



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**FARKLI ONOSMA L. (BORAGINACEAE) TÜRLERİNİN TİROZİNAZ
İNHİBİSYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Funda ÇIRAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Berkant KAYAN

AKSARAY, 2022

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182305402 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Funda ÇIRAK tarafından hazırlanan “**FARKLI ONOSMA L. (BORAGINACEAE) TÜRLERİNİN TİROZİNAZ İNHİBİSYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Berkant KAYAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Doç Dr. Rıza BİNZET

Mersin Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Erkut YILMAZ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Funda ÇIRAK

TEŞEKKÜR

Tez konum için beni yönlendiren ve tez çalışmam sırasında bana bilgi ve tecrübesiyle destek veren danışmanım Sayın Prof. Dr. Berkant KAYAN'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım ve tez sürecim boyunca yardımını esirgemeyen bilgi ve birikiminden faydalandığım, her konuda desteğini aldığım ikinci danışmanım Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognazi Anabilim Dalı üyesi Sayın Prof. Dr. Didem ŞÖHRETOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım bitki materyallerinin toplanması ve teşhisinin yapılması, temin edilmesini sağlayan ve bilgilerini paylaşan Mersin Üniversitesi, Botanik Anabilim Dalı üyesi Sayın Doç. Dr. Rıza BİNİZET'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan canım aileme teşekkür ederim.

Varlığıyla bana güç veren ve hayatıma anlam katan en kıymetlim canım kızım Alina ÇIRAK'a teşekkür ederim.

Her türlü desteğini ve varlığını hep yanımda hissettiğim, her günüme değer katan, beni hep yukarılara taşıyan sevgili eşim Tamer ÇIRAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Funda ÇIRAK
AKSARAY, 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Tıbbi Aromatik Bitkilerin Medikal ve Kozmetik Uygulamalarda Kullanımı....	3
2.1.1 <i>Onosma</i> L. (Boraginaceae)	5
2.1.1.1 <i>Onosma rascheyana</i> Boiss.	7
2.1.1.2 <i>Onosma papillosa</i> Riedl.....	8
2.1.1.3 <i>Onosma discedens</i> Hausskn. ex Bornm	8
2.1.1.4 <i>O. alborosea</i> Fisch. & C.A.Mey. ssp. <i>alborosea</i> var. <i>alborosea</i>	8
2.1.1.5 <i>Onosma erzincanica</i> Binzet & Eren.....	8
2.2 Enzimler ve Özellikleri	9
2.2.1 Enzimlerin sınıflandırılması.....	11
2.2.2 Enzim inhibisyonu	13
2.3 Tirozinaz Enzimi.....	14
2.3.1 Tirozinaz enziminin uygulamaları	14
2.3.2 Tirozinaz enzim inhibisyonu.....	15
2.3.3 Tirozinaz enzim inhibisyonunu uygulamaları.....	16
2.4 Antioksidanlar	18
2.4.1 Antioksidanların sınıflandırılması.....	19
2.5 Fenolik Bileşikler, Flavonoidler ve Flavonoller	21
2.5.1 Fenolik bileşikler.....	21
2.5.2 Flavonoidler	22
2.5.3 Flavonoller	23
2.6 Ekstraksiyon Yöntemleri.....	24
2.6.1 Mekanik olarak yapılan ekstraksiyon	25
2.6.2 Distilasyonla yapılan ekstraksiyon.....	25
2.6.3 Çözücülerle yapılan ekstraksiyon	25
2.6.3.1 Perkolasyon yöntemi ile ekstraksiyon.....	26
2.6.3.2 Dekoksiyon yöntemi ile ekstraksiyon	26
2.6.3.3 Maserasyon yöntemi ile ekstraksiyon	26
2.6.4 Soxhlet Ekstraksiyonu.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1 Kullanılan Bitki Materyalleri	29
3.2 Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Cihazlar.....	30
3.3 Bitki Materyallerinin Ekstraksiyonu	31
3.4 Bitki Ekstrelerinin İçeriklerinin Belirlenmesi	32
3.4.1 Toplam fenol içeriğinin belirlenmesi	32
3.4.2 Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi.....	33
3.4.3 Toplam flavonol içeriğinin belirlenmesi	34
3.5 Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi.....	34
3.5.1 DPPH radikal süpürücü etkinlik	35
3.5.2 NO radikali süpürücü etkinlik.....	35

3.5.3 SO radikali süpürücü etkinlik	36
3.5.4 Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC).....	37
3.6 Tirozinaz Enzim İnhibisyonu	38
3.7 Sitotoksik Etki Tayini (MTT Yöntemi)	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1 Bitki Ekstrelerinin İçerikleri	41
4.1.1 Toplam fenol içeriği.....	41
4.1.2 Toplam flavonoit içeriği.....	43
4.1.3 Toplam flavanol içeriği	44
4.2 Antioksidan Özellikleri	46
4.2.1 DPPH radikal süpürücü etkinlik	46
4.2.2 NO radikali süpürücü etkinlik	48
4.2.3 SO radikali süpürücü etkinlik	50
4.2.4 Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC).....	50
4.3 Tirozinaz Enzim İnhibisyonu	53
4.4 Sitotoksik Etki Tayini (MTT Yöntemi)	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	57
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	74

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI *ONOSMA* L. (BORAGINACEAE) TÜRLERİNİN TİROZİNAZ İNHİBİSYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Funda ÇIRAK

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Berkant KAYAN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Didem ŞÖHRETOĞLU

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, *Onosma* L. (Boraginaceae) cinsine ait beş farklı türün anti-hiperpigmentasyon tedavisinde kullanılmak üzere potansiyelinin belirlenmesi için tirozinaz enzim inhibitör etkisi incelenmiştir. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri endemik *O. papillosa* Riedl, endemik *O. discedens* Hausskn. ex Bornm. endemik *O. erzincanica* Binzet & Eren, *O. rascheyana* Boiss., ve *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea* taksonlarıdır. Öncelikle her bir türün toprak üstü kısımları mekanik olarak öğütülmüş ve metanol içerisinde maserasyon yöntemi uygulanmış ve sonrasında filtre kağıdı ile süzölmüştür. Çözeltiler evaporatöre alınarak düşük sıcaklıkta (<40°C) çözücü uzaklaştırılmıştır. Islak ekstraktlar liyofilize edilerek kuru ekstraktlar elde edilmiş ve deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır. İlk olarak ekstraktlarda bulunan toplam fenolik bileşik, flavonoid ve flavonol içerikleri araştırılmıştır. Ekstraktların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla DPPH, NO ve SO radikal süpürücü etki tayini ve CUPRAC bakır indirgeme kapasitesi tayini deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların tirozinaz inhibitör etkisinin belirlenmesi amacıyla substrat olarak L-DOPA kullanılarak türlerin ve derişimin etkisi araştırılmıştır. Son olarak ekstraktların hücre canlılığı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla fare embriyonik fibroblast (3T3) hücre hattı üzerinde MTT testi ile sitotoksite deneyleri yapılmıştır. Çalışmalarda elde edilen bulgular tüm *Onosma* türlerinin tirozinaz inhibitör etkisi ve antioksidan aktivitesi bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca düşük derişimlerde ($\leq 500\mu\text{g/mL}$) türlerin sahip olduğu sitotoksiste değerleri kabul edilebilir seviyededir.

Anahtar Kelimeler: *Onosma*, Endemik, Tirozinaz, Enzim inhibisyonu, Antioksidan Sitotoksiste.

Şubat, 2022; 74 sayfa

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT *ONOSMA* L. (BORAGINACEAE) SPECIES ON TYROSINASE INHIBITION

Funda ÇIRAK

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Berkant KAYAN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Didem ŞÖHRETOĞLU

ABSTRACT

In this study, the tyrosinase enzyme inhibitory effect of five different species belonging to the genus *Onosma* L. (Boraginaceae) was investigated to determine their potential for use in anti-hyperpigmentation treatment. Plant materials used in the study are endemic *O. papillosa* Riedl, endemic *O. discedens* Hausskn. ex Bornm. endemic *O. erzincanica* Binzet & Eren, *O. rascheyana* Boiss., and *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea* taxa. First, the aerial parts of each species were mechanically ground and dispersed in methanol, and after the maceration method was applied, it was then filtered with filter paper. The solutions were taken to the evaporator and the solvent was removed at low temperature (<40°C). Wet extracts were lyophilized to obtain dry extracts and stored for use in experiments. Firstly, the total phenolic compounds, flavonoids and flavonol contents in the extracts were investigated. In order to determine the antioxidant activities of the extracts, DPPH, NO and SO radical scavenging effects and CUPRAC copper reducing capacity experiments were carried out. In order to determine the tyrosinase inhibitory effect of the extracts, the effects of species and concentration were investigated by using L-DOPA as a substrate. Finally, cytotoxicity experiments with MTT test were performed on mouse embryonic fibroblast (3T3) cell line in order to investigate the effects of extracts on cell viability. The obtained results showed that all *Onosma* species have tyrosinase inhibitory effect and antioxidant activity. In addition, the cytotoxicity values of the species at low concentrations ($\leq 500\mu\text{g/mL}$) are at acceptable levels.

Keywords: *Onosma*, Endemic, Tyrosinase, Enzyme inhibition, Antioxidant, Cytotoxicity.

February, 2022; 74 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Enzimatik tepkimelerin şematik gösterimi.	9
Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması.	20
Şekil 2.3. Antioksidanların oksidan moleküllere karşı etkilerine göre sınıflandırılması.	21
Şekil 2.4. Fenolün kimyasal yapısı.	22
Şekil 2.5. Flavonoidlerin temel iskelet yapısı ve sınıflandırılması.	23
Şekil 2.6. Ekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması.	25
Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan <i>Onosma</i> türlerinin genel görünüşleri.	30
Şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon grafiği.	41
Şekil 4.2. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin toplam fenolik bileşik miktarlarının gallik asit eşdeğerleri.	42
Şekil 4.3. Kersetin kalibrasyon grafiği.	43
Şekil 4.4. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin toplam flavonoit miktarlarının kersetin eşdeğerleri.	44
Şekil 4.5. Kersetin kalibrasyon grafiği.	45
Şekil 4.6. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin toplam flavonol bileşik miktarlarının kersetin eşdeğerleri.	46
Şekil 4.7. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü etkinliği.	47
Şekil 4.8. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin NO radikal süpürücü etkinliği.	49
Şekil 4.9. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin SO radikal süpürücü etkinliği.	50
Şekil 4.10. Gallik asit kalibrasyon grafiği.	51
Şekil 4.11. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin CUPRAC indirgeyici kapasite tayini.	52
Şekil 4.12. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin CUPRAC indirgeyici kapasite gallik asit eşdeğerleri grafiği.	53
Şekil 4.13. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ve kojik asitin tirozinaz inhibisyonuna etkisi.	54
Şekil 4.14. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri.	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan <i>Onosma</i> taksonlarının lokalite bilgileri...	29
Çizelge 3.2. Toplam fenol içeriğinin belirlenmesinde kullanılan örnek miktarları...	32
Çizelge 3.3. Toplam flavonoit içeriğinin belirlenmesinde kullanılan örnek miktarları.	33
Çizelge 3.4. Griess reaktifi kimyasal kompozisyonu.....	36
Çizelge 3.5. Tirozinaz inhibisyon deneylerinde kullanılan çözeltiler.....	39
Çizelge 4.1. Gallik asite ait derişim ve absorbens değerleri.	41
Çizelge 4.2. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin stok çözelti derişimleri ve toplam fenolik bileşik miktarlarının gallik asit eşdeğerleri.	42
Çizelge 4.3. Kersetine ait derişim ve absorbens değerleri.	43
Çizelge 4.4. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin stok çözelti derişimleri ve toplam flavonoit miktarlarının kersetin eşdeğerleri.	44
Çizelge 4.5. Kersetine ait derişim ve absorbens değerleri.	45
Çizelge 4.6. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin stok çözelti derişimleri ve toplam flavonol miktarlarının kersetin eşdeğerleri	45
Çizelge 4.7. Askorbik asitin DPPH radikal süpürücü etkinliği.	47
Çizelge 4.8. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü etkinlik IC ₅₀ değerleri.	48
Çizelge 4.9. Gallik asitin NO radikal süpürücü etkinliği.....	48
Çizelge 4.10. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin NO radikal süpürücü etkinlik IC ₅₀ değerleri.	49
Çizelge 4.11. Gallik asite ait derişim ve absorbens değerleri.	51
Çizelge 4.12. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin CUPRAC indirgeyici kapasite gallik asit eşdeğerleri.	52
Çizelge 4.13. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin ekstrelerinin tirozinaz inhibisyonu IC ₅₀ değerleri.	54
Çizelge 4.14. Farklı <i>Onosma</i> türlerinin 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksikite değerleri.	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Askorbik asit
CH₃OH	Metanol
CuCl₂	Bakır (II) klorür
CUPRAC	Bis(neokuproin)-bakır (II) klorür
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
GA	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
H₂O	Su
H₂SO₄	Sülfürik asit
IC₅₀	Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu
KE	Kersetin eşdeğeri
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5- Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NH₄Ac	Amonyum asetat
NO	Azot oksit - Nitrik oksit
PBS	Fosfat tamponlu tuz - Phosphate Buffered Saline
RE	Rutin eşdeğeri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SO	Süperoksit
UV	Ultraviyole
3T3	Fare fibroblast hücresi
°C	Santigrad derece
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar

1. GİRİŞ

İnsanlığın başlangıcından günümüze dek uzanan süreçte bitkisel temelli materyaller insanların gıda ve sağlık gibi yaşamsal alanlarda her zaman ihtiyaç duyduğu kaynaklar olmuştur. Özellikle günümüzde tıbbi ve aromatik bitkiler olarak tanımlanan, içeriğinde bir takım fizyolojik sorunlara çözüm olabilecek nitelikte etken maddeler bulunduran bitkiler tarihsel süreçte hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmışlardır. Tıbbi ve aromatik bitkiler aynı zamanda kozmetik bazı sorun veya arayışlara da çözüm sunmuştur. Ciltte meydana gelen pigmentasyon problemleri, yaşlanmaya bağlı oluşan deformasyonlar, vücut görünümünü veya kokusunu değiştirme isteği kozmetik çözüm arayışlarının önde gelenleri olarak tanımlanabilir.

Örneğin hiperpigmentasyon kısaca epidermis ve/veya dermiste oluşan melanin artışına bağlı cildin aşırı renklenmesi durumudur ve bu süreçte gerçekleşen kimyasal tepkimelerin bir etmenle engellenmesi hiperpigmentasyon gibi rahatsızlıkların önlenmesi veya kontrol altına alınmasında çözüm olabilmektedir. Melanin sentezinde önemli bir role sahip olan tirozinaz enziminin aktivitesinin engellenmesi, yani bu enzimin inhibisyonu hiperpigmentasyonun tedavisi için kullanılan bir yaklaşımdır. Benzer şekilde tirozinaz inhibitörleri kullanılarak doğal bir süreç olan melanin sentezini engellemek cilt beyazlatma, leke giderme gibi kozmetik uygulamalarda tercih edilmektedir.

Enzimatik esmerleşme gıda işleme süreçlerinde, özellikle ısı uygulamalarında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Ancak bazı durumlarda gıdaların tüketimine lezzet, koku ve olumlu bir görünüm katan bu değişim bazı durumlarda gıda kaynaklarının bu özelliklerini olumsuz etkilemekte ve bazen sağlık sorunlarına bazen de ticari kayıplara neden olabilmektedir. Bazı polifenolik bileşenlerin oksijen varlığında tirozinaz ile katalizlenmesi enzimatik esmerleşme gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle istenmeyen bu gibi durumların önlenmesi ve düzeltilmesinde tirozinaz inhibitörlerinin kullanımı kritik bir öneme sahiptir.

Hem gıda, hem sağlık hem de kozmetik alanında tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılabilmesi için bir takım kriterleri sağlaması gerekmektedir. Örneğin ilaç etken madde olarak kullanılacak bir bileşenin hücreler üzerindeki toksik etkisi veya cilde uygulanacak bir maddenin irritasyon etkileri mutlaka incelenmelidir. Bu nedenle

öncelikle bitkilerin içeriklerinin ve etkilerinin bilinmesi hayati önem taşımaktadır. Son zamanlarda doğal kaynaklı ürünlerin gıda, sağlık ve kozmetik alanlarda tüketimine artan ilgiyle birlikte yeni alternatiflere de ilgi ve ihtiyaçta artış olmuştur. Bu nedenle bitkilerin enzim inhibitör etkileri, antioksidan etkileri ve hücre canlılığına toksik etkileri yoğun olarak araştırılmaktadır.

Bu çalışmada 3'ü endemik olmak üzere toplam 5 farklı *Onosma* türüne ait bitki materyallerinin metanol ekstraktları hazırlanmış, bu ekstraktlardaki toplam fenolik bileşen, flavonoid ve flavonol içerikleri belirlenmiş, antioksidan aktiviteleri, tirozinaz enzim inhibitör etkinliği ve sitotoksik özellikleri araştırılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Tıbbi Aromatik Bitkilerin Medikal ve Kozmetik Uygulamalarda Kullanımı

Eski çağlardaki arkeolojik keşiflere göre insanlar bitkileri her zaman gıda ya da ilaç olarak kullanarak sürekli bir ilişki içerisindeyler. Bu da gösteriyor ki insanlığın var oluşundan beri bitkiler tedavi amaçlı kullanılmaktadır [1]. Sağlık problemi olduğunda her zaman tedavide öncelikle başvurulanan bitkiler olmuştur ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu oranı dünyada %80 olarak belirtmiştir. Ayrıca Farnsworth ve ark. [2] yaptıkları araştırmada gelişmiş ülkelerdeki ilaçların % 25 oranında bitkisel kökenli olduklarını belirtmişlerdir.

Tıbbi ve aromatik bitki tanım olarak bitkinin çeşitli kısımları kullanılarak elde edilen etken maddenin insan ve hayvanlarda hastalık tedavisinde kullanılan ve ayrıca tüketim alanları bakımından da geniş bir alanı kapsayan bitkilere denir. Tıbbi ve aromatik bitkileri familyalarına, bitki içerisinde bulunan etken maddesine, kullanılan kısımlarına ve farmakolojik etkilerine göre gruplandırabiliriz. Bununla beraber tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgi günden güne artmakta ve araştırılmaya devam etmektedir [3].

Türkiye florası coğrafi konumundan dolayı zengin bir ülkedir. Bütün Avrupa kıtasındaki bitki türlerinin neredeyse tamamına yakını kadarı ülkemizde bulunmaktadır. Ayrıca ülkemiz endemik bitki türü bakımından da oldukça zengindir. Tüm Avrupa’da endemik bitki türü sayısı 2750 iken Türkiye’deki endemik bitki türü sayısı 2891’dir. Aynı zamanda endemik olan 497 alt tür ve 390 varyete de endemik sayısına eklendiği zaman toplam endemik takson sayısı 3778 olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’ne göre tıbbi amaçla kullanılan bitki türü sayısının tahmini olarak 20 000 ile 70 000 civarında olduğu varsayılmaktadır [4].

Türkiye florası göz önüne alındığında çok fazla tıbbi bitkiye sahip olduğumuz görülmektedir. Tıbbi bitkilerin tür sayısı kesin olarak bilinmemekle birlikte 500 civarında olduğu tahmin edilmekle beraber yaklaşık bunların 200 tıbbi ve aromatik bitki türünün ihraç potansiyelinin olduğu belirtilmektedir [5]. Türkiye’nin üç tarafının denizlerle çevrili olması ve bitki örtüsünün zenginliğinden dolayı tıbbi ve aromatik bitkilerin ağırlıklı olduğu ve toplandığı bölgeler Ege, Marmara, Akdeniz, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgeleridir [3].

İnsanlık tarihinin başlangıcından itibaren güzellik insanlar için önemli bir konu oluşmuştur ve insanlar bu amaçla sürekli arayış içerisinde bulunmuşlardır. Bu amaçla bitkiler her zaman sıklıkla kullanılmıştır. Kozmetik insanların gün geçtikçe daha çok önem verdiği bir alan olmuş ve tıp biliminin bir kolu olarak de erlendirmi tir [6].

Kozmetik  r n Kozmetik yönetmeliği Madde 4. (h) bendinde “*İnsan vücudunun dış kısımlarına; epiderma, tırnaklar, kıllar, sa lar, dudaklar ve dış genital organlarına veya di ler ile a ız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek, bunları korumak, iyi bir durumda tutmak veya vücut kokularını düzeltmek olan bütün madde veya karışımları*” olarak tanımlanmıştır [7].

Kozmetik ürünlerde bitkilerin kullanımı ve doğal olana yönelim gün geçtikçe artmaktadır ve bu nedenle bitkisel kaynaklı kozmetik ürünlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Ayrıca bitkiler cilt koruyucu ve ya lanma karşıtı olarak cilt bakımında, kuruluk, egzama, akne tedavisinde, serbest radikal süpürücü etkisinden dolayı da birçok alanda kullanılmakta ve hayatımızda gün geçtikçe yeri artmaktadır [8].

İnsan vücudunun dış tabakası olan deri epidermis, dermis ve hipodermis olan üç tabakadan meydana gelmiştir. Cildin ya lanmasını etkileyen hücre hasarı ile ilişkilendirilen en önemli etken serbest oksijen radikallerdir. Bunlar kararlı olmayıp birçok fizyolojik hasardan sorumludurlar ve aynı zamanda deride meydana gelen birçok hastalıkla da ba ları olduğu bilinmektedir. Vücudumuzda stres, sigara, pestisitler vs. gibi birçok sebepten dolayı üretilen serbest radikaller oluşur ve bunları yok eden maddelerde antioksidanlardır. Antioksidanlar bu sebeplerden ötürü insan hayatında önemli bir yere sahiptir [9].

Hiperpigmentasyon epidermis ve/veya dermiste melanin artışına bağlıdır. Tirozinaz bakır içeren melanojenik bir enzimdir ve canlılarda yaygın olarak bulunur. Dolayısıyla tirozinaz enziminin inhibisyonu ile hiperpigmentasyon ve benzer cilt rahatsızlıklarının önlenmesi mümkün olabilmektedir ve kozmetik sektöründe tirozinaz inhibitörleri özellikle cilt beyazlatıcı (skin whitening / skin bleaching) veya leke açıcı (depigmentan)  r nlerin bileşiminde sıklıkla yer almaktadır. Son yıllarda hiperpigmentasyon tedavisi, cilt beyazlatma ve leke giderici amaçla kullanılmak üzere güvenli ve etkili tirozinaz inhibitörleri arayışı önem kazanmıştır.

Buna rağmen, sadece birkaç tirozinaz inhibitörü ticari olarak kullanılabilir. Bunun sebebi hücreler arası yüksek toksisite ve düşük kararlılıkları nedeniyle sınırlı uygulamalar yapmaya izin vermektedir [10].

İnsanların ilaç ve kozmetik gibi ürünlerde doğal ürünleri tercih etmeye başlaması ve bu ilginin artmasıyla beraber tıbbi ve aromatik bitkilerin önemi artmıştır ve bu nedenle bitkiler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar önem kazanmıştır. Tıbbi ve aromatik bitkiler aynı zamanda geleneksel olarak yaşanmayla ilgili çeşitli hastalıkları tedavi etmek için halk ilaçları olarak kabul edilmektedir. Dikkat çeken antioksidan, antiinflamatuvar, sitotoksik ve enzim inhibisyon aktiviteleri gibi farmakolojik özellikleri nedeniyle *Onosma* cinsi önemli tıbbi ve aromatik bitki türlerine sahiptir [11].

Bugüne kadar yapılan çalışmalara baktığımızda, Türkiye’de doğal yayılış gösteren ve halk arasında çeşitli tıbbi amaçlarla kullanılan *Onosma* türlerinin tirozinaz enzim inhibisyonuna etkisi, antioksidan etkisi ve sitotoksik araştırmalarının sınırlı olduğu dikkat çekmektedir. Buradan hareketle tez çalışması kapsamında *Onosma* cinsinin üçü endemik olmak üzere beş türü ile çalışılmış ve kendi içerisinde karşılaştırmalı olarak tirozinaz inhibisyonu, antioksidan aktivite ve sitotoksik deneyleri ile ilgili araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

2.1.1 *Onosma* L. (Boraginaceae)

Boraginaceae dünyada yaklaşık 150 cins ve 2500 farklı tür ile yayılış gösteren en büyük familyalardan biridir [12]. Boraginaceae familyası subtropikal ve ılıman bölgelerde yayılış gösterirken en yoğun olduğu bölgeler arasında ılıman iklime sahip olan Akdeniz ve İran-Turan bitki coğrafyası bölgesi yer almaktadır. Araştırmalara göre aynı zamanda Güney Amerikanın orta bölgeleri ve Kuzey Amerika’da da yayılış gösterdikleri tespit edilmiştir [13].

Boraginaceae familyasına ait türler genellikle küçük boylu çalı veya bodur ağaç yapısında, batıcı sert tüylere sahip, tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık olabilen otsu bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Ilıman koşullara sahip Akdeniz bölgesi %35’lik bir endemizm oranı ile Boraginaceae familyasının en önemli yayılış gösteren bölgelerindendir [14].

Boraginaceae familyası Türkiye’deki en çok tür içeren familyalar içerisinde dokuzuncu sırada yer almaktadır. Boraginaceae familyası 34 cins ve 325 türe sahip bu ailenin aynı zamanda 16 alt tür ve 16 varyete olmak üzere toplam 357 takson içermektedir [15].

Yunancada “onos” ve “osmê”, Latince “osma” kelimelerinin bir araya gelmesiyle beraber *Onosma* kelimesinin kökenini oluşturmaktadır. Koku, parfüm, mis kokulu, hoş koku saçmak anlamına gelmektedir. İngiltere’de “Golden Drop” olarak bilinen bitkiye ülkemizde şıncar, emzik otu, yalancı havaciva ve altın damla gibi isimler verilmiştir [12, 16].

Onosma cinsinin Türkiye’de yetişen türlerinin büyük bölümünün tanımlanması Avustralyalı Botanikçi Riedl tarafından yapılmıştır. *Onosma* cinsi *Protonosma*, *Podonosma* ve *Onosma* olmak üzere 3 seksiyona ayrılmıştır. *Onosma* seksiyonu da kendi içerisinde *Hoplatricha* ve *Asterotricha* olmak üzere iki alt seksiyona ayrılmaktadır [17].

Boraginaceae familyasının çiçekli en büyük cinsi olan *Onosma* küresel olarak yayılış gösteren kuru ve güneşli havayı seven tıbbi bitkilerdir ve bütün dünyada toplam 180 türe sahiptir [18]. Türkiye’de güncel olarak *Onosma* 102 tür, 4 varyete ve 1 melez tür ile bunlardan 59 türü de endemik olmakla beraber *Onosma* cinsine ait 104 adet alt tür bulunmaktadır. Bu türlerle beraber %57 ile Türkiye yüksek bir endemizm oranına sahiptir [18, 19]. Tanımlanan bu türlerin tıbbi bitki olarak bilindiği ve halk arasında da halk hekimliğinde yanık ve yara iyileştirme gibi geleneksel uygulamaları bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca tıbbi uygulamalar yanında boya olarak da kullanıldığı ve bazı türlerinin çiçeklerinin yenilerek tüketildiği bilinmektedir [20].

Onosma sistematik ve taksonomik açıdan çalışılması zor ve karmaşık bir cinstir, fakat cins üzerinde devam eden sistematik çalışmalar sonucunda tür sayısı giderek artış göstermektedir [21].

Onosma türlerinin sistematik olarak sınıflandırılması

› **Alem:** Plantae

› › **Şube:** Magnoliophyta

› › › **Sınıf:** Magnoliopsida

› › › › **Alt Sınıf:** Asteridae

› › › › › **Takım:** Lamiales

› › › › › › **Familiya:** Boraginaceae

› › › › › › › **Cins:** *Onosma*

› › › › › › › › **Tür 1:** *Onosma rascheyana* Boiss.

Tür 2: *Onosma papillosa* Riedl

Tür 3: *Onosma discedens* Hausskn. ex Bornm.

Tür 4: *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea*

Tür 5: *Onosma erzincanica* Binzet & Eren

Tez kapsamında çalışılacak olan bitkilerden *Onosma* cinsine ait olan endemik *O. papillosa*, endemik *O. discedens*, endemik *O. erzincanica*, *O. rascheyana* ve *O. alborosea* ssp. *alborosea* var. *alborosea* taksonları seçilmiştir. Çalışmada kullanılan *Onosma* taksonları üzerinde ilk kez tirozinaz inhibisyon deneyleri yapılmış ve literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca *Onosma* türleri üzerinde antioksidan ve sitotoksitite deneyleri de ilk defa çalışılmıştır.

2.1.1.1 *Onosma rascheyana* Boiss.

Boraginaceae familyasına ait olan *O. rascheyana* Boiss. İsviçreli botanikçi olan Pierre Edmond Boissier tarafından tanımlanmıştır [22]. Binzet ve ark. tarafından yapılan çalışmada bu tür morfolojik açıdan incelenmiş ve gövde tipi belirlenmiştir. *O. rascheyana* türü *Onosma* cinsinin diğer türleri gibi sıcak, kuru ve ılıman iklim koşullarında yayılış göstermektedir. Aynı zamanda morfolojik özellikleri diğer *Onosma* türlerinde olduğu gibi batıcı sert tüylere sahiptir ve küçük boyutlu otsu bitkiler olarak tanımlanmaktadır [23].

2.1.1.2 *Onosma papillosa* Riedl

Türkiye’de endemik bir tür olan *Onosma papillosa* türü Avustralyalı botanikçi Harald Riedl tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Binzet ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda *O. papillosa* anatomik, morfolojik ve ekolojik özellikleri incelenmiş ve incelenen türün küçük boyutlu otsu yapısında batıcı sert tüylere sahip olduğu görülmüştür [20].

2.1.1.3 *Onosma discedens* Hausskn. ex Bornm

Türkiye’de endemik bir tür olan *O. discedens* Alman botanikçiler Heinrich Carl Haussknecht ve Joseph Friedrich Nicolaus Bornmüller tarafından tanımlanmıştır [24]. Son yıllarda doğada meydana gelen değişimler ve aşırı otlatma nedeniyle soyunun tükendiği kayıtlara geçilmiş ancak 2009 yılında Kandemir tarafından yapılan çalışmada tekrar toplanmıştır. *O. discedens* çok yıllık bir bitkidir ve yaprakları gümüşü ince uzun mızrak şeklindedir ve çiçekleri daha çok uç kısımlarda kümelenmiştir. Gövdesi ve yaprak yüzeyleri daha yumuşak olan beyaz tüylerle kaplıdır [25].

2.1.1.4 *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea*

Boraginaceae familyasına ait olan *Onosma alborosea* ssp. *alborosea* var. *alborosea* Rus botanikçi Friedrich Ernst Ludwig Fischer ve Alman asıllı Rus botanikçi Carl Anton von Meyer tarafından tanımlanmıştır [26]. *O. alborosea* ssp. *alborosea* var. *alborosea* taksonunun Türkiye’deki yerel ismi kaya emceğidir [27]. Kayalık alanlarda yayılış göstermekte ve çiçeklerindeki renk dönüşümleri ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir [14].

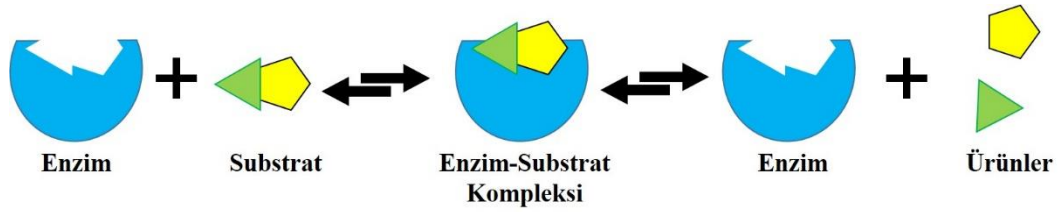
2.1.1.5 *Onosma erzincanica* Binzet & Eren

Bu endemik *Onosma* türü 2018 yılında Erzincan’da Rıza Binzet ve Özkan Eren tarafından bilim dünyasına tanıtılmıştır. Morfolojik özelliklerine bakıldığında dik batıcı setoz tüyler ile kaplı olması karakteristiktir. Kurduğunda yaprakların kağıt gibi incilmesi diğer karakteristik özelliğidir. Türün yayılış alanı genellikle çok hareketli yamaçlardır [18].

2.2 Enzimler ve Özellikleri

Canlılarda hücresel boyutta tüm kimyasal tepkimelerin gerçekleşmesinde rol alan enzimler, hücreler tarafından sentezlenerek üretilen, temelinde protein yapısına sahip biyokatalizörlerdir [28]. Bununla birlikte enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için hücre içerisinde bulunmaları zorunlu değildir. Eğer yeterli koşullar ve ortam sağlanırsa hücre dışında da aktivite gösterebilirler [29]. Enzimlerin katalitik özelliği kimyasal tepkimelerde geçiş formu olarak bulunarak tepkimelerin gerçekleşebilmesi için gerekli aktivasyon enerjisini düşürmesi olarak özetlenebilir.

Ürünleri (Ü) oluşturmak üzere enzimlerin (E) tepkime verdiği bileşiklere substrat (S), substratlarla oluşturdukları ara ürünlere de enzim substrat kompleksi (ES) denilmektedir. Bu süreçte enzimlerin yapısında herhangi bir kimyasal değişiklik gerçekleşmez. Enzim substrat kompleksi oluşuktan sonra ya ürün oluşacak ya da ürün oluşmadan enzim ve substrat ayrılacaktır. Ayrıca şekilde gösterilen ürünlerin tekrar enzim ile tepkimeye girerek birleştiği durumlar da mevcuttur. Enzimatik tepkimeler sadece substratın birden fazla ürün oluşturduğu değil aynı zamanda birden fazla substratın katılarak bir veya birden fazla ürünün oluştuğu bir tepkime türü olarak da düşünülmelidir. Temsili enzimatik tepkime mekanizması Şekil 2.1’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Enzimatik tepkimelerin şematik gösterimi.

Enzimatik tepkimeler için enzim kinetiğini genel olarak açıklayan Michaelis - Menten eşitliği üzerinden (2.1) gösterilmiştir. Burada k_1 enzim substrat kompleksi oluşum hız sabitini, k_2 enzim substrat kompleksi ayrışma hız sabitini ve k_3 ise ürünlerin oluşum basamağındaki hız sabitini ifade etmektedir.



Enzimatik tepkimelerde enzim substrat ilişkisi oldukça özgüldür ve bu yüzden enzimatik reaksiyonlar genellikle tek bir substrata veya tepkime türüne karşı seçici olarak gerçekleşmektedir [28]. Enzimlerin özgülüğünü (spesifite) sahip oldukları 3-boyutlu geometrik yapıları, protein yapıları ve aktif bölgelerindeki grupların kimyasal özellikleri belirlemektedir. Biyolojik sistemlerde genellikle enzimlerin bir tepkimede katalizör olarak fonksiyon göstermeleri için aktivatör olarak adlandırılan bileşenlere gerek duyulmaktadır, ancak bazen de enzimler sadece protein yapısında bulunur ve herhangi bir aktivatöre ihtiyaç duymadan işlev gösterebilirler. Enzimleri oluşturan protein yapı apoenzim, aktivatörler de koenzim veya kofaktör, bu iki bileşimin birlikte bulunduğu kompleks ise haloenzim olarak adlandırılmaktadır [30]. Apoenzim ve koenzim arasında zayıf etkileşimler bulunmaktadır. Genellikle ortamda serbest olarak bulunan bu moleküller tepkime esnasında enzim ile etkileşim göstererek enzimin işlevini yapmasını sağlarlar. Enzimlerle kuvvetli bağ yaparak sıkıca bağlanan bileşiklere ise enzimin prostetik grubu denilmektedir. Bu şekilde kolay ayrılmayan bir konjuge protein yapısı oluşmakta ve enzim aktivite göstermektedir. Bazı enzimler organik bileşenlerle kompleks oluştururken bazıları ise aktivite göstermek için metal iyonlarına gereksinim duymaktadır ve metallerle kompleks oluşturmaktadır. Örneğin, tirozinaz bakır varlığında aktivite gösteren bir enzimdir [31].

Organik bileşiklerin kimyasal tepkimeleri laboratuvar ortamında gerçekleştirilirken standart koşullarda tepkime hızı genellikle düşük olmaktadır. Bu durumda sıcaklık, basınç ve pH koşullandırmaları veya katalizör varlığı ile tepkimeler hızlandırılarak tepkimeler gerçekleşmektedir [30]. Ancak canlıların fizyolojik koşulları genellikle (düşük sıcaklık, atmosfer basıncı ve nötral pH) çok değişkenlik göstermemektedir. Bu noktada enzimlerin biyolojik katalizör olarak varlığı ve bu hücrel koşullarda yüksek aktivite göstermeleri önem kazanmaktadır. Katalizlenmemiş tepkime hızları ile kıyaslandığında enzimatik reaksiyonların hızları 10^6 ila 10^{18} kat daha yüksektir [32, 33]. Enzimatik tepkime kinetikleri sıcaklık, pH gibi faktörlerin yanı sıra enzim, substrat ve ürünlerin derişimi ile ortamdaki diğer fiziksel koşullardan etkilenebilmektedir [30]. Bu koşullar sağlandığında enzimler canlı dışı ortamlarda da aktivite gösterebilmektedirler.

Tüm bu özelliklerinden dolayı enzimler farklı birçok alanda kullanılabilmektedir. Enzimlerden tıp, gıda endüstrisi, kozmetik ve tarım sanayisi gibi birçok alanda faydalanılmaktadır [34].

2.2.1 Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasında Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology) enzim komisyonunun belirlemiş olduğu standartlar kabul görmektedir. Enzimler EC (enzim komisyonu) numarası ile tanımlanmaktadır. Enzimler katalizledikleri reaksiyonun türüne göre son olarak translokazların 2018 yılında eklenmesiyle 7 ana grupta sınıflandırılmışlardır [35]. Enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için birincil kaynak olarak IUBMB tarafından oluşturulmuş ExplorENZ enzim veritabanı yaygın olarak kullanılmakta ve bilimsel olarak kabul görmektedir [36, 37].

IUBMB'ye göre enzimlerin sınıfları [36]:

- 1- Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-indirgenme (oksidasyon-redüksiyon) tepkimelerini katalizleyen enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Tepkimede enzimin hidrojen veya elektron vererek (*donor*) yükseltgenen veya elektron alarak (*acceptor*) indirgenen hangi gruplara etki ettiğine göre oksidoredüktazlar alt gruplarda sınıflandırılmaktadır. Örneğin tirozinaz, oksidoredüktazların moleküler oksijenle indirgenmesi veya birleşmesi ile çiftlenmiş donörler üzerine etki yapan enzimler alt grubunun bir oksijen atomunun diğer donörle birleştiği ve donör olarak diğer olarak tanımlanmış bileşikler alt-alt grubunun bir üyesidir ve EC:1.14.18.1 ile tanımlanmaktadır.
- 2- Transferazlar: Bir bileşikten (*donor*) diğerine (*acceptor*) metil, glukozil, karbonil v.d. gibi fonksiyonel grupların transferini katalizleyen enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Transferazlar genellikle transfer edilen gruba göre isimlendirilerek alt gruplarda sınıflandırılmaktadır. Örneğin fosfat açıltransferaz, transferazların açıltransferazlar alt grubunun aminoaçıl grubu dışındaki grupların transfer edildiği alt-alt grubunun bir üyesidir ve EC:2.3.1.8 ile tanımlanmaktadır.

- 3- Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini katalizleyen enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Enzimin etki ettiği bağa (ester, eter, peptit, karbon-karbon gibi) göre alt gruplarda sınıflandırılmaktadır. Örneğin α -amilaz, hidrolazların, glikozilazlar alt grubunun glikozidazlar alt-alt grubunun bir üyesidir ve EC:3.2.1.1 ile tanımlanmaktadır.
- 4- Liyazlar: Bir moleküldeki C-C, C-O, C-N ve diğer bağların hidroliz veya oksidasyon dışında kalan yollarla ayrıldığı reaksiyonları katalizleyen enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Genellikle etki edilen substrat ve grubun ismine göre alt gruplarda sınıflandırılmaktadır. Örneğin pektin liyaz, liyazlar grubunun karbon-oksijen liyazlar alt grubunun polisakkaritlere etki eden enzimler alt-alt grubunun bir üyesidir ve EC:4.2.2.10 ile tanımlanmaktadır.
- 5- İzomerazlar: Tek bir molekül içerisindeki değişiklikleri katalizleyen enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Örneğin β -karoten izomeraz, izomerazlar grubunun *cis-trans*-izomerazlar alt grubunun tek alt-alt grubu olan *cis-trans*-izomerazların bir üyesidir ve EC:5.2.1.14 ile tanımlanmaktadır.
- 6- Ligazlar: İki molekülün veya bir moleküle ait iki grubun ATP ya da benzer yapıdaki bir trifosfata ait difosfat bağının hidrolizi eşliğinde birleşmesini katalizleyen enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Örneğin asetat-KoA ligaz, ligazlar grubunun karbon-kükürt bağı oluşumunu katalizleyenler alt grubunun asit-tiyol ligazlar alt-alt grubunun bir üyesidir ve EC: 6.2.1.1 ile tanımlanmaktadır.
- 7- Translokazlar: Enzimlerin en yeni grubu olarak tanımlanan bu grupta iyon veya moleküllerin membranlardan geçişini veya membranlarda ayrılmasını katalizleyen enzimler yer almaktadır. Örneğin askorbat ferredüktaz (transmembran), translokazlar grubunun inorganik katyonların translokasyonunu katalizleyenler alt grubunun oksidoredüktaz reaksiyonları ile ilişkili olanlar alt-alt grubunun bir üyesidir ve EC: 7.2.1.3 ile tanımlanmaktadır.

2.2.2 Enzim inhibisyonu

Enzimlerin aktivitelerinin baskılanması veya tamamen durması durumuna enzim inhibisyonu denilmektedir. Enzim inhibisyonunda substrat gibi davranarak enzim ile etkileşebilen ancak tepkime vermeyerek ürüne dönüşmeyen ve sonuçta enzimin substrat ile ilişkisini engelleyen enzim inhibitörü olarak adlandırılan bileşikler rol oynamaktadır. Genellikle iyonlar gibi düşük molekül ağırlığına sahip maddeler inhibitör olarak etki göstermektedir [31-33]. Enzimatik aktivitenin baskılanması gerçekleşmesi istenilen tepkimeler için olumsuz etki oluştururken özellikle biyomedikal teknolojilerde hastalıklara neden olabilen enzimatik tepkimeler, gıda teknolojisinde mikrobiyal kaynaklı bozulmalar, renk dönüşümleri, kozmetik teknolojisinde pigmentlerin enzimatik bozunması gibi istenmeyen durumların kontrolü ve önlenmesinde önemli araçlar olarak kullanılabilir. Benzer şekilde farmasötik teknolojilerde ilaç üretiminde, zirai teknolojide pestisit üretiminde, biyoteknolojide biyosensörlerin geliştirilmesinde enzimatik inhibitörler sıklıkla kullanılmaktadır [33].

Enzimatik inhibisyon tersinir (*reversible*) ve tersinmez (*irreversible*) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tersinir inhibisyonunda kovalent olmayan etkileşimler ile inhibitör ve enzim kompleksi oluştuğu için bu durum denge reaksiyonu gibi düşünülebilir [33, 38]. Bu durumda inhibitör enzimden ayrılabilirdiği için substratla tekrar birleşme olasılığı bulunmaktadır. Tersinir inhibisyon kendi içinde yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif) ve yarı yarışmalı (ankompetitif) olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Yarışmalı inhibisyonunda inhibitör substrata çok benzer özellikler göstermektedir ve substrat ile enzimin etkileşimini engelleyerek enzimin işlevini yerine getirememesine neden olmaktadır. Bu tip inhibisyonunda substrat derişiminin arttırılması, enzimin inhibitörden daha yüksek oranda substrat ile etkileşerek aktivite göstermesiyle enzim substrat kompleksi oluşumu yönünde teşvik eder [28, 30]. Yarışmasız inhibisyonunda ise aynı anda hem inhibitör hem de substrat enzim ile etkileşebilmektedir. Bu nedenle inhibitörün etkisi üzerinde substrat derişiminin bir etkisi bulunmamaktadır. Bu tip inhibisyonunda inhibitör enzim ile veya enzim substrat kompleksiyle etkileşebilir ve tepkimeyi engelleyebilir, ancak bununla birlikte inhibitör enzimden ayrıldığında (tersinme) enzim substrat kompleksinin ürüne dönüşümü mümkün olabilmektedir. Bu durumda inhibitörün enzim ile

etkileşmesi sonucu enzimin katalitik aktivitesi azalmakta ve tepkime sonucu ürün oluşumu yavaşlamaktadır [28, 38]. Yarı yarışmalı inhibisyonda ise inhibitör sadece enzim substrat kompleksine bağlanabilir ve bu durum enzim substrat kompleksinin ürün oluşumu yerine inhibitör kompleksi oluşturması ile sonuçlanmaktadır.

Tersinmez inhibisyonda kovalent bağ nedeniyle veya enzim inhibitör kompleksinin sıkı etkileşimi nedeniyle kompleksin ayrışması oldukça düşük hızda gerçekleşmektedir [28]. Gerek kimyasal gerekse konformasyonel dönüşüm gibi değişiklikler nedeniyle oluşan enzim inhibitör kompleksinden tersinmez inhibitörü ayırmak oldukça zordur [33].

2.3 Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz L-tirozin, L-dopa:oksijen oksidoredüktaz sistematik isimlendirmesi ve EC: 1.14.18.1 numarası ile tanımlanmış kofaktör olarak bakır katyonu içeren bir enzimdir. Tirozinaz ayrıca monofenol monooksijenaz, fenolaz, monofenol oksidaz, tirozin-dopa oksidaz, polifenol oksidaz gibi isimlendirmelerle de adlandırılmaktadır. Tirozinaz, betalain [39] ile melanin [40] biyosentezinde rol alan ve bakteriler, mantarlar, bitkiler, böcekler, kabuklular ve memeliler gibi çeşitli ve geniş canlılarda bulunan önemli bir enzimdir [41].

2.3.1 Tirozinaz enziminin uygulamaları

Melanin bakterilerde, mantarlarda, hayvanlarda ve bitkilerde çok yaygın olarak bulunmaktadır. Melanin L-tirozin molekülünün kompleks çok basamaklı dönüşüm tepkimelerinin son ürünü olan multi-fonksiyonel ve polimorf biyopolimer yapısındadır. Genetik etmenlere bağlı ırksal pigmentasyon temelli yüksek melanin içeriği cildi ultraviyole (UV) ışına kaynaklı cilt hasarlarına karşı optik ve kimyasal bariyer olarak etki göstermesi nedeniyle insanlarda epidermal melaninin oldukça önemli fizyolojik etkilere sahiptir [42]. Bununla birlikte hiperpigmentasyon aşırı melanin sentezinin sonucu ciltte lekelenmeye sebep olabilen bir durumdur. Hipopigmentasyon ise yetersiz melanin sentezi sonucunda psoriazis ve vitiligo gibi durumlara neden olabilmektedir [43]. Tirozinaz enzimi melanin sentezinde etken bir enzim olduğu için her iki durum için de önemli etkiye sahiptir. Tirozinaz enzimi

tarafından tirozinin dopakroma oksidasyonu melanin biyogenezinde oldukça önemli ve kritik bir basamaktır [40].

Taze sebze ve meyvelerin hasat edilmeden önceki renklerini kaybederek kararması tüketici tarafından olumsuz algılanmakta ve bu sebeple ürünlerin ticari değerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu duruma sebze, meyve ve mantar gibi ürünlerin içerisinde bulunan polifenolik substratların oksijen varlığında tirozinaz ile katalizlenmesi sonucu hiperpigmentasyonu yani enzimatik esmerleşmesi neden olmaktadır [44]. Bu nedenle gıdaların enzimatik esmerleşme reaksiyonlarını engellemek amacıyla tirozinaz inhibitörleri önem kazanmış ve gıda üretim ve tüketimine uygun doğal ve sentetik tirozinaz inhibitör kaynakları yoğun olarak araştırılmıştır [43, 45].

2.3.2 Tirozinaz enzim inhibisyonu

Tirozinaz enziminin inhibisyonu birçok farklı yaklaşımla gerçekleştirilebilse de yaygın kabul gören yöntem olarak potansiyel inhibitörlerin etkinliği substrat olarak tirozin veya dopa varlığında dopakrom oluşumunun takip edilmesi ile belirlenmektedir [43, 45]. Bu kapsamda askorbik asit gibi dopakinonu indirgeyen ajanlar, tiyo- grubu içeren bileşikler gibi dopakinon süpürücü ajanlar, substrat olarak tirozinaz enzimine afinite gösteren bazı fenolik bileşenler, spesifik olmayan şekilde enzimin denaturasyonuna neden olan asit ve bazlar, enzime tersinmez olarak bağlanarak enzimin aktivitesini kalıcı olarak engelleyen inaktivatörler ve enzime tersinir olarak bağlanarak katalitik aktivitesini düşüren bileşikler tirozinaz inhibitörü olarak davranabilmektedir. İnaktivatörler ve tersinir inhibitörler doğrudan enzim spesifik davrandıkları için “gerçek inhibitör” olarak tanımlanmışlardır ve bu bileşenlerin inhibisyon güçleri diğer gruplara göre daha yüksektir [43].

İnhibisyon gücü genellikle enzim aktivitesini % 50 oranında baskılamak için gerekli inhibitör derişimi olan IC_{50} değeri üzerinden değerlendirilmektedir. Ancak IC_{50} değeri enzim ve substrat derişimi ile kompozisyonu, inkübasyon süresi gibi deneysel koşullar nedeniyle farklılık gösterebilmekte ve bu durum literatürde gerçekleştirilen çalışmaların karşılaştırılması açısından sorun oluşturabilmektedir [43]. Bu nedenle çalışmalarda kojik asit, tropolon gibi pozitif kontrol örnekleri standart olarak aynı

deney düzeneğinde değerlendirilerek relatif inhibitör aktivite hesaplanarak karşılaştırma yapılmaktadır.

Tirozinaz inhibitörlerini kaynağına göre doğal, sentetik ve yarı sentetik olarak üçe ayırabiliriz. Genellikle bitkiler ve mantarlar içerdikleri fenolik bileşenler, steroidler, ve alkaloidlerle ve ayrıca bakteriler de içerdikleri bazı alkaloidler, makrolitler ve polifenollerle doğal tirozinaz inhibitörlerine temel kaynaklardır. Ayrıca polifenoller, flavonoidler, izoflavonlar, kurkuminoidler, kalkonlar, fenolik asitler ve terpenoid türevleri gibi bazı doğal kaynaklı bileşenler sentetik kaynaklı olarak da üretilmektedirler [46].

2.3.3 Tirozinaz enzim inhibisyonunu uygulamaları

Tirozinazın sebze, meyve ve mantarların enzimatik esmerleşmesindeki ve insan derisinde gerçekleşen hiperpigmentasyondaki kilit rolü nedeniyle tirozinaz inhibisyonuna yönelik araştırmacıların gıda, kozmetik ve medikal alanlarda potansiyel inhibitör etken madde tanımlama, sentez, izolasyon gibi yaklaşımlarla yoğun ilgisi oluşmuştur. Özellikle sıkı regülasyonlar nedeniyle cilt beyazlaştırıcı ajanlar gibi dermokozmetik ve klinik uygulamalarda kullanılabilecek etkinlik ve güvenlik tirozinaz inhibitörlerinin sayısı oldukça düşüktür. Bununla birlikte hem endüstriyel hem de klinik alanda ihtiyaç artmaktadır [46].

Kojik asit yaygın kullanım alanı bulunan ve tanınan bir tirozinaz inhibitörüdür. Alternatif tirozinaz inhibitör araştırmalarında kojik asit sıklıkla referans standart olarak kullanılmaktadır. Chen ve ark. çalışmalarında kojik asitin tirozinaz inhibisyon mekanizmasını farklı inhibitör kaynağı, inkübasyon sıcaklığı, derişim, enzim ile etkileşim mekanizması gibi parametreler üzerinden araştırmışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar kojik asidin enzimatik tepkime için gerekli olan oksijen alımını etkilemesiyle, kinon bileşiklerini difenollere indirgeyerek melanin oluşumunu önlemesiyle veya bu iki mekanizmanın birlikte gerçekleşmesiyle tirozinazı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu bulgular tirozinaz enziminin karışık tip inhibisyon mekanizmasını doğrulamaktadır [47].

Ayrıca hem mekanizma hem de IC₅₀ değerlerindeki farklılıklar nedeniyle kojik asit analogları da yoğun olarak alternatif tirozinaz inhibitörleri olarak araştırılmaktadır.

Zolghadri ve ark. tarafından yapılan derlemede kojik asitin L-DOPA üzerindeki tirozinaz IC₅₀ değeri 20,00 ± 1,08 µM olarak belirtilirken kojik asit analogları için bu değer 1,35 ile 17,5 µM aralığında değişmektedir [46].

You-Jung Kim gallik asitin melanogenez inhibisyonu potansiyelini araştırdığı çalışmasında kojik asiti referans olarak mantar tirozinazı üzerindeki inhibisyon aktivitesini incelemiştir. Çalışmadan elde ettiği sonuçlar gallik asitin (IC₅₀= 3,59 µM) kojik asitten (IC₅₀= 59,72 µM) yüksek inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlar gallik asitin antioksidatif ve antimelanogenik etkisinin birlikte sinerjik etkisine dayandırılarak açıklanmaktadır [48].

Rangkadilok ve ark. çalışmalarında longan (ejderha gözü) meyvesinin ektrelerinin serbest radikal süpürücü etki ve tirozinaz inhibisyon aktivitelerini incelemiştir. Kojik asidin pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada (IC₅₀= 8,9 µg/mL) taze ve kurutulmuş çekirdeklerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 2,9 ve 3,2 mg/mL olarak rapor edilmiştir. Bu durum meyve ektrelerinin tirozinaz inhibisyon etkilerinin bulunduğu ancak kojik asite göre düşük olduğu şeklinde belirtilmiştir [49].

Kubo ve ark. safran bitkisinden elde ettikleri flavanollerin tirozinaz inhibisyon aktivitesi ve inhibisyon mekanizmaları üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında mantar tirozinazının L-DOPA üzerindeki katalitik aktivasyonunun inhibisyonunu temel almışlardır. Çalışma sonuçlarına göre kojik asit (ID₅₀= 14 µM) kıyaslandığında kaempferol (ID₅₀= 230 µM) ve kersetin (ID₅₀= 70 µM)'in yakın fakat düşük inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada kojik asitin karışık-tip inhibisyon mekanizmasına karşılık bu iki bileşiğin yarışmalı inhibisyon gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir [50].

Chan ve ark. farklı zencefil türlerinin yaprak ve rizomlarının antioksidan ve tirozinaz inhibisyon özelliklerini incelemiştir. Bu çalışmada 0,5 mg/mL yaprak ektrelerinin yüzde tirozinaz inhibisyonları pozitif kontrol olarak *Hibiscus tiliaceus* (% 43,9) ile karşılaştırılmış ve en yüksek etki *Etlingera elatior*'da (% 55,2) saptanmıştır. Sonuç olarak üç *Etlingera* türünün yüksek tirozinaz aktivitesi ile birlikte antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmiş ve gıda koruyucu ve cilt renk açıcı uygulamaları için potansiyellerini ortaya koymuşlardır [51].

2.4 Antioksidanlar

Aerobik organizmalar oksijenli ortamda hayatta kalabilen, büyüyen organizmalardır ve yaşamak için oksijene ihtiyaç duyarlar. Fakat bu durumda oksijenin serbest üretimi oksidatif stresle ve toksik olması ile bağlantılıdır. Çeşitli serbest radikallerde bu reaksiyonlarda yaygın ürünlerdir. Oksijenin toksik de olabilen bu etkisini yok etmek için serbest radikalleri nötralize edebilen su ve yağda çözünen antioksidanlar üretir [52].

Antioksidanlar metabolik faaliyetler sırasında meydana gelen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engeller ve serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı önlemek için vücudun savunma mekanizmalarını oluşturan maddelerdir. Gıdalardaki antioksidanlar doğal olarak bulunur ve oksidasyonu geciktirerek önlerler. Antioksidanlar hücrelerdeki oksidatif stresi azaltarak insan sağlığı için önemli bir rol oynarlar [53]. Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik yapılarda olabilirler.

Atomlar ya da moleküllerin yapısında elektronlar genellikle çiftler halinde birleşirler ve her bir çift, çekirdeğin etrafındaki tanımlanmamış bir uzay bölgesi içinde hareket eder. Bu boşluk atomik veya moleküler orbital olarak adlandırılır. Serbest radikal ise bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron içeren bağımsız olarak var olabilen bir türdür. Bu elektronların kararlı hale gelebilmek için başka bir molekülden bir elektron alır veya bir elektron verdiği zaman molekül oksitlenir. Eşleşmemiş elektronlarından dolayı bu tip moleküller oldukça reaktiflerdir. Bu yapıdaki moleküller kararlı hale geçmek için elektron almak isterler bu durum tekrarlanarak ilerlemesi halinde moleküllerin yapısı kalıcı olarak değişir ve geri dönülemez hasarlara yol açarlar. Bu durum devam ederken ortamda antioksidanın olması ile antioksidan bir elektronunu serbest radikale bağlar ve reaksiyonu durdurur [54].

İnsan vücudunda sürekli olarak devam eden biyokimyasal ve fiziksel olaylar sonucunda serbest radikaller ve reaktif oksijenler üretilir. Serbest radikaller metabolik amaçlar için sürekli olarak üretilir ve reaktiviteleri sürekli olarak değişir. Ancak bazıları biyolojik moleküllerde özellikle DNA, lipidler ve proteinlerde gibi önemli büyük moleküllerde ciddi hasara neden olabilir. Bunun sonucunda da kanser, yaşlanma, diyabet gibi çeşitli kronik bozukluklara sebep olurlar.

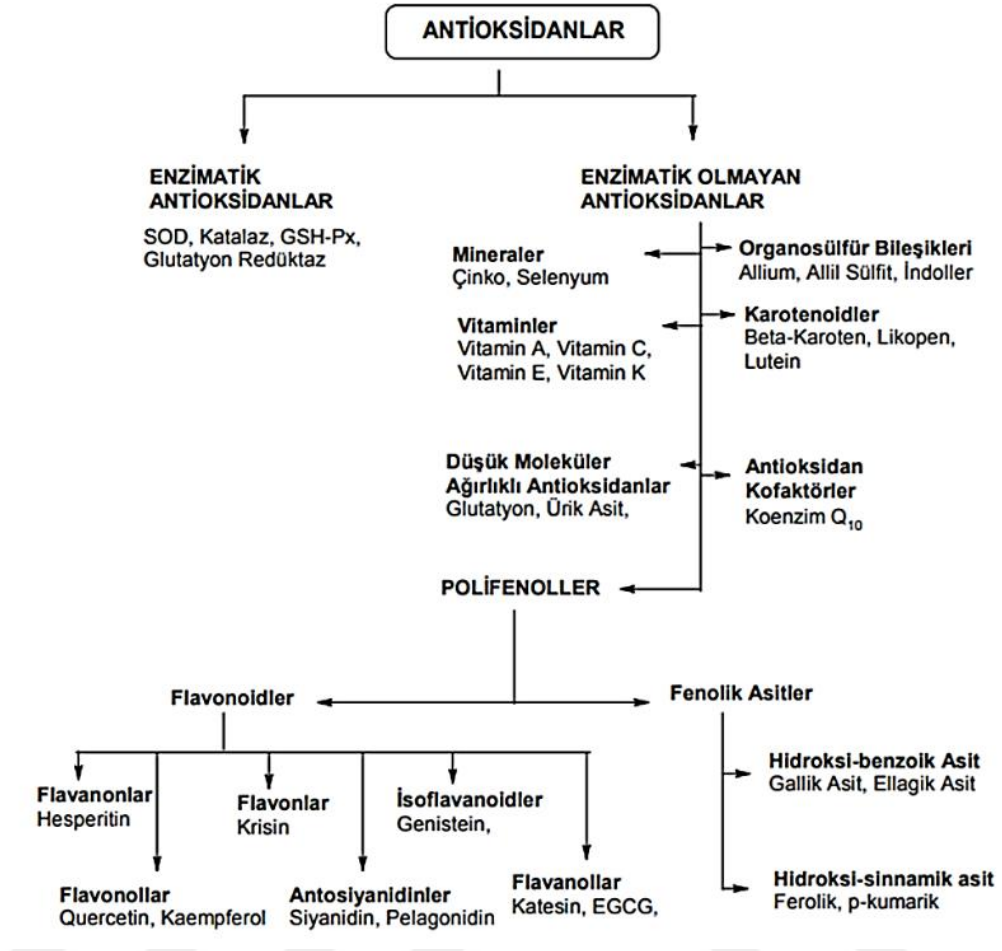
Antioksidan savunma sistemleri oksijen türevli türlerin oluşumunu sürekli temizler ve minimuma indirmeye çalışır fakat yüzde yüz etkili değildir. Sentetik antioksidanlar da günümüzde tıbbi uygulamalarda sürekli olarak kullanılmaktadır yalnız yan etkileri ve hedeflenen organlar dışındaki toksisiteleri nedeniyle güvenli sorgulanmaktadır. Bu nedenle sentetik antioksidanlara göre bitki kaynaklı olan doğal antioksidanların tercih sebebi olması ve besin takviyesi için geniş bir kullanım alanı olması yüksektir [54, 55].

Doğal antioksidanlar oksidatif hasarlara karşı direnci artırır ve insan sağlığı üzerinde önemli etkilerinin olduğuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Doğal antioksidan kaynakları olarak bilinen meyve ve sebzeler, tohumlar, tahıllar, şarap, çay, zeytinyağı ve aromatik bitkiler kapsamlı olarak incelenmektedirler [56].

Son yıllarda doğal antioksidanlara hastalık önleyici ilaç olarak büyük bir ilgi meydana geldi. Serbest radikallerin oksidasyonu diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, çeşitli nörodejeneratif bozukluklar ve yaşlanma süreci gibi birçok hastalığa neden olur. Bunun sonucunda biyolojik olarak zararlı radikalleri söndürmeyi amaçlayan bitkisel ürünler de dahil olmak üzere yeni doğal antioksidanların keşfine büyük bir ilgi mevcuttur. Dünya çapında tamamlayıcı ve alternatif ilaçlarda kullanılan kaynakların araştırılması, bu tür ajanların keşfi için önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir [57].

2.4.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanları mekanizmalarına göre sınıflandıracak olursak iki gruba ayırabiliriz (Şekil 2.2). İlk olarak enzimatik antioksidanlar; örneğin katalaz, glutatyon redüktaz ve SOD gibi enzimatik antioksidanlar radikallerle reaksiyona girerler, yeni bir serbest radikal oluşumunu önlerler, aynı zamanda da daha zararlı olabilecek formlara girmesini engellerler. İkinci olarak enzimatik olmayan antioksidanlar; askorbik asit, E vitamini ve polifenoller gibi yapılar radikal zincir reaksiyonunu kırarak oksijen radikalini yakalarlar ve reaksiyona son verirler [58].



Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması. [59]

Antioksidanların oksidatif tepkimelerde gösterdikleri etkiler farklı şekillerde olabilir. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu önleyen sistemlerde bakır ve demir iyonlarını bağlayan metal şelatörleri, mitokondride doğal olarak kendiliğinden meydana gelirler. Süperoksit ve peroksitler reaktif oksijen türlerine örnek olarak verilebilir. Bir diğer gösterdikleri etki de reaktif oksijen türlerini yakalayıp nötralize eden antioksidanlardır. Bu grupta yer alan bazı antioksidanlar flavonoidler, askorbik asit, indirgenmiş glutasyon, tokoferol, ürik asit v.b gibi olan antioksidanlar zincir tepkimesinin ilerlemesini engileyerek reaksiyonun durdururlar ya da radikal zincir tepkimesinin başlamasını inhibe ederek dururlar [60]. Antioksidanların oksidan moleküllere karşı etkilerine göre sınıflandırılması Şekil 2.3’de verilmiştir [61].

Scavenging	Quencher	Chain Breaking	Repair
Süperoksit gösteren antioksidanlardır. <i>Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) vb.</i>	Giderici etki gösteren antioksidanlardır. <i>vitaminler; A vitamini (beta karoten), C vitamini (askorbat), E vitamini (alfa tokoferol), flavonoidler, mannitol ve antosiyanidinler</i>	Zincir kırıcı etki gösteren antioksidanlardır. <i>bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin</i>	Tamir edici antioksidanlardır. <i>metionin sülfoksid redüktaz</i>

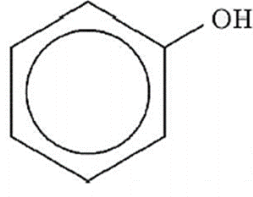
Şekil 2.3. Antioksidanların oksidan moleküllere karşı etkilerine göre sınıflandırılması.

2.5 Fenolik Bileşikler, Flavonoidler ve Flavonoller

2.5.1 Fenolik bileşikler

İnsan ve hayvan diyetlerinin içerisinde bulunan genellikle iki veya daha çok fenol grupları içeren polifenoller bitki içerisinde bulunan çeşitli bir bileşik sınıfıdır. Şimdiye kadar sekiz binden fazla polifenol türevli madde tesbit edilmiştir ve bu maddeler vitaminler ve mineraller gibi çok geniş bir gruba sahiptir. Birçok bitki polifenolleri ya aktif olarak geliştirilmekte ya da bitkisel ilaç olarak satılmaktadır. Fenoller aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır ve güçlü antioksidanlardır. Polifenollerin en büyük ve en çok çalışılan grubu flavonoidlerdir [62].

Fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın görülen gruplardır. Fenol (C_6H_5OH), molekül ağırlığı 94.11 g/mol ve kimyasal yapısı olarak benzen ya da aromatik halkaya bir ya da daha fazla OH- molekülünün bağlandığı, hem üretilen bir kimyasal hem de doğal organik bir hidroksi bileşiğidir (Şekil 2.4). Fenolik maddeler bir ya da birden çok hidroksil grup içeren aromatik halkaya sahiptirler. Fenolik bileşikler en basit olan fenolden türemişlerdir. Farklı türevlerinin oluşmasını sağlayan kısım moleküldeki yer değişiklikleridir [63].



Şekil 2.4. Fenolün kimyasal yapısı.

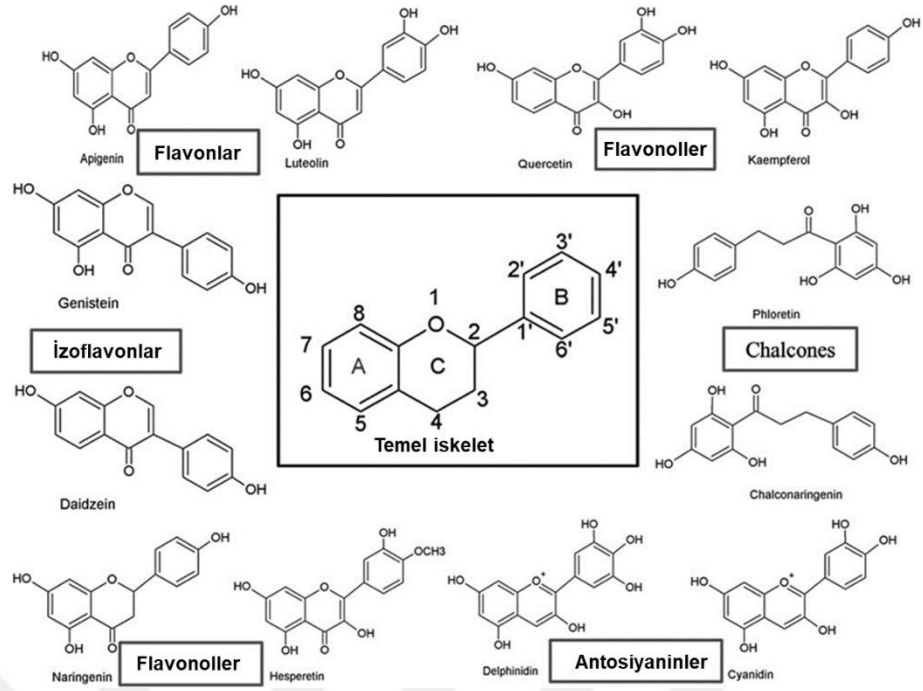
Bitkilerden sentezlenen fenolik bileşenler, enfeksiyon, yaralanma ve UV radyasyon gibi benzer stres koşullarında etkisini göstermektedir [62].

Fenolik maddelerin bitki hücrelerinde suda çözünmeyenleri hücre duvarının bileşeni olurken suda çözünen fenolik maddeler bitki hücresinin içerisinde yer alır bu da gösteriyor ki fenolik bileşikler bitki hücresinde homojen olarak dağılmamaktadır [64].

2.5.2 Flavonoidler

Flavonoidler, 3 karbon köprüsü ile bağlanan 2 aromatik halka ile 15 karbon içeren polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidler, B halkasının bağlı olduğu C halkasının karbonuna ve C halkasının doymamışlık ve oksidasyon derecesine bağlı olarak farklı alt gruplara ayrılabilir.

B halkasının C halkasının 3. konumunda bağlandığı flavonoidlere izoflavonlar denir. B halkasının 4 konumunda bağlı olanlara neoflavonoidler, B halkasının 2 konumunda bağlı olduklarına neoflavonoidler denir. C halkasının yapısal özelliklerine göre birkaç alt gruba ayrılabilir. Flavonoidlerin alt gruplar şunlardır: flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanonoller, flavanoller veya kateşinler, antosiyaninler ve kalkonlar (Şekil 2.5) [65].



Şekil 2.5. Flavonoidlerin temel iskelet yapısı ve sınıflandırılması. [65]

Flavonoidler biyolojik aktiviteleri olan ve en iyi karakterize edilebilen en önemli ve en yaygın polifenol yapılarıdır. Flavonoidler bitkilerde bulunan ve renk vermeyi sağlayan pigmentlere sahiptirler. Bu grupta 5000'den fazla bilinen bileşik içermektedir. Flavonoidler 13 alt gruba ayrılabilirler ve bunlardan en önemli alt sınıfları ise flavonlar, flavonoller, izoflavonoidler ve proantosiyantinlerdir [62].

Flavonoid bileşikler doğada bitkilerin çeşitli yerlerinde bulunurlar ve bitkilerden elde edilirler. Ayrıca meyve, sebze, çay, kakao ve şarap gibi bitki kökenli yiyecek ve içeceklerde bol miktarlarda bulunurlar. Flavonoidler ayrıca sağlık açısından geliştirici etkileri göz önüne alındığında çeşitli farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda da vazgeçilmez bileşenler arasındadır.

2.5.3 Flavonoller

Flavonoller, C halkasının 3 konumunda bir hidroksil grubuna sahip olan ve ayrıca glikosile olabilen flavonoidlerin alt gruplarından biridir [66]. Flavonollerin içerisinde en çok bulunan madde kersetindir. Kersetin bitkilerde birçok farklı glikozidik formda bulunur. Birçok meyve ve sebze de lahana, marul, domates en çok da soğanın içerisinde flavonol olan kersetin bulunmaktadır [67]. Meyve ve sebzelerin yanı sıra,

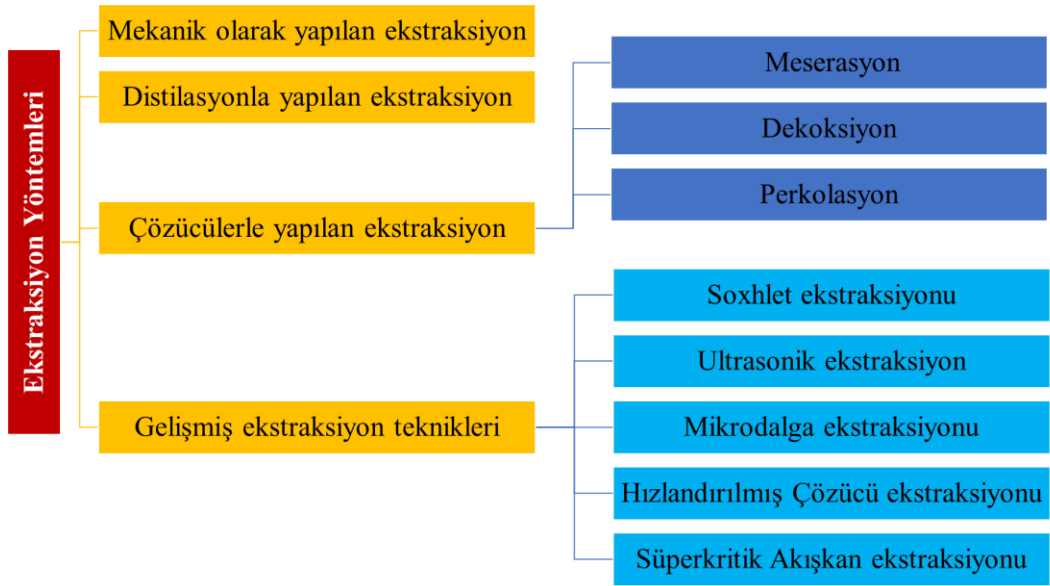
ay ve kırmızı arapta da flavanol kaynağıdır. Flavanol alımının, antioksidan potansiyeli ve düşük vasküler hastalık riski içerdiği ve sağlık için çok faydalı bir ilişki içerisinde olduğu bulunmuştur [65].

2.6 Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon katı veya sıvı fazda bulunan bir veya birden fazla bileşiğin alkol, su veya organik çözücüler yardımı ile saflaştırılması, bileşenlerine ayrılması amacıyla yapılan bir işlemdir. Ekstraksiyonların temeli basit, ucuz ve hızlı olması prensibine dayanmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon işleminin yapıldığı maddelerde kayıp ve bozunma olmaması, daha sonradan tekrar saflaştırma işlemi gerektirmemesi ve minimum atık çözücü içermesi önemli parametrelerdir [68].

Bitkilerde ekstraksiyon yaprak, çiçek, kök veya tohum kısımlarından yararlanılarak yapılır [69]. Genellikle ekstraksiyondan önce bitki numuneleri hava ile kurutma ya da dondurarak kurutma yapılır ve daha sonra öğütme ve homojen haline getirme işlemlerine tabi tutulur [70]. Bitkilerde bulunan lipidler, fitokimyasallar, farmasötikler, aromalar, kokular ve pigmentler gibi birçok biyoaktif bileşenleri analiz edebilmek için ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bitkisel materyallerden biyoaktif bilşenlerin ticarileştirilmesi ile bitki ekstraktlarına ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde sıkça başvurulmaktadır [68].

Şekil 2.6’da ekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması şematik olarak gösterilmiş ve devamında alt başlıklar olarak kısaca özetlenmiştir.



Şekil 2.6. Ekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması.

2.6.1 Mekanik olarak yapılan ekstraksiyon

Mekanik olarak yapılan Mekanik olarak yapılan ekstraksiyon yöntemini iki grupta inceleyebiliriz. İlk olarak canlı bitki çizilir ve çizilen bölgeden dışarı çıkan özüt hemen veya bir müddet sonra kazınarak alınır. İkinci olarak yapılan yöntem ise bitkinin preslenerek basınç yardımı ile ezilmesi ve sıkılması sayesinde elde edilen özüttür [71].

2.6.2 Distilasyonla yapılan ekstraksiyon

Distilasyonla yapılan ekstraksiyonlarda bir veya birden fazla bileşenin farklı kaynama noktasının farklılığından yararlanılarak fiziksel olarak ayırmaya yaramaktadır. Bu yöntemle yapılan farmasötik ekstraksiyonlarda suyun ve diğer uçucu yağların saflaştırılmasından aynı zamanda doğal hammaddelerden bileşenlerin ayrılmasında yararlanılmaktadır. Genelde bu yöntem bitkilerde kolayca buharlaşabilen özelliklerde olan uçucu maddeler için kullanılır [71].

2.6.3 Çözücülerle yapılan ekstraksiyon

Çözücülerle yapılan ekstraksiyonlar genelde katı-sıvı ekstraksiyonları olarak bilinir. Temel prensibi katı fazda bulunan bileşenin çözücü özelliği olan bir sıvının içerisinde

alınarak ayrılması işlemidir. Oluşan bu karışımdan katı faz ve sıvı faz belirli bir süre etkileştikten sonra uygun bir yöntem bulunarak ayrılmasıdır [72].

Çözücülerle yapılan ekstraksiyonları dört başlıkta inceleyebiliriz.

2.6.3.1 Perkolasyon yöntemi ile ekstraksiyon

Perkolasyon yönteminde ekstraksiyon yapılacak olan maddeye göre cam, porselen, emaye ve paslanmaz çelikten yapılmış farklı şekil ve boyutlarda olan perkolatör denilen cihazlarda gerçekleştirilir. Çalışma prensibi drog üzerinden akan çözücü ile yapılan bir ekstraksiyon yöntemidir ve drogtan etkin maddenin tamamının ekstre edilmesine kadar sürdürülür. Drog, devamlı olarak yeni çözücü ile temas içindedir. Bu işlem yapılırken ekstraksiyon yapılacak maddenin kuru ve küçük parçacıklar halinde olması gereklidir. Perkolasyonda malzeme toz şeklindeki bitkiler ile doldurulur, üzerine organik çözücü eklenerek iki fazın birbiriyle teması sağlanır böylelikle çözücünün yer değiştirmesi ve yerini yeni çözücüye vermesi ile özütleme meydana gelir [71].

2.6.3.2 Dekoksiyon yöntemi ile ekstraksiyon

Kullanılacak maddelere soğuk su eklenerek ısıtılmaya başlanarak meserasyon oluşturulur. Sıcak su banyosunda tutulan katı-sıvı çözeltisi yarım saatin sonunda sıcakken sıkılarak ekstre elde edilir [71].

2.6.3.3 Maserasyon yöntemi ile ekstraksiyon

Maserasyon yöntemi ile ekstraksiyonda mesere edilecek olan madde gerekli boyutlara getirildikten sonra üzerine uygun çözücüler kullanılarak kapalı bir şekilde 24 saat ile 10 gün arasında çalkalanarak hazırlanır. Daha sonrasında uygun materyallerde süzülerek ekstreler hazırlanır [73]. Bitki materyallerinde ekstre hazırlamak için kullanılan çözücüler hazırlanan ekstraksiyonlarda kullanım kolaylığı, verimliliği ve geniş uygulanabilirliği nedeniyle en yaygın kullanılan prosedürlerden biridir [70].

Saravanakumar ve ark. yaptıkları çalışmada *Onosma* cinsinin iki endemik türü olan *O. isaurica* ve *O. bracteosa* ile çalışılmıştır. Bitkilerin ekstraksiyonlarında

maserasyon yöntemi kullanılmıştır ve ekstraler hazırlanmıştır. Bu çalışmada *O. isaurica* ve *O. bracteosa* nın fitokimyasal karakterizasyon, antioksidan aktivite ve enzim inhibisyonu test edilmiştir [74].

Katanić Stanković ve ark. *O. sericea* ve *O. stenoloba* türleri ile çalışmışlar ve maserasyon yöntemi kullanılarak ekstraksiyonlarını hazırlamışlardır. Bu çalışmada kullanılan *O. sericea* ve *O. stenoloba* türlerinin fitokimyasal karakterizasyon, antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu, antimikrobiyal aktivite potansiyalleri araştırılmıştır [75].

2.6.4 Soxhlet Ekstraksiyonu

Franz von Soxhlet 1879 yılında yapmış olduğu katı numuneden yağ özütlemesi yapabilmek için bir laboratuvar cihazı yapmıştır ve bu sayede ekstraksiyon yöntemine de ismini vermiştir. Bu yöntemde kullanılan Soxhlet ekstraktörü içerisinde bulunan tüp şeklindeki aparat filtre kağıdından yapılmıştır ve içerisine özütlenmek istenen madde yerleştirilir. Ekstraktörün altındaki kısma şilifli bir cam balon yerleştirilir ve içerisine kullanılmak istenen çözücü konularak şilifli bir ısıtıcıda ısıtmaya başlanır. Düzenegın üst kısmında da buharlaşan çözücüyü tekrar yoğunlaştırmak için geri soğutucu takılır. Isıtılan balon içerisindeki çözücü yoğunlaştıktan sonra tekrar numunenin üzerine dökülür. Maddenin içerisinde bulunan tüp çözücünün yoğunlaşması ile dolar ve bypass kolunun seviyesine ulaştıktan sonra çözücü tekrar balona boşalır. Bu döngü buharlaşma, yoğunlaşma, dolum ve sifon oluşturma olarak tekrar eder ve buna reflux adı verilmektedir. Bu işlemler sırasında bir miktar yağ çözünür fakat çözücü cam balona ulaştığında orada kalır tekrar döngüye katılmaz. Bu durum soxhlet ekstraksiyonunun en önemli avantajıdır [76].

Fakat maserasyon ve soxhlet ekstraksiyonu gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılmasının bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Çünkü kullanılan büyük hacimlerde organik çözücü ve bu yöntemlerde gereken uzun ekstraksiyon süresi nedeniyle düşük verimlilik gösterirken aynı zamanda da potansiyel çevre kirliliği göstermiştir.

Son yıllarda mikrodalga, ultrason destekli ekstraksiyonlar, Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu gibi sıkıştırılmış sıvıların ekstraksiyon ajanı olarak kullanımına dayalı teknikler gibi bir takım yöntemler geliştirilmiştir [70].



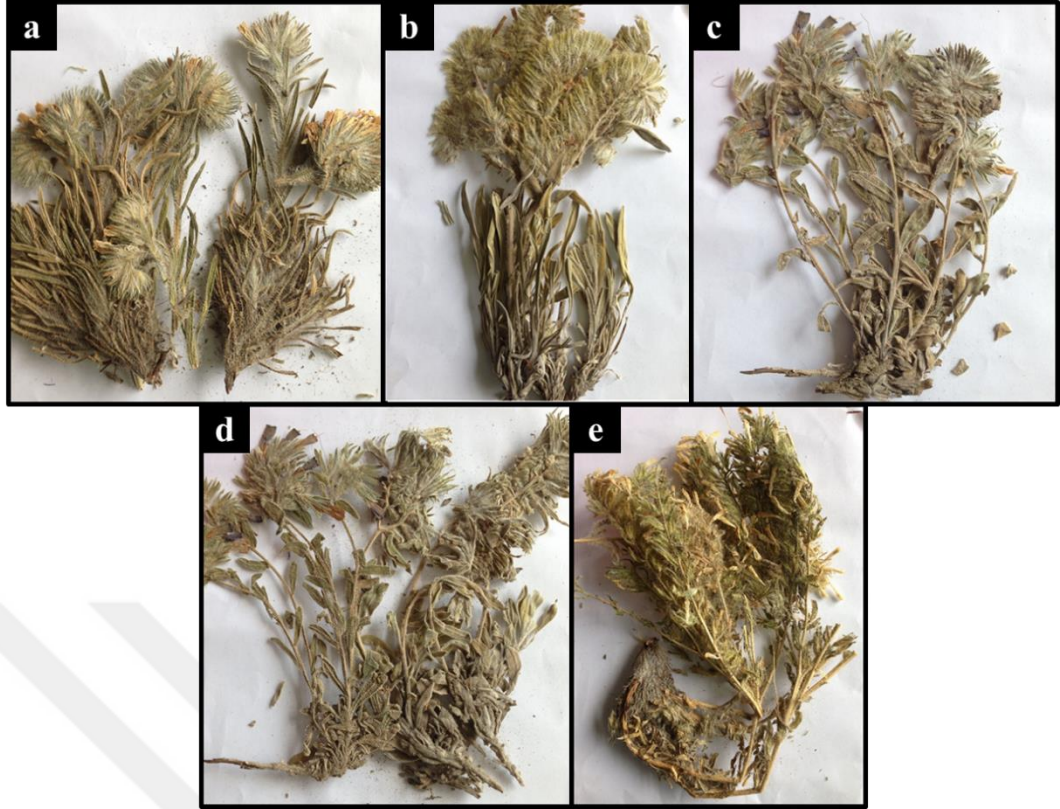
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Bitki Materyalleri

Tez çalışmasını oluşturan endemik *O. papillosa*, endemik *O. discedens*, endemik *O. erzincanica*, *O. rascheyana* ve *O. alborosea* ssp. *alborosea* var. *alborosea* taksonları 2020 yılı vejetasyon döneminde aşağıda çizelgede (Çizelge 3.1) belirtilen lokalitelerden toplanmıştır. Türlerin teşhislerinde sorun yaşamamak için her beş örneğin çiçekli ve meyveli örneklerinin toplanmasına dikkat edilmiştir. Toplanan türlerin teşhisleri ilgili sistematik kaynaklardan faydalanılarak yapılmıştır [18, 77]. Toplanan taksonların lokalitelerinin koordinatları ve denizden yükseklikleri Magellan Triton 200K model GPS yardımıyla belirlenmiştir. Araziden toplanan örnekler köklerinden ayrılmış ve toprak üstü kısımları gölgelik alanda yaklaşık üç hafta boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan örnekler ayrı kutulara alınmış, gerekli etiketlemeler yapılmış ve deneylerde kullanılacağı zamana kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Onosma* taksonlarının genel görünüşleri Şekil 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan *Onosma* taksonlarının lokalite bilgileri.

Taksonlar	Lokalite
<i>O. rascheyana</i>	B7: Adıyaman, Çelikhane-Sürgü 1 km, taşlık kayalık yamaçlar, 1300 m, 12.05.2010, 38° 00' N, 038° 12' E, Binzet 202029
<i>O. papillosa</i>	C5: Niğde, Ulukışla-Aksaray 7-8 km, yol kenarı, yamaçlar, 1400 m, 38° 34' N, 036° 25' E, 09.06.2020, Binzet 202006.
<i>O. discedens</i>	B7: Erzincan: Kemaliye-İliç 15 km, kayalık yamaçlar, step alanlar, 1450 m, 39° 22' N 038° 27'E, 08.06.2020, Binzet 202027.
<i>O. alborosea</i> ssp. <i>alborosea</i> var. <i>alborosea</i>	B7: Erzincan: Kemaliye-Arapgir 26 km, kayalık alanlar, 39° 11' N, 038° 36' E, 24.05.2020, Binzet 202024
<i>O. erzincanica</i>	B7: Erzincan: Kemah-İliç 25 km, hareketli taşlık ve kayalık yamaçlar, 39°36'N, 038°41'E, 1570 m, 23.05.2020, Binzet 202023.



Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan *Onosma* türlerinin genel görünüşleri.

a) *O. papillosa*, b) *O. discedens*, c) *O. rascheyana*,
d) *O. alborosea* ssp. *alborosea* var. *alborosea*, e) *O. erzincanica*

3.2 Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Cihazlar

Çalışmada bitki materyallerinin ekstraksiyonunda hekzan ve metanol kullanılmıştır.

Bitki ekstratlarının içeriklerinin belirlenmesi çalışmalarında gallik asit, Folin - Ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat, etanol, alüminyum klorür, kersetin ve sodyum asetat kullanılmıştır.

Antioksidan etkinliğin belirlenmesi çalışmalarında 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), askorbik asit, metanol, azot monoksit (NO), Griess reaktifi, sodyum nitroprussür dihidrat, dimetil sülfoksit (DMSO), nitroblue tetrazolium (NBT), sodyum hidroksit, gallik asit, bakır (II) klorür, neokuprin ve amonyum asetat kullanılmıştır.

Tirozinaz enzim inhibisyonu etkinliğinin belirlenmesi çalışmalarında metanol, L-DOPA, fosfat tamponu (PBS) ve kojik asit kullanılmıştır.

Ekstrelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi çalışmalarında fare fibroblast hücre hattı (3T3), fetal bovine serum (FBS), penisilin, streptavidin, L-glutamin, DMEM hücre kültür vasatı, fosfat tamponu (PBS), 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılmıştır.

Kullanılan Cihazlar

Etüv	: Nüve FN 120 Kuru Havalı Sterilizatör
Hassas tartı	: KERN AND SOHN ABJ 220-4NM
Mikro pipetler	: Eppendorf research plus 10-1000
Liyofilizatör	: Virtis Freezemobile 5
Manyetik Karıştırıcı	: Daihan MSH-20A Analog
Çalkalamalı Su Banyosu	: Nüve ST 402
Termal Plate Çalkalayıcı	: Biosan PST-60 HL
Döner Evaporatör	: Heidolph Laborota 4000
Ultrasonik Banyo	: Transsonic 570 (Elma)
Mikroplaka Okuyucu ve	
UV Spektrofotometresi	: BIO-TEK, µQuant (MQX 200)

3.3 Bitki Materyallerinin Ekstraksiyonu

Bitkilerin toprak üstü kısımları mekanik olarak parçalanmış ve elde edilen örneklerden 5 g tartılarak kirlilikten arındırılmak üzere 100 mL hekzan içerisine alınmıştır. Örnekler 25-30 °C aralığında 20 dk. süresince ultra sonikatör içerisinde yıkama işlemi uygulanmış ve sonrasında filtre kağıdı ile süzülerek çözücü uzaklaştırılmış ve 30 °C’de etüvde kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemler her bir bitki türünün tüm materyaline uygulanmıştır.

Elde edilen kuru bitki materyali tekrar mekanik olarak öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz materyal bitki/çözücü oranı 1/25 (w/v) olacak şekilde metanol içerisine alınmıştır. Karışım ışık almayan ortamda 24 saat bekletilerek maserasyon yöntemi uygulanmıştır. Sonrasında düşük sıcaklıkta (<40 °C) 75 rpm hızında döner evaporatörde (Heidolph Laborota 4000, Almanya) 12 saat boyunca karıştırılmıştır. Filtre kağıdı ile süzülen örneklerin çözelti kısımları balona alınarak, döner evaporatörde düşük sıcaklık (<40 °C) ve vakum altında kuruluğa kadar çözücü

uzaklaştırılmış ve bitki ekstraları elde edilmiştir. Bitki ekstraları liyofilize edilerek (Virtis Freezemobile 5, ABD) +4°C’de saklanmıştır.

3.4 Bitki Ekstralarının İçeriklerinin Belirlenmesi

Bitki ekstralarının içerisindeki toplam fenolik bileşiklerinin miktarlarının belirlenmesi için Folin-Ciocalteu yöntemi [78], toplam flavonoid [79] ve flavonol [80] miktarlarının belirlenmesi için ise literatürde kullanılan yöntemler uyarlanarak kullanılmış ve ilgili bölümlerde açıklanmıştır.

3.4.1 Toplam fenol içeriğinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan farklı *Onosma* türlerinin içerdiği toplam fenol içeriğinin belirlenebilmesi için bitkilerin Folin-Ciocalteu yöntemiyle fenolik içerik miktar tayini gerçekleştirilmiştir [78]. Kısaca bu yöntemde; bitkilerin kuru ekstraları Çizelge 3.2’de verilen miktarlarda tartılmış ve 1,0 mL su içerisinde çözülmüştür.

Çizelge 3.2. Toplam fenol içeriğinin belirlenmesinde kullanılan örnek miktarları.

<i>Onosma</i> türü	Kütle (mg)
<i>O. rascheyana</i>	4,2
<i>O. papillosa</i>	5,3
<i>O. discedens</i>	3,5
<i>O. alborosea</i>	3,9
<i>O. erzincanica</i>	3,1

Bitki ekstraları ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla kullanılacak pozitif kontrol olarak gallik asit belirlenmiş ve dört farklı derişimde (0, 50, 200 ve 400 µg/mL) çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak, örnek ve gallik asit çözeltilerinden 10 µL kuyucuklara alınmış, üzerine 150 µL Folin - Ciocalteu reaktifi (1:4 reaktif: su) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3 dk. bekletildikten sonra üzerine 50 µl Na₂CO₃ (2:3 Na₂CO₃:su) çözeltisi eklenmiştir. Örnekler 120 dk süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve UV-VIS spektrofotometre (Biotech Instruments, M-Quant Biomolecular spectrophotometer) ile 725 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Fenolik bileşik miktar tayinini pozitif kontrol ile karşılaştırmak üzere önce gallik asit absorbanslarına karşılık gelen toplam fenolik bileşik miktarı, sonrasında bitki

ekstrelerinin gallik asit eşdeğeri (GAE) hesaplanmıştır. Gallik aside ait kalibrasyon grafiği farklı konsantrasyon değerlerinde gallik asitin absorbans değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. Gallik asit eşdeğeri ise kuru bitki ekstresinde bulunan toplam fenolik miktarının mg GAE/g olarak ifade edilmiştir [81].

3.4.2 Toplam flavonoit içeriğinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan farklı *Onosma* türlerinin içerdiği toplam flavonoit içeriğinin belirlenebilmesi için yöntem olarak flavonoit-alüminyum kompleksinin oluşması sağlanarak flavonoit içerik miktar tayini gerçekleştirilmiştir [79]. Kısaca bu yöntemde; bitkilerin kuru ekstreleri Çizelge 3.3’de verilen miktarlarda tartılmış ve 1,0 mL etanol içerisinde çözülmüş ve son derişim 1,0 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek ayarlanmıştır.

Çizelge 3.3. Toplam flavonoit içeriğinin belirlenmesinde kullanılan örnek miktarları.

<i>Onosma</i> türü	Kütle (mg)
<i>O. rascheyana</i>	4,2
<i>O. papillosa</i>	4,1
<i>O. discedens</i>	3,4
<i>O. alborosea</i>	3,5
<i>O. erzincanica</i>	5,0

Bitki ekstreleri ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla kullanılacak pozitif kontrol olarak kersetin belirlenmiş ve dört farklı derişimde (50, 100, 200 ve 400 µg/mL) çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak, örnek ve kersetin çözeltilerinden 150 µL kuyucuklara alınmış, üzerine 150 µL 2% AlCl₃ etanol çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 60 dk. süresince inkübasyona bırakılmış ve flavonoitlerin varlığını gösteren sarı renk oluşumunu görmek için beklenmiştir. Daha sonra UV-VIS spektrofotometre (Biotech Instruments, M-Quant Biomolecular spectrophotometer) ile 420 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Flavonoit bileşik miktar tayinini pozitif kontrol ile karşılaştırmak üzere önce kersetin absorbanslarına karşılık gelen toplam fenolik bileşik miktarı, sonrasında bitki ekstrelerinin kersetin eşdeğeri hesaplanmıştır. Kersetine ait kalibrasyon grafiği farklı konsantrasyon değerlerinde kersetinin absorbans değerleri kullanılarak

oluşturulmuştur. Kersetin eşdeğeri (KE) ise kuru bitki ekstresinde bulunan toplam flavonoit miktarının kersetin eşdeğeri mg KE/g olarak ifade edilmiştir [55].

3.4.3 Toplam flavonol içeriğinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan farklı *Onosma* türlerinin içerdiği toplam flavonol içeriğinin belirlenebilmesi için Kumaran ve ark. tarafından tanımlanan yöntem uyarlanarak flavonol içerik miktar tayini gerçekleştirilmiştir [80]. Kısaca bu yöntemde; toplam flavonoit içeriğinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılan stok çözeltiler kullanılmıştır.

Bitki ekstreleri ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla kullanılacak pozitif kontrol olarak kersetin belirlenmiş ve dört farklı derişimde (50, 100, 200 ve 400 µg/mL) çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak, örnek ve kersetin çözeltilerinden 100 µL kuyucuklara alınmış, üzerine 100 µL %2,0 AlCl₃ etanol solüsyonu ve 150 µL sodyum asetat çözeltisi eklenmiştir.

Oda sıcaklığında 150 dk. süresince inkübasyona bırakılmış ve daha sonra UV-VIS spektrofotometre ile 440 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Flavonol bileşik miktar tayinini pozitif kontrol ile karşılaştırmak üzere önce kersetin absorbanslarına karşılık gelen toplam fenolik bileşik miktarı, sonrasında bitki ekstrelerinin kersetin eşdeğeri hesaplanmıştır. Kersetine ait kalibrasyon grafiği farklı konsantrasyon değerlerinde kersetinin absorbans değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. Kersetin eşdeğeri ise kuru bitki ekstresinde bulunan toplam flavonol miktarının kersetin eşdeğeri mg KE/g olarak ifade edilmiştir [55].

3.5 Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan farklı *Onosma* türlerinin toprak üstü kısımlarından metanol ile hazırlanan ekstrelerin her biri için; DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), NO (nitrik oksit), SO (süperoksit) ve CUPRAC (bis(neokuproin)-bakır (II) klorür) radikallerinin süpürücü etkinliği çalışılarak antioksidan miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

3.5.1 DPPH radikal süpürücü etkinlik

DPPH radikal süpürücü etkinliğinin belirlenmesi antioksidan özelliğine sahip maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için sıkça kullanılan yöntemlerden biridir [82, 83].

Onosma bitkisinin her bir türünden 10 mg tartılmış ve 1 mL metanolde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Her bir örnekten dört (2000, 1000, 500 ve 250 µg/mL) farklı derişimler hazırlanmıştır. Bitki ekstraları ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla pozitif kontrol olarak askorbik asit belirlenmiştir. Deneylerde 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılarak, mikropipet yardımı ile örnek çözeltilerinden (pozitif kontrol için askorbik asit) 200 µL kuyucuklara alınmış, üzerine 50 µL 1mM DPPH eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk. süresince vortex cihazında çalkalanarak inkübasyona bırakılmış ve daha sonra UV-VIS spektrofotometre ile 517 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Onosma türlerinin ekstralarının radikal süpürücü etkinliğini belirlemek için sadece DPPH ve metanol içeren çözeltiyi kör kabul edilerek okunan absorbans değerinden örneklerin absorbans değerleri çıkartılıp daha sonra kör absorbansına bölünüp yüzde inhibisyonu hesaplanmıştır (Denklem 3.1). Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmış ve grafiklerden karşılaştırma yapılmıştır.

$$\% DPPH Radikali Süpürücü Aktivite = \frac{A_{kör} - A_{örnek}}{A_{kör}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5.2 NO radikali süpürücü etkinlik

NO radikali süpürücü etkinlik deneyleri azot monoksit (*ing.* nitric oxide) molekülünün antioksidan etken madde ile tepkimesi (süpürülmesi) sonucu tepkimeye girmeyen miktarının saptanması temeline dayanmaktadır. Azot monoksitin Gries reaktifi (Çizelge 3.4) ile tepkimesi sonucu oluşan kromatik değişimin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile etkinlik değeri ilişkilendirilmektedir [82, 84].

Gerçekleştirilen deneylerde farklı *Onosma* türlerinin antioksidan etkinliği araştırılmış ve referans antioksidan madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Ayrıca, azot monoksit kaynağı olarak sodyum nitroprussit (Na₂[Fe(CN)₅]NO) kullanılarak Griess reaktifi

ile tepkimesi sonucu absorbans ölçümleri ile NO radikali süpürücü etkinlik değeri belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Griess reaktifi kimyasal kompozisyonu.

Griess Reaktifi	
Kimyasal Bileşen	Miktar
Sülfanilamit	1,0 g
Naftiletilendiamin dihidroklorit	0,1 g
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	2,5 mL
Distile su	100 mL

Çalışmalarda, çözücü olarak DMSO kullanılarak her bir *Onosma* türünden dört (3000, 2000, 1000 ve 500 µg/mL) farklı derişimde örnekler hazırlanmıştır. Ayrıca gallik asit çözeltisi olarak (200, 100, 50 ve 25 µg/mL) derişimlerinde örnekler hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak, örnek çözeltilerinden (pozitif kontrol için gallik asit) 60’ar µL kuyucuklara alınmış, üzerine 60 µL sodyum nitroprussit çözeltisi eklenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 150 dk. süresince inkübasyona bırakılmış ve sonrasında 120 µL Griess reaktifi eklenerek tekrar 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra UV-VIS spektrofotometre ile 577 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ NO Radikali Süpürücü Aktivite} = \frac{A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek}}{A_{k\ddot{o}r}} \times 100 \quad (3.2)$$

NO radikali süpürücü etki (%) Denklem (3.2)’de verildiği şekilde hesaplanmıştır. Denklemde $A_{k\ddot{o}r}$; örnek içermeyen sadece DMSO ile hazırlanmış kuyucukların absorbans değerlerini, $A_{\ddot{o}rnek}$ ise örneklerle ait absorbans değerlerini tanımlamaktadır.

3.5.3 SO radikali süpürücü etkinlik

SO radikali süpürücü etkinlik deneyleri alkalın DMSO molekülünün oluşturduğu süperoksit radikallerinin antioksidan etken madde ile tepkimesi (süpürülmesi) sonucu tepkimeye girmeyen miktarının saptanması temeline dayanmaktadır. Süperoksit radikalleri ile NBT (nitroblue tetrazolium) bileşiğinin tepkimesi sonucu oluşan

diformazan bileşiğine bağı kromatik değişimin (mavi renk oluşumu) spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile etkinlik değeri ilişkilendirilmektedir [82, 85].

Gerçekleştirilen deneylerde farklı *Onosma* türlerinin antioksidan etkinliği araştırılmış ve referans antioksidan madde olarak askorbik asit kullanılmıştır.

Çalışmalarda, çözücü olarak DMSO kullanılarak her bir *Onosma* türünden dört (3000, 2000, 1000 ve 500 µg/mL) farklı derişimde örnekler ve askorbik asit çözeltisi olarak (200, 100, 50 ve 25 µg/mL) derişimlerinde örnekler hazırlanmıştır. Ayrıca çözücü olarak DMSO kullanılarak 1mg/mL derişimde NBT çözeltisi ve %10'luk (v/v) alkali DMSO çözeltisi (5mM NaOH:DMSO) hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak, örnek ve askorbik asit çözeltilerinden 30'ar µL kuyucuklara alınmış, üzerine 10 µL NBT çözeltisi eklenmiştir. Örneklere 100 µL alkali DMSO eklenerek UV-VIS spektrofotometre ile 560 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

$$\% SO \text{ Radikali Süpürücü Aktivite} = \frac{A_{k\ddot{or}} - A_{\ddot{or}nek}}{A_{k\ddot{or}}} \times 100 \quad (3.3)$$

SO radikali süpürücü etki (%) Denklem (3.3)'de verildiği şekilde hesaplanmıştır. Denklemde $A_{k\ddot{or}}$; örnek içermeyen sadece DMSO ile hazırlanmış kuyucukların absorbans değerlerini, $A_{\ddot{or}nek}$ ise örneklere ait absorbans değerlerini tanımlamaktadır.

3.5.4 Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC)

Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinden bir diğeri de CUPRAC yöntemidir. Bu yöntemde bitki ekstreleri içerisindeki bakır indirgeyici antioksidan özelliğe sahip bileşikler kromojenik Cu(II)-neocuprione (Nc) reaktifi ile tepkimeye girmekte (sarı renk oluşumu) ve oluşan ürünlerin derişimine bağı kromatik renk değişimi temeline dayanmaktadır. Bu şekilde tepkime sonucu spektrofotometrik ölçümler ile elde edilen absorbans değerleri toplam antioksidan bileşik miktarı ile ilişkilendirilmektedir [86].

Gerçekleştirilen deneylerde farklı *Onosma* türlerinin antioksidan etkinliği araştırılmış ve referans antioksidan madde olarak gallik asit kullanılmıştır.

Çalışmalarda, çözücü olarak DMSO kullanılarak her bir *Onosma* türünden dört (3000, 2000, 1000 ve 500 µg/mL) farklı derişimde örnekler ve gallik asit çözeltisi olarak (400, 200, 100 ve 50 µg/mL) derişimlerinde örnekler hazırlanmıştır. Ayrıca 10 mM bakır (II) klorür (CuCl_2) çözeltisi (su), 7,5 mM neokuprin çözeltisi (etanol) ve 1M amonyum asetat (NH_4Ac) çözeltisi hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak, hazırlanan stok çözeltilerden 50'şer µL (bakır klorür, neokuprin ve amonyum asetat çözeltilerinden) kuyucuklara alınmış, üzerine örnek çözeltilerinden (pozitif kontrol için gallik asit) 25'er µL eklenmiştir. Örneklerle 25 µL su eklenerek ışık görmeyen ortamda 30dk. inkübasyona bırakılmış ve sonrasında UV-VIS spektrofotometre ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

CUPRAC antioksidan kapasiteleri pozitif kontrol ile karşılaştırmak üzere önce gallik asit absorbanslarına karşılık gelen yüzde bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi, sonrasında bitki ekstralarının gallik asit eşdeğeri hesaplanmıştır. Gallik aside ait kalibrasyon grafiğı farklı konsantrasyon değerlerinde gallik asidin absorbans değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. Gallik asit eşdeğeri (GAE) ise kuru bitki ekstresinde bulunan toplam antioksidan miktarının gallik asit eşdeğeri mg GAE/g olarak ifade edilmiştir [55].

3.6 Tirozinaz Enzim İnhibisyonu

Onosma türlerine ait ekstraların tirozinaz inhibitör etkisi, Masuda ve ark. tarafından belirtilen yöntemle substrat olarak L-DOPA kullanılarak belirlenmiştir [87].

Çalışmalarda kullanılan her bir *Onosma* türüne ait örneklerden metanol içerisinde 10 mg/mL stok çözelti hazırlanmış ve sonrasında farklı derişimde (2000, 1000 ve 500 µg/mL) örnekler fosfat tamponu (pH 6.8) ile seyreltilerek elde edilmiştir. Tirozinaz inhibisyonu için pozitif kontrol olarak 200 ve 100 µM (28,422 ve 14,211 µg/mL) kojik asit kullanılmıştır.

Tirozinaz inhibisyonunun belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılarak, Çizelge 3.5’de verilen çözeltilerden belirtilen miktarlarda kuyucuklara alınmış ve oda sıcaklığında karanlıkta çalkalayıcıda 20 dk. bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 40 µL 3 mM L-DOPA eklenmiş ve UV-VIS spektrofotometre ile 475 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Tirozinaz inhibisyon deneylerinde kullanılan çözeltiler.

Kör	
(a)	120 µL fosfat tamponu (pH 6.8) + 40 µL 100 U/mL tirozinaz enzimi
(b)	160 µL fosfat tamponu (pH 6.8)
Numuneler	
(c)	40 µL örnek çözeltisi + 40 µL 100 U/mL tirozinaz enzimi + 80 µL 100 mM fosfat tamponu (pH 6.8)
(d)	Enzim içermeyen 40 µL örnek çözeltisi + 120 µL fosfat tamponu (pH 6.8)

Tirozinaz inhibisyonu Denklem (3.4)’den faydalanılarak hesaplanmıştır. Denklemden A, absorbansı ve alt indisler de sırasıyla kullanılan çözeltileri ifade etmektedir.

$$\% inhibisyon = \frac{[(A_a - A_b) - (A_c - A_d)]}{(A_a - A_b)} \times 100 \quad (3.4)$$

3.7 Sitotoksik Etki Tayini (MTT Yöntemi)

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] tayin yöntemi, Mossman tarafından geliştirilmiş ve etken maddelerin hücreler üzerinde sitotoksikite, proliferasyon veya aktivasyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [88]. Bu yöntem benzer şekilde bitki ekstraktlarının belirli hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır [55]. Tez çalışmalarında kullanılan *Onosma* türlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla bitkilerden elde edilen metanol ekstraktlarına MTT tayin yöntemi uygulanmıştır.

Bu kapsamda sitotoksikite çalışmalarında, 3T3 hücre (fare embriyonik fibroblast) hattı kullanılarak deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre süspansiyonu, %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin + streptavidin ve %1 L-glutamin içeren DMEM hücre kültür vasatında 1×10^5 hücre/mL içerecek şekilde hazırlanmıştır.

96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına her örnek için hazırlanan hücre süspansiyonlarından 100 µL aktararak plakalar inkübatöre (% 95 nem, % 5 CO₂ ve

37 °C koşullandırılmış) alınmıştır. Plakalar 48 saat süresince hücrelerin kuyucuklara yapışmaları ve çoğalmaları için inkübasyona bırakılmışlardır. Sonrasında hücre vasatı *Onosma* türlerine ait farklı derişimlerde (250, 500, 1000 ve 2000 µg/mL) bitki ekstresi içeren 100 µL hücre vasatı ile yenilenerek hücrelerle etkileştirilmek üzere 48 saat süresince tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Takiben, 100 µL hücre vasatı ile yıkanarak aspire edilen kuyucuklara 100 µL hücre vasatı ve 10 µL MTT çözeltisi (5 mg MTT/mL PBS) eklenmiştir. Plakalar canlı hücrelerin MTT ile etkileşimi için 4-6 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreçte MTT canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi ile indirgenmekte ve mor renkli formazan kristali oluşmaktadır. 100 µL % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenerek inkübasyon sonucu oluşan formazan kristalleri çözülmüştür. Son olarak plakalar 20 saat süresince inkübasyona bırakılmış ve oluşan çözeltilerin 577/655 nm'deki absorbansları mikropilaka okuyucuda (BIO-TEK, µQuant (MQX 200)) ölçülmüştür [55, 81].

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Bitki Ekstrelerinin İçerikleri

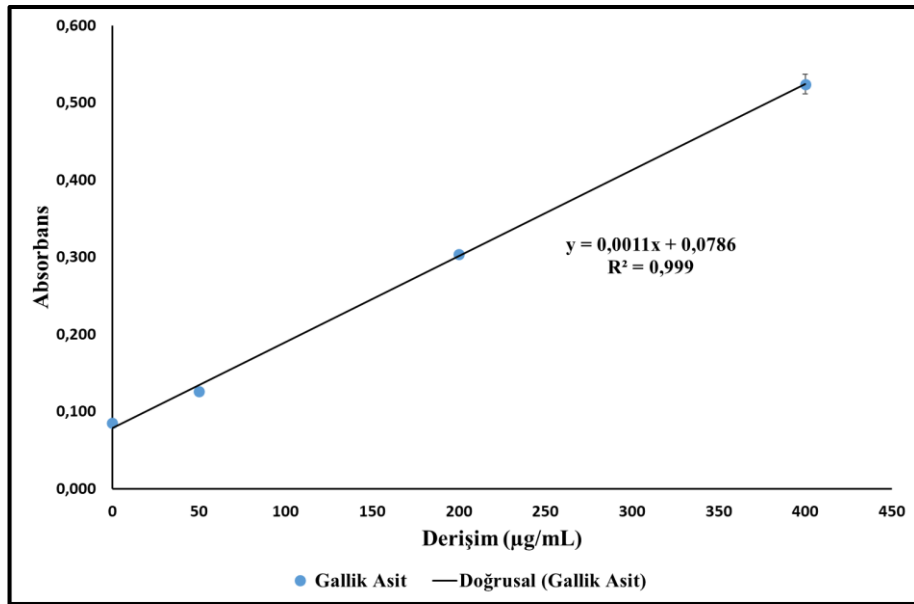
Tez çalışmalarında kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen ekstrelerdeki toplam fenol, flavonoit ve flavanol miktarları Bölüm 3.4’de verilen yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar pozitif kontrol ile değerlendirilerek türler arası karşılaştırmalı olarak grafikleri verilmiş ve eşdeğer miktar olarak ifade edilmiştir.

4.1.1 Toplam fenol içeriği

Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstrelerinin içerdiği toplam fenol miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. Çizelge 4.1’de verilen gallik asit derişimlerine karşılık absorbans değerlerinden kalibrasyon grafiği (Şekil 4.1) çizilmiş ve doğru denklemi elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Gallik asite ait derişim ve absorbans değerleri.

Gallik Asit Derişimi (µg/mL)	Absorbans (AU)	Standart Sapma (± AU)
400	0,524	0,013
200	0,304	0,003
50	0,126	0,001
0	0,085	0,005



Şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon grafiği

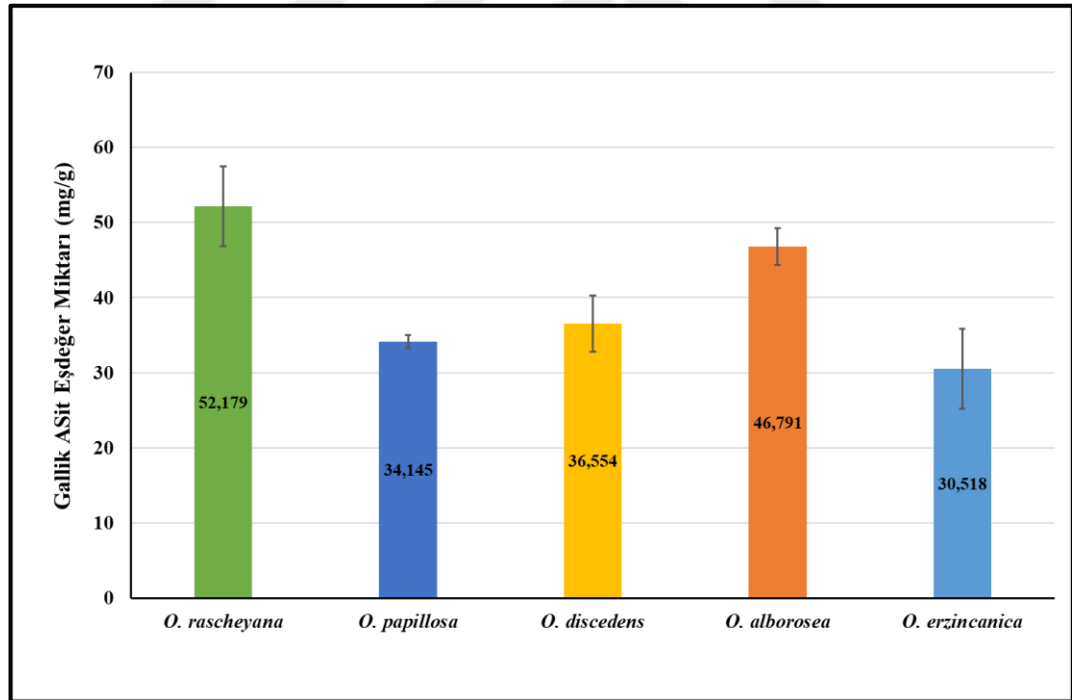
Kuru bitki ekstralarının absorbans değeri doğru denkleminde kullanılarak ekstralar içerisinde gallik asit eşdeğer miktarları (mg GAE/g) hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı *Onosma* türlerinin stok çözelti derişimleri ve toplam fenolik bileşik miktarlarının gallik asit eşdeğerleri.

Bilinmeyen	Örnek derişimi* (mg/mL)	GA Derişim (µg/mL)	Gallik Asit Eşdeğeri (mg GAE/g)	Standart Sapma (± mg GAE/g)
<i>O. rascheyana</i>	4,200	219,152	52,179	5,330
<i>O. papillosa</i>	5,300	180,970	34,145	0,864
<i>O. discedens</i>	3,500	127,939	36,554	3,728
<i>O. alborosea</i>	3,900	182,485	46,791	2,418
<i>O. erzincanica</i>	3,100	94,606	30,518	5,274

* Örnekler hazırlanırken kullanılan stok çözelti derişimini ifade etmektedir.

Onosma türlerinin karşılaştırmalı gösterimi Şekil 4.2’deki grafikte verilmiştir. En yüksek toplam fenolik bileşik miktarı *O. rascheyana* Boiss. türünde 52,179 (± 5,330) mg GAE/g olarak belirlenmiştir.



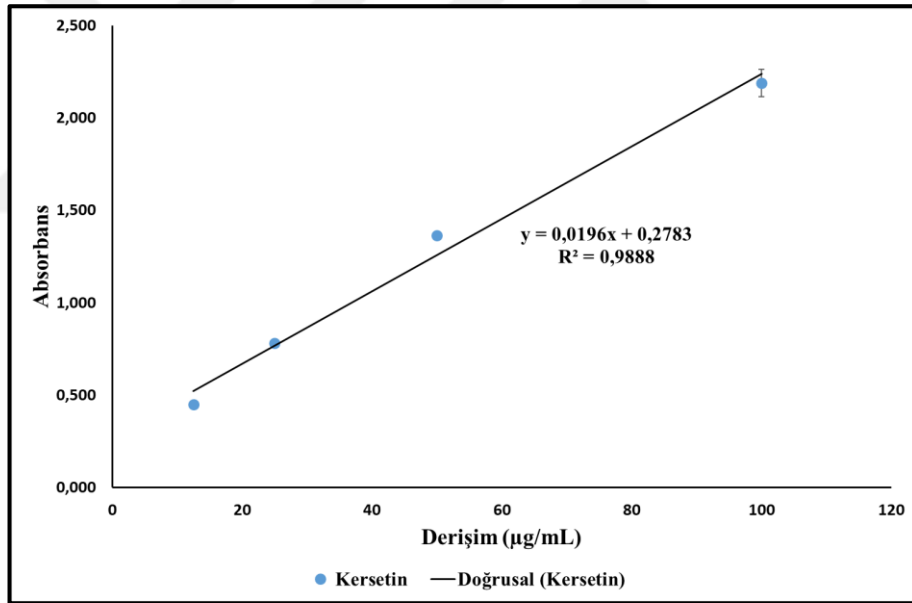
Şekil 4.2. Farklı *Onosma* türlerinin toplam fenolik bileşik miktarlarının gallik asit eşdeğerleri.

4.1.2 Toplam flavonoit içeriği

Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstralarının içerdiği toplam flavonoit miktarları flavonoit-alüminyum kompleks oluşumuna dayanan yöntem ile belirlenmiştir. Çizelge 4.3’de verilen kersetin derişimlerine karşılık absorbands değerlerinden kalibrasyon grafiği (Şekil 4.3) çizilmiş ve doğru denklemi elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. Kersetine ait derişim ve absorbands değerleri.

Kersetin Derişimi (µg/mL)	Absorbans (AU)	Standart Sapma (± AU)
100	2,189	0,073
50	1,365	0,011
25	0,782	0,009
12,5	0,450	0,004



Şekil 4.3. Kersetin kalibrasyon grafiği.

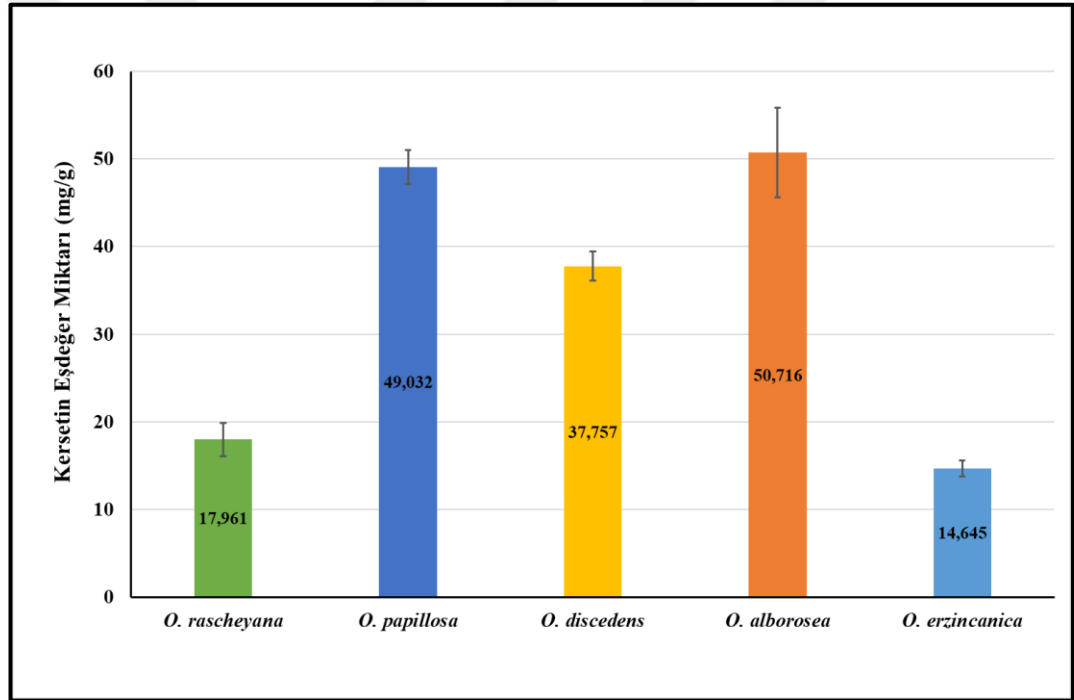
Kuru bitki ekstralarının absorbands değerleri doğru denkleminde kullanılarak ekstralar içerisinde kersetin eşdeğer miktarları (mg KE/g) hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı *Onosma* türlerinin stok çözelti derişimleri ve toplam flavonoit miktarlarının kersetin eşdeğerleri.

Bilinmeyen	Örnek derişimi* (mg/mL)	Kersetin Derişim (µg/mL)	Kersetin Eşdeğeri (mg KE/g)	Standart Sapma (± mg KE/g)
<i>O. rascheyana</i>	1,000	17,961	17,961	1,934
<i>O. papillosa</i>	1,000	49,032	49,032	1,945
<i>O. discedens</i>	1,000	37,757	37,757	1,655
<i>O. alborosea</i>	1,000	50,716	50,716	5,091
<i>O. erzincanica</i>	1,000	14,645	14,645	0,897

* Örnekler hazırlanırken kullanılan stok çözelti derişimini ifade etmektedir.

Onosma türlerinin karşılaştırmalı gösterimi Şekil 4.4'deki grafikte verilmiştir. En yüksek toplam flavonoit bileşik miktarı *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea* türünde 50,716 (± 5,091) mg KE/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Farklı *Onosma* türlerinin toplam flavonoit miktarlarının kersetin eşdeğerleri.

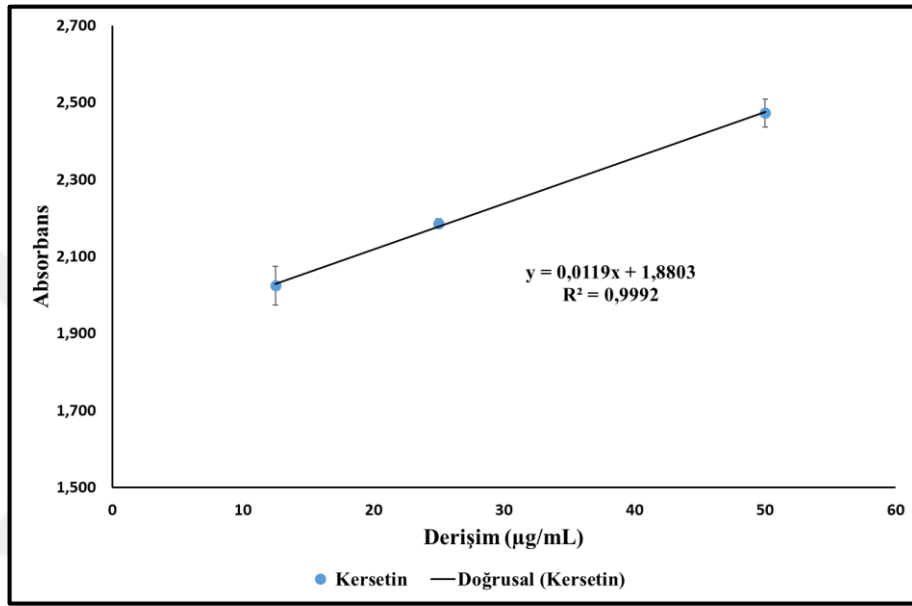
4.1.3 Toplam flavanol içeriği

Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstratlarının içerdiği toplam flavanol miktarları Bölüm 3.4.3'de açıklanan yöntem ile belirlenmiştir. Çizelge 4.5'de verilen kersetin derişimlerine karşılık absorbans değerlerinden kalibrasyon grafiği (Şekil 4.5) çizilmiş ve doğru denklemi elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. Kersetine ait derişim ve absorbens değeri.

Kersetin Derişimi (µg/mL)	Absorbans (AU)	Standart Sapma (± AU)
100	*	*
50	2,472	0,037
25	2,185	0,012
12,5	2,024	0,051

* Absorbans değeri spektrofotometrenin ölçüm sınırlarının üzerinde bulunduğu için hesaplamalardan çıkarılmıştır.



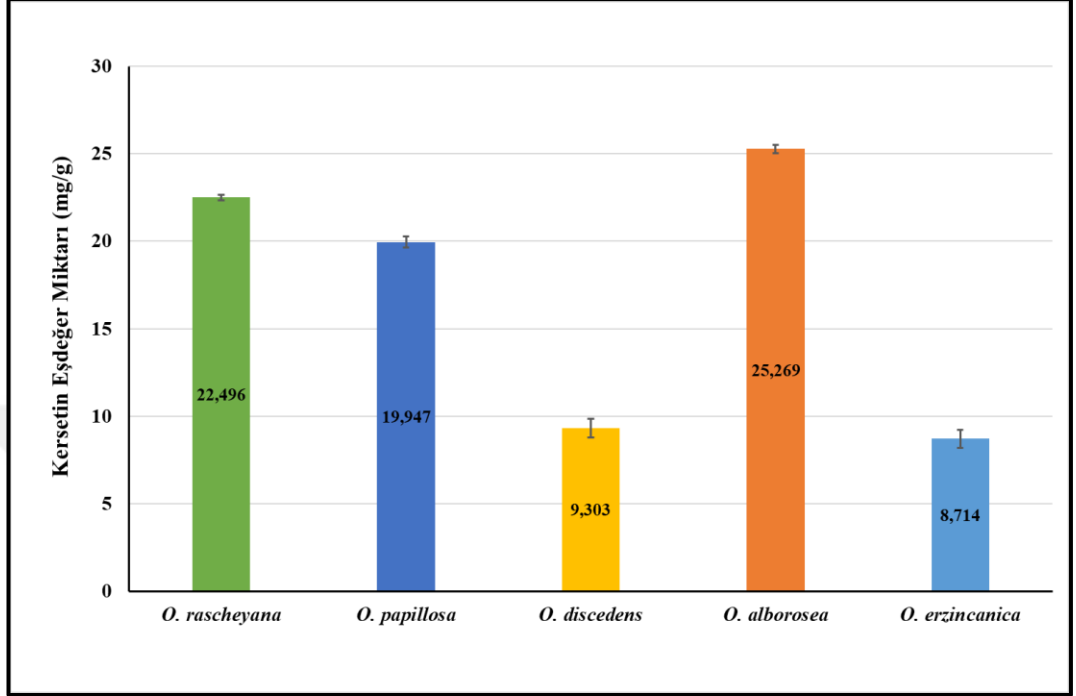
Şekil 4.5. Kersetin kalibrasyon grafiği.

Kuru bitki ekstraktlarının absorbens değeri doğru denkleminde kullanılarak ekstrakt içerisinde kersetin eşdeğer miktarları (mg KE/g) hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı *Onosma* türlerinin stok çözelti derişimleri ve toplam flavonol miktarlarının kersetin eşdeğeri

Bilinmeyen	Örnek derişimi* (mg/mL)	Kersetin Derişim (µg/mL)	Kersetin Eşdeğeri (mg KE/g)	Standart Sapma (± mg KE/g)
<i>O. rascheyana</i>	1,000	22,496	22,496	0,109
<i>O. papillosa</i>	1,000	19,947	19,947	0,710
<i>O. discedens</i>	1,000	9,303	9,303	0,630
<i>O. alborosea</i>	1,000	25,269	25,269	0,241
<i>O. erzincanica</i>	1,000	8,714	8,714	0,048

Onosma türlerinin karşılaştırmalı gösterimi Şekil 4.6'daki grafikte verilmiştir. En yüksek toplam flavanol bileşik miktarı *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea* türünde 25,269 ($\pm 0,241$) mg KE/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Farklı *Onosma* türlerinin toplam flavanol bileşik miktarlarının kersetin eşdeğerleri.

4.2 Antioksidan Özellikleri

Tez çalışmalarında kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen ekstrelerin her biri için; DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), NO (nitrik oksit), SO (süperoksit) ve CUPRAC (bis(neokuproin)-bakır (II) klorür) radikallerinin süpürücü etkinlikleri Bölüm 3.5'de açıklanan yöntemlerle çalışılarak antioksidan miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar DPPH, SO ve NO için yüzde süpürücü etkinlik olarak, CUPRAC için de galik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak verilmiştir.

4.2.1 DPPH radikal süpürücü etkinlik

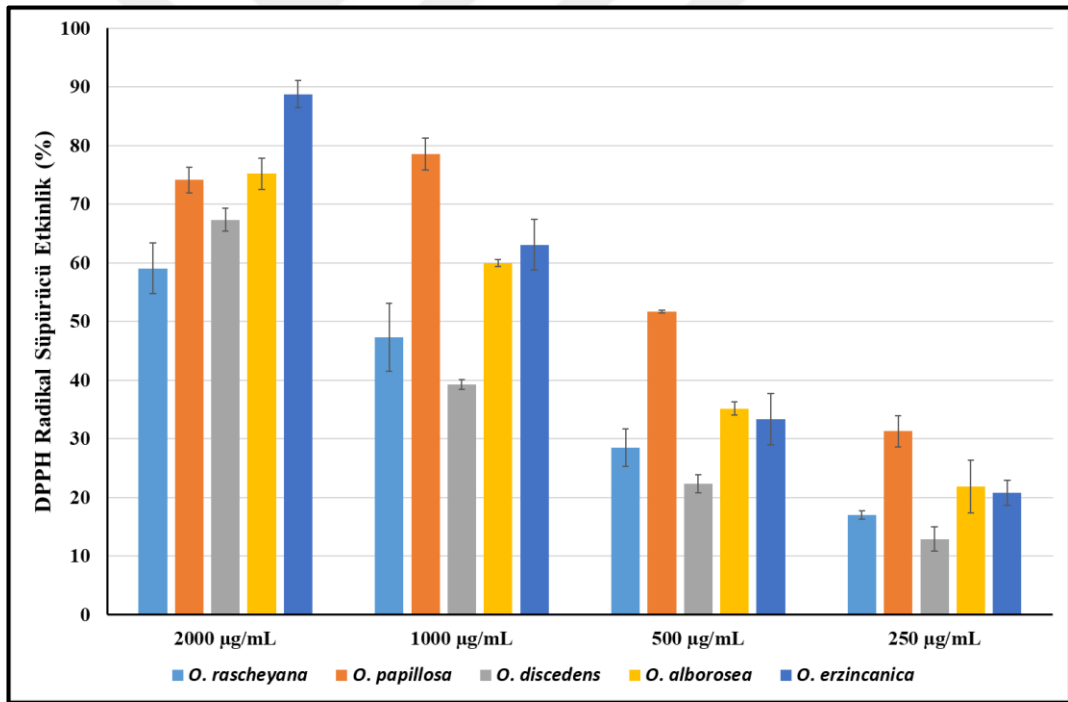
Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstrelerinin antioksidan etkinlikleri Bölüm 3.5.1'de açıklanan DPPH radikal süpürücü etkinliği tayini yöntemi ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asitin farklı derişimlerdeki DPPH radikal süpürücü etkinliği Çizelge 4.7'de verilmiştir. Askorbik asitin DPPH

radikaline karşı en düşük derişimde (500 µg/mL) de yüksek süpürücü etki gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 4.7. Askorbik asitin DPPH radikal süpürücü etkinliği.

	Derişim (µg/mL)			
Pozitif kontrol	200	100	50	25
Askorbik asit	93,236 (±2,174)	93,422 (±1,704)	92,952 (±2,276)	93,215 (±0,449)

Onosma türlerinin ekstrelerinin farklı derişimlerdeki DPPH radikal süpürücü etkinlikleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.7’deki grafikte verilmiştir. Tüm türlerde yüksek DPPH radikal süpürücü etkinlik gözlenmiştir. Elde edilen bulgulardan her bir tür için IC₅₀ değerleri hesaplanarak Çizelge 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı *Onosma* türlerinin ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü etkinliği.

Çizelge 4.8. Farklı *Onosma* türlerinin ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü etkinlik IC_{50} değerleri.

Onosma Türü	DPPH IC_{50} (μ g/mL)
<i>O. rascheyana</i>	1060,768
<i>O. papillosa</i>	521,510
<i>O. discedens</i>	1302,191
<i>O. alborosea</i>	800,101
<i>O. erzincanica</i>	776,208

Hesaplanan IC_{50} değerleri dikkate alındığında en yüksek DPPH radikal süpürücü etkinliği *O. papillosa*, Riedl. türünde 521,510 μ g/mL olarak belirlenmiştir.

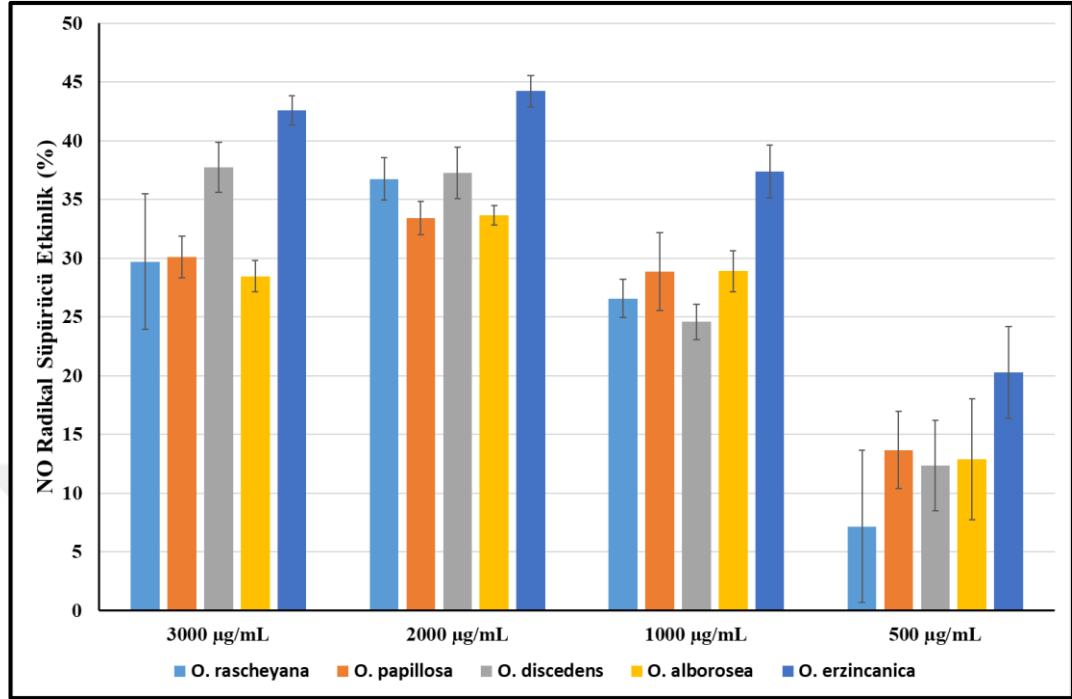
4.2.2 NO radikali süpürücü etkinlik

Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstrelerinin antioksidan etkinlikleri Bölüm 3.5.2’de açıklanan NO radikal süpürücü etkinliği tayini yöntemi ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak gallik asitin farklı derişimlerdeki NO radikal süpürücü etkinliği Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Gallik asitin NO radikal süpürücü etkinliği.

	Derişim (μ g/mL)			
Pozitif kontrol	200	100	50	25
Gallik asit	55,206 ($\pm$ 2,102)	52,558 ($\pm$ 1,073)	37,065 ($\pm$ 2,680)	12,863 ($\pm$ 4,327)

Onosma türlerinin ekstralarının farklı derişimlerdeki NO radikal süpürücü etkinlikleri karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.8'deki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.8. Farklı *Onosma* türlerinin ekstralarının NO radikal süpürücü etkinliği.

Tüm türlerde NO radikal süpürücü etkinlik gözlenmiştir. Elde edilen bulgulardan her bir tür için IC₅₀ değerleri hesaplanarak Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı *Onosma* türlerinin ekstralarının NO radikal süpürücü etkinlik IC₅₀ değerleri.

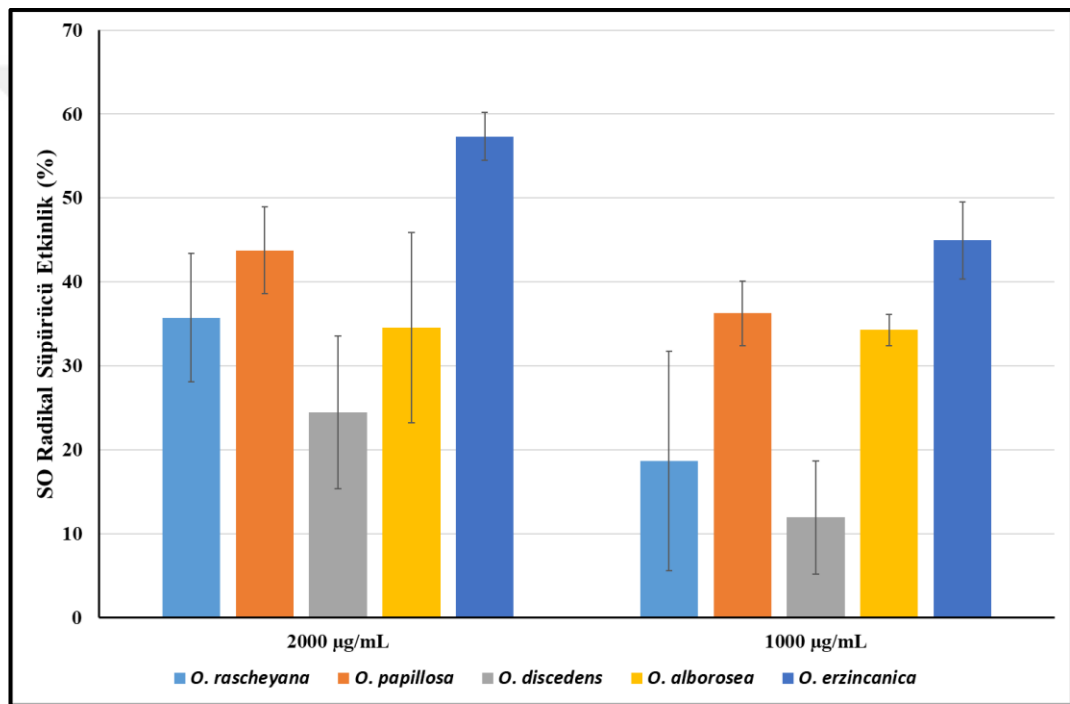
Onosma Türü	NO IC ₅₀ (µg/mL)
<i>O. rascheyana</i>	2605,076
<i>O. papillosa</i>	3219,750
<i>O. discedens</i>	2733,596
<i>O. alborosea</i>	3160,800
<i>O. erzincanica</i>	2254,830

Hesaplanan IC₅₀ değerleri dikkate alındığında en yüksek NO radikal süpürücü etkinliği *O. erzincanica* türünde (IC₅₀= 2254,830 µg/mL) belirlenmiştir.

4.2.3 SO radikali süpürücü etkinlik

Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstralarının antioksidan etkinlikleri Bölüm 3.5.3’de açıklanan SO radikal süpürücü etkinliği tayini yöntemi ile belirlenmiştir.

Onosma türlerinin ekstralarının farklı derişimlerdeki SO radikal süpürücü etkinlikleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.9’daki grafikte verilmiştir. Tüm türler için SO radikal süpürücü etkinliği sadece yüksek derişimlerde (1000 ve 2000 µg/mL) gözlemlenmiş, daha düşük derişimlerde tekrar edilebilir değerler elde edilememiştir.



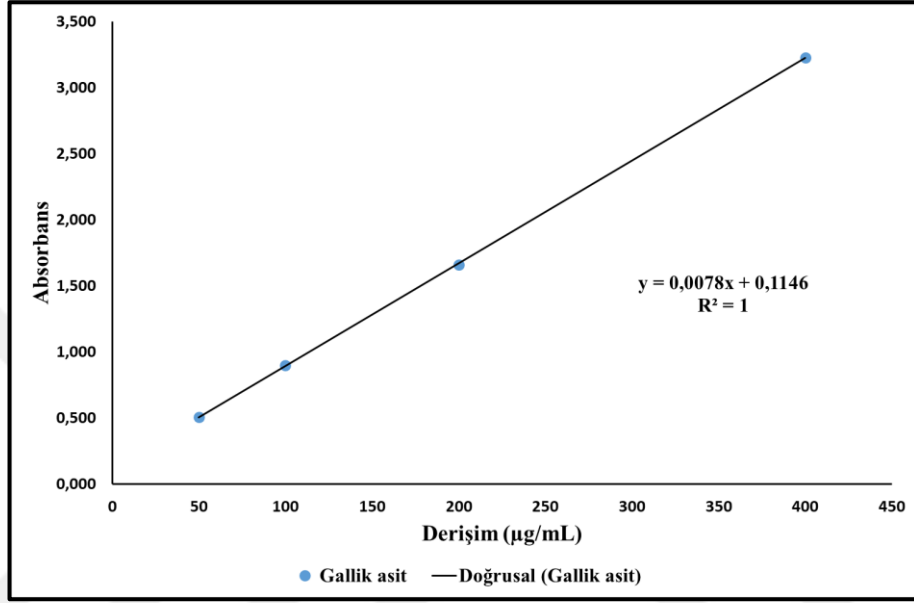
Şekil 4.9. Farklı *Onosma* türlerinin ekstralarının SO radikal süpürücü etkinliği.

4.2.4 Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC)

Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstralarının bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi Bölüm 3.5.4’de açıklanan (CUPRAC) yöntemi ile belirlenmiştir. Çizelge 4.11’de verilen gallik asit derişimlerine karşılık absorbans değerlerinden kalibrasyon grafiği (Şekil 4.10) çizilmiş ve doğru denklemi elde edilmiştir.

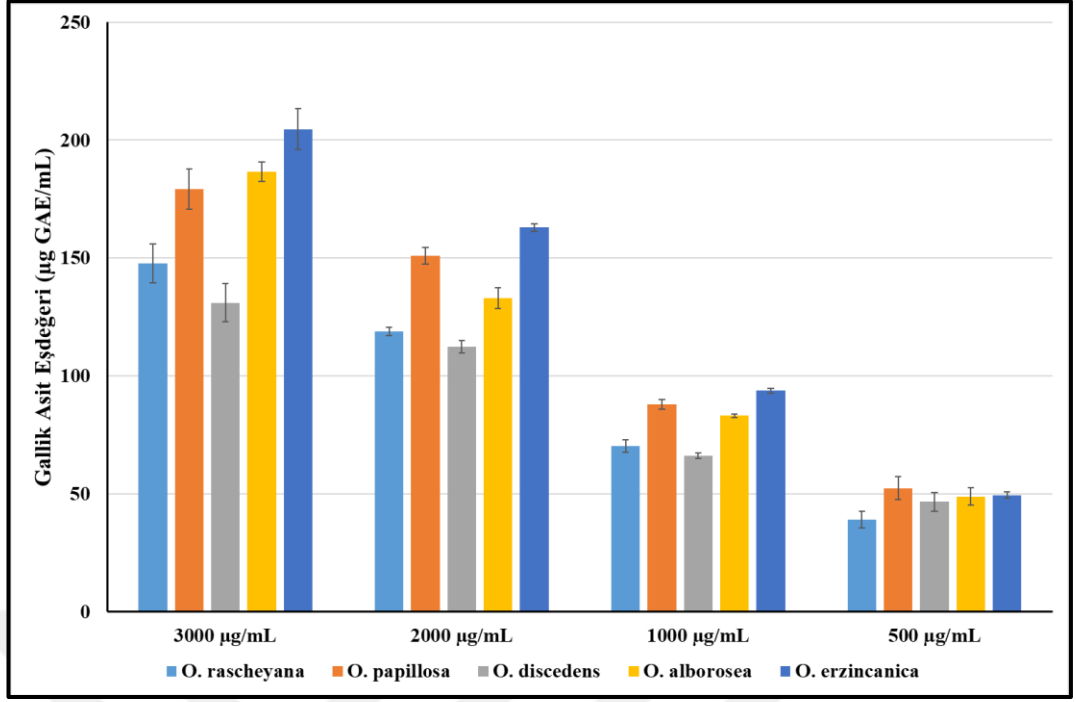
Çizelge 4.11. Gallik asite ait derişim ve absorbens değeri.

Gallik Asit Derişimi (µg/mL)	Absorbans (AU)	Standart Sapma (± AU)
400	3,226	0,571
200	1,658	0,016
100	0,896	0,037
50	0,505	0,006



Şekil 4.10. Gallik asit kalibrasyon grafiğı.

Onosma türlerine ait absorbens değeri doğru denkleminde kullanılarak farklı derişimlerdeki ekstreler içerisindeki gallik asit miktarları (µg GAE/mL) olarak hesaplanmış ve karşılaştırmalı olarak Şekil 4.11’de verilmiştir.



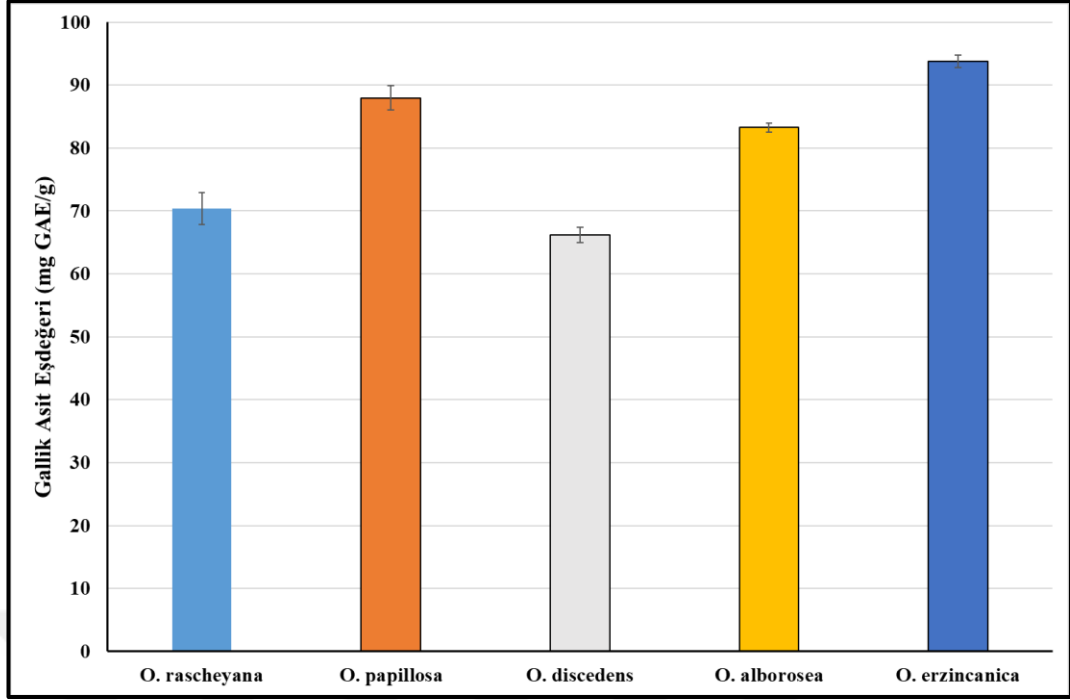
Şekil 4.11. Farklı *Onosma* türlerinin ekstrelerinin CUPRAC indirgeyici kapasite tayini.

Ayrıca farklı *Onosma* türlerinin 1000 µg/mL derişimi için birim bitki ekstresine karşılık gelen gallik asit eşdeğerleri (mg GAE/g) hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı *Onosma* türlerinin ekstrelerinin CUPRAC indirgeyici kapasite gallik asit eşdeğerleri.

<i>Onosma</i> türü	Gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g)	Standart Sapma (± mg GAE/g)
<i>O. rascheyana</i>	70,374	2,557
<i>O. papillosa</i>	87,970	1,968
<i>O. discedens</i>	66,183	1,228
<i>O. alborosea</i>	83,246	0,706
<i>O. erzincanica</i>	93,748	0,990

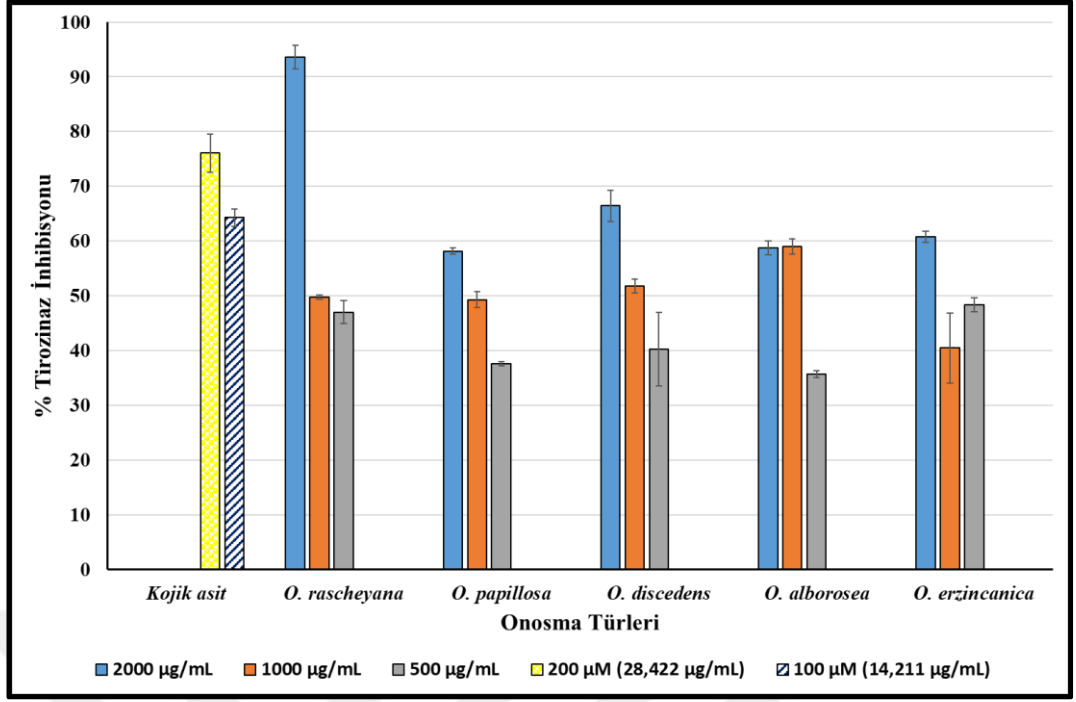
Onosma türlerine ait CUPRAC indirgeyici kapasite gallik asit eşdeğerleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.12’deki grafikte verilmiştir. En yüksek bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi *O. erzincanica* Binzet & Eren türünde 93,748 (± 0,990) mg GAE/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Farklı *Onosma* türlerinin ekstrelerinin CUPRAC indirgeyici kapasite gallik asit eşdeğerleri grafiği.

4.3 Tirozinaz Enzim İnhibisyonu

Onosma türlerinin ekstrelerinin farklı derişimlerde hazırlanmış çözeltilerinin tirozinaz inhibisyonuna etkisi Bölüm 3.6'da detayları verilen yöntemle substrat olarak L-DOPA kullanılarak belirlenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ilgili yöntemde verilen eşitlik kullanılarak yüzde tirozinaz inhibisyonu değerleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular pozitif kontrol olarak kojik asit ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.13'de sunulan grafikte verilmiştir.



Şekil 4.13. Farklı *Onosma* türlerinin ve kojik asitin tirozinaz inhibisyonuna etkisi.

Bulgular tüm *Onosma* türlerinin tirozinaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. 2000 µg/mL derişimde % 93,587 değeri ile en yüksek inhibisyonu *O. rascheyana* türünün gerçekleştirdiği gözlenmiştir. 1000 µg/mL derişimde % 59,018 ile *O. alborosea* türü, 500 µg/mL derişimde ise % 48,378 ile *O. erzincanica* türü en yüksek tirozinaz inhibisyonu gerçekleştirmiştir.

Ayrıca her bir türe ait yüzde inhibisyon verilerinden IC_{50} değerleri hesaplanarak Çizelge 4.13’de verilmiştir. *O. alborosea* türünün 800,460 µg/mL ile en düşük IC_{50} değerine sahip olduğu dikkate alındığında tirozinaz inhibisyonu açısından en yüksek etkiyi gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.13. Farklı *Onosma* türlerinin ekstrelerinin tirozinaz inhibisyonu IC_{50} değerleri.

Onosma Türü	Tirozinaz IC_{50} (µg/mL)
<i>O. rascheyana</i>	1027,679
<i>O. papillosa</i>	1295,385
<i>O. discedens</i>	998,304
<i>O. alborosea</i>	806,460
<i>O. erzincanica</i>	1469,606

4.4 Sitotoksik Etki Tayini (MTT Yöntemi)

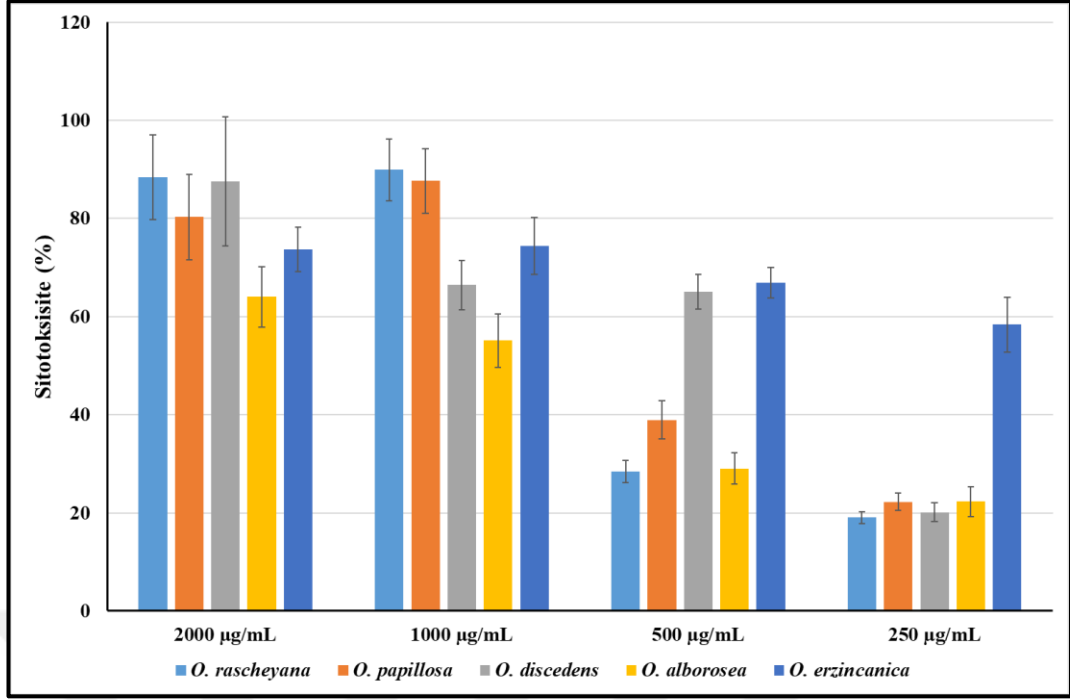
Çalışmada kullanılan *Onosma* türlerinden elde edilen bitki ekstralarının 3T3 hücre (fare embriyonik fibroblast) hattı üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Deneyler Bölüm 3.7’de detaylı olarak açıklanan MTT tayin yöntemi ile 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Onosma türlerinin her biri için farklı derişimlerdeki bitki ekstralarının 3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri mikropkaya okuyucuda 577/655 nm’de ölçülen absorbans değerleri üzerinden negatif kontrol grubu ile değerlendirilmiş ve yüzde sitotoksik etki değerleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı *Onosma* türlerinin 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksikite değerleri.

Takson	Derişim			
	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
<i>O. rascheyana</i>	88,412 (±8,676)	89,884 (±6,306)	28,457 (± 2,268)	19,033 (± 1,162)
<i>O. papillosa</i>	80,269 (±8,755)	87,619 (± 6,642)	38,943 (± 3,852)	22,234 (± 1,797)
<i>O. discedens</i>	87,512 (±13,152)	66,428 (± 4,980)	65,015 (± 3,552)	20,112 (± 1,906)
<i>O. alborosea</i>	64,014 (± 6,204)	55,091 (± 5,404)	29,047 (± 3,235)	22,300 (± 3,008)
<i>O. erzincanica</i>	73,671 (± 4,532)	74,392 (± 5,779)	66,887 (± 3,126)	58,363 (± 5,552)

3T3 hücre hattı üzerinde farklı *Onosma* türlerinin ekstralarının derişime bağı karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4.14’de verilmiştir. Bitki ekstralarının türe ve derişime duyarlı sitotoksik etki gösterdiği grafikte görülmektedir. Özellikle 1000 µg/mL derişimi ve üzerinde yüksek sitotoksik etki görülmekle birlikte 1000 µg/mL’de en düşük sitotoksik etki *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea* türünde (% 55,091 (± 5,404)) saptanmıştır. Düşük derişimlerde ise *O. rascheyana* Boiss. ve *O. alborosea* Fisch. & C.A.Mey. ssp. *alborosea* var. *alborosea* türlerinde en düşük sitotoksik etki görülürken *O. erzincanica* Binzet & Eren türünde tüm derişimlerde yüksek sitotoksik etki belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Farklı *Onosma* türlerinin 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Hiperpigmentasyon ve enzimatik esmerleşme gibi sorunlara çözüm sunmak üzere kozmetik, gıda ve medikal teknolojilerde tirozinaz inhibitörü etken maddeler yoğun olarak araştırılmakla birlikte özellikle doğal kaynaklı, sitotoksik etkisi düşük, antioksidan özelliği yüksek etken maddelere halen ihtiyaç duyulmakta ve yeni alternatifler ilgi görmektedir. İçerisinde Türkiye'ye endemik türlerin de bulunduğu beş farklı *Onosma* türünün tirozinaz inhibisyonuna etkilerinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında öncelikle *Onosma* türlerine ait bitkilerin toprak üstü kısımlarının metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Elde edilen bitki ekstrelerinin toplam fenolik, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları belirlenmiş, antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DPPH, NO ve SO radikal süpürücü etkinlikleri ve bakır (II) indirgeyici kapasitesi araştırılmış, tirozinaz inhibisyon etkisi çalışılmış ve sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan *Onosma* türlerinin metanol ekstrelerindeki toplam fenol içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak incelendiğinde en yüksek ve en düşük miktarlar sırasıyla 52,179 ($\pm 5,330$) ve 30,518 ($\pm 5,274$) mg GAE/g olarak *O. rascheyana* ve *O. erzincanica* türlerinde belirlenmiştir. Çalışmada toplam flavonoit içerikleri ise kersetin eşdeğer miktarı olarak değerlendirilmiş ve en yüksek miktar *O. alborose* türünde 50,716 ($\pm 5,091$) mg KE/g olarak belirlenirken, en düşük miktar *O. rascheyana* türünde 17,961 ($\pm 1,934$) mg KE/g olarak belirlenmiştir. Ayrıca her bir tür için toplam flavonol miktarlarının tayinine yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar kersetin eşdeğer miktarı olarak verilmiştir. Buna göre en yüksek toplam flavonol miktarı *O. alborosea* türünde 25,269 ($\pm 0,241$) mg KE/g olarak belirlenirken, en düşük miktar *O. erzincanica* türünde 8,714 ($\pm 0,048$) mg KE/g olarak belirlenmiştir.

Stankovic ve ark. benzer şekilde Folin-Ciocalteu yöntemiyle *O. sericea* ve *O. stenoloba* türlerinin metanol ekstrelerinde toplam fenolik bileşen miktarlarını sırasıyla 69,79 ($\pm 0,98$) ve 32,46 ($\pm 0,60$) mg GAE/g olarak saptamışlardır [75]. Bu sonuçlar *O. sericea* türündeki toplam fenolik içeriğin çalışmamızdaki türlerden daha yüksek olduğunu, *O. stenoloba* türünün ise *O. erzincanica* dışında daha düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada araştırmacılar toplam flavonoit içerik miktarlarını rutin eşdeğer olarak sırasıyla 52,62 ($\pm 0,54$) ve 8,36 ($\pm 0,27$) mg RE/g

olarak belirlemişlerdir. Diğer bir başlık olarak araştırmacılar DPPH radikal süpürücü etkinliğini araştırmış ve troloks eşdeğeri olarak sırasıyla 130,23 ($\pm$ 5,31) ve 53,96 ($\pm$ 0,78) mg TE/g sonuçlarını elde etmişlerdir. Bu sonuçlar toplam fenolik bileşen içeriği ile antioksidan etki arasındaki korelasyonu göstermektedir. Ayrıca ekstrelerin indirgeme gücünün belirlenmesi amacıyla araştırmacılar CUPRAC yöntemini kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda troloks eşdeğeri cinsinden sırasıyla 359,63 ($\pm$ 14,83) ve 142,88 ($\pm$ 1,49) mg TE/g olarak bulunmuş ve bu değerlerin de antioksidan etki ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir.

Saravanakumar ve ark. yaptıkları çalışmada *O. lycaonica* ve *O. papillosa* türlerinin metanol ekstrelerinin toplam fenolik bileşen içeriğini sırasıyla 43,5 ($\pm$ 1,5) ve 33,9 ($\pm$ 0,4) mg GAE/g olarak saptamışlardır [11]. *O. papillosa* türü için belirtilen bu değer aynı türe ait bulgularımızla (34,145 ($\pm$ 0,864) mg GAE/g) örtüşmekle birlikte bitkilerin toplandığı lokasyon ve zaman (iklimsel farklılıklar ve çiçek ve meyve dönemleri v.b) gibi bazı özelliklerinin etkili olabileceğine dikkat edilmelidir. Bununla birlikte araştırmacılar toplam flavonoit miktarlarını *O. lycaonica* ve *O. papillosa* türleri için sırasıyla 26,0 ($\pm$ 0,5) ve 32,9 ($\pm$ 0,3) mg KE/g olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızda kullanmış olduğumuz *O. papillosa* türüne ait ekstrelerde belirtilen çalışmaya göre daha yüksek toplam flavonoit içeriğinin (49,032 ($\pm$ 1,945) mg KE/g) bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında antioksidan etkiyi belirlemek için DPPH radikal süpürücü etkinliğini incelemiş ve sırasıyla IC₅₀ değerlerini 2,69 ($\pm$ 0,10) $\times 10^3$ ve 3,41 ($\pm$ 0,05) $\times 10^3$ μ g/mL olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlar tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz *O. papillosa* türüne ait ekstrelerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında 521,510 μ g/mL değeri ile antioksidan etkinin çalışmamızda kullandığımız ekstrelerde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum farklı ekstraksiyon yöntemi seçimi ve daha yüksek toplam flavonoit içeriği ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca araştırmacılar ekstrelerin indirgeme gücünü belirlemek amacıyla CUPRAC yöntemini kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda EC₅₀ değerlerini sırasıyla 1,10 ($\pm$ 0,01) $\times 10^3$ ve 1,32 ($\pm$ 0,02) $\times 10^3$ μ g/mL olarak belirlemişlerdir.

Saravanakumar ve ark. yaptıkları çalışmada *O. isaurica* ve *O. bracteosa* türlerinin metanol ekstrelerinin toplam fenolik bileşen içeriğini sırasıyla 21,20 ($\pm$ 0,16) ve 24,18 ($\pm$ 2,98) mg GAE/g olarak saptamışlardır [74]. Ayrıca araştırmacılar toplam flavonoit miktarlarını *O. isaurica* ve *O. bracteosa* türleri için sırasıyla 4,30 ($\pm$ 0,29) ve 29,47 ($\pm$ 0,06) mg KE/g olarak belirlemişlerdir. Sonuçlar bu iki tür için hem toplam fenolik hem de toplam flavonoit içeriğinin tez çalışmasındaki türlerden daha düşük olduğunu göstermektedir. Çalışmalarında araştırmacılar ekstrelerin antioksidan etkisini belirlemek için DPPH radikal süpürücü etkinliğini incelemiş ve sırasıyla IC₅₀ değerlerini 4,47 ($\pm$ 0,09) $\times 10^3$ ve 4,58 ($\pm$ 0,02) $\times 10^3$ μ g/mL olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlar tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz tüm *Onosma* türlerine ait ekstrelerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında antioksidan etkinin çalışmamızda kullandığımız ekstrelerde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca araştırmacılar ekstrelerin indirgeme gücünün belirlenmesi amacıyla CUPRAC yöntemini kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda troloks eşdeğeri cinsinden sırasıyla 143,57 ($\pm$ 2,52) ve 169,43 ($\pm$ 0,39) mg TE/g olarak bulunduğu rapor edilmiştir.

Sarıkürkçü ve ark. yaptıkları çalışmada *O. pulchra* türünün etil asetat, metanol ve sulu ekstrelerindeki toplam fenol içeriğini araştırmışlardır. Kullandıkları çözeltiler içerisinde en yüksek fenolik bileşen miktarını 26,93 mg GAE/g ile metanol ekstrelerinde saptadıklarını rapor etmişlerdir [89]. Bu değer tez çalışmamızda kullandığımız türlerle karşılaştırıldığında çalışmamızdaki toplam fenolik bileşen içeriği daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde araştırmacılar toplam flavonoit içeriği de en yüksek oranda (16,39 mg KE/g) metanol ekstresinde bulmuşlardır. Bu değer de çalışmamızdaki *O. erzincanica* türü dışındaki tüm flavonoit içeriklerinden düşüktür. Çalışmalarında araştırmacılar ayrıca DPPH radikal süpürücü etkinliğini incelemiş ve metanol ekstresi için IC₅₀ değerlerini 4,79 ($\pm$ 0,31) $\times 10^3$ μ g/mL olarak bulurken en yüksek etkiyi 3,90 ($\pm$ 0,02) $\times 10^3$ μ g/mL ile sulu ekstrede elde etmişlerdir. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz tüm *Onosma* türlerinin antioksidan etkisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.. Ayrıca ekstrelerin indirgeme gücünün belirlenmesi amacıyla araştırmacılar CUPRAC yöntemini kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda efektif derişim EC₅₀ değerlerini metanol ve su ekstreleri için sırasıyla 2,31 ($\pm$ 0,08) $\times 10^3$ ve 2,20 ($\pm$ 0,03) $\times 10^3$ μ g/mL olarak belirlemişlerdir.

Sıvacı ve ark. çalışmalarında vejetasyon ve reprodüktif dönemlerinde toplanan *O. sericea* ve *O. rascheyana* türlerinin yapraklarından elde ettikleri etanol ekstrelerindeki toplam fenolik bileşen miktarını incelemişlerdir. Vejetasyon döneminde sırasıyla 0,20 ve 0,30 mg GAE/g, reprodüktif dönemde ise 0,48 ve 0,42 mg GAE/g olarak elde ettikleri sonuçlara göre vejetasyon göre reprodüktif dönemde daha yüksek toplam fenolik bileşen tespit etmişlerdir [90]. Belirtilen çalışmada bitki ekstreleri hazırlanırken sadece yaprak kısımlarının kullanılmış olması karşılaştırmayı güçleştirmektedir. Bununla birlikte *O. rascheyana* türü için çalışmamızda elde ettiğimiz değerler karşılaştırıldığında aradaki fark ve bir önceki çalışmada verilen sonuçlar da dikkate alındığında metanol ekstresi ile daha yüksek verim alınabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında ekstrelerin antioksidan etkisini belirlemek için DPPH radikal süpürücü etkinliğini incelemiş ve IC₅₀ değerlerini vejetasyon döneminde sırasıyla 544 ve 430 µg/mL, reprodüktif dönemde sırasıyla 274 ve 326 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlar tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz *O. rascheyana* türü ile karşılaştırıldığında antioksidan etkinin çalışmamızda kullandığımız ekstrelerde daha düşük (1060,768 µg/mL) olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar antioksidan etken bileşenlerin yaprak kısmında daha yoğun olabileceğini düşündürmektedir.

Sarıkürkçü ve ark. *Onosma gigantea* türü üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile etil asetat ve metanol ekstrelerini, kaynayan su içerisinde bekleterek de su ekstrelerini elde etmişler ve Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik içeriği incelemişlerdir. Etil asetat, metanol ve su ekstrelerinden en yüksek toplam fenolik içerik suda saptanmış ve sırasıyla 0,41(± 0,01), 9,12 (± 0,14) ve 39,26 (± 0,61) mg GAE/g değerlerini rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada araştırmacılar toplam flavonoit içerik miktarlarını rutin eşdeğer olarak sırasıyla 0,07 (± 0,01), 1,74 (± 0,01) ve 3,81 (± 0,15) mg RE/g olarak belirlemişlerdir. [91]. DPPH radikal süpürücü çalışmalarında en yüksek etkiyi 32,14 (± 0,03) µmol TE/g ile sulu ekstrede elde eden araştırmacılar ayrıca CUPRAC yöntemi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarda indirgeme gücünü de 50,23 (± 0,19) µmol TE/g olarak benzer şekilde sulu ekstrede belirlemişlerdir.

Kirkan ve ark. *Onosma tauricum* var. *tauricum* üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada etil asetat, metanol ve su ekstrelerinde sırasıyla 1,64 (± 0,02), 16,20 (±

0,16) ve 40,88 ($\pm$ 2,93) mg GAE/g saptamışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda en yüksek toplam fenolik içerik su ekstresinde elde edilmiştir. Benzer şekilde araştırmacılar en yüksek toplam flavonoit içeriğini de su ektrelerinde saptamışlardır. Toplam flavonoit içerikleri rutin eşdeğer cinsinden sırasıyla 0,32 ($\pm$ 0,01), 3,14 ($\pm$ 0,01) ve 7,40 ($\pm$ 0,08) mg RE/g olarak rapor edilmiştir [92].

Maskovic ve ark. yaptıkları çalışmada *Onosma aucheriana* türünün etanol ekstresinin toplam fenolik bileşen içeriğini 90,26 ($\pm$ 0,69) mg GAE/g olarak saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmada araştırmacılar toplam flavonoit içerik miktarını rutin eşdeğer cinsinden 35,24 ($\pm$ 0,55) mg RE/g olarak belirlemişlerdir [93]. Araştırmacılar ayrıca çalışmalarında DPPH radikal süpürücü etkinliğini incelemiş ve IC₅₀ değerlerini 21,45 ($\pm$ 1,55) μ g/mL olarak saptamışlardır.

Gharib ve ark. Boraginaceae familyasına ait 8 türde gerçekleştirdikleri çalışmalarında su ve etanol ektrelerinde toplam fenolik ve flavonoit içerikleri incelemişlerdir. *Onosma* türleri içerisinde en yüksek gallik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik içerik 19,30 ($\pm$ 1,50) mg GAE/g *Onosma microcarpum* türünün etanol ekstresinde bulunurken diğer türler de dikkate alındığında en yüksek değer 270,33 ($\pm$ 2,60) mg GAE/g ile *Nonea caspica* türünün ekstresinde bulunmuştur. Bu türün etanol ekstresinde kersetin eşdeğeri olarak toplam flavonoit içeriği de 252,60 ($\pm$ 1,80) mg KE/g ile en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Sadece çalışmada kullanılan *Onosma* türleri dikkate alındığında ise benzer şekilde *Onosma microcarpum* türünün 14,80 ($\pm$ 0,85) mg KE/g değeri ile en yüksek toplam flavonoit içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir [94]. Antioksidan etkinin belirlenmesi amacıyla araştırmacılar çalışmalarında DPPH radikal süpürücü etkinliğini incelemiş ve en yüksek etkiyi 23,13 ($\pm$ 1,90) μ g/mL IC₅₀ değeri ile *Nonea caspica* türünün ekstresinde saptamışlardır. Sadece *Onosma* türleri dikkate alındığında ise 278,20 ($\pm$ 3,50) μ g/mL ile en yüksek etki *Onosma microcarpum* türünde belirlenmiştir. En düşük antioksidan etki ise 364,38 ($\pm$ 1,18) μ g/mL IC₅₀ değeri ile *Onosma sericeum* türünde verilmiştir. Bu sonuçlar toplam fenolik ve flavonoit içerikleri ile uyushmaktadır. Ayrıca araştırmacıların sunduğu sonuçlar tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz türlerle karşılaştırıldığında antioksidan etkinin çalışmamızda kullandığımız ektrelerde daha düşük olduğunu göstermektedir.

Demir ve ark. *Onosma armeniacum* türünün dimetil sülfoksit ekstreleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında toplam fenolik miktarını 26,1 ($\pm$ 0,4) mg GAE/g, toplam flavonoit miktarını da 13,7 ($\pm$ 0,9) mg KE/g olarak belirlemişlerdir [95].

Ebrahimzadeh ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada *Leonurus cardiaca*, *Grammosciadium platycarpum* ve *Onosma demawendicum* türlerinin metanol ekstreleri için toplam fenolik içerikleri sırasıyla 54,3 ($\pm$ 1,8), 66,9 ($\pm$ 4,3) ve 47,2 ($\pm$ 2,2) mg GAE/g olarak ve toplam flavonoit içerikleri de 35,2 ($\pm$ 0,9), 32,8 ($\pm$ 1,5) ve 13,7 ($\pm$ 0,8) mg KE/g olarak bulmuşlardır [96]. Türler arasındaki en düşük değerler *O. demawendicum*'da görülmüştür. Çalışmalarının devamında araştırmacılar ekstrelerin antioksidan etkisini belirlemek için DPPH radikal süpürücü etkinliğini incelemiş ve sırasıyla IC₅₀ değerlerini 144 ($\pm$ 12,1) $\times 10^3$, 45 ($\pm$ 2,1) $\times 10^3$ ve 221 ($\pm$ 11,7) $\times 10^3$ μ g/mL olarak belirlemişlerdir. Çalışmada ayrıca BHA ve kuersetin için IC₅₀ değerleri 53.96 ($\pm$ 3.1) ve 5.28 ($\pm$ 0.2) μ g/mL olarak verilmiştir. Tez çalışmamızda 25 μ g/mL derişiminde askorbik asitin DPPH radikal süpürücü etkinliği % 93,215 ($\pm$ 0,449) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz tüm *Onosma* türlerine ait ekstrelerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında antioksidan etkinin çalışmamızda kullandığımız ekstrelerde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar antioksidan aktiviteyi belirlemek üzere diğer bir yöntem olan NO radikal süpürücü etkiyi çalışmışlardır. Çalışmalarında pozitif kontrol olarak kersetin kullanmış ve IC₅₀ değerini 5,28 ($\pm$ 0,2) μ g/mL olarak belirlemişlerdir. En yüksek aktiviteyi *L. cardiaca* türünde belirleyen araştırmacılar IC₅₀ değerlerini sırasıyla 0.15 ($\pm$ 0.01) $\times 10^3$, 1.19 ($\pm$ 0.09) $\times 10^3$ ve 0.63 ($\pm$ 0.02) $\times 10^3$ μ g/mL olarak belirlemişlerdir. *O. demawendicum* türünün NO radikal süpürücü etkinliği tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz bulgularla kıyaslandığında daha yüksek aktivite gösterdiği anlaşılmaktadır. Ancak bununla birlikte çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız gallik asitin IC₅₀ değerinin 90,146 μ g/mL olduğu dikkate alınırsa iki sonuç arasında karşılaştırmanın yöntemsel farklılıklar nedeniyle güç olduğu düşünülebilir.

Sagdic ve ark. tarafından Türkiye'de bulunan iki endemik *Sideritis* türü üzerine yapılan çalışmada toplam fenolik içeriği *S. ozturkii* ve *S. caesarea* türleri için sırasıyla 39,35 ($\pm$ 3,51) ve 93,79 ($\pm$ 1,55) mg GAE/g, toplam flavonoit içeriği kateşin eşdeğeri olarak sırasıyla 8,58 ($\pm$ 0,00) ve 6,19 ($\pm$ 0,14) mg CE/g, toplam flavonol

içeriği ise rutin eşdeğeri olarak sırasıyla 12, 27 ($\pm 0,21$) ve 32,31 ($\pm 0,36$) mg RE/g olarak rapor edilmiştir [97].

Şöhretoğlu ve ark. tarafından farklı *Geranium* türleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada en yüksek toplam fenolik içerik *Geranium stepporum* türünün etil asetat ekstralarında 389,0881 ($\pm 0,84$) mg GAE/g olarak saptanmıştır. En yüksek toplam flavonoit içeriği *G. stepporum* türünün n-bütanol ekstralarında 116,5779 ($\pm 0,13$) mg KE/g olarak bulunmuştur. Ayrıca en yüksek toplam flavonol içeriği *G. stepporum* türünün n-bütanol ekstralarında 8,6666 ($\pm 0,48$) mg KE/g olarak belirlenmiştir [55]. Bu çalışmada araştırmacılar antioksidan aktiviteyi incelemek üzere NO radikal süpürücü etkinliğini araştırmış ve en yüksek aktiviteyi 98,4 $\mu\text{g/mL}$ IC₅₀ değeri ile *G. psilostemon* türünün etilasetat ekstresinde saptamışlardır. Bununla birlikte çalışmada türlerin aktivitesinin pozitif kontrol olarak kullanılan kersetinden oldukça düşük olduğu rapor edilmiştir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan pozitif kontrol ve türlere ait değerlerde NO radikal süpürücü aktivite açısından benzer bir ilişki görülmektedir.

Stankovic ve ark. yaptıkları çalışmada *O. sericea* ve *O. stenoloba* türlerinin farklı enzim inhibitör etkilerini de incelemişlerdir. Tirozinaz özelinde bakıldığında kojik asit eşdeğeri olarak sırasıyla 136.35 (± 1.43) ve 135.68 (± 1.44) mg KAE/g sonuçlarını bulmuşlardır [75]. Saravanakumar ve ark. benzer şekilde *O. lycaonica* ve *O. papillosa* türlerinin metanol ekstralarının tirozinaz enzimi inhibisyon IC₅₀ değerlerini sırasıyla 2,20 ($\pm 0,03$) $\times 10^3$ ve 2,05 ($\pm 0,08$) $\times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$ olarak ve kojik asit eşdeğeri olarak da sırasıyla 139.0 (± 1.9) ve 149.0 (± 5.6) mg KAE/g olarak belirlemişlerdir [11]. Tez çalışmasında gerçekleştirilen tirozinaz enzim inhibisyonu çalışmalarında *O. papillosa* türü için IC₅₀ değeri 1295,385 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuç çalışmada kullanılan ekstrenin daha yüksek tirozinaz aktivitesi gösterdiğini belirtmektedir. Saravanakumar ve ark. diğer çalışmalarında *O. isaurica* ve *O. bracteosa* türlerinin metanol ekstralarının tirozinaz enzimi inhibisyon IC₅₀ değerlerini sırasıyla 2,08 ($\pm 0,06$) $\times 10^3$ ve 2,13 ($\pm 0,01$) $\times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$ olarak ve kojik asit eşdeğeri olarak da sırasıyla sırasıyla 146.92 (± 4.10) ve 143.13 (± 0.47) mg KAE/g olarak belirlemişlerdir [74]. Tez çalışmamızda elde edilen bulgularla karşılaştırıldığında, *Onosma* türlerinde elde ettiğimiz tirozinaz inhibitör etkileri bu iki türden yüksek olarak belirlenmiştir. Sarıkürkçü ve ark. yaptıkları çalışmada

O. pulchra türünün etil asetat, metanol ve sulu ekstrelerindeki enzim inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada tirozinaz enzimi inhibisyon IC_{50} değerlerini sırasıyla $3,77 (\pm 0,06) \times 10^3$, $2,47 (\pm 0,28) \times 10^3$ ve $4,35 (\pm 0,20) \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ olarak bulmuşlardır [89]. Kirkan ve ark. *Onosma tauricum* var. *tauricum* üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin tirozinaz enzimi inhibisyon IC_{50} değerlerini sırasıyla $5,17 (\pm 0,06) \times 10^3$, $4,06 (\pm 0,01) \times 10^3$ ve $2,22 (\pm 0,01) \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ olarak bulmuşlardır. Bu iki çalışmada verilen değerler yine çalışmamızda elde edilen değerlerden yüksek olduğundan *O. pulchra* ve *O. tauricum* var. *tauricum* türlerinin çalışmamızda kullanılan türlerden daha düşük enzimatik inhibisyon sağladığı görülmüştür.

Maskovic ve ark. yaptıkları çalışmada *Onosma aucheriana* türünün etanol ekstresinin sitotoksik etkilerini MTT testi ile incelemişlerdir. $25 \mu\text{g/mL}$ ve üzeri derişimlerde ekstrelerin Hep2c ve L2OB hücrelerinin canlılığına önemli derecede etki ettiğini ve ayrıca $50 \mu\text{g/mL}$ derişiminde hücre büyümesi üzerinde % 50 inhibisyon sağladığını çalışmalarında rapor etmişlerdir [93]. Demir ve ark. *Onosma armeniacum* türünün dimetil sülfoksit ekstreleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada insan akciğer (A549), karaciğer (HepG2) ve kolon (WiDr) kanser hücre hatları ile normal fibroblast (BJ) hücre hattındaki sitotoksik etkileri incelemişlerdir. Elde ettikleri bulgularda ekstrelerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerine ait IC_{50} değerlerini sırasıyla $17,5 (\pm 0,5)$, $12,8 (\pm 0,5)$, $18,3 (\pm 0,3)$ ve $45,9 (\pm 1,0) \mu\text{g/mL}$ olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlara göre ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'nün "tümör hücre hattı üzerinde *in vitro* koşullarda $30 \mu\text{g/mL}$ derişiminin altındaki IC_{50} değerine sahip ekstreler antikanser ilaç geliştirmede umut vadetmektedir" tanımını kaynak göstererek çalışmada kullandıkları üç hücre hattına karşı ekstrelerin uygun olduğunu rapor etmişlerdir [95]. Şöhretoğlu ve ark. farklı *Geranium* türlerinin KB insan epidermoit karsinoma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT testi ile incelemişlerdir. 0.1 ile $10 \mu\text{g/mL}$ derişim aralığındaki ekstrelerin 48 saat sonrasında KB hücre hattı üzerindeki etkileri araştırıldığında derişime bağlı sitotoksik etki gözlemekle birlikte $10 \mu\text{g/mL}$ altında ihmal edilebilecek etki görüldüğünü bildirmişlerdir. Belirtilen derişimdeki ekstrelerden *G. psilostemon* ve *G. stepporum* türlerinin sulu ekstrelerinin % 50 ve üzeri sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [55]. Benzer şekilde tez çalışmamızda gerçekleştirilen sitotoksik etki deneylerinde derişim

duyarlı sonuçlar elde edilmiş ve tüm türlere ait ekstrelerde 500 µg/mL derişimi aşıldıkça sitotoksik etki % 50 ve üzerinde belirlenmiştir.

Sonuç olarak tüm bu veriler dikkate alındığında tez çalışmasında elde edilen toplam fenolik ve flavonoit içerik sonuçlarının diğer *Onosma* türlerine ait literatür çıktıları ile uyumlu olduğu ve göreceli olarak yüksek kabul edilebilecek toplam fenolik ve flavonoit içeriğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca toplam flavonol içeriğinin *Onosma* türlerinde incelendiği araştırmalar yaygın olmamakta ve bu nedenle karşılaştırma sunulamamakla birlikte bu bilginin antioksidan etki ve enzim inhibisyonu açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmasında DPPH radikal süpürücü etkinlik bulguları 1000 µg/mL derişimi ve altında en aktif türün *O. papillosa* (IC₅₀: 521,510 µg/mL) olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte tüm *Onosma* türlerinin DPPH radikal süpürücü etkinlik açısından aktif olduğu görülmüştür. Çalışmamızda antioksidan aktiviteyi belirlemek için diğer bir yöntem olan NO radikal süpürücü etki deneyleri gerçekleştirilmiş ve en aktif türün *O. erzincanica* (IC₅₀: 2254,830 µg/mL) olduğunu belirlenmiştir. 2000 µg/mL derişimi ve altında her *Onosma* türü için derişime bağlı lineer bir artış gözlenmiş ve türlerin NO radikal süpürücü etki açısından aktif oldukları değerlendirilmiştir. Ayrıca diğer bir antioksidan aktivite çalışması olarak SO radikal süpürücü etki incelenmiş ancak elde edilen bulgular tekrarlanabilir bulunmadığından sonuca bağlayıcı bir yorum yapılamamıştır.

Çalışmamızda CUPRAC indirgeme gücü tayini deneyleri gerçekleştirilerek *Onosma* türlerinin etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre en yüksek bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite gallik asit eşdeğeri olarak (93,748 (± 0,990) mg GAE/g) değeri ile *O. erzincanica* türünde belirlenmiştir. Buna karşılık 66,183 (± 1,228) mg GAE/g değeri ile en düşük kapasite *O. discedens* türünde saptanmıştır.

Tirozinaz enzim inhibisyonunun belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen tez çalışmalarından elde edilen bulgular tüm *Onosma* türlerinin tirozinaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. Genel olarak derişime bağlı bir etki gözlenirken, 2000 µg/mL derişimde % 93,587 değeri ile en yüksek inhibisyonu *O. rascheyana* türünün, 1000 µg/mL derişimde % 59,018 ile *O. alborosea* türünün, 500 µg/mL derişimde ise % 48,378 ile *O. erzincanica* türünün en yüksek tirozinaz enzim inhibisyonu

gösterdiği görülmektedir. Elde edilen bulgulardan IC₅₀ değerleri incelendiğinde en düşük IC₅₀ değeri ile (800,460 µg/mL) *O. alborosea* türünün en yüksek tirozinaz inhibisyonu etkisini gösterdiği görülmektedir.

Tez çalışmalarımızda kullanılan *Onosma* türlerinin potansiyel uygulamalarının başında dermatolojik uygulamalar geldiğinden hücre canlılığı üzerindeki toksik etkileri oldukça önemlidir. Bu amaçla 3T3 hücre (fare embriyonik fibroblast) hattı kullanılarak MTT yöntemiyle sitotoksik etki çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular tüm türlerin 500 µg/mL üzerindeki derişimlerde % 50 ve daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini belirlemiştir. Bununla birlikte *O. alborosea* türünün genel olarak en düşük sitotoksik etkiyi göstermekle birlikte özellikle 1000 µg/mL derişimde % 55,091 (± 5,404) ile en düşük etkiyi gösterdiği görülmüştür. Buna karşılık *O. erzincanica* türünün en düşük derişimde bile % 50 ve daha fazla sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde sonuç olarak tüm türlere ait ekstrelerin gerek antioksidan gerekse tirozinaz inhibitör etkileri nedeniyle farklı uygulamalarda kullanım potansiyeli bulunduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte özellikle *O. alborosea* türünün düşük sitotoksikite, yüksek tirozinaz inhibitör etki ve antioksidan etkisi nedeniyle kozmetik ve gıda alanlarında kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Koçyiğit, M., 2005. Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
2. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D. ve Guo, Z.G., 1985. Medicinal-Plants in Therapy, Bulletin of the World Health Organization, 63, 6, 965-981.
3. Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M.S., 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi, Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, 11, 52-67.
4. Kendir, G. ve Güvenç, A., 2010. Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 30, 1, 49-80.
5. Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Baskı: 2, Nobel Tıp Kitapevleri Yayını, İstanbul.
6. Özçatal, İ., 2018. Avrupa Birliği müktesebatına göre kozmetik sanayi ve kozmetik sektörünün Türkiye ekonomisindeki yeri, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Isparta.
7. T. C. Resmi Gazete, 25823 sayılı T.C. Sağlık Bakanlığı, Kozmetik Yönetmeliği 2. Md., Birinci Bölüm, Amaç, Kapsam, Dayanak ve Tanımlar., 23.05.2005
8. Aburjai, T. ve Natsheh, F.M., 2003. Plants used in cosmetics, Phytotherapy Research, 17, 9, 987-1000.
9. Şenol, F.S., 2016. Bitkisel kaynaklı kozmetik ürün geliştirilmesi üzerine farmakognozik araştırmalar, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
10. Yapar, E.A., 2017. Cilt Beyazlatıcılara Genel Bakış, Marmara Pharmaceutical Journal, 21, 1, 48-53.
11. Saravanakumar, K., Sarikurcu, C., Sahinler, S.S., Sarikurcu, R.B. ve Wang, M.H., 2021. Phytochemical Composition, Antioxidant, and Enzyme Inhibition Activities of Methanolic Extracts of Two Endemic Onosma Species, Plants-Basel, 10, 7.
12. Karacan, S., 2019. Bazı Onosma L. (Boraginaceae) türleri üzerine morfolojik, anatomik ve ekolojik araştırmalar Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.
13. Al-Shehbaz, I.A., 1991. The Genera of Boraginaceae in the Southerneastern United States, Journal of the Arnold Arboretum. Supplementary Series, 1, 1-169.
14. Özcan, T., 2008. Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some Boraginaceae taxa from Turkey, Plant Systematics and Evolution, 274, 3, 143-153.
15. Baser, K.H.C. *Aromatic Plants as a Source of Botanicals*. 2006. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.

16. Teke, H.İ., 2012. Türkiye'nin bazı endemik *Onosma* L. (Boraginaceae) taksonlarının morfolojik ve palinolojik yönden incelenmesi Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.
17. Riedl, H., 1978. *Onosma* L. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis, P.H. (Editör), Cilt: 6, Edinburg University press: Edinburgh, İskoçya, 326-378.
18. Binzet, R. ve Eren, O., 2018. *Onosma erzincanica* (Boraginaceae: Lithospermeae), a new scree species from Turkey, *Phytotaxa*, 356, 2, 117-130.
19. Binzet, R. ve Orcan, N., 2007. A New Species of *Onosma* (Boraginaceae) from Southern Turkey, *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 17, 1, 8-10, 3.
20. Akcin, O.E. ve Binzet, R., 2019. Anatomy of three *Onosma* species from Turkey, *Bangladesh Journal of Botany*, 48, 2, 329-337.
21. Binzet, R., Kandemir, I. ve Orcan, N., 2010. Palynological classification of *Onosma* L. (Boraginaceae) species from east Mediterranean region in Turkey, *Acta Botanica Croatica*, 69, 2.
22. Wikispecies. Pierre Edmond Boissier. Erişim 07.01.2022, URL: https://species.wikimedia.org/wiki/Pierre_Edmond_Boissier.
23. Binzet, R., Kandemir, I. ve Orcan, N., 2018. Numerical taxonomic study of the genus *onosma* L. (Boraginaceae) from Eastern Mediterranean region in Turkey, *Pakistan Journal of Botany*, 50, 561-573.
24. Wikispecies. Joseph Friedrich Nicolaus Bornmüller. Erişim 07.01.2022, URL: https://species.wikimedia.org/wiki/Joseph_Friedrich_Nicolaus_Bornm%C3%BCller.
25. Kandemir, A., 2009. The Rediscovery of Some Taxa Thought to Have Been Extinct in Turkey, *Turkish Journal of Botany*, 33, 2, 113-122.
26. Wikipedia. Friedrich Ernst Ludwig von Fischer. Erişim 07.01.2022, URL: https://tr.wikipedia.org/wiki/Friedrich_Ernst_Ludwig_von_Fischer.
27. Güzel, Ö., Duman, S., Yılmaz, S., Karakoyun, Ç., Kul, D., Pirhan, A.F. ve Bedir, E., 2021. Screening of cytotoxicity and DNA topoisomerase IIa inhibitory activity of Turkish *Onosma* species, *Turkish Journal of Botany*, 45, 776-788.
28. Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, İstanbul.
29. Kılıç, H.A., 2020. Giresun yöresinde yetişen bazı yöresel bitkilerin bakır indirgeme antioksidan kapasiteleri (CUPRAC) ve anti-tirozinaz enzim aktivitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.
30. Bingöl, G., 1977. *Vitaminler ve enzimler*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.
31. Atasağungil, M., 1965. *Enzimler*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.
32. Çepel, S., 2011. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

33. Lopina, O.D., 2017. Enzyme Inhibitors and Activators. Enzyme Inhibitors and Activators, Senturk, M. (Editör), Cilt, IntechOpen: Online.
34. Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: An overview, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3, 631-653.
35. Tipton, K. ve McDonald, A. A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification Erişim Tarihi:2022 02-01-2022, URL: <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/11/A-Brief-Guide-to-Enzyme-Classification-and-Nomenclature-rev.pdf>.
36. IUBMB. ExplorENZ - The Enzyme Database. Erişim 02.01.2022, URL: <https://www.enzyme-database.org/>.
37. McDonald, A.G., Boyce, S. ve Tipton, K.F., 2009. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list, Nucleic Acids Research, 37, D593-D597.
38. Saravanan, A., Jayasree, R., Sundaraman, T.R., Hemavathy, R.V., S.Jeevanantham, Kumar, P.S. ve Yaashikaa, P.R., 2020. Enzyme Inhibition in Therapeutic Applications. Frontiers in Enzyme Inhibition: Enzyme Inhibition - Environmental and Biomedical Applications, Baskar, G., Kumar, K.S. ve Tamilarasan, K. (Editör), Cilt: 1, Bentham Science Publishers Ltd: Singapur, 5-16.
39. Strack, D., Vogt, T. ve Schliemann, W., 2003. Recent advances in betalain research, Phytochemistry, 62, 3, 247-269.
40. Riley, P.A., 1997. Melanin, International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 29, 11, 1235-1239.
41. IUBMB. EC:1.14.18.1 - ExplorENZ - The Enzyme Database. Erişim 02.01.2022, URL: <https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=1.14.18.1>.
42. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S. ve Wortsman, J., 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, Physiological Reviews, 84, 4, 1155-1228.
43. Chang, T.S., 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, International Journal of Molecular Sciences, 10, 6, 2440-2475.
44. Martinez, M.V. ve Whitaker, J.R., 1995. The Biochemistry and Control of Enzymatic Browning, Trends in Food Science & Technology, 6, 6, 195-200.
45. Kim, Y.J. ve Uyama, H., 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, Cellular and Molecular Life Sciences, 62, 15, 1707-1723.
46. Zolghadri, S., Bahrami, A., Khan, M.T.H., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F. ve Saboury, A.A., 2019. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 34, 1, 279-309.
47. Chen, J.S., Wei, C.I. ve Marshall, M.R., 1991. Inhibition-Mechanism of Kojic Acid on Polyphenol Oxidase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 11, 1897-1901.
48. Kim, Y.J., 2007. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 30, 6, 1052-1055.

49. Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M. ve Satayavivad, J., 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2, 328-336.
50. Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., 1999. Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10, 4121-4125.
51. Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E. ve Lim, T.Y., 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species, *Food Chemistry*, 109, 3, 477-483.
52. Davies, K.J.A., 1995. Oxidative stress: The paradox of aerobic life, *Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives*, 61, 1-31.
53. Huang, D.J., Ou, B.X. ve Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6, 1841-1856.
54. Halliwell, B., 1994. Free-Radicals and Antioxidants - a Personal View, *Nutrition Reviews*, 52, 8, 253-265.
55. Sohretoglu, D., Genc, Y. ve Harput, S., 2017. Comparative Evaluation of Phenolic Profile, Antioxidative and Cytotoxic Activities of Different Geranium Species, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16, 178-187.
56. Dimitrios, B., 2006. Sources of natural phenolic antioxidants, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 9, 505-512.
57. Maldonado, P.D., Rivero-Cruz, I., Mata, R. ve Pedraza-Chaverri, J., 2005. Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6, 1996-2001.
58. Demir, A., 2015. *Onosma halophila*' nın farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyonu ve ekstraksiyon verimlerinin karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
59. Özkaya, A., 2007. Oksidatif strese maruz kalan ratların bazı biyokimyasal parametrelerine hesperetin ve ellagik asidin etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
60. Rice-Evans, C., 1999. 16 - Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Packer, L., Hiramatsu, M. ve Yoshikawa, T. (Editör), Cilt, Academic Press: San Diego, 239-253.
61. Orakçı, M., 2014. *Ebenus laguroides* boiss. var. *laguroides*, *inula thapsoides* subsp. *thapsoides* ve *onosma sericeum* bitkilerinin in vitro antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
62. Ferguson, L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475, 1-2, 89-111.

63. İnciman, H.Ş., 2020. Bazı Sideritis türlerinin tirozinaz inhibisyon aktivitesi, antioksidan etkisi ile toplam fenol ve flavonoit içeriklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
64. Naczk, M. ve Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, 1054, 1-2, 95-111.
65. Panche, A.N., Diwan, A.D. ve Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview, *Journal of Nutritional Science*, 5.
66. Sohretoglu, D., Sari, S., Barut, B. ve Ozel, A., 2018. Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by in vitro and in silico studies, *Bioorganic Chemistry*, 81, 168-174.
67. Erlund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology, *Nutrition Research*, 24, 10, 851-874.
68. Wang, L. ve Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 6, 300-312.
69. Şengül, M. ve Topdaş, E.F., 2019. Katı-Sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Modern Teknikler ve Bu Teknikler Arasında Ultrason Yardımlı Ekstraksiyonun Yeri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50, 2, 201-216.
70. Dai, J. ve Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 15, 10, 7313-7352.
71. Yetiş, Ü., 2017. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı'nın ÇED Alanında Kapasitesinin Güçlendirilmesi için Teknik Yardım Projesi.
72. Karacabey, E. ve Mazza, G., 2008. Optimization of Solid-Liquid Extraction of Resveratrol and Other Phenolic Compounds from Milled Grape Canes (*Vitis vinifera*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 15, 6318-6325.
73. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. ve Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117, 4, 426-436.
74. Saravanakumar, K., Sarikurkcu, C., Sarikurkcu, R.T. ve Wang, M.H., 2019. A comparative study on the phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibition activities of two endemic *Onosma* species, *Industrial Crops and Products*, 142.
75. Katanić Stanković, J.S., Ceylan, R., Zengin, G., Matić, S., Jurić, T., Diuzheva, A., Jeko, J., Cziáky, Z. ve Aktumsek, A., 2020. Multiple biological activities of two *Onosma* species (*O. sericea* and *O. stenoloba*) and HPLC-MS/MS characterization of their phytochemical composition, *Industrial Crops and Products*, 144, 112053.
76. Kayan, B., 2009. *Taxus baccata* L'nin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyonu ve ekstraksiyon verimlerinin karşılaştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

77. Riedl, H., 1978. Boraginaceae. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis, P.H. (Editör), Cilt: 6, Edinburg University press: Edinburgh, İskoçya, 237-437.
78. Cespedes, C.L., El-Hafidi, M., Pavon, N. ve Alarcon, J., 2008. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), *Maqui*, Food Chemistry, 107, 2, 820-829.
79. Ordonez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A. ve Isla, M.I., 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts, Food Chemistry, 97, 3, 452-458.
80. Kumaran, A. ve Karunakaran, R.J., 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India, *Lwt-Food Science and Technology*, 40, 2, 344-352.
81. Genç, Y., 2017. *Plantago holosteum* Scop. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
82. Jensen, S.R., Gotfredsen, C.H., Harput, U.S. ve Saracoglu, I., 2010. Chlorinated Iridoid Glucosides from *Veronica longifolia* and Their Antioxidant Activity, *Journal of Natural Products*, 73, 9, 1593-1596.
83. Saracoglu, I., Varel, M., Harput, U.S. ve Nagatsu, A., 2004. Acylated flavonoids and phenol glycosides from *Veronica thymoides* subsp *pseudocinerea*, *Phytochemistry*, 65, 16, 2379-2385.
84. Tsai, P.J., Tsai, T.H., Yu, C.H. ve Ho, S.C., 2007. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea, *Food Chemistry*, 103, 1, 181-187.
85. Srinivasan, R., Chandrasekar, M.J.N., Nanjan, M.J. ve Suresh, B., 2007. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root, *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 2, 284-291.
86. Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. ve Ercag, E., 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 5-6, 292-304.
87. Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. ve Yonemori, S., 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 1, 197-201.
88. Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 1-2, 55-63.
89. Sarikurkcu, C., Sahinler, S.S., Ceylan, O. ve Tepe, B., 2020. *Onosma pulchra*: Phytochemical composition, antioxidant, skin-whitening and anti-diabetic activity, *Industrial Crops and Products*, 154.
90. Sivaci, A., Binzet, R., Duman, S. ve Teke, H.I., 2015. The determination of total antioxidant activity, phenolics and pigments during vegetative and

reproductive periods of *onosma* species, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 21, 261-265.

91. Sarikurkcü, C., Kirkan, B., Ozer, M.S., Ceylan, O., Atilgan, N., Cengiz, M. ve Tepe, B., 2018. Chemical characterization and biological activity of *Onosma gigantea* extracts, Industrial Crops and Products, 115, 323-329.
92. Kirkan, B., Sarikurkcü, C., Ozer, M.S., Cengiz, M., Atilgan, N., Ceylan, O. ve Tepe, B., 2018. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of *Onosma tauricum* var. *tauricum*, Industrial Crops and Products, 125, 549-555.
93. Maskovic, P., Ac, M., Pavlovic, M., Vujosevic, M., Blagojević, J., Djuric, M., Moracanin, V.-M. ve Djukic, D., 2016. A Study on the Ethanolic Extract of *Onosma aucheriana* Biological and toxicological evaluation, Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition-, 67.
94. Gharib, A. ve Godarzee, M., 2016. Determination of secondary metabolites and antioxidant activity of some boraginaceae species growing in Iran, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15, 2459.
95. Demir, S., Demir, E.A., Turan, İ. ve Ozgen, U., 2021. Evaluation of Cytotoxic Effect of *Onosma armeniacum* Extract on Various Cancer Cells, KSU J. Agric Nat, 24, 2, 252-259.
96. Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Eslami, B. ve Asgarirad, H., 2010. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Leonurus cardiaca* subsp. *Persicus*, *Grammosciadium platycarpum* and *Onosma demawendicum*, African Journal of Biotechnology, 9, 8865-8871.
97. Sagdic, O., Aksoy, A., Ozkan, G., Ekici, L. ve Albayrak, S., 2008. Biological activities of the extracts of two endemic *Sideritis* species in Turkey, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 9, 1, 80-84.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Funda ÇIRAK

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2003-2010

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, 2018-2022

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı, Petrol (Araştırma-Geliştirme) / Yaz Stajı
2. Almira Farma İlaç İmalat Paz. San. Tic. Ltd. Şti (2012-2014) Kalite Kontrol & AR-GE
3. Almira Farma İlaç İmalat Paz. San. Tic. Ltd. Şti (2014-2017) Üretim Müdürü

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Çırak F., Kayan B., Şöhretoğlu D., 2021. Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Farklı *Onosma* L. (Boraginaceae) Türlerinde Araştırılması, 4. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi, 6-7 Aralık 2021, Sözlü Sunum