerin absorbands değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA ve AA kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon Yöntem Bulguları

Çizelge 4.1.'de gallerden elde edilen ekstre miktarı ve yüzde verim oranı sunulmuştur. Buna göre; *A. quercustozae* galinden %11.56, *A. ceconii* galinden %5.66, *A. quercusramuli* galinden %5.20 oranında verim elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Gallere ait kuru ağırlık, ekstre miktarları ve yüzde verim sonuçları

Gal oluşumunu indükleyen arı türü	Kuru ağırlık (g)	Elde edilen ekstre miktarı (g)	% Verim
<i>A. quercusramuli</i>	33	1.7162	5.20
<i>A. quercustozae</i>	30	3.47	11.56
<i>A. ceconii</i>	11	0.6234	5.66

4.2. Enzim İnhibisyon Aktivitesi Bulguları

4.2.1. Asetil ve Bütiril Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Bulguları

Çizelge 4.2. gal ekstreleri ve pozitif kontrolün asetil ve bütiril kolinesteraz enzim inhibisyonlarını ifade etmektedir. Ekstrelerin asetil kolinesteraz enzim inhibisyonunda aktivite göstermezken, bütiril kolinesteraz enzim inhibisyonunda aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi %31.33±1.25 inhibisyon oranı ile *A. quercustozae* gal ekstresi göstermiştir. *A. quercusramuli* ve *A. ceconii* gal ekstreleri sırasıyla %7.42±0.26 ve %8.58±0.52 inhibisyon oranıyla düşük aktivite göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan galantamin ise AChE inhibisyonunda %82.85 ± 0.21, BChE inhibisyonunda %81.33±1.04 oranında aktivite göstermiştir.

Çizelge 4.2. Gal ekstreleri ve pozitif kontrolün asetil ve bütiril kolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçları^a

Bitkiler	Örnekler	AChE (% İnhibisyon)	BChE (% İnhibisyon)
<i>Q. infectoria</i>	<i>A. quercusramuli</i> gal ekstresi	Aktif değil	7.42±0.26
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. quercustozae</i> gal ekstresi	Aktif değil	31.33±1.25
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. ceconii</i> gal ekstresi	Aktif değil	8.58±0.52
	Galantamin	82.85 ± 0.21	81.33±1.04

a:Konsantrasyonlar 200 µg/ml'dir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.2.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Bulguları

Çizelge 4.3. gal ekstreleri ve pozitif kontrolün tirozinaz enzim inhibisyonlarını ifade etmektedir. En yüksek aktiviteyi 61.16 ± 0.72 inhibisyon oranı ile *A. quercustozae* gal ekstresi göstermiştir. *A. quercusramuli* ve *A. cecconii* gal ekstreleri sırasıyla 51.78 ± 0.61 ve 55.86 ± 0.28 inhibisyon oranıyla yakın aktivite göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan kojik asitin tirozinaz enzim inhibisyonunun 95.05 ± 0.37 oranında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Gal ekstreleri ve pozitif kontrolün tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları^a

Bitkiler	Örnekler	Tirozinaz (%İnhibisyon)
<i>Q. infectoria</i>	<i>A. quercusramuli</i> gal ekstresi	51.78±0.61
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. quercustozae</i> gal ekstresi	61.16±0.72
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. cecconii</i> gal ekstresi	55.86±0.28
	Kojik asit	95.05±0.37

a: Konsantrasyonlar 200 µg/ml'dir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.2.3. Üreaz Enzim İnhibisyonu Bulguları

Çizelge 4.4.'de gal ekstrelerinin üreaz inhibisyon aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde *A. quercustozae* gal ekstresinin 40.98 ± 1.41 oranında aktivite gösterdiği, *A. quercusramuli* ve *A. cecconii* gal ekstrelerinin ise aktivite göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan tiyoürenin üreaz enzim inhibisyonu 98.37 ± 0.40 oranında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Gal ekstreleri ve pozitif kontrolün üreaz enzim inhibisyonu sonuçları^a

Bitkiler	Örnekler	Üreaz (%İnhibisyon)
<i>Q. infectoria</i>	<i>A. quercusramuli</i> gal ekstresi	Aktif değil
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. quercustozae</i> gal ekstresi	40.98±1.41
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. cecconii</i> gal ekstresi	Aktif değil
	Tiyoüre	98.37±0.40

a. Konsantrasyonlar 200 µg/ml'dir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.3. Antioksidan Aktivite Bulguları

4.3.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini Bulguları

Çizelge 4.5. gal ekstralarının toplam fenolik ve flavonoit içerik sonuçlarını ifade edilmektedir. Tüm ekstraların toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla gallik asit ve kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. Buna göre;

- 1 mg *A. quercusramuli* gal ekstresindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarının 51.54 ± 0.13 μg , kersetine eşdeğer toplam flavonoit miktarının ise 12.08 ± 0.03 μg olduğu,
- 1 mg *A. quercustozae* gal ekstresindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarının 438.24 ± 0.86 μg , kersetine eşdeğer toplam flavonoit miktarının ise 49.24 ± 0.69 μg olduğu,
- 1 mg *A. ceconii* gal ekstresindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarının 176.54 ± 0.87 μg , kersetine eşdeğer toplam flavonoit miktarının ise 22.85 ± 0.64 μg olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Toplam fenolik ve flavonoit içerik sonuçları^a

Bitkiler	Örnekler	Fenolik içerik ($\mu\text{gGAs}/\text{mg}$ ekstre) ^b	Flavonoit içerik ($\mu\text{gQEs}/\text{mg}$ ekstre) ^c
<i>Q. infectoria</i>	<i>A. quercusramuli</i> gal ekstresi	51.54 ± 0.13	12.08 ± 0.03
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. quercustozae</i> gal ekstresi	438.24 ± 0.86	49.24 ± 0.69
<i>Q. brantii</i> L.	<i>A. ceconii</i> gal ekstresi	176.54 ± 0.87	22.85 ± 0.64

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

b: Gallik asite eşdeğer fenolik içerik ($y=0.0356x-0.0047$ $R^2=0.997$)

c: Kersetine eşdeğer flavonoit içerik ($y=0.0619x-0.0043$ $R^2=0.9991$)

4.3.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Bulguları

Çizelge 4.6. gal ekstraları ve pozitif kontrollerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite sonuçlarını içermektedir. Gal ekstraları ve pozitif kontrollerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi farklı konsantrasyonlarda belirlendi. Bunlar;

- *A.quercusramuli* için, 10 farklı konsantrasyon (5, 10, 20, 50, 100, 300, 500, 600, 800, 1000 µg/ml),
- *A.quercustozae* için, 7 farklı konsantrasyon (1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 µg/ml),
- *A.cecconii* için, 6 farklı konsantrasyon (5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml).
- BHT için, 7 farklı konsantrasyon (5, 10, 20, 50, 100, 200, 1000 µg/ml),
- BHA için, 6 farklı konsantrasyon (2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml),
- AA için, 4 farklı konsantrasyon (2, 5, 10, 20 µg/ml).

A.quercusramuli'nin gal ekstresi 1000 µg/ml konsantrasyonda %91.40±0.01 inhibisyon, *A.quercustozae*'nin gal ekstresi 20 µg/ml konsantrasyonda %97.03±0 inhibisyon, *A.cecconii*'nin gal ekstresi 50 µg/ml konsantrasyonda %90.23±0.08 inhibisyon değerleriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

BHT 1000 µg/ml konsantrasyonda %52.95±0.02 inhibisyon, BHA 100 µg/ml konsantrasyonda %95.40±0.8 inhibisyon, AA ise 20 µg/ml konsantrasyonda %96.13±0.03 inhibisyon değerleriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

Tüm gal ekstraları pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den daha yüksek aktivite göstermiştir. Gal ekstraları kendi aralarında sıralandığında aktivite sıralamasının *A.quercustozae* >*A.cecconii* >*A.quercusramuli* şeklinde olduğu görülmektedir. En yüksek aktiviteyi 20 µg/ml konsantrasyonda *A.quercustozae* galinin gösterdiği (%97.03) ve aynı konsantrasyondaki AA'dan (%96.13) daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ekstre ve pozitif kontroller arasında aynı konsantrasyon baz alınarak aktivite sıralaması yapacak olursak 20 µg/ml konsantrasyonda *A.quercusramuli* galinin %29.22±0.02, *A.quercustozae* galinin %97.03±0, *A.cecconii* galinin %46.17±0.01, BHT'nin %4.90±0.02±0, BHA'nın %82.64±0.03, AA'nın ise %96.13±0.03 oranında inhibisyona sahip olduğu görülmektedir. Bu bulgular ışığında ekstre ve pozitif kontrol aktivite sıralaması *A.quercustozae* >AA >BHA >*A.cecconii* >*A.quercusramuli* >BHT şeklindedir.

Çizelge 4.6. Ekstre ve pozitif kontrollerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri

<i>A.quercusramuli</i>	%I	<i>A.quercustozae</i>	%I	<i>A.cecconii</i>	%I	BHT	%I	BHA	%I	AA	%I
5 µg/ml	18.05±0.02	1 µg/ml	9.77±0.02	5 µg/ml	3.05±0.04	5 µg/ml	1.70±0	2 µg/ml	14.90±0.05	2 µg/ml	31.66±0.02
10 µg/ml	23.49±0.02	2 µg/ml	23.94±0.02	10 µg/ml	16.83±0.02	10 µg/ml	2.40±0.01	5 µg/ml	50.03±0.01	5 µg/ml	42.83±0
20 µg/ml	29.22±0.02	3 µg/ml	32.30±0.02	20 µg/ml	46.17±0.01	20 µg/ml	4.90±0.02	10 µg/ml	70.28±0.01	10 µg/ml	68.19±0.09
50 µg/ml	38.68±0	4 µg/ml	37.30±0	30 µg/ml	61.93±0	50 µg/ml	12.91±0	20 µg/ml	82.64±0.03	20 µg/ml	96.13±0.03
100 µg/ml	45.55±0.04	5 µg/ml	55.48±0	40 µg/ml	78.30±0	100 µg/ml	26.42±0.01	50 µg/ml	94.35±0.01		
300 µg/ml	59.10±0.02	10 µg/ml	92.46±0	50 µg/ml	90.23±0.08	200 µg/ml	48.94±0.02	100 µg/ml	95.40±0.8		
500 µg/ml	85.07±0.01	20 µg/ml	97.03±0			1000 µg/ml	52.95±0.02				
600 µg/ml	88.95±0										
800 µg/ml	89.38±0										
1000 µg/ml	91.40±0.01										

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.3.3. ABTS Yöntemi (Katyon Radikali Giderim Aktivitesi) Bulguları

Çizelge 4.7. gal ekstreleri ve pozitif kontrollerin katyon radikali giderim aktivitesi yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite sonuçlarını belirtir. Gal ekstreleri ve pozitif kontrollerin katyon radikali giderim aktivitesi yöntemine göre antioksidan aktiviteleri farklı konsantrasyonlarda belirlendi. Bunlar;

- *A.quercusramuli* için, 9 farklı konsantrasyon (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µg/ml),
- *A.quercustozae* için, 8 farklı konsantrasyon (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 2.5 µg/ml),
- *A.cecconii* için, 8 farklı konsantrasyon (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25 µg/ml).
- BHT için, 6 farklı konsantrasyon (1, 2, 3, 5, 10, 20 µg/ml),
- BHA için, 8 farklı konsantrasyon (5,10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µg/ml),
- AA için, 4 farklı konsantrasyon (1, 2, 3, 4 µg/ml).

A.quercusramuli'nin gal ekstresi 100 µg/ml konsantrasyonda %97.22±0 inhibisyon, *A.quercustozae*'nin gal ekstresi 2.5 µg/ml konsantrasyonda %98.66±0.9 inhibisyon, *A.cecconii*'nin gal ekstresi 25 µg/ml konsantrasyonda %97.75±0.04 inhibisyon değerleriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

BHT 20 µg/ml konsantrasyonda %95.32±0.07 inhibisyon, BHA 100 µg/ml konsantrasyonda %95.72±0.09 inhibisyon, AA 4 µg/ml konsantrasyonda %99.30±0.3 inhibisyon değerleriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

Tüm gal ekstreleri pozitif kontrol olarak kullanılan BHA'dan daha iyi aktivite göstermiştir. Gal ekstreleri kendi aralarında sıralandığında ise aktivite sıralaması *A.quercustozae* >*A.cecconii* >*A.quercusramuli* şeklindedir. *A.quercustozae* gal ekstresi tüm pozitif kontrollerden daha yüksek aktiviteyi göstermiştir. 100 µg/ml konsantrasyonunda *A.quercusramuli* gal ekstresinin gösterdiği etkinin (%97.22±0), aynı konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan BHA'dan (%95.72±0.09) daha yüksek ve yine bu yöntemde 25 µg/ml konsantrasyonunda *A.cecconii* gal ekstresinin gösterdiği etkinin (%97.75±0.04), aynı konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den (%95.32±0.07) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Ekstre ve pozitif kontrollerin ABTS yöntemiyle belirlenen inhibisyon yüzdesi değerleri

<i>A.quercusramuli</i>	%I	<i>A.quercustozae</i>	%I	<i>A.cecconii</i>	%I	BHT	%I	BHA	%I	AA	%I
2 µg/ml	3.32±0.05	0.1 µg/ml	11.33±0.08	0.5 µg/ml	5.92±0.05	1 µg/ml	17.25±0.01	5 µg/ml	6.49±0.09	1 µg/ml	27.28±0.08
5 µg/ml	13.81±0.04	0.3 µg/ml	19.09±0.05	1 µg/ml	12.14±0.02	2 µg/ml	40.34±0.04	10 µg/ml	7.23±0.01	2 µg/ml	50.56±0.01
10 µg/ml	18.67±0.02	0.5 µg/ml	38.01±0.3	2 µg/ml	25.33±0.1	3 µg/ml	67.74±0.02	20 µg/ml	15.14±0.04	3 µg/ml	77.94±0.06
20 µg/ml	30.12±0.02	0.7 µg/ml	41.49±0	3 µg/ml	30.04±0	5 µg/ml	86.79±0.02	30 µg/ml	21.18±0.03	4 µg/ml	99.30±0.3
30 µg/ml	44.5±0.09	1 µg/ml	55.79±0.6	4 µg/ml	38.82±0.4	10 µg/ml	90.47±0.03	40 µg/ml	37.81±0		
40 µg/ml	61.25±0.01	1.5 µg/ml	77.76±0.7	5 µg/ml	52.02±0.08	25 µg/ml	95.32±0.07	50 µg/ml	51.70±0.03		
50 µg/ml	65.02±0.01	2 µg/ml	86±0.3	10 µg/ml	90.74±0.6			75 µg/ml	91.51±0.05		
75 µg/ml	85.74±0	2.5 µg/ml	98.66±0.9	25 µg/ml	97.75±0.04			100 µg/ml	95.72±0.09		
100 µg/ml	97.22±0										

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.3.4. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)

Bulguları

Çizelge 4.8. gal ekstreleri ve pozitif kontrollerin CUPRAC yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite sonuçlarını belirtir. Gal ekstreleri ve pozitif kontrollerin bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan aktiviteleri farklı konsantrasyonlarda belirlendi. Bunlar;

- *A.quercusramuli* için, 8 farklı konsantrasyon (10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250 µg/ml),
- *A.quercustozae* için, 9 farklı konsantrasyon (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 µg/ml),
- *A.cecconii* için, 10 farklı konsantrasyon (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µg/ml).
- BHT için, 10 farklı konsantrasyon (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/ml),
- BHA için, 9 farklı konsantrasyon (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µg/ml),
- AA için, 6 farklı konsantrasyon (2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml).

Bu yöntemde; kontrole karşı değerlendirilen örneklerde artan absorbans değeri artan antioksidan aktiviteyi ifade etmektedir.

A. quercusramuli 'nin gal ekstresi 250 µg/ml konsantrasyonda 1.22±0.07 absorbans değeri, *A.quercustozae*'nin gal ekstresi 10 µg/ml konsantrasyonda 1.2±0.08 absorbans değeri, *A.cecconii* 'nin gal ekstresi 50 µg/ml konsantrasyonda 1.84±0.19 absorbans değeri ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

BHT 10 µg/ml konsantrasyonda 2.04±0.15 absorbans, BHA 90 µg/ml konsantrasyonda 2.24±0.05 absorbans, AA 100 µg/ml konsantrasyonda 3.70±0.13 absorbans değerleri ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

Sonuçlara göre bu yöntemde gal ekstreleri kendi aralarında sıralandığında aktivite sıralaması *A.quercustozae* >*A.cecconii* >*A.quercusramuli* şeklinde olmuştur. Ekstre ve pozitif kontroller arasında aynı konsantrasyon baz alınarak aktivite sıralaması yapacak olursak 10 µg/ml konsantrasyonda *A.quercusramuli* gali 0.14±0, *A.quercustozae* gali 1.2±0.08, *A.cecconii* gali 0.40±0.02, BHT 2.04±0.15, BHA 0.07±0.01, AA ise 0.32±0.02 absorbans değeri göstermişlerdir. Bu bulgular ışığında aktivite sıralaması BHT >*A.quercustozae* >*A.cecconii* >AA >*A.quercusramuli* >BHA şeklindedir.

Çizelge 4.8. Ekstre ve pozitif kontrollerin CUPRAC yöntemiyle belirlenen absorbsans değerleri

<i>A.quercusramuli</i>	Absorbans	<i>A.quercustozae</i>	Absorbans	<i>A.cecconii</i>	Absorbans	BHT	Absorbans	BHA	Absorbans	AA	Absorbans
10 µg/ml	0.14±0	1 µg/ml	0.19±0.5	5 µg/ml	0.29±0.04	1 µg/ml	0.024±0.02	10 µg/ml	0.07±0.01	2 µg/ml	0.28±0.12
20 µg/ml	0.18±0	2 µg/ml	0.28±0.01	10 µg/ml	0.40±0.02	2 µg/ml	0.38±0.012	20 µg/ml	0.11±0	5 µg/ml	0.31±0.05
50 µg/ml	0.31±0.02	3 µg/ml	0.40±0.07	15 µg/ml	0.6±0.01	3 µg/ml	0.61±0.11	30 µg/ml	0.37±0.03	10 µg/ml	0.32±0.02
75 µg/ml	0.44±0.03	4 µg/ml	0.53±0.5	20 µg/ml	0.79±0	4 µg/ml	0.79±0.04	40 µg/ml	0.53±0.45	20 µg/ml	1.78±0.16
100 µg/ml	0.53±0.02	6 µg/ml	0.69±0.3	25 µg/ml	0.86±0	5 µg/ml	1.02±0.14	50 µg/ml	0.77±0.06	50 µg/ml	3.52±0.06
150 µg/ml	0.73±0.13	7 µg/ml	0.88±0.3	30 µg/ml	1.05±0.08	6 µg/ml	1.39±0.13	60 µg/ml	0.83±0.02	100 µg/ml	3.70±0.13
200 µg/ml	0.77±0.05	8 µg/ml	0.99±0.8	35 µg/ml	1.16±0.07	7 µg/ml	1.55±0.04	70 µg/ml	0.98±0.23		
250 µg/ml	1.22±0.07	9 µg/ml	1.04±0.09	40 µg/ml	1.35±0.07	8 µg/ml	1.68±0.06	80 µg/ml	1.29±0.37		
		10 µg/ml	1.2±0.08	45 µg/ml	1.45±0.13	9 µg/ml	1.75±0.10	90 µg/ml	2.24±0.05		
				50 µg/ml	1.84±0.19	10 µg/ml	2.04±0.15				

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Yeni, aktif biyolojik bileşiklerin elverişli bir kaynağı olarak bitkiler, içerdikleri bileşenleri yapısal düzeyde belirlemek için analiz edilmektedir. Bu yeni bileşikler, yeni bitkisel ilaçların keşfi açısından oldukça önemlidir.

Kolinerjik hipoteze göre, bilişsel işlev bozukluğu kolinerjik nöronların kaybına bağlıdır. Bu nedenle, asetilkolini (Ach) metabolize eden kolinesteraz enzimini bloke etmek, bilişi arttıran Ach seviyelerinin artmasına yardımcı olabilir (Kobayashi ve ark., 2016). Dolayısıyla da; kolinesterazların inhibisyonu Alzheimer hastalığı, yaşlılık demansı, ataksi ve miyastenia gravis gibi nörolojik hastalıkların tedavisi için umut verici bir strateji olarak kabul edilir.

Memeli beyni asetil ve bütiril kolinesteraz olmak üzere iki çeşit kolinesteraz içerir. Bu iki enzim %65 oranında amino asit sekans homolojisi gösterirken substratlara afinite, katalitik aktivite ve beyin içindeki dağılımı açısından farklılıklar gösterirler. Potansiyel kolinesteraz inhibitörleri kaynağı, kesinlikle doğada bol bulunan bitkilerden sağlanır. Çeşitli bitkilerin kolinesteraz inhibe edici aktivite gösterdiği ve bu nedenle de Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi ile ilişkili olabileceği bilinmektedir (Mukherjee ve ark., 2007).

Çalışmamızda, oluşumu farklı arı türleri tarafından indüklenen gallerin metanol ekstralarının AChE inhibisyonunda aktif olmadığı ancak BChE inhibisyonunda *A. quercustozae* gal ektesinin %31.33±1.25 oranında orta düzeyde, diğer ekstraların ise düşük düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kolinesteraz inhibisyonu açısından çalışılan gallerin metanol ekstralarının yüksek aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Meyve, mantar, sebzelerin esmerleşmesi ve insan derisindeki hiperpigmentasyon istenmeyen iki yaygın olaydır. Tirozinaz, enzimatik esmerleşme ve memelilerde melanogenezden sorumlu olarak bilinen ana enzimdir. Bu, araştırmacıları ve bilim insanlarını gıda, kozmetik, tıbbi endüstri gibi çeşitli uygulama alanları için yeni potansiyel tirozinaz inhibitörlerinin izolasyonu, sentezi ve tanımlanmasına odaklanmalarını teşvik etmiştir.

Fenolik bileşiklerin, bitki ekstralarında aktivitelere sorumlu en büyük fitokimyasal grup olduğu iyi bilinmektedir. Yeni anti-tirozinaz bileşiklerinin kaynaklarını bulmak için birçok bitki ekstralarının tirozinaz inhibe edici aktivitesi araştırılmaktadır. Örneğin, aşağıdaki bitkilerin anti-tirozinaz aktiviteleri çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. *Limonium tetragonum*, (Lee ve ark., 2017), *Arctostaphylos uva-ursi* (Matsuo ve ark., 1997), *Pleurotus ferulae* (Alam ve ark., 2012), *Artemisia aucheri* Boiss (Taherkhani, 2017), *Scutellaria. brevibracteata* subsp.

subvelutina (Senol ve ark., 2010), *Mangifera indica* (Nithitanakool ve ark. 2009), *Podocarpus falcatus* (Abdillahi ve ark., 2011), *Cymbopogon citrates* (Saeio ve ark., 2011), *Greyia flanaganii* (IC₅₀¼432.62 mg/ml) (Mapunya ve ark., 2011), *Vitis vinifera* yaprak ekstresi (IC₅₀¼ 3.84 mg/ ml) (Lin ve ark., 2017). Ayrıca Chiari ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilen Arjantin'e özgü 91 endemik bitkinin tirozinaz inhibisyonu aktivitesi araştırması sonuçları da bitki ekstralarının tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesine sahip olduğunu desteklemiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz gal ekstralarının tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi bulguları literatür ile uyumludur. Çalışılan tüm ekstralar aktif olup aktiviteleri orta düzeydedir.

Son zamanlarda üreaz inhibisyonu tıbbi ve tarımsal uygulamalarda önemli bir rol oynamaktadır. Üreaz katalizli reaksiyonlardan artmış amonyak ve pH seviyesi, insan ve tarım üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. *Proteus mirabilis* ve *Helicobacter pylori* insan vücudundaki enfeksiyon sırasında diğer mikroorganizmalara kıyasla genellikle daha yüksek üreaz aktivitesi gösterirler. Tıbbi açıdan bakıldığında, mikroorganizmaların enfeksiyonu sırasındaki yüksek üreaz enzim aktivitesi olgusu tanısal karakterizasyon, taksonomik tanımlama, tedavi takibi ve aşı üretimi için faydalı olabilir (Khan ve ark., 2007; Lateef ve ark., 2012). Son birkaç yılda, bitki ekstralarının (Amin ve ark., 2013; Mahernia ve ark., 2015; Bai ve ark., 2015) ve bitkilerden izole edilmiş doğal bileşiklerin (Modolo ve ark., 2015; Hassan ve Zemlicka, 2016) bu enzime karşı etkileriyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Çalıştığımız gal ekstralardan *A. quercustozae*'a ait ekstre üreaz enzim inhibisyonu açısından aktif (%40.98±1.41) iken *A. quercusramuli* ve *A. cecconii* aktivite sergilememişlerdir.

Antioksidanlar, insanda çeşitli metabolik işlemler sırasında tetiklenen oksidatif stres yoluyla meydana gelen serbest radikallerin veya reaktif oksijen türlerinin oksidasyonunun önlenmesi veya yavaşlatılması için radikal temizleme potansiyeline sahip doğal veya sentetik kimyasal bileşiklerdir. Bu antioksidan bileşikler, çeşitli metabolik enzimler tarafından katalizlenen biyokimyasal yollar boyunca hücreler ve dokular dahil olmak üzere insan vücudundaki temel hücresel bileşenlere zarar vermeden önce serbest radikallerin veya reaktif oksijen türlerinin çıkarılması ve önlenmesi için zorunludur (Nile ve Khobragade, 2011; Nile ve ark., 2013).

Kanserojenez gibi bazı yan etkilerin sentetik antioksidanlara atfedilmiş olması sebebiyle sentetik antioksidanların yerine doğal kaynaklı antioksidan madde arayışına

ilgi artmaktadır. Antioksidan aktivite doğal bileşiklerin en önemli biyolojik özelliklerindedir.

Doğal antioksidanlar, gıda kalitesini ve stabilitesini destekleyebildiğinden ve biyolojik sistemlerde serbest radikal zincir reaksiyonunu sona erdirmek için nutrasötik olarak işlev görebildiklerinden, doğal antioksidan kaynağı olarak bitki ekstralarının antioksidan özelliklerini doğrudan değerlendirilmesi konusuna son zamanlarda artan bir ilgi gösterilmiştir.

Doğal olarak oluşan antioksidanların birçoğunun serbest radikal veya aktif oksijen temizleyiciler olduğu tespit edilmiştir ve böylece bitkiler biyolojik aktiviteleri ve antioksidan özellikleri bakımından incelenmiştir (Ito ve ark., 1983; McClements ve Decker, 2000; Zheng ve Wang, 2001).

Bitkisel polifenollerin en büyük grubundan olan flavonoidler tanen içerir. Kansere savaşmak için kullanılan bitkilerin antioksidan aktivitesi ve polifenol içerikleri hakkındaki son raporlar, polifenollerin, yani flavonoidlerin, tanenlerin ve fenolik asitlerin antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Kovacevic, 2000; Rakic ve ark., 2007).

Bazı bitki ekstralarının total fenolik içeriği ile antioksidan kapasitesi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Shirzad ve ark., 2011; Rahnama ve ark., 2014).

Karimi ve Moradi (2015) yaptıkları çalışmada *Q. brantii* meşe palamutunun n-hekzan, kloroform, n-butanol ve su ekstralarının toplam fenol-flavonoid içerikleri ile antioksidan aktivitelerini araştırmış ve n-butanol ekstresinin en yüksek toplam fenolik içeriğe (376.2 ± 7.1) sahip olduğunu ve aynı zamanda en düşük IC_{50} (6.5 ± 0.6 µg/ml) değerini sergilediğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada, tüm ekstralarda toplam fenolik içerik ile serbest radikal süpürücü özellik (DPPH yöntemiyle) arasında önemli düzeyde ilişki olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu raporlar çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyum içindedir. *A. quercustozae* gal ekstresinin toplam fenolik içerik (438.24 ± 0.86) bakımından diğer ekstralardan daha zengin olması ve tüm antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinde en yüksek aktiviteyi sergilemiş olması yukarıda bahsedilen yargıyı desteklemektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Quercus infectoria üzerinde oluşumu *Andricus quercusramuli* tarafından, *Quercus brantii* L. üzerinde oluşumu *Andricus quercustozae* ve *Andricus cecconii* tarafından indüklenen meşe gallerine ait metanol ekstralarının kolinesteraz, tirozinaz, üreaz enzim inhibisyonları ile antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenen bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ve önerilerimiz aşağıda listelenmiştir.

- Aynı bitki üzerinde oluşumu farklı türler tarafından indüklenen gallerin farklı düzeyde aktivite gösterdiği saptanmış olup, bu da galin biyolojik aktivite göstermesine etken olan kimyasal içeriğin oluşumunda sadece konak bitkinin değil, indükleyici türün de etkisi olduğunu düşündürmektedir.
- Çalışmamıza konu olan gallerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili literatürde bu güne kadar herhangi bir kaydın olmaması çalışmamızın özgün değerini arttırmaktadır.
- Çalışmamızda gallerin metanol ekstraları analiz edilmiş olup bazı testlerde aktivite saptanmamıştır. Söz konusu gallerin farklı polaritelere sahip çözücülerden elde edilecek ekstralarının biyolojik aktivitelerinin araştırılabileceğini önermekteyiz.
- Çalışılan gallerin hayvan yemi olarak tüketilmesinden dolayı canlı sistemde gözle görülür bir yan etkisi yoktur. Bu bağlamda; sentetik antioksidan ve inhibitörlerin tespit edilen yan etkilerinden dolayı doğal kaynaklı antioksidan ve inhibitör madde arayışında çalışmamızın bir basamak olacağı görüşüdeyiz.
- Toplam fenolik madde açısından zengin olan *A. quercustozae* galinin fenolik madde kompozisyonu belirlenerek yüksek antioksidan aktiviteden sorumlu bileşenler endüstriye kazandırılabilir.
- Antioksidan aktivite açısından *A. quercustozae* galinin metanol ekstresi umut vaat edici olup bu aktivite ileri analiz yöntemleriyle desteklenebilir.

KAYNAKLAR

- Abiy, Y., 2005, Antimicrobial Flavonoids from the Stem Bark of *Erythrina burtii*, *Fitoterapia*, 96, 496-499.
- Abdillahi, H.S., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2011, Anti-inflammatory, antioxidant, anti-tyrosinase and phenolic contents of four Podocarpus species used in traditional medicine in South Africa, *Journal of Ethnopharmacology*, 136, 496–503.
- Ahmad, W., Ahmad, B., Ahmad, M., Iqbal, Z., Nisar, M., Ahmad, M., 2003, In vitro inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase by crude extract of *Myricaria elegans* Royle, *Journal of Biological Science*, 3, 1046–1049.
- Ahn, S.J., Koketsu, M., Ishihara, H., Lee, S.M., Ha, S.K., Lee, K.H., Kang, T.H., Kima, S.Y., 2006, Regulation of melanin synthesis by selenium-containing carbohydrates, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 281-286.
- Alam, N., Yoon, K.N., Lee, J.S., 2012, Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 111–18.
- Alkan, B., 1952, Türkiye'nin Zoosesid (Zoocecid) leri (kökeni hayvansal bitki urları) üzerinde çalışmalar II, A. Ü. Ziraat Fakültesi 1952 yıllığı, Ankara, 17, 259- 279.
- Amin, M., Anwar, F., Naz, F., Mehmood, T., Saari, N., 2013, Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibition activities of some traditional medicinal plants, *Molecules*, 18, 2135–2149.
- Amtul, Z., Rahman, A., Siddiqui, R., Choudhary, M., 2002, Chemistry and mechanism of urease inhibition, *Current Medicinal Chemistry*, 9, 1323–1348.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine, The CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Aprahamian, I., Stella, F., Forlenza, O.V., 2013, New treatment strategies for Alzheimer's disease: is there a hope?, *Indian Journal of Medical Research*, 138(4), 449-460.
- Archambault, M., Yaar, M., Gilchrest, B.A., 1995, Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation, *Journal of Investigative Dermatology*, 104, 859-867.
- Avcı, M., 1993, Türkiye'nin flora bölgeleri ve Anadolu Diagonaline coğrafî bir yaklaşım, *Türk Coğrafya Dergisi*, 28, 225-248.
- Bagchi, K., Puri, S., 1998, Free radicals and antioxidants in health and disease, *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4, 350–360.
- Bai, S., Bharti, P., Seasotiya, L., Malik, A., Dalal, S., 2015, In vitro screening and evaluation of some Indian medicinal plants for their potential to inhibit Jack bean and bacterial ureases causing urinary infections, *Pharmaceutical Biology*, 53, 326–333.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982, The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*, 30(4558), 408-414.
- Basri, D.F., Tan L.S., Shafiei Z., Zin N.M., 2012, In vitro antibacterial activity of galls of *Quercus infectoria* olivier against oral pathogens, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID:632796. doi:10.1155/2012/632796
- Baş, R., 1973, Türkiye'de orman ağaçlarında zarar yapan zar kanatlılar (Hymenoptera) üzerine araştırmalar, Tek. Bült. Serisi, *OAE Yayınları*, 66 ,Ankara, 155.

- Becker, E.M., Nissen, L.R. and Skibsted, L.H., 2004, Antioxidant Evaluation Protocols: Food Quality or Health Effects, *European Food Research and Technology*, 219, 561-571.
- Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson, K.S., Mangani S, Ciurli S., 2004, Molecular details of urease inhibition by boric acid: insights into the catalytic mechanism, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (12), 3714-3715.
- Benini, S., Kosikowska, P., Cianci M., Mazzei L., Gonzales Vara A., Berlicki Ł., 2013, The crystal structure of *Sporosarcina pasteurii* urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18, 391–399.
- Bhattacharya A., Sood P., Citovsky V., 2010, The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection, *Molecular Plant Pathology*, 11(5), 705–719.
- Bilgin Sökmen, B., Aydın, S., Şahin, Y., Akyurt, İ., 2016, Üreaz ve Elastaz Aktivitelerine Giresun'dan Toplanan *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Deniz Yosununun İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 6(14), 124-131
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, J., Mendez, J., 2002, Antioxidan activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*, *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 379-381.
- Castro, A., Martinez, A., 2001, Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 1(3), 267-272.
- Callahan, B.P., Yuan, Y., Wolfenden, R.J., 2005, The burden borne by urease. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 10828–10829.
- Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Pawelek, J.M., Ichihashi, M., 1996, Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: Regulation by ultraviolet, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1313, 130-138.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993, An introduction to free radicals chemistry, *British Medical Bulletin*, 49, 481–493.
- Chiari, M.E., Joray, M.B., Ruiz, .G, 2010, Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central argentina: isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*, *Food Chemistry*, 120, 10–4.
- Copeland, R.A., Harpel M.R., Tummino, P.J., 2007, Targeting enzyme inhibitors in drug discovery, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(7), 967-978.
- Costin, G.E., Hearing, V.J., 2007, Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress, *FASEB Journal*, 21, 976-994.
- Cook, J.M., Rokas, A., Pagel, M., Stone, G.N., 2002, Evolutionary shifts between host oak sections and host-plant organs in *Andricus* gallwasps, *Evolution*, 56(9), 18
- Çıplak, B., Demirsoy, A., Bozcuk, A.N., 1993, Distribution of Orthoptera in relation to the Anatolian Diagonal in Turkey, *Articulata*, 8 (1), 1-20.
- Çıplak, B., 2003, Distribution of Tettigoniinae (Orthoptera, Tettigoniidae) bushcrickets in Turkey: the importance of the Anatolian Taurus Mountains in biodiversity and implications for conservation, *Biodiversity Conservation*, 1, 47-64.
- Çıplak, B., 2004, Biogeography of Anatolia: the marker group Orthoptera, *Memorie della Societa Entomologica Italiana*, 82 (2), 357-372.

- Çıplak, B., 2004, Systematics, phylogeny and biogeography of *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae): evolution within a refugium, *Zoologica Scripta*, 33, 19-44.
- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S., Singh, H.K., 2002, A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba* anticholinesterase and cognitive enhancing activities, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73, 893–900.
- Deshpande, S.S., Deshpande, U.S., Salunkhe, D.K., 1995, Food Antioxidants, Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., *Marcel Dekker*, New York, 361.
- Dunnett, S.B., Fibiger, H.C., 1993, Role of forebrain cholinergic systems in learning and memory: relevance to the cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia, *Progress in Brain Research*, 98, 413.
- Durna Daştan, S., Zonus, N., Yalçın, İ., Daştan, T., 2012, C.Ü Bazı Meşe ve Gül Türlerinin Galli ve Galsız Bireylerindeki Total Protein İçeriğinin Farklı Yöntemler Kullanılarak Araştırılması, *Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 33 (1), 1-19.
- Ebadi, M., 2001, Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases, *Prominent*, Arizona.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R. M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Flores Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., Hultgren, S.J., 2015, Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options, *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269-284.
- Ferreira, R.O., Carvalho Juniora, A.R., Silvab, T.M.G., Castroa, R. N., Silvab T.M.S., Carvalhoa, M.G., 2014, Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 617-625.
- Fishbein, W.N., Carbone, P.P., Hochstein, H.D., 1965, Acetohydroxamate: bacterial urease inhibitor with therapeutic potential in hyperammonaemic states, *Nature*, 208(5005), 46-48.
- Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., Abad, S., Sanchez Lopez, E., Garcia, M.L., Olloquequi, J., Beas Zarate, C., Auladell, C., Camins A., 2016, A Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment, *Neural Plast*, Article ID:8501693.
- Follmer, C., 2010, Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections, *Journal of Clinical Pathology*, 63(5), 424-30.
- Fu, T.Y., Lee, W.C., Ko, H.H., Yen, L.F., 2014, Extracts of *Artocarpus communis* decrease α -Melanocyte Stimulating Hormone- Induced Melanogenesis through Activation of ERK and JNK Signaling Pathways, *The Scientific World Journal*, 2014, 1-8.
- Giacobini, E., 2003, Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease, *Neurochemical Research*, 28(3), 515-522.
- Govaerts, R., Frodin, D.G., 1998, World checklist and bibliography of Fagales (Betulaceae, Corylaceae, Fagaceae and Ticodenraceae), *Royal Bot Gardens Kew*, Great Britain.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999, Free Radicals in Biology and Medicine, *Oxford University*, New York, 36.

- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297, 353.
- Hassan, S.T.S., Zemlicka, 2016, M., Plant-derived urease inhibitors as alternative chemotherapeutic agents, *Archiv der Pharmazie*, 349, 507–522.
- Hassan, S.T.S., Sudomova, M., 2017, The development of urease inhibitors: what opportunities exist for better treatment of *Helicobacter pylori* infection in children? *Children*, 4(1), 2.
- Hausinger, R.P., Karplus, P.A., 2016, Handbook on metalloproteins. *Wiley Online Library*.
- Hearing, V.J., 1987, Mammalian Monophenol Monooxygenase (Tyrosinase): Purification, Properties, and Reactions Catalyzed, *Methods in Enzymology*, 142, 154-165.
- Hearing, V.J., 1999, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 4, 24-28.
- Hemminga, M.A., Duarte, C.M., 2000, Seagrass ecology, *Cambridge University*, 1298.
- Hengshan, W., Yingming, P., Xujie, T., Zhiqing, H., 2006, Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans*'s seeds, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 39, 496-502.
- Hillhouse, B.J., Ming, D.S., French, C.J., Neil Towers, G.H., 2004, Acetylcholine esterase inhibitors in *Rhodiola rosea*, *Pharmaceutical Biology*, 42, 68–72.
- Huang, M.Y., Huang W.D., Chou H.M., Chen C.C., Chen P.J., Chang Y.T., Yang C.M., 2015, Structural, biochemical, and physiological characterization of photosynthesis in leaf-derived cup-shaped galls on *Litsea acuminata*, *BMC Plant Biology*, 15, 61.
- Inghaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W., 2003, Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies, *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 261–264.
- Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M., Ogiso, T., 1983, Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats, *Journal of the National Cancer Institute*, 70(2), 343-352.
- Jung, S.W., Lee, N.K., Kim, S.J., Han, D., 1995, Screening of Tyrosinase Inhibitor from Plants, *Korean Journal of Food Science and Technology*, 27(6), 891-896.
- Kaur, G., Hamid, H., Ali, A., Alam, M.S., Athar M., 2004, Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*, *Journal of Ethnopharmacol*, 90, 285–292.
- Kaur G., Athar, M., Alam, M.S., 2008, *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages, *Chemico-Biological Interactions*, 171, 272–282.
- Karimi, A., Moradi, M.T., 2015, Total phenolic compounds and in vitro antioxidant potential of crude methanol extract and the correspond fractions of *Quercus brantii* L. acorn. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(1), 35-39.
- Katılmış, Y., Kiyak, S., 2008, Checklist of Cynipidae of Turkey with a new genus record, *Journal of Natural History*, 42(31), 2161-2167.
- Kemal, M., Kocak, A.Ö., 2010, Winter trips to south Van Lake and the cynipid galls on oaks (Hymenoptera, Cynipidae), *Cesa News*, 56, 1-66.
- Khan, H., Khan, M.A., Hussan, I., 2007, Enzyme inhibition activities of the extracts from rhizomes of *Gloriosa superba* Linn (*Colchicaceae*). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22, 722–725.

- Khan, S., Karim, A., Iqbal, S., 2009, Helicobacter urease: Niche construction at the single molecule level, *Journal of Biosciences*, 34, 503–511.
- Kılıç, S., 2015, Doğu Anadolu Meşesi (*Quercus brantii*) ve Mazı Meşesi (*Quercus infectoria*) Yapraklarının Silajlarına İlave Edilen Değişik Meyve Posalarının Silaj Kalitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, *Dicle Üni. Fen Bilim. Enst.*, Diyarbakır, 25-29.
- Kıvrak, I.A., Duru, M.E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmandar, M., Topcu, G., 2009, Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*, *Food Chemistry*, 116, 470–479.
- Kıyak S., Kılıç T., Katılmış Y., 2008, A contribution to the knowledge of the *Cynipidae* fauna of Turkey (*Hymenoptera: Cynipidae*), *Munis Entomology & Zoology*, 3(1), 523-535.
- Kim, Y.J., Uyama, H., 2005, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1707–1723.
- Krajewska, B., 2009, Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 9–21.
- Krajewska, B.A., 2016, A combined temperature-pH study of urease kinetics. Assigning pKa values to ionizable groups of the active site involved in the catalytic reaction. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 124, 70–6.
- Kobayashi, H., Ohnishi, T., Nakagawa, R., Yoshizawa, K., 2016, The comparative efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a Bayesian network meta-analysis, *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 31(8), 892-904.
- Konieczna, I., Żarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesińska, B., Frączyk, J., Kamiński Z., Kaca, W., 2012, Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases, *Current Protein & Peptide Science*, 13, 789-806.
- Korkmaz, M., Sarı M., Başbüyük H. H., 2010, Genetic structure of *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae: Gomphocerinae) populations in Anatolia: A stable rear edge population, *Annals of the Entomological Society of America*, 103(4), 625-634.
- Kosikowska, P., Berlicki, Ł., 2011, Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21, 945–957.
- Kovacevic, N., 2000, Basic Farmakognosy, *Belgrade University of Belgrade Faculty of Pharmacy*.
- Kuo, Y.C., Rajesh, R., 2017, A critical overview of therapeutic strategy and advancement for Alzheimer's disease treatment, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 92-105.
- Larik, F.A., Saeed, A., Channar, P.A., Muqadar, U., Abbas, Q., Hassan, M., Seo, S.Y., Bolte, M., 2017, Design, synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies of novel 1-pentanoyl-3-arylthioureas as inhibitors of mushroom tyrosinase and free radical scavengers, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141, 273-281.
- Lateef, M., Iqbal, L., Fatima, N., Siddiqui, K., Afza, N., Zia-ul-Haq, M., Ahmad, M., 2012, Evaluation of antioxidant and urease inhibition activities of roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 99–102.
- Lee, S.G., Karadeniz, F., Seo, Y., Kong, C.S., 2017, Anti-melanogenic effects of flavonoid glycosides from *Limonium tetragonum* (thunb.) bullock via inhibition of tyrosinase and tyrosinase-related proteins, *Molecules*, 22, 1480–1490.

- Leon, R., Garcia, A.G., Marco-Contelles, J., 2013, Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease, *Medicinal Research Reviews*, 33(1), 139-189.
- Liu, T., Stern, A., Roberts, L.J., 1999, The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid, *Journal of Biomedical Science*, 6, 226–235.
- Lin, Y.S., Chen, H.J., Huang, J.P., Lee P.C., Tsai C.R., Hsu T.F., Huang W.Y., 2017, Kinetics of tyrosinase inhibitory activity using *Vitis vinifera* leaf extracts, *BioMed Research International*, Article ID 5232680.
- Lukiewicz, S., 1972, The biological role of melanin. I. New concepts and methodological approaches, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 10, 93-108.
- McClements, D.J., Decker, E.A., 2000, Lipid Oxidation in Oil-in- Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems, *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood L.G, Garg, M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046–2056.
- Macegoniuk, K., 2013, Inhibitors of bacterial and plants urease. A review. *Folia Biologica et Oecologica*, 9, 9–16.
- Mahernia, S., Bagherzadeh, K., Mojab, F., Amanlou, M., 2015, Urease inhibitory activities of somecommonly consumed herbal medicines, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14, 943–947.
- Mapunya, M.B., Hussein, A.A., Rodriguez, B., Lall, N., 2011, Tyrosinase activity of *Greyia flanaganii* (Bolus) constituents, *Phytomedicine*, 18, 1006–12.
- Maroney, M.J., Ciurli, S., 2014, Nonredox nickel enzymes, *Chemical Reviews*, 114, 4206–4228.
- Martinson E.O., Hackett J.D., Machado C.A., Arnold A.E., 2015, Metatranscriptome analysis of fig flowers provides insights into potential mechanisms for mutualism stability and gall induction, *Plos One*, 10(6).
- Matsuo K, Kobayashi M, Takuno Y, 1997, Anti-tyrosinase activity constituents of *Arctostaphylos uva-urs*, *Yakugaku Zasshi*, 117, 1028–32.
- Mazzei, L., Cianci, M., Benini, S., Bertini, L., Musiani, F, Ciurli, S., 2016, Kinetic and structural studies reveal a unique binding mode of sulfite to the nickel center in urease, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 154, 42–49.
- Melika, G., Ross Farre P., Penzes Z.S., Pujade Villar, J., 2004, UFO Abei Melika et Pujade-Villar (Hymenoptera:Cynipidae:Synergini) new genus and new species from japan. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 51(4), 313-327.
- Melika, G., Stone, G.N., 2001, A new species of cynipid gall wasp from Turkey (Hymenoptera:Cynipidae), *Folia Entomologica Hungarica*, 62, 127-131.
- Mobley, H.L., Hausinger, R.P., 1989, Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiology Reviews*, 53, 85–108.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D., Hausinger, R.P., 1995, Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Review*, 59, 451-480.
- Mobley, H.L.T., 2001, *Helicobacter pylori*: physiology and genetics, Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., Stuart, L., *American Society of Microbiology Pres.*, Washington (DC), 97–109.
- Modolo L.V., de Souza, A.X., Horta, L.P., Araujo, D.P., de Fátima, A., 2015, An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: a review, *Journal of Advanced Research*, 6, 35–44.

- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2000, Comparison of the free radical-scavenging activity of Propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109-114.
- Morgan, B.D.G., O'Neill, T., Dewey, D.L., Galpine, A.R., Riely, P.A., 1981, Treatment of malignant melanoma by intravascular 4-hydroxyanisole, *Clinical Oncology*, 7, 227-234.
- Mufson, E.J., Mahady, L., Waters, D., Counts, S.E., Perez, S.E., Dekosky, S.T., Ginsberg, S.D., Ikonovic, M.D., Scheff, S.W., Binder, L.I., 2015, Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease, *Neuroscience*, 309, 51-67.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., 2007, Acetylcholinesterase inhibitors from plants, *Phytomedicine*, 14, 289-300.
- Munoz, J.L., Garcia Molina, F., Varon, R., Rodriguez Lopez, J.N., Garcia Canovas, F., Tudela, J., 2006, Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity, *Analytical Biochemistry*, 351, 128-138.
- Mutun, S., Dinç, S., 2011, Contributions to the gallwasp (Hymenoptera:Cynipidae) fauna of Turkey with one new record, *Journal of Applied Biological Science*, 5(3), 83-85.
- Nabati F., Mojab, F., Habibi Rezaei, M., Bagherzadeh, K., Amanlou, M., Yousefi, B., 2012, Large scale screening of commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease activity, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 72.
- Nagesh, L., Sivasamy, S., Muralikrishna, K., Bhat, K.G., 2012, Antibacterial potential of gall extract of *Quercus infectoria* against enterococcus faecalis-an in vitro study, *Pharmacognosy Journal*, 4, 47-50.
- Naish, S., Holden, J. L., Cooksey, C. J., Riely P.A., 1988, The major primary cytotoxic product of 4-hydroxyanisole oxidation by mushroom tyrosinase is 4-methoxy ortho benzoquinone, *Pigment Cell & Melanoma Research*, 1, 382-385.
- Nile, S.H., Khobragade, C.N., 2011, In vitro anti-inflammatory and xanthine oxidase inhibitory activity of *Tephrosia purpurea* shoot extract, *Natural Product Communications*, 6, 1437-1440.
- Nile, S.H., Kumar, B., Park, S.W., 2013, In vitro evaluation of selected benzimidazole derivatives as an antioxidant and xanthine oxidase inhibitors, *Chemical Biology & Drug Design*, 82, 290-295.
- Nithitanakool, S., Pithayanukul, P., Bavovada, R., 2009, Saparpakorn P. Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules*, 14, 257-265.
- Oh, Y.E., Jang, Y.J., Choi, H.Y., Choi, W.Y., Choi T.B., 2010, Inhibitory effects of 1-O-methyl-fructofuranose from *Schisandra chinensis* fruit on melanogenesis in B16F0 melanoma cells, *Journal Ethnopharmacol*, 132, 219-224.
- Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M.I., Khalid, A., 2004, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants, *Journal Ethnopharmacol*, 91, 57-60.
- Onado, Y., Takido, M., Magaribuchi, T., Iwasaki, H., 1990, Effects of 12-sulfodehydroabiatic acid monosodium salt (TA2711), a new anti-ulcer agent, on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents and gastric mucosal defensive factors in rats, *Japanese Journal of Pharmacology*, 52, 631-638.
- Patela S., Raufb A., Khanc H., 2018, The relevance of folkloric usage of plant galls as medicines: Finding the scientific rationale, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 240-247

- Perry, N., Court, G., Bidet, N., Court, J., Perry, E., 1996, European herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy, *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 11, 1063–1069.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.G., Theolad, A.E., Jenner, P., Perry, E.K., 2000, In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 895–902.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.G., Sampson, J., Theolad, A.E., Hart, S., Lis-balchin, M., Houlst, J.R.S., Evans, P., Jenner, P., Milligan, S., Perry, E.K., 2001, In vitro activities of *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1347–1356.
- Preet A., Baldev S., Nirmal S., 2012, A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 1175–1180.
- Rahnama, S., Rabiei, Z., Alibabaei, Z., Mokhtari, S., Rafieian-kopaei, M., Deris, F., 2014, Anti-amnesic activity of *Citrus aurantium* flowers extract against scopolamine-induced memory impairments in rats, *Neurological Sciences*, 4.
- Re, R., Pellegrini, N., Protrggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C, 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Madicine*, 26, 1231-1237.
- Real Guerra, R., Stanisçuaski, F., Carlini, C.R., 2013, Soybean urease: over a hundred years of knowledge. A comprehensive survey of international soybean research – genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships, 39, Board, J.E., *InTech*, 318.
- Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tešević, V., Povrenović, D., 2007, Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia, *Food Chemistry*, 104(2), 830-834.
- Rice Evans, C.A., Miller, N.J., 1984, Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.
- Riely, P.A., Sawyer, B., Wolff, M.A., 1975, The melanocytotoxic effect of 4-hydroxyanisole, *Journal of Investigative Dermatology*, 64, 86–89.
- Riely, P.A., 1991, Melanogenesis: a realistic target for antimelanoma therapy, *European Journal of Cancer*, 27, 1172–1177.
- Riley, A.P., 2003, Melanogenesis and malanoma, *Pigment Cell & Melanoma Research*, 16, 548-552.
- Roberson, M.R., Harrell, L.E., 1997, Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism, *Brain Research Reviews*, 25(1), 50-69.
- Sabudak, T., Demirkiran, Ö., Öztürk, M., Topcu G., 2013, Phenolic compounds from *Trifolium echinatum* Bieb. and investigation of their tyrosinase inhibitory and antioxidant activities, *Phytochemistry*, 96, 305–311.
- Saeio, K., Yotsawimonwat, S., Anuchapreeda, S., Okonogi, S., 2011, Development of microemulsion of a potent anti-tyrosinase essential oil of an edible plant, *Drug Discoveries & Therapeutics*, 5, 246–252.
- Senol, F.S., Orhan, I., Yilmaz, G., 2010, Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria* L. taxa from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 781–788.
- Shabana, S., Kawai, A., Kai, K., Akiyama, K., Hayashi H., 2010, Inhibitory Activity against Urease of Quercetin Glycosides Isolated from *Allium cepa* and *Psidium guajava*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(4), 878-880.

- Shirzad, H., Taji, F., Rafieian-Kopaei, M., 2011, Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice, *Journal of Medicinal Food*, 14(9), 969-974.
- Shorthouse J.D., Wool D., Raman A., 2005, Gall-inducing insects- Nature's most sophisticated herbivores, *Basic and Applied Ecology*, 6, 407-411.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977, Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Slominski, A., Paus, R., 1993, Melanogenesis is coupled to murine anagen: toward new concepts for the role of melanocyte and the regulation of melanogenesis in hair growth, *Journal of Investigative Dermatology*, 111, 941-947.
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P.M., Schallreuter, K.U., Paus, R., Tobin, D.J., 2005, Hair Follicle pigmentation, *Journal of Investigative Dermatology*, 124, 13-21.
- Snezana, A.K., Christine, K., David, W.M., 2018, A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 553-565.
- Stone, G.N., Schönrogge, K., 2003, The adaptive significance of insect gall morphology, *Trends in Ecology and Evolution*, 18(10), 512-522.
- Sumner, J.B., 1926, Isolation and crystallization of the enzyme urease, *Journal of Biological Chemistry*, 69, 435–41.
- Taherkhani, M., 2017, Chemical constituents, total phenolic content, antimicrobial, antioxidant and radical scavenging properties, chelating ability, tyrosinase inhibition and in vitro cytotoxic effects of *Artemisia aucheri* herbs. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 50, 736–745.
- Tariot, P.N., 1994, Alzheimer's disease: an overview, *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 8, 4–11.
- Tocco, G., Fais, B., Meli, G., Begala, M., Podda, G., Fadda, M.B., Corda, M., Attanasi, O.A., Filippone, P., Berretta, S., 2009, PEG-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol-coumarin derivatives: preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(1), 36-39.
- Todd, C., Hewitt, S.D., Kempenaar, J., Noz, K., Thody, A.J., Ponc, M., 1993, Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: Effect of ultraviolet radiation, *Archives of Dermatological Research*, 285, 455-459.
- Uhlíková H., Obořil M., Klemková J., Šedo O., Zdráhal Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J., 2016, Elicitin-induced distal systemic resistance in plants is mediated through the protein-protein interactions influenced by selected lysine residues, *Frontiers in Plant Science*, 7, 59.
- Unver, N., Paul, F.P., Horster, S., Wenck, H., Stab, F., Blatt, T., Elsasser, H.P., 2006, Alterations in the epidermal-dermal melanin axis and factor XIIIa melanophages in senile lentigo and ageing skin, *British Journal of Dermatology*, 155, 119-128.
- Upadhyay, L.S.B., 2012, Urease inhibitors: a review, *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 381–388.
- Vasconcelos, J.F., Teixeira, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Nunes, X.P., Giulietti, A.M., Ribeiro-dos-Santos, R., Soares, M.B., 2007, Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation, *European Journal of Pharmacology*, 609, 126.

- Williams, J.J., Rodman, J.S., Peterson, C.M., 1984, A randomized double-blind study of acetohydroxamic acid in struvite nephrolithiasis, *New England Tip Dergisi*, 311(12), 760-764.
- Wöhler, F., 1828, Ueber künstliche Bildung des Harnstoffs, *Annals of Physics*, 88, 253–256.
- Ya, W., Chun-Meng, Z., Tao, G., 2015, Preliminary screening of 44 plant extracts for anti-tyrosinase and antioxidant activities. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 1737–1744.
- Yamauchi, K., Mitsunaga, T., 2016, Melanogenesis and melanosome transportation modulators from plants, *Letters in Drug Design & Discovery*, 13, 472-751.
- Yao, M., Tung, W., Chen, X., Zhan, C.G., 2013, Reaction pathways and free energy profiles for spontaneous hydrolysis of urea and tetramethylurea: unexpected substituent effects, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 11, 7595–605.
- Yoshida, M., Takashi, T., Inoue, S., 2000, Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes, *Journal of Investigative Dermatology*, 114, 335-342.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176–186.
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001, Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- Xie, S.S., Wang, X.B., Li, J.Y., Yang, L., Kong, L.Y., 2013, Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine-Coumarin Hybrids as Multifunctional Cholinesterase Inhibitors Against Alzheimer's Disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 540-53.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Merve DOĞAN ABDİOĞLU
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Bandırma 27.10.1985
Telefon : 05393238811
e-mail : mervdoga@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Ömer Seyfettin Anadolu Lisesi, Gönen, Balıkesir	2003
Üniversite	: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sinop	2008

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2008-2009	Bandırma Birey Dershanesi	Biyoloji Öğretmeni
2009-2011	Gönen Özgür Dershanesi	Biyoloji Öğretmeni
2012-2014	Halkalı Final Dershanesi	Biyoloji Öğretmeni
2015-2017	Batman İbni Sina Anadolu Meslek Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2017-	Batman Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

UZMANLIK ALANI

Antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, enzim inhibisyonu

YABANCI DİLLER

İngilizce (orta düzey)

YAYINLAR

1. Nesrin Haşimi, Merve Doğan, Erdem Seven. The Antioxidant Activity of *Quercus infectoria* Gall Induced by *Andricus quercusramuli* . International Eurasian Conference On Biological And Chemical Sciences . Ankara / Turkey, 26 - 27 April 2018
2. Merve Doğan, Nesrin Haşimi, Erdem Seven, Mehmet Boğa. Antioxidant Activity of *Quercus brantii* L. Galls Induced by Gall Wasps. The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB2018). Kyiv/Ukraine 03-06 July 2018.
3. Nesin Haşimi, Leyla Eren Karahan, Merve Doğan. Antioxidant Activity of *Adiantum capillus-veneris* L. The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB2018). Kyiv/Ukraine, 03-06 July 2018
4. Merve Doğan, Mehmet Boğa, Nesrin Haşimi, Erdem Seven. The Enzyme Inhibitory Activity of Some Oak Galls. The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB2018). Kyiv/Ukraine, 03-06 July 2018