

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



***STACHYS MEGALODONTA* SUBSP. *MEGALODONTA* BİTKİSİNİN
ANTİKOLİNESTERAZ, ANTİDİYABETİK, ANTİOKSİDAN VE
ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

FİKRİCAN BALCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)
Prof Dr. Ümit ÇAKIR
Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARASAKAL

BALIKESİR, OCAK-2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “*Stachys megalodonta* subsp. *megalodonta* Bitkisinin, Antikolinesteraz, Antidiyabetik, Antioksidan ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fikrihan BALCI

ÖZET

STACHYS MEGALODONTA SUBSP. MEGALODONTA BİTKİSİNİN, ANTİKOLİNESTERAZ, ANTİDİYABETİK, ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİKRİCAN BALCI

**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

(EŞ DANIŞMAN: DR. MEHMET EMİN DİKEN)

BALIKESİR, OCAK- 2023

Alzheimer hastalığı (AD) özellikle yaşlı nüfusu yüksek olan gelişmiş ülkeler için başlıca bir sorundur. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirikolinesteraz (BChE) inhibitörleri hastalığın tedavisi için umut verici bileşiklerdir. Bu çalışmada Lamiaceae familyasına ait *Stachys megalodonta* Hausskn. & Bornm. ex P.H.Davis subsp. *megalodonta* (SM) bitkisinin distile su ve etanol (EtOH) ekstraktlarının dana beyninden elde edilen AChE ve BChE enzimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ekstraktların, ticari olarak temin edilen α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki aktiviteleri çalışılmıştır. DPPH, ABTS, FRAP metodları ile bitkinin antioksidan aktivitesi çalışılmıştır. Ayrıca disk difüzyon yöntemi ve minimum inhibisyon konsantrasyonu yöntemi ile *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *E.coli* (ATCC 11303), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-9027) ve *Enterobacter aerogenes* (ATCC-13048) bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarında; SM bitkisinin AChE ve BChE üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bitkinin etanol ekstraktının AChE ve BChE enzimlerini sırasıyla $0,032\pm 0,002$ ve $0,042\pm 0,008$ IC₅₀ değerleri ile güçlü bir şekilde inhibe ettiği kaydedilmiştir. Bitkinin etanol ekstraktının α -amilaz ve α -glukosidaz enzimlerini sırasıyla $2,119\pm 0,005$ ve $3,891\pm 0,009$ IC₅₀ değerleri ile inhibe ettiği belirlenmiştir. DPPH ve ABTS deneylerinde etanol ekstraktının sırasıyla $1,501\pm 0,12$ ve $1,011\pm 0,09$ IC₅₀ değerleri ile nispeten güçlü antioksidan aktiviteleri kaydedilmiştir. Bitkinin etanol ekstraktının çalışılan bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği, su ekstraktının ise *E.coli* bakterisine karşı herhangi bir etki göstermediği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: *Stachys megalodonta* Hausskn. & Bornm. Ex P.H. Davis subsp. *megalodonta*, Asetilkolinesteraz, Bütirikolinesteraz, α -Amilaz, α -Glukosidaz, Antioksidan, Antibakteriyel, Lamiaceae

Bilim Kodu: 20603

Sayfa Sayısı: 52

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTICHOLINESTERASE, ANTIDIABETIC, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *STACHYS* *MEGALODONTA* SUBSP. *MEGALODONTA* PLANT

MSC THESIS

FIKRICAN BALCI

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOGAN)

(CO-SUPERVISOR: DR. MEHMET EMIN DIKEN)

BALIKESIR, JANUARY - 2023

Alzheimer's disease (AD) is a major problem especially for developed countries with a high elderly population. Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors are promising compounds for the treatment of the disease. In this study, the effects of *Stachys megalodonta* Hausskn. & Bornm. ex P.H.Davis subsp. *megalodonta* (SM) plant's distilled water and ethanol (EtOH) extracts belonging to the Lamiaceae family on AChE and BChE enzymes were investigated. The effect of the extracts on commercially available α -amylase and α -glucosidase enzymes were studied. The antioxidant activity of the plant was studied by DPPH, ABTS, FRAP methods. In addition, its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *E.coli* (ATCC 11303), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-9027) and *Enterobacter aerogenes* (ATCC-13048) bacteria was determined by disk diffusion method and minimum inhibition concentration method. In the results of the study; it has been determined that the SM plant has an inhibitory effect on AChE and BChE. It was noted that the ethanol extract of the plant strongly inhibited AChE and BChE enzymes with IC₅₀ values of 0.032±0.002 and 0.042±0.008, respectively. The ethanol extract of the plant has been shown to inhibit α -amylase and α -glucosidase enzymes with IC₅₀ values of 2.119±0.005 and 3.891±0.009, respectively. In DPPH and ABTS experiments, relatively strong antioxidant activities were recorded with IC₅₀ values of 1.501±0.12 and 1.011±0.09, respectively, of the ethanol extract. It was observed that the ethanol extract of the plant showed an antibacterial effect against the bacteria studied, while the water extract did not show any effect against the *E.coli* bacteria.

KEY WORDS: *Stachys megalodonta* Hausskn. & Bornm. ex P.H.Davis subsp. *megalodonta*, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, α -Amylase, α -Glucosidase, Antioxidant, Antibacterial, Lamiaceae

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı ve Kolinerjik Hipotez.....	1
1.2. Nörotransmitter ve Nöromodülatör Nedir.....	1
1.2.1. Asetilkolin	3
1.3. Alzheimer Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri	4
1.3.1. Lamiaceae Familyasındaki Kolinesteraz İnhibitörleri	4
1.4. Diabetes Mellitus	5
1.4.1. α -Amilaz ve α -Glukosidaz	6
1.4.2. Lamiaceae Familyası ve Antidiyabetik Aktivite	6
1.5. Reaktif Oksijen Türleri, Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres	6
1.6. Antibakteriyel Aktivite	10
1.7. Literatür Taraması	10
2. MATERYAL VE METOT	13
2.1. Kullanılan Kimyasallar	13
2.2. Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması.....	14
2.2.1. Tris-Sükroz Tamponunun Hazırlanması	14
2.2.2. Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması	14
2.2.3. Sodyum Fosfat Tamponunun Hazırlanması (pH:8,00).....	15
2.2.4. DTNB Çözeltisinin Hazırlanması.....	15
2.2.5. Asetilkolin Substrat Çözeltisinin Hazırlanması.....	15
2.2.6. Bütirilkolin Substrat Çözeltisinin Hazırlanması.....	15
2.2.7. α -amilaz Çözeltisinin Hazırlanması.....	15
2.2.8. α -glukosidaz Çözeltisinin Hazırlanması	15
2.2.9. Sodyum Fosfat Tamponunun Hazırlanması (pH:6,9).....	15
2.2.10. PNPG Çözeltisinin hazırlanması	16
2.2.11. DPPH Çözeltisinin Hazırlanması	16
2.2.12. Gallik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	16
2.2.13. ABTS Çözeltisinin Hazırlanması	16
2.2.14. FRAP Çözeltisinin Hazırlanması.....	16
2.2.15. Trolox Çözeltisinin Hazırlanması.....	17
2.2.16. Muller-Hinton Besiyerinin Hazırlanması.....	17
2.2.17. LB Broth Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	17
2.3. Deneysel Metot.....	17
2.3.1. Bitki Örneklerinin Toplanması.....	17
2.3.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	17
2.3.3. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Elde Edilmesi.....	18
2.3.4. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Aktivite Tayini.....	18

2.3.5. Stachys megalodonta bitkisinin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	18
2.3.6. Stachys megalodonta bitkisinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	19
2.3.7. Stachys megalodonta bitkisinin α -Glukosidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	19
2.3.8. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikal Tutucu Aktivitenin Belirlenmesi	19
2.3.9. ABTS metodu Radikal Tutucu Aktivitenin Belirlenmesi	20
2.3.10. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi.....	20
2.3.11. Stachys megalodonta Bitkisinin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi.....	20
3. BULGULAR	22
3.1. Stachys megalodonta Bitkisinin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	22
3.2. Stachys megalodonta Bitkisinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	23
3.3. Stachys megalodonta Bitkisinin α -Glukosidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri.....	24
3.4. Antioksidan Aktivite	25
3.4.1. DPPH Radikal Tutucu Aktivite	25
3.4.2. ABTS Metodu Radikal Tutucu Aktivite	26
3.4.3. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Aktivite	27
3.5. Stachys megalodonta Bitkisinin Antibakteriyel Aktivitesi	28
4. SONUÇ ve TARTIŞMA	30
4.1. Antikolinesteraz Aktivite	30
4.2. Antidiyabetik Aktivite	34
4.3. Antioksidan Aktivite	35
4.4. Antibakteriyel Aktivite	37
5. ÖNERİLER	40
6. KAYNAKÇA (IEEE).....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Presinaptik, nöron, sinaptik boşluk ve postsinaptik nöron.....	2
Şekil 1.2: Asetilkolin sentezi ve yıkımı.....	3
Şekil 1.3: Reaktif oksijen oluşumu.....	7
Şekil 1.4: Mitokondriyal süperoksit radikallerinin üretimi.....	8
Şekil 1.5: Reaktif oksijen türlerinin hücre hasarı üzerindeki etkisi.....	9
Şekil 3.1: SM EtOH ekstraktının AChE üzerindeki Etkisi.....	22
Şekil 3.2: SM Su ekstraktının AChE üzerindeki Etkisi.....	22
Şekil 3.3: SM EtOH ekstraktının BChE üzerindeki Etkisi.....	23
Şekil 3.4: SM Su ekstraktının BChE üzerindeki Etkisi.....	23
Şekil 3.5: SM EtOH ekstraktının α -amilaz üzerindeki etkisi.....	24
Şekil 3.6: SM Su ekstraktının α -amilaz üzerindeki etkisi.....	24
Şekil 3.7: SM EtOH ekstraktının α -glukosidaz üzerindeki etkisi.....	25
Şekil 3.8: SM Su ekstraktının α -glukosidaz üzerindeki etkisi.....	25
Şekil 3.9: Ekstraktların artan derişime bağlı % DPPH antioksidan aktiviteleri.....	26
Şekil 3.10: Ekstraktların artan derişime bağlı % ABTS+ antioksidan aktiviteleri.....	27
Şekil 3.11: Trolox standart eğrisi ve eğim çizgisi denklemi.....	27
Şekil 3.12: Ekstraktların <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> disk difüzyon sonuçları.....	28
Şekil 3.13: Ekstraktların <i>P. aeruginosa</i> ve <i>E. aerogenes</i> disk difüzyon sonuçları.....	28
Şekil 4.1: Bazı lamiaceae türlerinin etanol ekstraktlarının AChE üzerindeki inhibisyon aktiviteleri.....	32
Şekil 4.2: Lamiaceae familyasına ait farklı bitkilerin, farklı metodlar ile belirlenen antioksidan aktiviteleri.....	37
Şekil 4.3: Lamiaceae familyasına ait bazı bitkilerin EO'larının, bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları.....	38

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Kullanılan kimyasallar.....	13
Tablo 3.1: SM ekstraktlarının kolinesterazlar üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	23
Tablo 3.2: SM ekstraktlarının α -amilaz üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	24
Tablo 3.3: SM ekstraktlarının α -glukosidaz üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	25
Tablo 3.4: Ekstraktların DPPH radikal tutucu aktiviteleri üzerinden hesaplanan IC ₅₀ değerleri	26
Tablo 3.5: Ekstraktların ABTS metodu radikal tutucu aktiviteleri üzerinden hesaplanan IC ₅₀ değerleri.....	26
Tablo 3.6: SM ekstraktlarının trolox eşdeğerliği FRAP sonuçları.....	27
Tablo 3.7: Ekstraktların bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları.....	28
Tablo 3.8: Ekstraktların bakterilere karşı gösterdiği MİK değerleri.....	29

KISALTMALAR LİSTESİ

µg	: mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
BCh	: Bütirilkolin
BChE	: Bütirilkolinesteraz
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
ChAT	: Kolinasetil transferaz
dk	: Dakika
DM	: Diabetes mellitus
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoik Asit)
EO	: Esansiyel yağlar
EtOH	: Etanol
FeCl₃·6H₂O	: Demir III klorür
gr	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorür
IC₅₀	: %50'lik inhibitör konsantrasyonu
L	: Litre
M	: Molar
MeOH	: Metanol
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorürü
nm	: Nanometre
O₂	: Süperoksit radikali

O₃	: Ozon
°C	: Santigrat derece
OH	: Hidroksil
OSS	: Otonom sinir sistemi
PNPG	: 4-Nitrophenyl β-D-glucoopyranoside
pO₂	: Kısmi oksijen basıncı
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SM	: <i>Stachys megalodonta</i>
TPTZ	: 2,4,6-tri-2-pyridinyl-1,3,5-triazine
Tris	: Trizma-base
Tris-HCl	: Tris hidroklorür
UV	: ultraviyole

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimimin boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Serap DOĞAN'a sonsuz teşekkür ve hürmetlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen eş danışmanım Dr. Mehmet Emin DİKEN'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamın materyali olan bitki örneklerinin teşhis ve teminindeki katkılarından dolayı Dr. Özal GÜNER ve Dr. Öğr. üyesi Mikail AÇAR'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemdeki en büyük pay sahibi ve bu tezin ortaya çıkmasında beni sürekli cesaretlendiren sevgili annem Ayşe KINIKLI'ya şükranlarımı sunarım.

Balıkesir, 2023

Fikrican BALCI

1. GİRİŞ

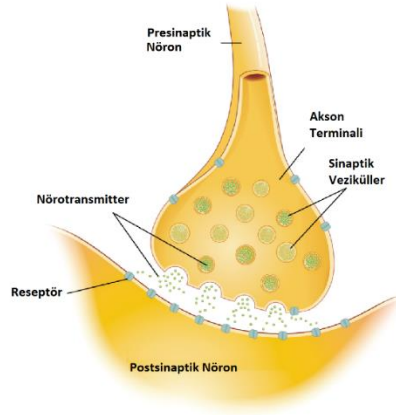
1.1. Alzheimer Hastalığı ve Kolinerjik Hipotez

Alzheimer hastalığı (AD) dejeneratif bir beyin hastalığı olarak tanımlanabilir ve demans hastalıklarının büyük bir kısmını oluşturur. Günlük yaşam gereksinimlerini yerine getirmede zorlanma, hafıza, dil, problem çözme ve diğer bilişsel yeteneklerle ilgili problemler hastalığın karakteristik semptomlarıdır. AD'de beyin ve nöronlar tamamen zarar görmekte veya tahrip olmaktadır. Hastalık nihayetinde ölümle sonuçlanır [1]. AD'ye neden olan faktörler için beş hipotez önerilmiştir. Bunlar kolinerjik hipotez, amiloid hipotezi, tau hipotezi, kalsiyum hipotezi ve izoprenoid değişim hipotezleridir [2].

Hastalığın tedavisi için üzerinde en çok durulan ve başarı yüzdesi yüksek olan kolinerjik hipotezdir [3]. Bu hipoteze göre kritik nörotransmitterler olan asetilkolin (ACh) ve bütirikolin (BCh) eksikliği nörotransmisyonun bozulmasına neden olur ve bilişsel bozuklukla sonuçlanır. Dolayısıyla ACh ve BCh düzeyi hastalığın tedavisi için belirleyici bir faktördür [4,5]. İnsan beyinde ACh ve BCh seviyesinin düzenlenmesinde asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) önemli rol oynar. AChE asetilkolini hidrolize eder. Pseudo-kolinesteraz olarak bilinen BChE de asetilkolini hidrolize edebilir. Bu kolinesterazların inhibisyonu beyindeki ACh ve BCh seviyesini artırır ve hastalığın semptomatik tedavisinde kullanılabilir. Bu nedenle birçok araştırma grubu bu enzimler için inhibe edici aktivite araştırmaları yapmıştır [2]. Güncel çalışmalar hastalığın ilerleyen safhalarında BChE'nin daha önemli bir rol oynadığını göstermiştir [6]. Halen galantamin, donepezil ve rivastigmin gibi AChE inhibitörleri hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [7]. Bu yüksek başarı oranına rağmen tıpta ve tarımda kullanılan karbamat türevi AChE inhibitörlerinin insan sağlığına olan zararları ve yan etkileri konusunda endişeler vardır [8]. Literatürde bu ilaçların bulantı, kusma gibi gastrointestinal sorunlarla halüsinasyon gibi diğer sistem yan etkileri oluşturduğuna dair bulgular mevcuttur[9].

1.2. Nörotransmitter ve Nöromodülatör Nedir

Nörotransmitterler, yakınlardaki diğer nöronlarla iletişim kurmak için nöronların sinir uçlarından salınan kimyasal habercilerdir. Nörotransmitterler, sinaptik boşluk ucundaki diğer nöronları uyarmak veya inhibe etmek için presinaptik nöronlardan salınır. (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Presinaptik, nöron, sinaptik boşluk ve postsinaptik nöron [10].

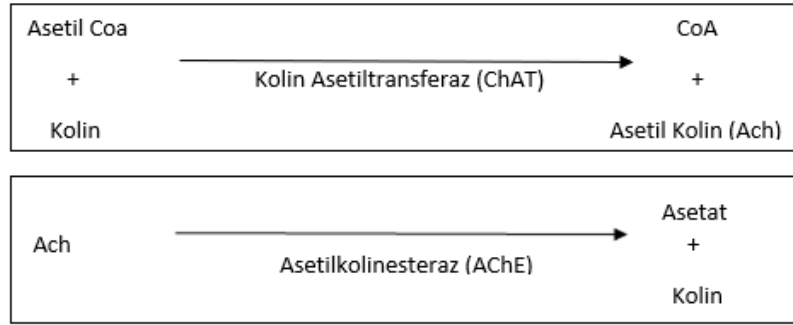
Nöromodülatörler, merkezi sinir sistemi ortamındaki nöronlar tarafından salınan ve uygun reseptörlerle farklı nöron gruplarını etkileyen kimyasal habercilerdir. Bu geniş aktivite yelpazesi, nöromodülatörler ve nörotransmitterler arasında ayırım sağlar. Bir nörotransmitter, kendisine bağlı tek postsinaptik nöronu doğrudan etkileyen yalnızca bir presinaptik nörona sahiptir [11]. Nöromodülatörler, nöromodülatör salınımının meydana geldiği komşu nöronları veya daha uzakta bulunan nöronları etkileyebilir. Bu, nöromodülatörlerin, nörotransmitterlerden daha yavaş etki ettiğini gösterir ve nörotransmitterlere kıyasla çok daha geniş bir etki yelpazesine sahip olduğu anlamına gelir. Nöromodülatörler, doğrudan iyon kanalı reseptörlerini aktive etmek yerine, nörotransmitterlerle uyum içinde hareket eden ve reseptörlerin uyarıcı veya inhibe edici tepkilerini güçlendiren maddelerdir [12].

Nöronların çeşitli organ ve dokulara sinyal gönderebilmeleri için diğer nöronlarla bağlantı kurmaları gerekir. Sinyaller, nöronlar içinde elektriksel olarak, nöronlar arasında kimyasal olarak iletilir. Birçok nörotransmitter, nöronların içindeki veziküllerde depolanır. Nöronun kendisinin uyarılmasından sonra veziküller nöronun terminaline yaklaşır ve iki nöron arasındaki sinaptik boşluğa salınır. Sinaptik boşlukta bulunan nörotransmitterler için; sinyalin iletileceği nöronda, nörotransmittere özgü bir reseptör varsa, sinyal ona bağlanır ve iletim gerçekleşir. Nörotransmitterler ve reseptörler arasındaki bu ilişki, anahtar-kilit modeline benzetilebilir. Nörotransmitterler bazı durumlarda gelen sinyallerin devamını sağlayabilirken bazı durumlarda da engelleyebilirler. Bir sinyalin devamını sağlayan nörotransmitterlere uyarıcı (eksitatör) nörotransmitterler denir. Sinyallerin iletimini engelleyen nörotransmitterlere ise engelleyici (inhibitör) nörotransmitterler denir [13]. Uyarıcı ve engelleyici nörotransmitterler olarak sınıflandırılrsa da nörotransmitterlerin etki mekanizmasını, bağlandıkları reseptörlerin tipi belirlemektedir. Asetilkolin ve dopamin, reseptör çeşitliliğine sahip nörotransmitterlerdendir. Bağlandıkları reseptör tipi onların

işlevlerini belirler [14]. İşlevini tamamlamış bir nörotransmitter başka bir nöron tarafından geri alınarak, etki alanından uzaklaştırılarak veya ortamdaki enzimler tarafından parçalanarak etkinliğini kaybedebilmektedir [15].

1.2.1 Asetilkolin

Asetilkolin sadece keşfedilen ilk nörotransmitter değil, aynı zamanda kendi grubunun tek üyesidir. Merkezi ve periferik sinir sistemleri üzerinde etkilidir [16]. Asetilkolin, Kolin Asetiltransferaz (ChAT) tarafından, koenzim A ve kolin moleküllerinin sentezinden oluşur. Kolin beyinde değil karaciğerde üretilir. Asetilkolin, nöronal hücre gövdelerinde ChAT enzimi tarafından sentezlenir ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından yıkılır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Asetilkolin sentezi ve yıkımı.

Düşük seviyeli alfa ve gama motor nöronlar, tüm otonom sinir sistemi (OSS) preganglionik nöronları, tüm parasempatik postgangliyonik nöronlar ve ter bezlerini inerve eden sempatik postgangliyonik nöronlar asetilkolin içerir. Asetilkolin, beyin Meynert bazal gangliyonlarında bulunur [17]. Aksonlar buradan serebral kortekse ulaşır. Burada asetilkolin, öğrenme (özellikle algılama) ve dikkat ile ilgili süreçlere katkıda bulunur. Medial septumdan hipokampüse giden kolinerjik yol sayesinde hafıza oluşumunda da rol oynar. Özellikle, bu nöronlardaki değişikliklerin Alzheimer demansından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Alzheimer hastalığı olan kişiler beyinlerindeki asetilkolinin %90'ını kaybetmişlerdir [18]. Sindirim sistemindekiler de dahil olmak üzere tüm kas hareketleri asetilkolin tarafından yürütülür. Öğrenme, duygu ve hafıza ile ilgili önemli rollere sahiptir. REM (rüya) uykusunun planlanmasında da rol oynar. Bunun yanı sıra sindirim, kalp atış hızı kontrolü, kan basıncı, hareket gibi birçok fonksiyonda önemli rol oynar [19]. Asetilkolin AChE tarafından parçalanır. Kolinesteraz inhibitörlerinin ortama eklenmesi, asetilkolinin

parçalanmasını önleyerek kolinerjik aktiviteyi artırır. Kolinesteraz inhibitörleri, Alzheimer hastalığı ve myastenia gravis gibi hastalıkları tedavi etmek için kullanılır [20].

1.3. Alzheimer Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri

Alzheimer hastalığı, 1907'de Alman nörolog Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. 51 yaşındaki bir hastanın otopsisini gerçekleştiren Alois Alzheimer, normalde çok yaşlı insanlarda bulunan kıvrımlı protein parçaları yığınları ve çok sayıda senil plak tanımlamıştır [21]. Hastanın yaşına ve senil plakların olağandışı sayısına dayanarak, Alois Alzheimer, bu yeni yumru yapılarıyla birlikte, bu hastalığın, aslında yaşlılarda normalde görülebilen zihinsel işlev ve duygusal dengeyi bozduğunu belirlemiştir [22]. Alzheimer hastalığı; neokortikal atrofi, nöron ve sinapsların kaybı ve hücre içi mekik tipi nörofibriler yapıların hücre dışı amiloid plaklarla oluşması nedeniyle ilerleyici beyin hasarına neden olan çok faktörlü bir hastalıktır [23]. Alzheimer hastalığında kolinerjik eksiklik ile zihinsel işlev bozukluğunun başlangıcı, seyri ve ilerlemesi arasında açık bir ilişki vardır [24]. Kolinerjik eksikliklere ek olarak ileri AD'de beyin ACh sentezinde %55-67'lik bir azalma meydana gelmektedir [25]. Kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile yakın ilişkisi nedeniyle ACh'yi sinaptik boşlukta daha uzun süre tutmak, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaçla semptomatik tedavide kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır [2].

Antikolinesteraz aktivitesine sahip bileşiklerin çoğunun, özellikle alkaloit taşıyanların azotlu bileşikler olduğu gerçeği vurgulanmıştır. Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin AD'de klinik uygulaması 1980'li yılların başında fizostigminin (Eserin) oral ve intravenöz olarak kullanılmasıyla başlamıştır. Bu ilaç grubunda bulunan ilk fizostigmin, bir tür bakla olan *Physostigma venenosum* L. (Fabaceae) adı verilen bitkiden izole edilmiş bir alkaloiddir. Phizostigmin (Synapton®), daha sonra sentezlenen asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesine (rivastigmin, Exelon®) sahip bazı ilaçlar için model oluşturmuştur [7].

1.3.1. Lamiaceae Familyasındaki Kolinesteraz İnhibitörleri

Terapötik olarak etkili bazı bitkiler, tedavilerde uzun süredir kullanılmaktadır. Örnek olarak Galantamin, kardelenden elde edilen bir alkaloidtir ve son zamanlarda Alzheimer tedavisinde kullanılmaktadır [26].

Lamiaceae familyasındaki bitkilerin geleneksel tıpta yüzyıllar boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkisel ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. *M. officinalis* ve *L. angustifolia* ağrı kesici ve antidepresan olarak oksidatif stres bozuklukları ve uyku düzeni bozukluğunda kullanılmıştır. Ayrıca bu bitkilerin antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları, sentetik antibiyotiklere kıyasla daha güvenilir ve ulaşılabilir oldukları bildirilmiştir [27-29]. *Melissa officinalis*'in hafif ve orta dereceli AD'li hastalarda bilişsel işlevi iyileştirdiği ve ajitasyonu azalttığı gösterilmiştir. Çalışmalar, *M. officinalis*'in merkezi sinir sisteminde hem nikotinik hem de muskarinik reseptörlere bağlanma özellikleriyle ACh reseptör aktivitesine neden olduğunu göstermiştir [30]. Lamiaceae familyası oldukça zengin terpen içeriğe sahiptir. Özellikle diterpen içeriğine bu familyada sıklıkla rastlanmaktadır [31]. Terpenler ise vücutta ilaç emilimini arttırmak için penetrasyon arttırıcılar olarak dikkat çekmekte ve son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır [32].

1.4. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), yetersiz insülin sekresyonu ve insülin direncine bağlı olarak kan şekerinin yükselmesi sonucu seyreden metabolik ve sistemik bir hastalıktır. En yaygın semptomlar, ağız kuruluğu, sık idrara çıkma, sürekli açlık hissi, el ve ayaklarda uyuşma, halsizlik ve idrar yolu enfeksiyonlarıdır [33]. Bu yaygın hastalığın bir sonucu olarak yaşam süresi ve kalitesi ciddi şekilde sınırlanır [34]. DM, kan şekeri düzeylerinin ya insülin olarak bilinen hormonun yetersiz salgılanmasından ya da pankreatik beta hücrelerinin hasar görmesinden kaynaklandığı kronik bir metabolik bozukluktur [35]. Çoğu durumda, hem azalmış insülin sekresyonu hem de insülin direnci diyabet gelişiminde rol oynar [36]. Vücudun ana enerji kaynağı olan glikoz, pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülin yardımıyla kan dolaşımından hücrelere girerek kan şekerini düşürür. Hastalık zamanla ilerledikçe, yetersiz insülin hormonu, kan şekeri seviyesini dengeleyemez ve bu durum birçok uzun vadeli mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara yol açabilir. Hastalığın sebep olduğu komplikasyonlar, doku ve organ kaybı ile sonuçlanır [37-38]. DM hastalığının üç ana tipi vardır. Tip 1, insüline bağımlı DM, pankreatik beta hücrelerinin T-hücresi aracılı yıkımı ve insülin sekresyonunda mutlak eksiklik ile karakterize olan otoimmün bir hastalıktır [39]. Daha yaygın olan tip 2 DM, pankreas tarafından insülin salgılanmasındaki göreceli yetersizlik ile hücrelerin üretilen insüline uygun şekilde yanıt vermediği insülin direncinin bir kombinasyonudur [40]. Tip 3 DM, hamile kadınlarda görülür, zor doğum riskine yol açan anormal boy fetüs ile karakterizedir [41].

1.4.1. α -Amilaz ve α -Glukosidaz

Tip 2 DM önlenebilir bir hastalık olduğu için, tip 1 DM'ye göre daha fazla ilgi görmekte ve çalışılmaktadır. Tip 2 diyabet, plazma glukoz seviyelerini kontrol etmeye yardımcı olan diyet ve yaşam tarzı değişiklikleri ile kontrol altında tutulabilir [42]. Bu durum iki şekilde mümkün olur. İlaç veya kontrollü diyet ile insülin sekresyonunu uyararak ve ince bağırsaktan kan şekeri emilim oranını azaltmak için nişastanın sindirimini keserek veya yavaşlatarak mümkündür [43]. Nişastanın sindirimini yavaşlatmak veya tamamen ortadan kaldırmak, nişasta sindiriminde birincil enzimler olan α -amilaz ve α -glukosidaz'ın inhibisyonu ile elde edilebilmektedir [44]. Akarboz, miglitol ve voglibose gibi ilaçlar, α -amilaz ve α -glukosidaz aktivitesini inhibe etmek için kullanılır. Ancak bu ilaçları kullanmanın gastrointestinal rahatsızlık gibi yan etkilerinden dolayı alternatif inhibitörlere ihtiyaç vardır [45].

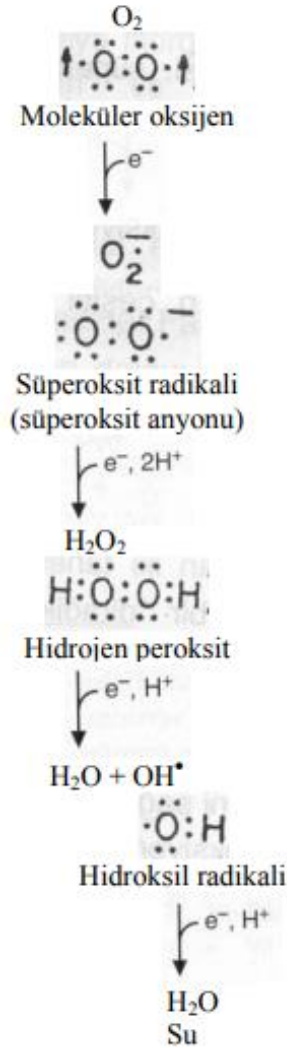
1.4.2. Lamiaceae Familyası ve Antidiyabetik Aktivite

Flavonoidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, terpenoidler, saponinler, tanenler, glikozitler, glikolipitler, diyet lifleri, karotenoidler ve çeşitli bitki molekülleri, farklı mekanizmalar yoluyla potansiyel antidiyabetik aktivite göstermiştir [46]. Flavonoidler ve diğer polifenoller, pankreatik β -hücrelerinde insülin salınımını ve ekspresyonunu arttırarak kan şekeri düşürücü aktiviteler gösterir [47]. Triterpenoidlerin, α -glukosidaz ve α -amilaz inhibisyonu yoluyla elde edilebilecek umut verici antidiyabetik özelliklere sahip olduğu görülmektedir [48]. Daha önce bahesildiği gibi Lamiaceae familyasında bulunan bitkiler, fenolik bileşikler ve terpenoidler bakımından oldukça zengindir [13].

1.5. Reaktif Oksijen Türleri, Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres

Serbest radikal, dış yörüngesinde eşlenmemiş bir elektron içeren ve bağımsız olarak var olabilen bir moleküldür. Serbest radikaller DNA'ya zarar verebilir. Hücredeki antioksidan savunma, serbest radikallerin ve buna bağlı reaksiyonların olumsuz etkilerini azaltabilir ve kontrol altında tutabilir. Hücrenin antioksidan savunması dışarıdan alınan besinler ile arttırılabilir [49]. Serbest radikallerin ve reaktif oksijen alınımının oksidatif strese neden olarak genetik bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıkları tetiklediği bildirilmiştir [50]. Reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil

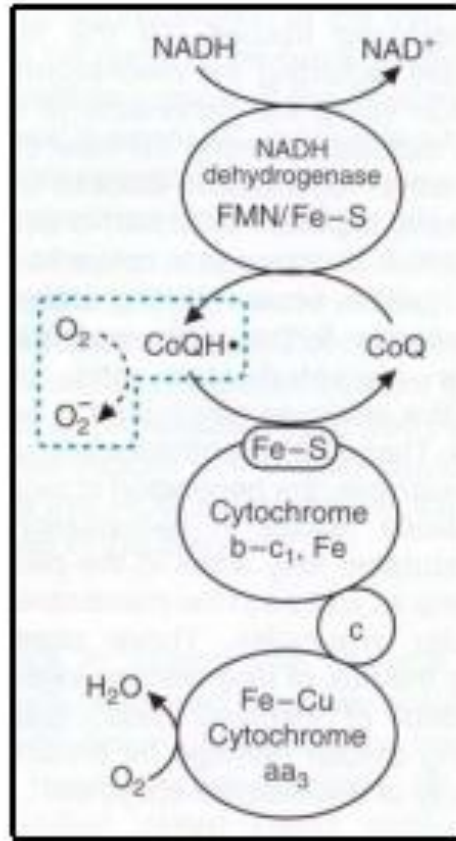
radikalidir (OH•) ve normal oksijen metabolizması sırasında küçük miktarlarda üretilir (şekil 1.3) [51].



Şekil 1.3: Reaktif oksijen oluşumu.

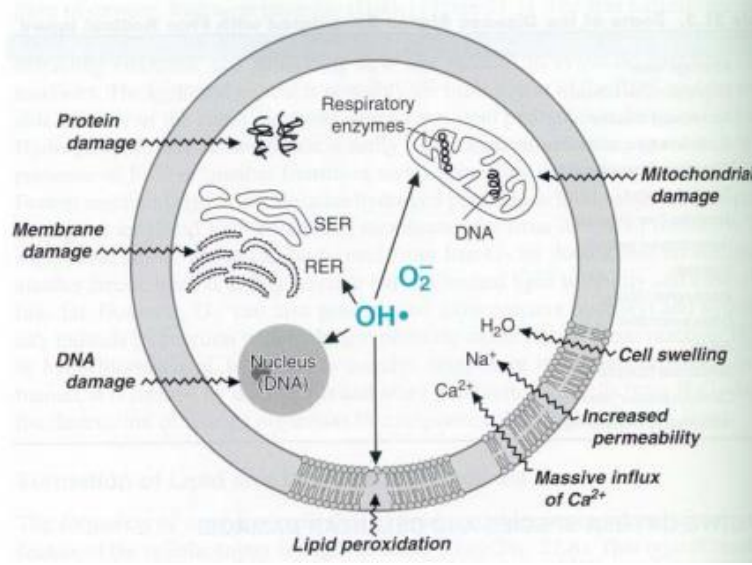
Reaktif oksijen türleri (ROS), karbon merkezli organik radikaller (R•), peroksit radikalleri (ROO•), alkoksi radikalleri (RO•), tiyil radikalleri (RS•) dahil olmak üzere çeşitli serbest radikallerin oluştuğu radikal zincir reaksiyonlarını başlatır. Sülfenil radikalleri (RSO•), tiyil peroksit radikali (RSO₂•) dahil olmak üzere çeşitli serbest radikallerin hücre içi oluşumuna sebep olurlar [52]. Hücrelerdeki normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlar sırasında, enzimlerin aktif merkezlerinde ara ürünler olarak serbest radikaller oluşur. Nadiren, bu serbest radikal ara maddeler enzimin aktif bölgesinden dışarı sızar ve istemeden moleküler oksijen ile etkileşerek nihai olarak serbest oksijen radikallerini oluşturur. Serbest radikal oluşumunun kaynağı, mitokondriyal elektron taşıma zincirinden kaynaklı sızıntıdır.

Mitokondriyal iç zardaki oksidatif fosforile zincir bileşenlerindeki önemli azalmalar, mitokondriyal süperoksit radikallerinin üretimini artırır (şekil 1.4) [53].



Şekil 1.4: Mitokondriyal süperoksit radikallerinin üretimi.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek kısmi oksijen basıncı (pO₂), ozon (O₃), nitrojen dioksit (NO₂), kimyasallar ve ilaçlar gibi tahrip edici etkilerle artar. Serbest radikaller, lipitler, proteinler, DNA, karbonhidratlar ve enzimler dahil olmak üzere tüm hayati hücre bağlantı noktalarına saldırır. Süperoksit radikalleri (O₂⁻) ve hidroksil radikalleri (OH•), sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum zarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membran lipid peroksidasyonu, membran geçirgenliğinin artmasına neden olur. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olur ve yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Tüm bu serbest oksijen radikali etkileri sonucunda hücre hasar meydana gelir. Artan hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller, hücre hasarının önemli nedenleridir (şekil 1.5) [54].



Şekil 1.5: Reaktif oksijen türlerinin hücre hasarı üzerindeki etkisi.

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücresel hasarın birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu inanılmaktadır. B. Ateroskleroz, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne kas distrofisi, preklampsi, rahim ağzı kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diyabet, akut böbrek yetmezliği, Down sendromu, Alzheimer hastalığı, Retrolental fibroz, serebrovasküler hastalıklar, iskemi/reperfüzyon hasarı gibi durumlarda, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur [55]. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve neden oldukları hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalara “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” denir. Antioksidanlar dört farklı şekilde çalışır.

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyen, onları tutan veya yeni, daha zayıf moleküllere dönüştüren bir süpürücü etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tür bir etki gösterir.
- 2) Serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girerek onlara hidrojen aktararak veya inaktif forma dönüştürerek aktivitelerini azaltan etkiye inhibitör etki denir. Vitaminler ve flavonoidler bu etkiye sahiptir.
- 3) Zincir kırma etkisi, serbest oksijen radikallerini yakalama ve işlevlerine müdahale etmek için zincirlerini kırma etkisidir. Hemogloblin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırma etkisi gösterir.

4) Serbest radikallerin neden olduğu hasarı onarmak ise onarıcı etki olarak adlandırılır [56]. Dışarıdan alınan besinler ve takviyeler ile hücrelerin antioksidan savunma kapasitelerini artırmak mümkündür [57].

1.6. Antibakteriyel Aktivite

Antibakteriyel aktivite testleri, incelenmekte olan bir maddenin bakteriyel büyüme üzerindeki etkisini belirlemek için kullanılır [58]. Penisilinin keşfiyle birlikte antibakteriyel aktiviteyi ölçmek için yapılan in vitro direnç testleri geliştirilmeye başlanmıştır [59].

Bakteriyel enfeksiyonlar, insanlar için önemli ve çoğu zaman tehlikeli enfeksiyonlar olduğundan, çeşitli kaynaklardan antibakteriyel ajanlar geliştirmek için araştırmalar hızla devam etmektedir [60]. Aromatik bitkiler, bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmaya yardımcı olan birçok fitokimyasal içerir [29]. Geleneksel tıpta kullanılan bitkiler, antimikrobiyal bileşiklerin yeni potansiyel kaynakları olduğundan, bunlarla ilgili bilimsel çalışmalar büyük önem taşımaktadır [27].

Antibakteriyel aktiviteyi ölçmek için birçok metot geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygını ise, uygulama kolaylığı ve etkinliğinden dolayı disk difüzyon yöntemidir. Bu yöntem, katı besiyerinde yetiştirilen bakterilerin üremesinin, besiyerine yerleştirilen diskler ve bu disklere emdirilmiş antibakteriyel ajanlar aracılığı ile inhibe edilmesi stratejisine dayanmaktadır. Antibakteriyel aktivite, disklerin etrafında oluşan zonların ölçülmesi ile belirlenir [58]. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testi, farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan eklenmiş sıvı besiyerinde büyütülen bakterilerin yoğunluğunun, spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bakteri gelişimini %100 engelleyen antimikrobiyal ajan konsantrasyonu, minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır [61].

1.7. Literatür Taraması

Lamiaceae familyasının büyük bir üyesi olan *Stachys* cinsi, Akdeniz, Asya, Amerika ve Güney Afrika'nın ılıman ve tropikal bölgelerinde yayılış gösteren 300'den fazla tür içerir [62]. Şimdiye kadar, cinsin en yerleşik ve kapsamlı sınıflandırması Bhattacharjee (1980) tarafından, *Betonica* L. ve *Stachys* L. olmak üzere iki alt cinse ayrılarak sunulmuştur [63].

Uluslararası literatürde, *Stachys* türleri, etnofarmakolojik kullanımlarını gerekçelendiren çeşitli fitokimyasal ve farmakolojik araştırmalar yoluyla geniş çapta incelenmiştir. Anti-enflamatuar, antioksidan, analjezik, renoprotektif, anksiyolitik ve antidepresan aktivite özelliklerinden dolayı farmakolojik olarak özel kabul edilir [64]. Bu nedenle, bu cins, bitkilerin farklı kısımlarından biyoaktif sekonder metabolitlerin taranmasında büyük ilgi görmektedir. Genel olarak, önemli kimyasal gruplara ait 200'den fazla bileşik, bu cinsin farklı türlerinden izole edilmiştir (terpenler, polifenoller, fenolik asitler, uçucu yağlar) [65]. Sonuç olarak, *Stachys* cinsine ait bitkiler, hem terapötik hem de ekonomik uygulamalarla mükemmel bir fitokimyasal kaynağı olarak kabul edilir.

S. Harada ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *S. sieboldii*'nin ("chorogi") yumrularından elde edilen sulu ekstrakt, nöroprotektif potansiyeli açısından fare modelinde *in vivo* olarak incelenmiştir [66]. Bu çalışmada, chorogi ekstraktının kutleal iskemi ve skopolamin kaynaklı hafıza bozukluğu üzerindeki etkileri incelenmiş ve *S. sieboldii*'nin iskemik beyin hasarı ile ilişkili öğrenme ve hafıza disfonksiyonunu iyileştirdiği kanıtlanmıştır.

Başka bir çalışmada, *S. lavandulifolia* ekstraktlarının ve bu ekstraktlara ait bileşiklerin kolinesteraz inhibe edici aktiviteleri incelenmiştir [67]. Bu çalışmada n-heksan ekstraktı, 0,014 mg/ml IC₅₀ değeri ile asetilkolinesteraz'a (AChE) karşı en aktif ekstrakt özelliği göstermiştir. Bununla birlikte, diklorometan ekstraktı, 0,144 mg/ml IC₅₀ değeri ile bütirikolinesteraz'a (BChE) karşı en etkili inhibitör etki göstermiştir. Metanol ekstraktı ise 0,211 mg/mL'lik bir IC₅₀ değeri ile AChE'ye karşı seçici bir inhibe edici aktivite sergilemiştir.

M. Ferhat ve arkadaşları, *S. guyoniana*'nın toprak üstü kısımlarının n-butanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarının antikolinesteraz aktivitelerini incelemiştir [68]. n-butanol ekstraktının AChE'ye karşı $5,78 \pm 0,01$ µg/ml IC₅₀ değerinde inhibitör etki gösterdiğini kaydetmişlerdir. Bu değer Alzheimer hastalığında kullanılan galantaminin $5,01 \pm 0,10$ µg/ml'lik IC₅₀ değerine çok yakındır. Ayrıca bu ekstraktın BChE'yi $39,1 \pm 1,41$ µg/mL IC₅₀ değeri ile pozitif kontrolden (IC₅₀ = $39,10 \pm 1,41$ µg/mL) daha iyi inhibe ettiğini göstermişlerdir.

M. B. Bahadori ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *S. cretica subsp.* ekstraktlarının anti-diyabetik aktivitesini değerlendirmiştir [69]. Bu çalışmada *S. cretica subsp.* bitkisinin metanol ekstraktının, α-amilaz karşısında 61.4 mg ACEs/g kuru bitki değeri ile ve α-glukosidaz

karşısında 47.8 mg ACEs/g kuru bitki değeri ile güçlü anti-diyabetik aktivite gösterdiğini kaydetmişlerdir. Antiglukosidaz aktivitesinin kafeik asit, transsinnamik asit ve vanilin ile ilişkili olduğunu ve amilaz inhibe edici aktivitenin kaempferol ve para-hidroksibenzoik asit ile ilişkili olduğunu, dolayısıyla güçlü antidiyabetik özelliklerin, metanol ekstraktının fenolik bileşen içeriği ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

M. Ferhat ve arkadaşları [68] yukarıda bahsedilen çalışmada, *S. guyoniana*'nın ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini β -karoten-linoleik asit, DPPH, ABTS, Cupric İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) ve metal şelatlama deneyleri ile çalışmışlardır. Kloroform ekstraktının, β -karoten-linoleik asitte $2,3 \pm 1,27$ $\mu\text{g/ml}$ IC₅₀ değeri ve ABTS yönteminde $7,29 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$ IC₅₀ değeri ile güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca n-butanol ekstraktının, DPPH testinde $2,91 \pm 0,14$ $\mu\text{g/ml}$ IC₅₀ değeri ile diğer ekstraktlar ve referans bileşik α -tokoferol (IC₅₀ = $7,31 \pm 0,17$ $\mu\text{g/ml}$) ile karşılaştırıldığında daha iyi antioksidan aktivite gösterdiğini kaydetmişlerdir.

A. Shakeri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada [70] *S. parviflora*'nın toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktının, 0,12 mg/mL MİK değeri ile Gram-pozitif bakteri *Bacillus cereus*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediğini bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada *S. thirkei* bitkisinin ekstraktlarının farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi, inhibisyon zon çapı değerine göre incelenmiştir [71]. Aseton ve metanol ekstraktının, *S. aureus*, *S. pyogenes* ve *E. coli*'ye karşı iyi aktivite gösterdikleri bildirilirken, *S. thirkei* ekstraktlarının, *P. aeruginosa* (Gram-negatif bakteri) ve *Candida albicans*'a (maya) karşı aktif olmadığı kaydedilmiştir.

E. M. Tomou ve arkadaşları, yaptıkları derleme çalışmasında *Stachys* cinsine ait bitkiler ile yapılmış çalışmalarını kapsamlı bir şekilde ele almışlardır [72]. Bu çalışma ve literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde *Stachys megalodonta* bitkisine ait benzer bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.

2. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada yapılan deneyler sırasında, aşağıdaki kimyasallar kullanılmıştır.

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Deneyler sırasında kullanılan kimyasalların Marka ve Cas numaraları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Marka	Cas No.
Ethanol (EtOH)	İsolab	64-17-5
Methanol (MeOH)	İsolab	67-56-1
Trizma base (Tris)	Merck	77-86-1
Sükroz	Merck	57-50-1
Tris hidroklorür (Tris-Hcl)	Merck	1185-53-1
Amonyum sülfat	İsolab	7783-20-2
Sodyum klorür (NaCl)	İsolab	7647-14-5
5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoik Asit) (DTNB)	Merck	69-78-3
Asetilkolin klorür	Merck	60-31-1
Bütirilkolin iyodid	Merck	1866-16-6
Sodyum fosfat	İsolab	7558-79-4
Sodyum bikarbonat	İsolab	144-55-8
Alpha amylase (α -Amilaz)	Merck	9000-85-5
Nişasta	İsolab	9005-84-9
Dinitro salisilik asit	Merck	609-99-4
Alpha glucosidase (α -Glukosidaz)	Merck	9001-42-7
P-Nitrofenil-A-D-Glikopiranosid (PNPG)	Merck	10344-94-2
Muller-Hinton agar	Merck	-
LB broth	Merck	-
1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH)	Merck	1898-66-4
Sodyum asetat trihidrat	İsolab	6131-90-4

Tablo 2.1 (devam)

Kimyasal	Marka	Cas No.
Asetik asit	Merck	64-19-7
2,4,6-Tri-2-Pyridinyl-1,3,5-Triazine(Tptz)	Merck	3682-35-7
Hidroklorik Asit (HCl)	İsolab	7647-01-0
Nitrik asit	İsolab	7697-37-2
Sodyum Hidroksit (NaOH)	İsolab	1310-73-2
Demir Iıı Klorür ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	Merck	10025-77-1
Trolox	Merck	53188-07-1
Linoleik Asit	Merck	60-33-3
Tween 20	Merck	9005-64-5
2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt (ABTS)	Merck	30931-67-0
Potasyum persülfat	Merck	7727-21-1

2.2. Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.1. Tris-Sükroz Tamponunun Hazırlanması

6,057 gr Tris, behere aktarılarak üzerine 850 ml distile su eklenir. Sulu çözelti manyetik karıştırıcıda homojenize edilir. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan çözeltiliye 102,69 gr sükroz eklenir. Homojenize olan çözeltinin PH'sı, 4N NaOH kullanılarak 7,40'a ayarlanır. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1 litreye (1 L) tamamlanır.

2.2.2. Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması

1,97 gr Tris-HCl, behere aktarılarak üzerine 200 ml distile su eklenir. Sulu çözelti manyetik karıştırıcıda homojenize edilir. Üzerine 20,53 gr Sükroz ve 1,75 gr NaCl eklenir. Homojenize olan çözeltinin PH'sı %10 Nitrik asit kullanılarak 8,0'a ayarlanır. Çözeltinin son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

2.2.3. Sodyum Fosfat Tamponunun Hazırlanması (pH:8,0)

14,196 gr Sodyum fosfat, behere aktarılarak üzerine 950 ml distile su eklenir. Sulu çözelti manyetik karıştırıcıda homojenize edilir. Homojenize olan çözeltinin PH'sı 4N NaOH kullanılarak 8,0'a ayarlanır. Çözeltinin son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

2.2.4. DTNB Çözeltisinin Hazırlanması

0,04 gr DTNB (10 mM), 10 ml balon joje içerisine alınır. Üzerine 0,015 gr sodyum bikarbonat eklenir. Balon joje içerisindeki kimyasalların son hacmi Sodyum fosfat tamponu (100 mM, PH:8,0) ile 10 ml'ye tamamlanır.

2.2.5. Asetilkolin Substrat Çözeltisinin Hazırlanması

0,14 gr Asetilkolin klorür (75 mM), 10 ml balon joje içerisine alınır. Balon joje içerisindeki kimyasalın son hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

2.2.6. Bütirikolin Substrat Çözeltisinin Hazırlanması

0,24 gr Bütirikolin iyodid (75 mM), 10 ml balon joje içerisine alınır. Balon joje içerisindeki kimyasalın son hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

2.2.7. α -amilaz Çözeltisinin Hazırlanması

0,238 gr sodyum fosfat, 100 ml'lik behere alınır ve üzerine 90 ml distile su eklenir. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan çözeltiliye 0,035 gr NaCl eklenir. Homojenize olan çözeltini PH'sı 4N NaOH kullanılarak 6,9'a ayarlanır ve çözeltiliye 0,05 gr α -amilaz eklenir. Çözeltinin son hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2.2.8. α -glukozidaz Çözeltisinin Hazırlanması

α -glukozidaz stok enzimi üzerinden şu şekilde hesaplanır;

$$(\text{Stok U}) \times (\text{Y mg}) = (10 \text{ U}) \times (\text{Stok mg})$$

Y mg α -glukozidaz 10 ml balon jeye alınır ve son hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

2.2.9. Sodyum Fosfat Tamponunun Hazırlanması (pH:6,9)

3,549 gr Sodyum fosfat, behere aktarılarak üzerine 240 ml distile su eklenir. Sulu çözelti manyetik karıştırıcıda homojenize edilir. Homojenize olan çözeltinin PH'sı 4N NaOH kullanılarak 6,9'a ayarlanır. Çözeltinin son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

2.2.10. PNPG Çözeltisinin Hazırlanması

0,078 gr PNPG 50 ml'lik balonjojeye alınır ve son hacmi, 100 mM PH:6,9 fosfat tamponu ile 50 ml'ye tamamlanır.

2.2.11. DPPH Çözeltisinin Hazırlanması

0,024 gr DPPH reaktifi, 100 ml balon joje içerisine alınır. Balon joje içerisindeki kimyasalın son hacmi MeOH ile 100 ml'ye tamamlanır.

2.2.12. Gallik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg gallik asit, 10 ml'lik balon joje içerisine alınır. Son hacim 10 ml olacak şekilde distile su eklenir.

2.2.13. ABTS Çözeltisinin Hazırlanması

0,384 gr ABTS tuzu behere aktarılarak üzerine 90 ml distile su eklenir. Sulu çözelti manyetik karıştırıcıda homojenize edilir. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan çözeltiye 0,065 gr potasyum persülfat eklenir. Homojenize olan çözeltinin son hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Elde edilen çözelti 734 nm'de 1.50 ± 0.001 absorbans elde dilene kadar MeOH ile seyreltilir.

2.2.14. FRAP Çözeltisinin Hazırlanması

Çözelti A (300 mM Asetat tamponu, PH: 3,6): 20,412 gr sodyum asetat 500 ml'lik behere alınır ve üzerine 450 ml distile su eklenir. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan çözeltiye 8 ml asetik asit (1M) eklenir. Homojenize olan çözeltinin PH'sı %38'lik HCl ile 3,6'ya ayarlanır ve son hacmi distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Çözelti B (40 mM HCl içinde 10 mM TPTZ tamponu): 50 ml'lik bir behere 25 ml distile su eklenir. Üzerine yavaş bir şekilde, 1M'lık HCl stoğundan 2 ml eklenir. Karışımın hacmi dişte su ile 45 ml'ye getirilir. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan çözeltiye 0,167 gr TPTZ eklenir. Çözeltinin son hacmi distile su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Çözelti C (20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 0,27 gr Demir III Klorür, 50 ml'lik behere alınır ve üzerine 45 ml distile su eklenir. Manyetik karıştırıcıda homojenize edilen çözeltinin son hacmi distile su ile 50 ml'ye tamamlanır. 25 ml Çözelti A ve 2,5 ml Çözelti B karıştırılır. Karışımın üzerine 2,5 ml Çözelti C eklenir. Elde edilen karışım 37 °C'de 30 dk süre ile inkübe edilir. Çözeltinin son hali FRAP çözeltisi olarak adlandırılır [73].

2.2.15. Trolox Çözeltisinin Hazırlanması

0,025 gr Trolox, Son hacim 10 ml olacak şekilde distile su ile çözdürülür. Elde edilen Çözeltiden 1 ml alınır ve üzerine 9 ml distile su eklenir.

2.2.16. Muller-Hinton Besiyerinin Hazırlanması

34 gr Dehidre besiyeri, vida kapaklı otoklav şişesine alınır. Son hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile sulandırılır. Elde edilen karışım 90 °C su banyosunda ısıtılarak homojen hale getirilir. Karışım, otoklavda 115 °C'de 10 dakika sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan karışımın oda sıcaklığında ılıması beklenir. Yaklaşık 50 °C'ye kadar ısınan karışım, bek alevi altında steril petri kaplarına 12'şer mL dökülür. Petri kaplarındaki besiyerinin ağızları kapalı şekilde, oda sıcaklığında donması sağlanır. Hazırlanan besiyerlerinin etrafı parafilm ile sarılarak daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırılır.

2.2.17. LB broth Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

25 gr dehidre besiyeri 1 litre distile suda eritilir 121 °C' da 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Hazırlanan besiyeri steril tüplere bek alevi altında 10'ar ml dağıtılır.

2.3. Deneysel Metot

2.3.1. Bitki Örneklerinin Toplanması

Stachys megalodonta türü çiçeklenme döneminde Dr. Özal GÜNER tarafından yayılış alanından toplanmıştır. Bitkilerin tür tayini, Dr. Öğr. üyesi Mikail AÇAR (Munzur Üniversitesi Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü) tarafından gerçekleştirilmiştir. Taze olarak toplanan örnekler aynı zamanda herbaryum materyali haline getirilip muhafaza altına alınmıştır.

2.3.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bitki örnekleri oda sıcaklığında karanlık bir ortamda kurutuldu ve mekanik bir öğütücü kullanılarak toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş bitkiden üç adet 0.5'er gram alındı ve üzerlerine 5 ml çözücüler (etanol, distile su) eklendi. Numuneler bir çalkalayıcı etüvde 10°C'de gece boyunca tutuldu. Numuneler daha sonra etüvden çıkarıldı ve 5000 g'de 10 dakika santrifüjlendi, süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı. Tüpte kalan çökeltiler, solventler ile tekrar kapatılarak işlem tekrarlandı. Nihai süpernatantlar, 1 µm'lik mikrofiltreler ile süzüldü ve çözücüler, evaporatör yardımı ile vakum altında 37°C'de buharlaştırılarak

uzaklaştırıldı. Nihai toz ekstraktlar, kendi çözücüleri ile 10 mg/ml'lik bir konsantrasyona seyreltildi ve inhibisyon deneylerinde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı [74].

2.3.3. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada kolinesteraz kaynağı olarak dana beyni kullanılmıştır. Beyin, mezbahane kesiminden hemen sonra uygun bir taşıma kabı ile laboratuvara getirilmiştir. 10 gr dana beyni, 50 mL Tris tamponu (bölüm 2.2.1.) içerisinde çelik bıçaklı homojenizatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 10 dakika 1000 g' de santrifüj edilip süpernatant alınmıştır. Elde edilen süpernatant, 10 dakika 5000 g'de santrifüjlenmiştir. Nihai süpernatantın aktivite tayini gerçekleştirilmiş ve AChE ve BChE kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.3.4. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Aktivite Tayini

Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz enzimlerinin aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 2.7 ml Tris-HCl tamponuna (bölüm 2.2.2), 90 µl DTNB çözeltisi, 150 µl asetilkolin/bütirilkolin substrat çözeltisi ilave edildi ve 37 °C'de 5 dk inkübe edildi. UV visible spektrofotometre ile 412 nm'de ölçümler yapıldı. Daha sonra 60 µl enzim çözeltisi eklendi ve 37 °C'de 5 dk inkübe edilerek 412 nm'de ölçüm yapıldı. Kör olarak kullanılan çözeltilere substrat yerine distile su eklenmiştir. ACh'nin hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinler, DTNB ile reaksiyona girerek 5-tio-2-nitrobenzoat anyonunu oluşturur. Oluşan sarı renkli bileşik 412 nm dalga boyunda maksimum absorban verir [75].

2.3.5. *Stachys megalodonta* Bitkisinin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri Ellman tarafından geliştirilen yöntem ile yapılmıştır [76]. Kısaca 140 µl sodyum fosfat tamponu (bölüm 2.2.3.), 20µl DTNB çözeltisi, 20 µl ekstrakt çözeltisi (10 mg/ml), 20 µl enzim çözeltisi 96 kuyucuklu mikropate'e yüklenmiştir. 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra 10µl asetilkolin/bütirilkolin substrat çözeltilerinin eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Mikropate bir mikropate okuyucuya yüklenerek 412 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Etki grafiği elde etmek için ekstrakt çözeltisi miktarı her ölçümde değiştirilmiştir (5-25 µl).

Ekstrakt miktarlarına göre reaksiyonun son hacmi 210 µl olacak şekilde sodyum fosfat tampon miktarı da değiştirilmiştir.

2.3.6. *Stachys megalodonta* Bitkisinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

0.5 mg/mL α -amilaz içeren 500 µL 0.02 M sodyum fosfat tamponuna (bölüm 2.2.7) değişen miktarlarda bitki ekstraktları (0-200 µL) eklenmiş ve 25°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 500 µl, %1'lik nişasta çözeltisinden eklenerek 10 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 1 ml dinitro salisilik asit ilave edilmiş ve karışım su banyosunda kaynatılarak reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon karışımı soğuduktan sonra 10 ml distile su ilave edilmiş ve 540 nm'de absorbans okuması gerçekleştirilmiştir [77]. Bitki ekstraktı içermeyen reaksiyon karışımlarının absorbans değerleri %100'lük aktivite değerleri olarak kullanılmıştır ve bitki ekstraktlarının inhibisyon konsantrasyonları bu değerler üzerinden hesaplanmıştır.

2.3.7. *Stachys megalodonta* Bitkisinin α -Glukosidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

100 µL α -glukozidaz çözeltisi (bölüm 2.2.8), 500 µl 100 mM fosfat tamponuna (bölüm 2.2.9) eklenmiş ve bitki ekstraktları değişen miktarlarda (0–200 µL) karışıma ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 25°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 50 µL PNPG çözeltisi (bölüm 2.2.10) ilave edilmiş ve karışım, 5 dakika boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımlarının 405 nm'de absorbansları ölçülmüştür [77]. Bitki ekstraktı içermeyen karışımlara %100 aktivite değeri verilerek ekstraktların inhibisyon konsantrasyonları hesaplanmıştır.

2.3.8. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikal Tutucu Aktivitenin Belirlenmesi

Ekstraktların radikal tutucu aktiviteleri, DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [78]. Bitki ekstraktları ve gallik asit çözeltisi (bölüm 2.2.12) değişen konsantrasyonlarda (1-25 µl) 96-well plate kuyucuklarına yüklenmiş ve 200 µl DPPH reaktifi (bölüm 2.2.11) eklenmiştir. Kuyucukların son hacimleri distile su kullanılarak 250 µl'ye getirilmiştir. Well plate'ler 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Kontrol olarak %80'lik metanol çözeltisi kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda 517 nm'de

absorbans ölçümü yapılmıştır. Radikal tutucu aktivite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Antioksidan Aktivite (\%)} = [1 - (\text{örneğin absorbansı} / \text{kontrolün absorbansı})] \times 100$$

2.3.9. ABTS metodu Radikal Tutucu Aktivitenin Belirlenmesi

Ekstraktların ABTS radikal tutucu aktivitesi Re ve ark. (Re et al. 1999) tarafından geliştirilen metot ile gerçekleştirilmiştir [79]. Bitki Ekstraktları ve gallik asit 96-well plate'in kuyucuklarına değişen miktarlarda (1-25 µl) yüklenmiştir ve her kuyucuğa 200 µl ABTS reaktifi (bölüm 2.2.13) eklenmiştir. Kuyucukların son hacimleri distile su kullanılarak 250 µl'ye getirilmiştir. Well plate'ler 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Kontrol olarak %80'lik metanol çözeltisi kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda 734 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır ve radikal tutucu aktivite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Antioksidan Aktivite (\%)} = [1 - (\text{örneğin absorbansı} / \text{kontrolün absorbansı})] \times 100$$

2.3.10. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Bitki ekstraktları ve trolox çözeltisi (bölüm 2.2.15) 96- well plate'e değişen miktarlarda (5-50 µl) eklenmiştir ve son hacim 300 µl olacak şekilde FRAP çözeltisi (bölüm 2.2.14) ile tamamlanmıştır. Örneklerin 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbansı mikropate okuyucu ile 593 nm'de ölçülmüştür. Trolox absorbansları kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur ve bitki ekstraktlarının trolox eşdeğeri antioksidan aktivitesi, oluşturulan bu eğrinin denklemi kullanılarak hesaplanmıştır [80].

2.3.11. *Stachys megalodonta* Bitkisinin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Antibakteriyel aktivite tayini için disk difüzyon metodu kullanılmıştır [58]. Bu yöntem gere, steril disklere *S. megalodonta* bitkisinin ekstraktları emdirilmiştir. Ekstraktların içine konulan diskler bir gece +4 °C' de bekletilmiştir. 0,5 McFarland olacak şekilde hazırlanmış bakteri çözeltileri *S. aureus* (ATCC-25923), *E. coli* (ATCC-11303), *P. Aeruginosa* (ATCC-9027) ve *E. aerogenes* (ATCC-13048) muller-hinton besiyerine (bölüm 2.2.16) yayma ekim

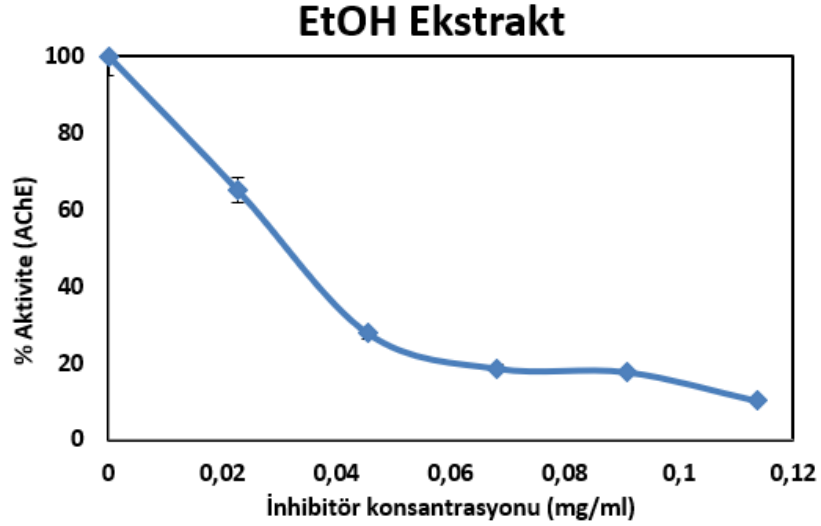
olarak ekilmiş ve diskler besiyerlerine yerleştirilmiştir. Bir gece inkübasyon sonuncunda disklerin etrafında oluşan zon çapları ölçülmüş ve bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir.

Ayrıca ekstraktların minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir [61]. Bu yöntemle göre 0,5 McFarland olacak şekilde hazırlanmış bakteri çözeltileri 10 ml'lik sıvı besiyerlerine (bölüm 2.2.17) 100'er µl eklenmiş ve besiyerlerine değişen konsantrasyonlarda (0-200 µl) ekstraktlar eklenmiştir. Bir gece inkübasyon sonrasında mikropate okuyucu ile 650 nm'de dalga boyu taraması yapılarak, bakteri gelişimini %100 engelleyen konsantrasyonlar, minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir.

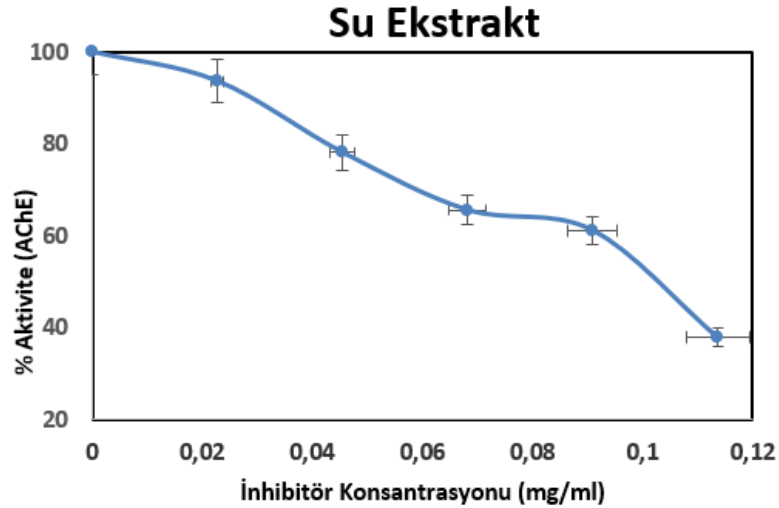
3. BULGULAR

3.1. *Stachys megalodonta* Bitkisinin Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

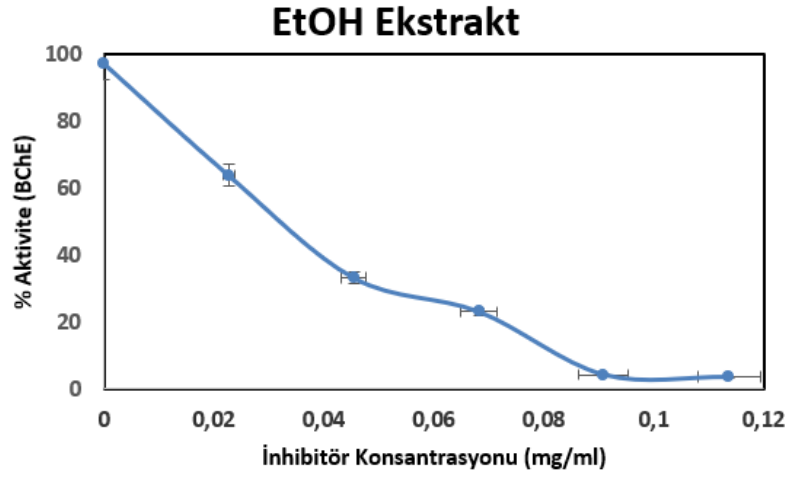
SM bitkisinin kolinesteraz enzimleri üzerindeki etkisi spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. İnhibisyon grafikleri Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te verilmiştir. Grafikler üzerinden hesaplanan IC₅₀ değerleri, tablo 3.1'de verilmiştir.



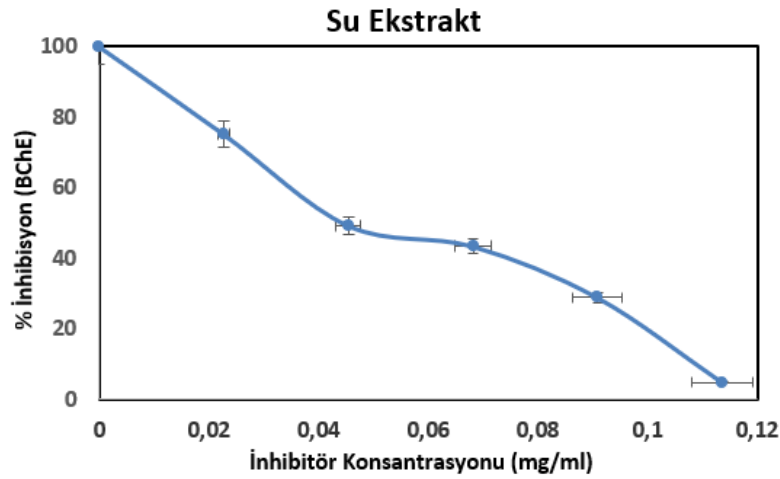
Şekil 3.1: SM EtOH ekstraktının AChE üzerindeki Etkisi.



Şekil 3.2: SM Su ekstraktının AChE üzerindeki etkisi.



Şekil 3.3: SM EtOH ekstrektının BChE üzerindeki etkisi.



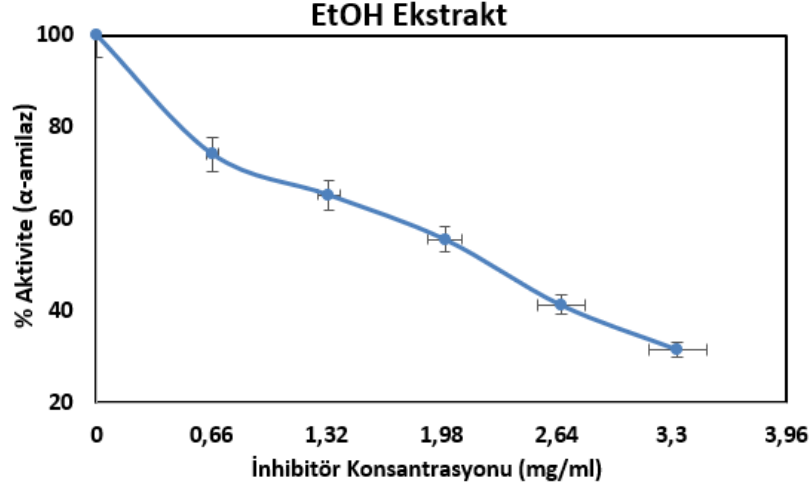
Şekil 3.4: SM Su ekstrektının BChE üzerindeki etkisi.

Tablo 3.1: SM ekstrektlarının kolınesterazlar üzerindeki IC₅₀ değeri.

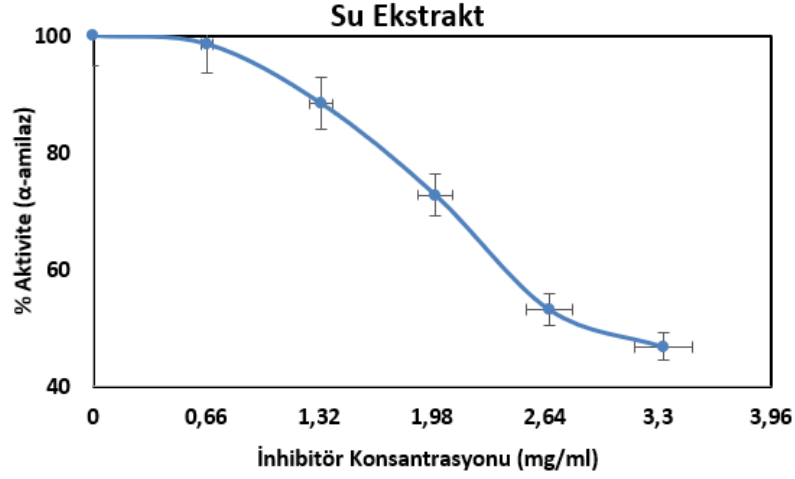
Ekstrekt	AChE IC ₅₀ (mg/ml)	BChE IC ₅₀ (mg/ml)
EtOH	0,032±0,002	0,042±0,008
Su	0,117±0,018	0,051±0,004

3.2. *Stachys megalodonta* Bitkisinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

SM bitkisinin α -Amilaz üzerindeki etkisi spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. İnhibisyon grafikleri şekil 3.5 ve şekil 3.6'da verilmiştir. Grafikler üzerinden hesaplanan IC₅₀ değeri, tablo 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.5: SM EtOH ekstraktının α -amilaz üzerindeki etkisi.



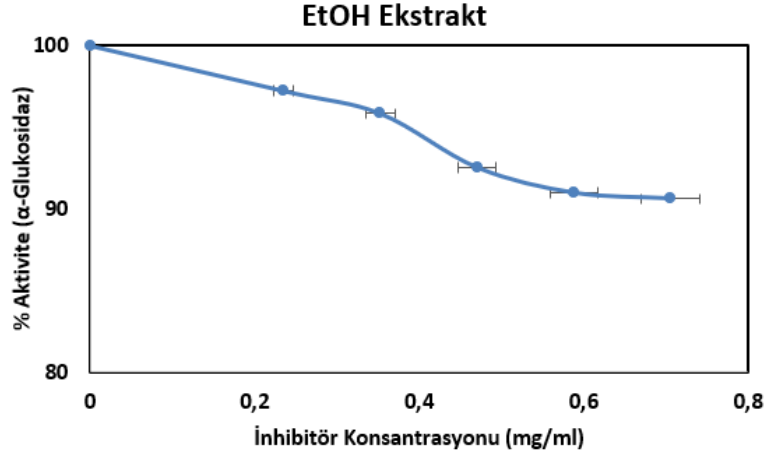
Şekil 3.6: SM Su ekstraktının α -amilaz üzerindeki etkisi.

Tablo 3.2: SM ekstraktlarının α -amilaz üzerindeki IC_{50} değerleri.

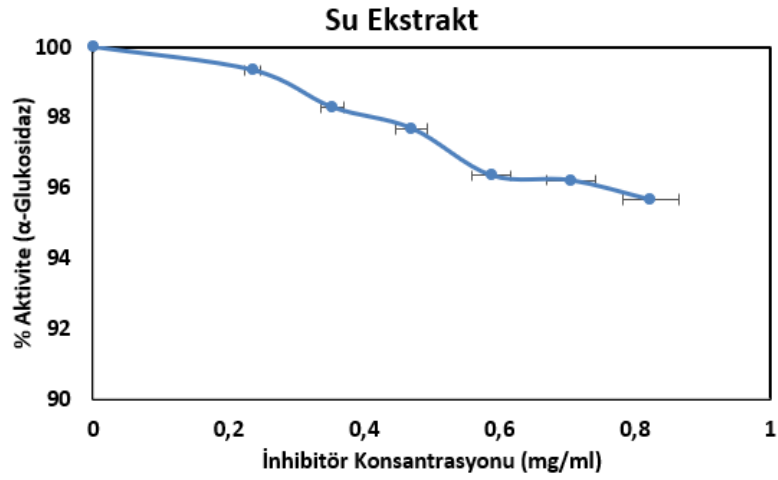
Ekstrakt	IC_{50} (mg/ml)
EtOH	2,119±0,005
Su	2,839±0,192

3.3. *Stachys megalodonta* Bitkisinin α -Glukosidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

SM bitkisinin α -Glukosidaz üzerindeki etkisi spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. İnhibisyon grafikleri şekil 3.7 ve şekil 3.8’de verilmiştir. Grafikler üzerinden hesaplanan IC_{50} değerleri, tablo 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.7: SM EtOH ekstraktının α -glukosidaz üzerindeki etkisi.



Şekil 3.8: SM Su ekstraktının α -glukosidaz üzerindeki etkisi.

Tablo 3.3: SM ekstraktlarının α -glukosidaz üzerindeki IC_{50} değerleri.

Ekstrakt	IC_{50} (mg/ml)
EtOH	3,891 \pm 0,009
Su	5,617 \pm 0,087

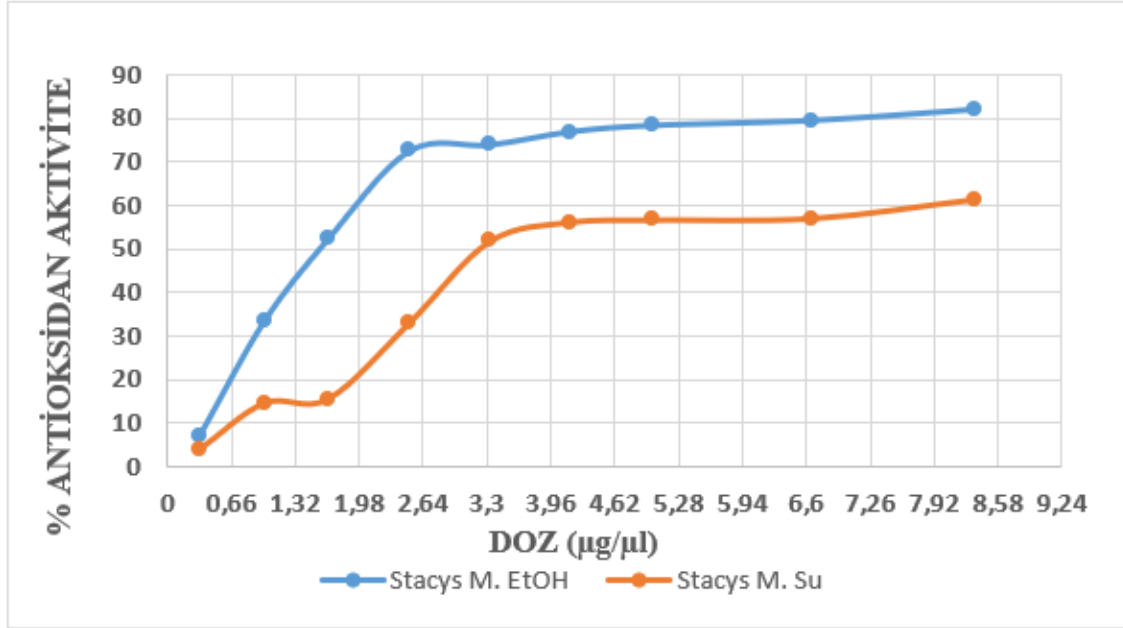
3.4. Antioksidan Aktivite

3.4.1. DPPH Radikal Tutucu Aktivite

SM bitkisinin DPPH radikal tutucu aktivite sonuçları üzerinden hesaplanan IC_{50} değerleri tablo 3.4'te verilmiştir. Ekstraktların % antioksidan aktivitelerinin artan derişime bağılı değişimi şekil 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.4: Ekstraktların DPPH radikal tutucu aktiviteleri üzerinden hesaplanan IC₅₀ değerleri.

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/µl)
Etanol	1,501±0,12
Su	1,868±0,007
Gallik asit	0,009±0,0



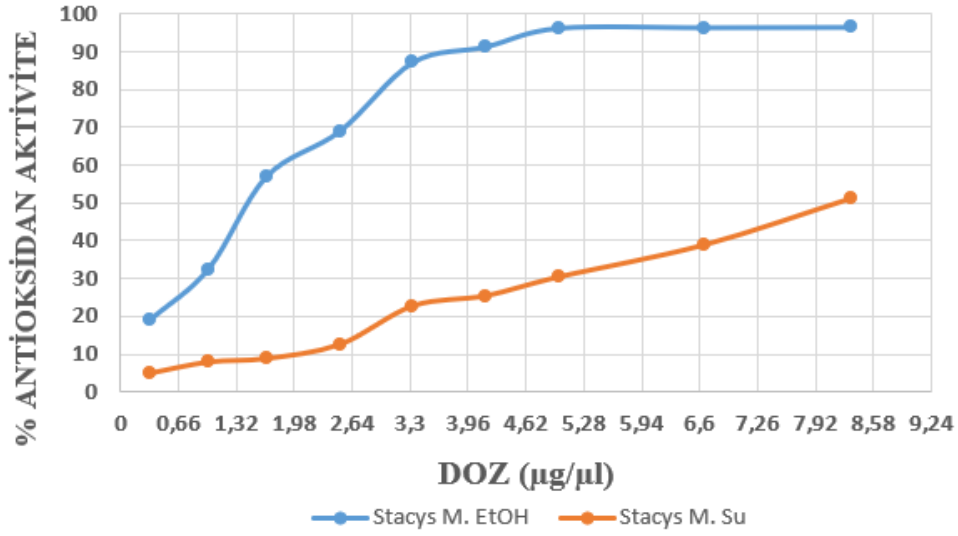
Şekil 3.9: Ekstraktların artan derişime bağlı % DPPH antioksidan aktiviteleri.

3.4.2. ABTS Metodu Radikal Tutucu Aktivite

SM bitkisinin ABTS metodu radikal tutucu aktivite sonuçları üzerinden hesaplanan IC₅₀ değerleri tablo 3.5'te verilmiştir. Ekstraktların % antioksidan aktivitelerinin artan derişime bağlı değişimi şekil 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.5: Ekstraktların ABTS metodu radikal tutucu aktiviteleri üzerinden hesaplanan IC₅₀ değerleri.

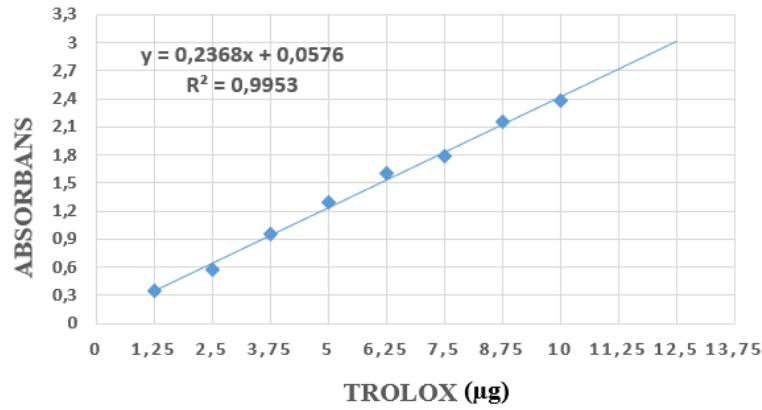
Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/µl)
Etanol	1,011±0,09
Su	2,986±0,04
Gallik asit	0,003±0,0



Şekil 3.10: Ekstraktların artan derişime bağlı % ABTS⁺ antioksidan aktiviteleeri.

3.4.3. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Aktivite

SM ekstraktlarıyla yapılan FRAP testi sonuçlarına göre, trolox eşdeğeri antioksidan aktiviteleeri hesaplanmış ve tablo 3.6’da verilmiştir. Hesaplamalarda kullanılan standart eğri grafiği ve denklemi Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11: Trolox standart eğrisi ve eğim çizgisi denklemi.

Tablo 3.6: SM ekstraktlarının trolox eşdeğerliği FRAP sonuçları.

Ekstrakt	Trolox Eşdeğerliği (µg/g)
Etanol	61,45±0,34
Su	29±0,681

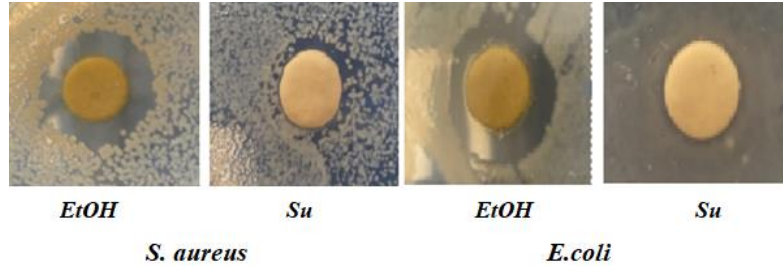
3.5. *Stachys megalodonta* Bitkisinin Antibakteriyel Aktivitesi

SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının gram (+) *Staphylococcus aureus* bakterisine ve gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes* bakterilerine karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve SM bitkisinin etanol ekstraktının gram (-) *Esherichia coli* bakterisine karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu, disk difüzyon yöntemi ile gösterilmiştir. Antibakteriyel aktiviteler şekil 3.12 ve şekil 3.13'te, inhibisyon zon çapları tablo 3.7'de gösterilmiştir.

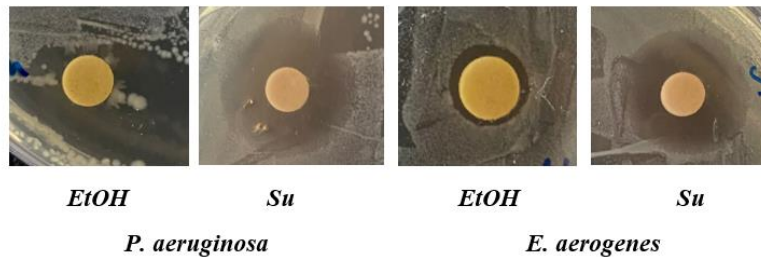
Ayrıca ekstraktların bakterilere karşı MİK değerleri hesaplanmış ve sonuçlar tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: Ekstraktların bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları.

Bakteri	SM EtOH Ekstraktı İnhibisyon zon çapı (mm)	SM Su Ekstraktı İnhibisyon zon çapı (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	10,09
<i>Esherichia coli</i>	10,8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,7	16,09
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7,9	16,26



Şekil 3.12: Ekstraktların *S. aureus* ve *E. coli* disk difüzyon sonuçları.



Şekil 3.13: Ekstraktların *P. aeruginosa* ve *E. aerogenes* disk difüzyon sonuçları.

Tablo 3.8: Ekstraktların bakterilere karşı gösterdiği MİK değerleri.

Bakteri	SM EtOH Ekstraktı MİK Değeri (mg/ml)	SM Su Ekstraktı MİK Değeri (mg/ml)
<i>Staphylacoccus aureus</i>	0,625	1,25
<i>Esherichia coli</i>	0,625	2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,25	0,625
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,25	0,625

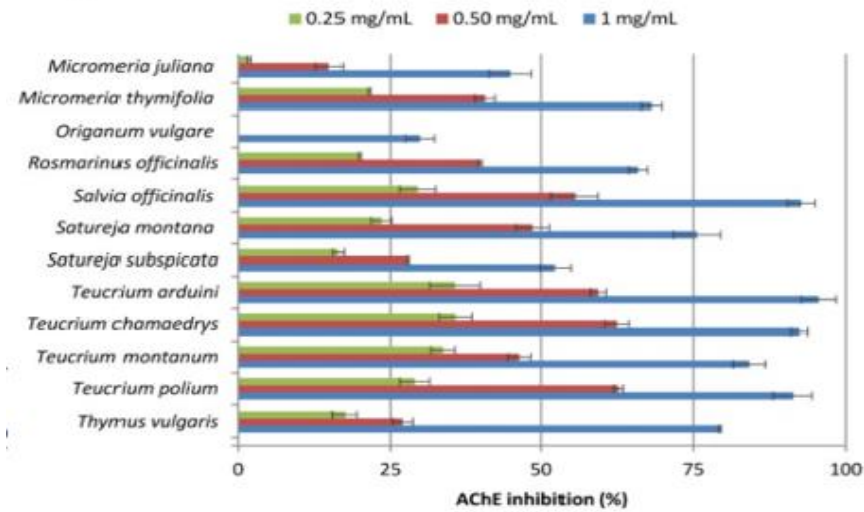
4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Antikolinesteraz Aktivite

Daha önce bahsedildiği gibi (bölüm 1.1.) kolinesterazların inhibisyonu Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisi için önemli bir araştırma konusudur. Kolinerjik hipotez, AD patogenezinde nörotransmitter seviyelerindeki azalmanın bir sonucu olarak kolinerjik nöronların kaybını önermektedir. Beyindeki birincil nörotransmitter olan ACh'nin azalmış seviyeleri, AD'nin ilerlemesinde önemli bir rol oynar. ACh, AChE ve BChE tarafından hidrolize edilir ve bu enzimlerin aşırı aktivitesi bilişsel işlev kaybına yol açar. AD ilerledikçe AChE aktivitesi azalırken BChE aktivitesi, kolinerjik nöronlardaki ACh seviyelerini düzenlemek ve AChE kaybını telafi etmek için artar [81]. Her iki enzim de AD'nin farklı evrelerinde (erken evrede AChE ve geç evrede BChE) bilişsel bozuklukla mücadele etmek için terapötik hedeflerdir. Ayrıca BChE, AChE nakavt fare modellerinde kolinesteraz fonksiyonunu korumuştur. Bu değişiklikler muhtemelen kolinerjik sinapsların ve nöronların kaybıyla ilişkilidir, bu da AD ilerledikçe ikili inhibisyonun daha önemli hale gelebileceğini düşündürür [82]. Birkaç spesifik BChE inhibitörü, spesifik AChE inhibitörü veya çift etkili AChE ve BChE inhibitörü bildirilmiştir. Örneğin, Bambuterol, BChE ile AChE arasında ayırım yapabilen, iyi bilinen bir seçici BChE inhibitörüdür [83]. Testosteron ve bunun on adet metaboliti, BChE'nin seçici inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Metoklopramid, ranitidin ve tiaprid gibi bazı BChE inhibitörlerinin, güçlü organofosfor bileşiklerinin inhibisyonuna karşı koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir [84]. Donepezil ve Galantamin gibi spesifik AChE inhibitörleri, AD'nin klinik yönetiminde tercih edilen ilaçlar haline gelmiştir ve uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ancak donepezil ve çoğu tekli kolinesteraz inhibitörleri, patogenetik tedavi sağlamamaktadır [85]. Rivastigmin, psödo-geri dönüşümsüz, karbamat türevi, beyine spesifik, ikili kolinesteraz inhibitörüdür. Farmakokinetik profil, rivastigminin 24 saat boyunca sürekli ve kontrollü ilaç dağıtımını sağladığını ve böylece daha etkin bir patogenetik tedaviye neden olduğunu göstermiştir [86]. M.F. Eskander ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre [87], klinik AD öyküsü olan 55 hastada, rivastigmin, nöronlardaki ve aksonlardaki AChE aktivitesini 10^{-6} - 10^{-4} M konsantrasyonlarında doza bağımlı bir şekilde inhibe edebilirken, serebral kortikal nöronlarda BChE aktivitesini 10^{-5} M konsantrasyonda inhibe etmiştir ve kısa vadede AD semptomlarında iyileşme gözlenmiştir. Ayrıca, hafif ve orta derecede AD'si olan hastalarda yapılan 13 haftalık bir çalışma, rivastigminin BOS'ta (beyin omurilik sıvısı) hem AChE hem de BChE aktivitesini sırasıyla %42,6 ve %45,4 oranında önemli ölçüde azalttığını

göstermiştir [88]. Bu sonuçlar rivastigminin inhibitör etkisinin BChE üzerinde AChE'ye kıyasla daha güçlü olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde, AD olasılığı olan hastalarda yapılan bir klinik çalışmanın sonuçları [89], rivastigmin tedavisinin BOS'ta AChE ve BChE aktivitesini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ancak donepezil ve galantamin tedavisi, BOS-AChE aktivitesinde anlamlı bir azalma gösterirken BChE aktivitesinde herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Kısaca donepezil ve galantamin gibi AChE spesifik inhibitörler hastalığın patogenetik tedavisinde anlamlı bir ilerleme kaydedemezken, rivastigmin gibi ikili inhibitörler ise nispeten daha etkili bir patogenetik tedavi sağlamaktadır. Ancak nispeten daha etkili tedaviye rağmen daha önce bahsedildiği gibi (bölüm 1.1.) karbamat türevi ilaçların yan etkileri konusunda ciddi endişeler vardır. Bahsedilen ilaçların klinik deneylerinde bildirilen en yaygın yan etkiler mide bulantısı, kusma, ishal, baş dönmesi ve kilo kaybı olmuştur. Çalışmalar arasında, bu olayların bildirilme sıklığı genellikle donepezil ile en düşük ve rivastigmin ile en yüksek olmuştur [90]. Bu sebeplere binaen, yan etkileri nispeten daha az olan ve ikili inhibisyon etkisi gösterebilen yeni inhibitörlerin araştırılmaları ve tanımlanmaları büyük önem arz etmektedir. Yan etkilerin azlığı için yeni inhibitörlerin keşfi konusunda ilk akla gelen materyal ise bitkilerdir. Örneğin, halen kolinesteraz inhibitörlerinin liderliğini sürdüren rivastigmin'in yapısal iskeleti, AChE alkaloidi olan fizostigmine (physostigmine)'den yola çıkarak tasarlanmıştır. AChE inhibitörü olan fizostigmin ise Calabar fasulyesinde (*Physostigma venenosum*) doğal olarak bulunur [91]. Morfin benzeri bir yapıya sahip olan ve AD araştırmalarında önemli rol oynayan galantamin, ilk olarak *Galanthus nivalis* L.'den (kardelen) elde edilen ve 2001 yılında ABD FDA tarafından onaylanan doğal bir alkaloiddir [92]. Ayrıca *Narcissus tazetta* L. ve *Leucojum aestivum* L. ve *Lycoris radiata* Herb., galantamin içermekte ve farmakoloji alanında kullanılmaktadır. Modern tıbbi araştırmalarda kullanımları 1950'lerde Sovyetler Birliği'nde başlamıştır. Bu bitkilerin aktif bileşenleri, AChE inhibitör özellikleri ile bağlantılı olarak saflaştırılmış, tanımlanmış ve incelenmiştir [93]. *Uncaria rhynchophylla*, modern Çin tıbbında epilepsiyi tedavi etmek için kullanılır. *U. rhynchophylla*'nın güçlü antiepileptik ve nöroprotektif etkileri vardır. Ek olarak, bu bitkiden elde edilen bir kolinesteraz inhibitörü olan gaisocidin metil eter, AD tedavisi için önemli bir potansiyel ilaç olarak kabul edilir [94]. Kısaca bahsedildiği üzere bitkiler, kolinesteraz inhibitörleri konusunda etkili materyallerdir. Bitkiler arasında ise Lamiaceae familyası öne çıkmaktadır. *Calamintha*, *Lavandula*, *Mentha*, *Melissa*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Teucrium* ve *Thymus* cinsine ait Lamiaceae familyasının birçok türü geleneksel olarak Hırvatistan ve çevre ülkelerde solunum, sindirim ve sinir sisteminin çeşitli hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır

[95]. Bu ailedeki birkaç cins, çeşitli in-vitro ve in-vivo yöntemler kullanılarak antioksidan ve nöroprotektif özellikleri açısından incelenmiştir. Bu aktiviteler esas olarak polifenollerin, özellikle rosmarinik asidin varlığına bağlanmıştır [96-97]. Kafeik asit, ferulik asit, parakumarik asit, klorojenik asit, rosmarinik asit ve hidroksisinnamat türevleri, özellikle Lamiaceae familyasının türlerinde yaygın olarak bulunur. Son zamanlarda yapılan biyolojik ve farmakolojik çalışmalar, bu fitokimyasalların antiviral, antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, antianjiyojenik, antidepresan, antikanser ve antihepatotoksik aktiviteler dahil olmak üzere pek çok faydalı aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir [98-100]. Lamiaceae türleri, kolinesteraz inhibitörleri olarak da yoğunlukla çalışılmaktadır. Şekil 4.1'de [101] bazı Lamiaceae türlerinin etanol ekstraktlarının AChE üzerindeki inhibisyon aktiviteleri verilmiştir. İlgili çalışmada *Mentha x piperita*, *M. longifolia*, *Salvia officinalis*, *Satureja montana*, *Teucrium arduini*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *T. polium* ve *Thymus vulgaris* bitkilerinin etanol ekstraktları, 1mg/ml konsantrasyonda AChE'yi %75'in üzerinde inhibe etmişlerdir.



Şekil 4.1: Bazı Lamiaceae türlerinin etanol ekstraktlarının AChE üzerindeki inhibisyon aktiviteleri.

Başka bir çalışmada *Laurus nobilis*, *Hypericum undulatum* ve *Sanguisorba minor*, bitkilerinin etanol ekstraktlarının, AChE üzerinde 1mg/ml konsantrasyonda sırasıyla %64, %68 ve %78 olmak üzere yüksek bir AChE inhibisyon değeri gösterdiği tespit edilmiştir [102]. Bahsedilen fitokimyasalları bünyelerinde barındırmaları ve AChE üzerindeki yüksek inhibisyon aktiviteleri sebebiyle, Lamiaceae familyasının türleri çalışma konusu olarak ilgi görmeye devam etmektedir.

Gevrek deliçay olarak ta bilinen SM, Lamiaceae familyasına ait bir tür çaydır. Literatür taramasında, bu bitkiye ait herhangi bir biyokimyasal çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının dana beyninden elde edilen AChE ve BChE aktivitesi üzerindeki etkileri, Ellman metodu kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda SM bitkisinin hem AChE hem de BChE üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.1-3.4).

Daha önce badesildiği gibi (bölüm 1.6) Alzheimer hastalığında kullanılan galantaminin AChE ve BChE üzerinde sırasıyla $5,01 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$ ve $39.10 \pm 1.41 \mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri vardır. Bu çalışmada SM bitkisinin EtOH ve su ekstraktlarının BChE üzerinde sırasıyla $0,042 \pm 0,008 \text{ mg/ml}$ ve $0,051 \pm 0,004 \text{ mg/ml}$ IC_{50} değeri gösterdiği kaydedilmiştir. Ayrıca EtOH ve su ekstraktlarının AChE üzerinde sırasıya $0,032 \pm 0,002 \text{ mg/ml}$ ve $0,117 \pm 0,018 \text{ mg/ml}$ IC_{50} değerleri gösterdiği kaydedilmiştir. Ekstraktların BChE üzerindeki IC_{50} değerlerinin, referans ilaç olan galantaminin IC_{50} değerine olan yakınlığı dikkat çekmektedir. Ayrıca ekstraktların AChE üzerinde de, bahsedilen diğer sonuçlarla kıyaslandığında güçlü bir inhibitör aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Bu durum SM bitkisinin alternatif bir kolinesteraz inhibitörü olarak değerlendirilmesinin ve SM bitkisi ile yapılabilecek kimyasal kompozisyon belirleme çalışmaları ile ileri saflaştırma çalışmalarının önünü açmaktadır.

AD hastalığının ilerleyen safhalarında AChE aktivitesinde güçlü bir düşüş gözlenirken, BChE aktivitesinde anlamlı bir artış gözlenmektedir [81]. Yine de ileri düzey AD hastalığının semptomatik tedavisinde ikili inhibitörler yüksek bir başarı oranı göstermiştir. Ancak ileri düzey AD hastaları için spesifik BChE inhibisyonu sağlayan tedavi modellerinin sayısı oldukça yetersizdir. Böyle bir tedavi modellemesi, aktivitesi aşırı düşen AChE'yi ve aktivitesi aşırı yükselen BChE'yi nominal düzeylerde tutarak hastalığın semptomatik ve patogenetik tedavisi için bir umut oluşturabilir. Böyle bir tedavi modellemesi için SM bitkisi üzerindeki çalışmaların genişletebileceği düşünülmektedir. SM bitkisinin ekstraktlarının, özellikle de su ekstraktının AChE ve BChE üzerinde gösterdiği inhibisyon aktivitesindeki anlamlı fark, böyle bir tedavi modellemesinde değerlendirilebilir. Bu durumda; bitkinin ekstraktlarının kimyasal kompozisyonunu belirlemek ve AChE ve BChE üzerindeki etkilerden sorumlu molekülleri ayrı ayrı tespit etmek önemli bir çalışma konusu olacaktır. Bahsedilen tedavi modellemesinde, spesifik olarak güçlü BChE inhibitörü olan moleküllerin saflaştırılması gereklidir. Bu durumda SM bitkisi, etkili bir materyal olarak düşünülebilir.

4.2. Antidiyabetik Aktivite

Diabetes mellitus (DM) kronik bir hastalıktır ve anormal glikoz toleransı ve insülin direnci ile karakterizedir [103]. DM, metabolik sendrom, kalp hastalığı, böbrek fonksiyon kaybı ve körlük gibi komplikasyonlarla ilişkilidir. Postprandiyal hiperglisemi, tip 2 diyabet gelişimi için önemli bir risk faktörüdür [104]. Diyabet ve hiperglisemiyi önlemenin en etkili yollarından biri kandaki glikoz seviyesini kontrol etmektir. Kanda bulunan glikozun kaynağı, karbonhidratların hidrolizidir ve α -glukosidaz ve α -amilaz gibi sindirim enzimleri tarafından katalize edilir. α -Glukosidaz, polisakkaritleri hidrolize etme işlevine sahip bir bağırsak zarı enzimidir. Benzer şekilde α -amilaz, nişastaları ve oligosakkaritleri basit şekerlere hidrolize edebilen pankreas ve tükürük bezleri tarafından salgılanan bir enzimdir. Bu enzimlerin inhibisyonu, karbonhidratların sindirimini yavaşlatır ve glikozun kana emilimini azaltır. Bu nedenle, gastrointestinal sistemdeki bu enzimlerin aktivitesinin inhibisyonu, diyabet yönetimi için terapötik bir yaklaşım olarak kabul edilir [105]. Bu enzimlerin inhibisyonu için akarboz ve vogliboz gibi bazı sentetik inhibitörleri geliştirilmiştir [106]. Bununla birlikte, bu inhibitörlerin şişkinlik, hazımsızlık ve karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi yan etkileri vardır. Bu nedenle doğal olarak oluşan ve hiçbir yan etkisi olmayan inhibitörler tercih edilmektedir. Bir dizi çalışma, doğal fitokimyasalların antidiyabetik etkilerini in-vitro ve in-vivo olarak incelemiştir [107]. Polifenoller sağlığı geliştiren fitokimyasalların en büyük grubunu oluştururlar. α -amilaz ve α -glukosidaz inhibisyonunda yer alan bileşikler arasında fenolik asitler, flavonoidler, flavonoller ve antosiyaninler bulunur [108]. Lamiaceae familyası zengin polifenolik içeriklerinden dolayı antidiyabetik çalışmalar sırasında en sık kullanılan bitki cinslerini içermektedir [109]. Yapılan bir çalışmada Lamiaceae familyasına ait *A. iva*'nın toprak üstü kısımlarının su ve metanol ekstraktlarının, alfa-amilaz için sırasıyla 0.210 ± 0.003 ve 0.180 ± 0.005 $\mu\text{g/ml}$ IC₅₀ değerleri ve alfa-glukosidaz için sırasıyla $0,172 \pm 0,012$ ve $0,130 \pm 0,008$ $\mu\text{g/ml}$ IC₅₀ değerleri ile çok güçlü inhibitör özellikler gösterdiği kaydedilmiştir [110]. Başka bir çalışmada yine Lamiaceae familyasından *S. virgata* bitkisinin etanol ekstraktının α -amilaz'a karşı $19,08$ mg/ml IC₅₀ değeri ile düşük-orta dereceli antidiyabetik aktivite gösterdiği kaydedilmiştir [111].

Bu çalışmada SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının, ticari olarak temin edilen α -amilaz ve α -glukosidaz enzimlerine karşı gösterdikleri inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. SM bitkisinin EtOH ekstraktının α -amilaz ve α -glukosidaz üzerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla $2,119 \pm 0,005$ mg/ml ve $3,891 \pm 0,009$ mg/ml olarak tespit edilmiştir. SM bitkisinin su

ekstraktının α -amilaz ve α -glukosidaz üzerindeki IC_{50} değerleri ise sırasıyla $2,839\pm 0,192$ mg/ml ve $5,617\pm 0,087$ olarak kaydedilmiştir. Bitkinin her iki ekstraktında α -amilaz üzerinde α -glukosidaz'a kıyasla daha güçlü inhibitör etki gösterdiği farkedilmektedir. Kaydedilen bu değerler, çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun $0,049$ mg/ml'lik IC_{50} değeri [111] ve farklı bitkiler ile yapılan önceki çalışma sonuçları ile kıyaslandığında, çok güçlü olarak değerlendirilen inhibitör aktivite değerleri ile düşük-orta olarak değerlendirilen inhibitör aktivite değerlerinin arasında yer almaktadır. Bu durum kaydedilen bu sonuçların orta-güçlü inhibitör aktivite değeri olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Özellikle α -amilaz üzerindeki inhibitör aktivite değeri düşünüldüğünde SM bitkisi ile yapılabilecek ileri saflaştırma ve antidiyabetik çalışmalar önem kazanmaktadır.

Literatürde *Stachyc* cinsinin sahip olduğu biyolojik özellikler, türlerin barındırdığı fenolik içeriğe atfedilmiştir [112]. Ancak anti-inflamatuar veya analjezik etkileri veya bileşenleri tam olarak açıklanamamıştır. P. Taslimi ve I. Gulcin yaptıkları çalışmada [113] doğal fenolik bileşiklerin antidiyabetik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda özellikle Lamiaceae familyasında bolca bulunan p-kumarik asit ve rosmarinik asitin α -glukosidazı sırası ile $157,96$ nM ve $33,53$ nM IC_{50} değerleri ile güçlü bir şekilde inhibe ettiğini kaydetmişlerdir. Bahsedilen çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun IC_{50} değeri ise $22,80$ nM olarak kaydedilmiştir. Rosmarinik asit, antibakteriyel antioksidan, antiviral antiinflamatuvar özellikler gibi birçok biyolojik özelliği sahiptir [114]. Bu özelliklerinden dolayı en sık çalışılan fenolik bileşiklerden biri olmuştur. I. Carev ve C. Sarıkurkcu [115] *Stachys cretica* ssp. ekstraktları ile yaptıkları çalışmada bitkinin su ekstraktının $68,22 \pm 0,97$ μ g/g rosmarinik asit barındırdığını ve $177,34 \pm 2,32$ μ g/g p-kumarik asit içerdiğini kaydetmişlerdir. Bu durum SM bitkisi ile yapılabilecek kimyasal kompozisyon belirleme çalışmalarının önünü açmaktadır.

4.3. Antioksidan Aktivite

Diyetin bilişsel aktivite üzerindeki etkilerini belirleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bu mekanizmalarda enflamatuar yollar rol oynayabilir. Enflamasyon, AD'nin patogeneğinde önemli bir rol oynar [116]. AD'de yer alan anahtar diyet mekanizmalarından biri, antioksidan takviyeleri yoluyla değiştirilebilen oksidatif strestir [117]. Bilişsel bozukluk veya bunama için potansiyel bir tedavi olarak antioksidanların

kullanımı yıllardır ilgi çekmektedir. Oksidatif stres dengesizliği, AD patogenezinde yer alan ayırt edici belirteçlerden biridir [118]. Oksijen radikallerinin net etkisi hasardır. AD'de görülen bu tür hasar, gelişmiş glikasyon son ürünlerini, nitrasyonları, lipid peroksidasyon adüktlerini ve karbonil ile modifiye edilmiş nörofilament proteinleri ve serbest karbonilleri içerir [119]. Normal hücre fonksiyonu için ROS üretimi ile antioksidan savunma arasındaki denge esastır. Bununla birlikte, Alzheimer hastalığında, antioksidan enzimlerin aktivitesi değişerek, oksidatif hasar birikimine yol açar [120]. Oksidatif hasarın sitopatolojik önemi, antioksidan enzimlerin yukarı regülasyonu yoluyla görülür. Hemeoksijenaz-1 (HO-1), oksidatif strese hücreyel yanıtın en hassas ve seçici göstergelerinden biridir ve AD hastalarının beyinde hem HO-1 proteini hem de bu proteinin mRNA'sının arttığı gösterilmiştir [121]. Reaktif oksijen metabolizması dengesiz olduğunda, yetersiz antioksidan savunma ile birlikte aşırı ROS üretimine ve dolayısı ile oksidatif strese yol açar. Artan ROS üretimine yol açan mitokondriyal hasarın, klinik semptomların başlangıcından önce AD'nin erken evrelerine katkıda bulunduğu dair kanıtlar vardır [122]. Daha önce de bahsedildiği gibi diyet ve takviyeler ile hücrelerin antioksidan savunması güçlendirilebilir ve oksidatif stresin önüne geçebilir.

Bu çalışmada SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri, DPPH, ABTS ve FRAP metodları ile araştırılmıştır. DPPH ve ABTS radikal süpürücü aktiviteler için ayrı ayrı, konsantrasyona bağlı değişen %antioksidan aktivite grafikleri oluşturulmuş ve pozitif kontrol olarak gallik asit kullanılmıştır. DPPH ve ABTS için ekstraktların IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (tablo 3.4-3.5). Demir III'ün indirgenme kapasitesi stratejisi ile çalışan FRAP testinde ise, pozitif kontrol olan trolox ile bir standart eğri grafiği oluşturulmuş ve bu grafiğin eğim denklemi üzerinden, ekstraktların antioksidan aktiviteleri, trolox eşdeğerliği olarak µg/g cinsinden hesaplanmıştır (tablo 3.6). SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının DPPH radikali için IC₅₀ değerleri, sırasıyla 1,501±0,12 ve 1,868±0,007 olarak tespit edilmiştir. % antioksidan aktiviteleri ise 8 µg/µl'de, sırasıyla %81 ve %61 olarak kaydedilmiştir. SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının ABTS radikali için IC₅₀ değerleri, sırasıyla 1,011±0,09 ve 2,986±0,04 olarak belirlenmiştir. % antioksidan aktiviteleri ise 8 µg/µl'de, sırasıyla %96 ve %51 olarak kaydedilmiştir. SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri, trolox eşdeğerliği olarak sırasıyla 61,45±0,34 µg/g trolox eşdeğerliği ve 29±0,681 µg/g trolox eşdeğerliği olarak kaydedilmiştir. Özetle bu çalışmada SM bitkisinin etanol ekstraktının, su ekstraktına kıyasla daha güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir.

F. Sharififar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Lamiaceae familyasına ait *T. polium* bitkisinin DPPH ve ABTS radikal süpürme aktivitesi IC₅₀ değerlerini sırasıyla 20,1 ± 1,7 ve 23,7 ± 1,9 olarak kaydetmiştir [123]. Başka bir çalışmada ise Lamiaceae familyasına ait farklı bitkilerin antioksidant aktiviteleri farklı metotlar ile çalışılmış ve şekil 4.2’te gösterilen sonuçlar kaydedilmiştir [124].

	DPPH Assay µmol TE/mg dm	ORAC Assay µmol TE/mg dm	SOD-Like Activity Assay SC ₅₀ mg dm/mL (CL 95%)
<i>Origanum vulgare</i>	1.63 ± 0.13	4.40 ± 0.17	0.967 (0.726-1.287)
<i>Thymus vulgaris</i>	1.79 ± 0.22	4.22 ± 0.06	0.978 (0.738-1.295)
<i>Salvia officinalis</i>	1.49 ± 0.08	4.70 ± 0.11	0.991 (0.747-1.315)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1.41 ± 0.15	3.35 ± 0.63	1.168 (0.856-1.592)
<i>Origanum majorana</i>	1.05 ± 0.22	3.63 ± 0.26	2.102 (1.658-3.029)

Şekil 4.2: Lamiaceae familyasına ait farklı bitkilerin, farklı metodlar ile belirlenen antioksidan aktiviteleri.

Başka bir çalışmada ise *Salvia kloroleuca* bitkisinin etil asetat ekstraktının yüksek 230,4±10,5 FRAP değerine sahip olduğu belirlenmiştir [125]. Bahsedilen çalışmalar ve bulgularan değerler yüksek antioksidan aktiviteler olarak değerlendirilmiştir. SM bitkisinin etanol ekstraktının antioksidan aktivite değerleri, yukarıda bahsedilen çalışma sonuçlarındaki değerlere çok uzak değildir ve nispeten yüksek antioksidan aktiviteler olarak değerlendirilebilmektedir. Dolayısı ile SM bitkisinin etanol ekstraktı, esansiyel yağ içeriğinin belirlenmesi ve ileri antioksidan çalışmalar için uygun bir aday olarak düşünülebilmektedir.

4.4. Antibakteriyel Aktivite

İdrar yolu enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonları ve solunum yolu enfeksiyonları her yaştan insanı etkileyen ve bazı durumlarda ölümcül olabilen en önemli morbidite nedenleridir. Son yıllarda artan antibiyotik direnci önemli bir sorun haline gelmiş ve bilim insanlarını yeni antibakteriyel molekül keşiflerine itmiştir [126]. Bitkiler ve bitkilerden elde edilen çeşitli esansiyel yağlar (EO), çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı yüzlerce yıldır doğal antibiyotikler olarak kullanılmaktadır ve *Zengiber officinale*,

Origanum majorana, *Thymus zygis*, *Rosmarinus officinalis* ve *Juniperus communis* gibi bitkiler, antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri açısından ilgi görmüştür. [127]. Birçok bağımsız çalışma, kekik ve tarçından elde edilen EO'ların, karvakrol ve timol gibi fenolik bileşiklerle ilgili antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve bunların belirli koşullar altında antifungal ve antibakteriyel olarak kullanılabileceğini göstermiştir [128-130]. EO'ların antibakteriyel etkisi, bakterilerin hücre duvarlarına ve zarlarına verilen hasardan kaynaklanır. Birçok EO, nispeten düşük memeli toksisitesi ve hızlı bozunması nedeniyle güvenlidir [131]. Genel olarak, Gram-negatif bakteriler EO'lara Gram-pozitif bakterilerden daha dirençlidir [132].

Lamiaceae familyası, geleneksel tıpta en yaygın olarak kullanılan bitki türlerini içeren familyalardan biridir ve tıbbi değeri EO'larının bileşimine dayanmaktadır [133]. Bu familyaya ait bitkilerin EO'ları, önemli değere sahip fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, doğal ürünler olarak kullanımları açısından araştırma gruplarının da ilgisini toplamıştır [134]. Sarra Moumni ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Lamiaceae familyasındaki bazı bitkilerin EO'larının antibakteriyel etkilerini göstermişlerdir ve şekil 4.3'de verilen inhibisyon zon çapı sonuçları bulgulamışlardır [135].

Essential oils	Microorganisms				
	<i>E. coli</i> <i>Ecol</i>	<i>S. enterica</i> <i>Sent</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>Paer</i>	<i>B. subtilis</i> <i>Bsub</i>	<i>S. aureus</i> <i>Saur</i>
<i>S. officinalis</i>	11.3 ± 1.2	7.7 ± 1.2	7.0 ± 1.0	17.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6
<i>T. capitatus</i>	20.3 ± 0.6	20.0 ± 1.0	20.3 ± 0.6	30.0 ± 1.0	15.0 ± 1.0
<i>R. officinalis</i>	11.0 ± 1.0	8.7 ± 0.6	8.3 ± 0.8	19.3 ± 1.2	10.0 ± 1.7
<i>O. majorana</i>	14.0 ± 1.0	14.0 ± 1.0	6.3 ± 0.6	6.0 ± 0.0	12.0 ± 1.0
<i>Gentamicine</i> ®	17.3 ± 0.6	17.3 ± 0.6	16.0 ± 1.0	24.3 ± 1.2	21.7 ± 1.5

Şekil 4.3: Lamiaceae familyasına ait bazı bitkilerin EO'larının, bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları [131].

Sthéfane G. Araújo ve arkadaşları ise yaptıkları minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) çalışmasında, *Rosmarinus officinalis*'in etanol ekstraktının, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli*'yi 250 µg / mL'lik bir konsantrasyonda ve *E. faecalis* ve *S. mutans*'i 500 µg / mL'lik bir konsantrasyonda inhibe ettiğini, *Melissa officinalis*, *Mentha sp* ve *Ocimum basilicum*'un etanol ekstraktlarının, *S. Mutants* 'i sırasıyla 250, 500 ve 250 µg / mL konsantrasyonda inhibe ettiğini raporlamışlardır [136].

Bu çalışmada SM bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının *S. aureus*, *E. Coli*, *P. aeruginosa* ve *E. aerogenes* bakterilerine karşı gösterdikleri antibakteriyel aktivite, disk difüzyon yöntemi ve MİK yöntemi ile araştırılmıştır. SM bitkisinin etanol ekstraktının dört bakteri üzerinde de antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Zon çapları sırasıyla 12 mm, 10,8 mm, 6,7 mm ve 7,9 mm olarak ölçülmüştür. Su ekstraktının ise *E. coli* üzerinde zon çapı oluşturmadığı tespit edilirken *S. aureus* için 10,09 mm, *P. aeruginosa* için 16,09 mm, *E. aerogenes* için 16,26 mm zon çapı gösterdiği kaydedilmiştir. Ölçülen bu değerler kaydedilen MİK değerleri ile doğrulanmaktadır (Tablo 3.8) Su ekstraktının gram negatif bakteriler olan *P. aeruginosa* ve *E. aerogenes* üzerinde EtOH ekstraktına kıyasla çok daha güçlü antibakteriyel özellik göstermiş olması kaydedilmelidir. Ayrıca Çalışmanın ham ekstraktlar ile yapılmasına rağmen etanol ekstraktında görülen zon çapları, SM bitkisinin EO'larının güçlü bir antibakteriyel olabileceğini göstermiştir. Daha önce bahsedildiği gibi gram-negatif bakteriler, EO'lara gram-pozitif bakterilerden daha dirençlidir. SM bitkisinin etanol ekstraktının, gram (-) bir bakteri olan *E. coli* üzerinde de güçlü bir inhibisyon etkisi göstermesi, bitkinin EO'ları ile yapılabilecek ileri bir çalışmanın önünü açmaktadır. Özellikle su ekstraktının inhibisyon zon çapları ve mik değerleri düşünüldüğünde bitkinin antibakteriyel bir gıda takviyesi olarak değerlendirilmesinin mümkün olduğunu düşündürmektedir.

5. ÖNERİLER

SM bitkisinin ekstraktları ile yapılan çalışmalar sonucunda, bu bitkinin özellikle etanol ekstraktının, güçlü bir AChE inhibitörü olduğu, her iki ekstraktında güçlü bir BChE inhibitörü olduğu kaydedilmiştir. Bu durum özellikle AD'nin ilerleyen safhalarında BChE'nin önemi düşünüldüğünde SM bitkisinin potansiyel bir kolinesteraz inhibitörü olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Ayrıca yapılan antidiyabetik aktivite çalışmaları ile, ekstraktların orta-güçlü antidiyabetik aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Ekstraktların nispeten güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu literatüre sunulmuştur. Bölüm 4.1.'de bahsedildiği gibi, modellenebilecek spesifik BChE inhibityonu içeren bir AD tedavi prosedüründe, SM bitkisinden izole edilebilecek olan moleküllerin potansiyel inhibitör adayları olabileceği düşünülmektedir. SM bitkisinin ekstraktlarının yüksek antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri nedeniyle daha ileri ve kapsamlı çalışmalarda ve farklı alanlarda kullanımı değerlendirilebilir. Bütün özellikleri bir arada düşünüldüğünde ise SM bitkisinin esansiyel içeriğinin gıda takviyesi çalışmalarında kullanılabileceği, özellikle antibakteriyel ve antidiyabetik aktivitesi düşünüldüğünde ise içeriğinin krem olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKÇA (IEEE)

- [1] S. Karakaya, et al. Molecular Docking Studies of Coumarins Isolated from Extracts and Essential Oils of *Zosima absinthifolia* Link as Potential Inhibitors for Alzheimer's Disease, *Molecules*. 24 (4) (2019), 722
- [2] J. Yingying, G. Hongwei, Pharmacophore-based drug design for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Phytomedicine* 54 (15) (2019), 28-290
- [3] M. Ibrahim, T. Farooq, N. Hussain, A. Hussain, T. Gulzar, I. Hussain, M. S. Akash, F. S. Rehmani, Acetyl and butyryl cholinesterase inhibitory sesquiterpene lactones from *Amberboa ramosa*, *Chem Cent J*. 7 (2013), 116.
- [4] Y. Chen, H. Lin, H. Yang, R. Tan, Y. Bian, T. Fu, W. Li, L. Wu, Y. Pei, H. Sun, Discovery of new acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors through structure-based virtual screening, *Rsc Adv*. 7 (2017), 3429–3438.
- [5] H. Cavdar, et al., Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with uracil derivatives: kinetic and computational studies. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 34 (1) (2019), 429-437.
- [6] B. Merek, et al., Novel carbamate derivatives as selective butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Chem*. 78 (2018), 29-38.
- [7] F. Zemek, L. Drtinova, E. Nepovimova, V. Sepsova, J. Korabecny, J. Klimes, K. Kuca, Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine, *Expert Opin. Drug Saf*. 13 (6) (2014) 759–774.
- [8] J. Tsiaoussis, E. Hatzidaki, A. O. Docea, T. K. Nikolouzakis, D. Petrakis, T. Burykina, C. Mamoulakis, A. Makrigiannakis, A. Tsatsakis, Molecular and clinical aspects of embryotoxicity induced by acetylcholinesterase inhibitors, *Toxicology*. 409 (1) (2018), 137-143.
- [9] P. K. İşeri, H. Efendi, Efficacy and safety of donepezil and rivastigmine in Alzheimer's disease, *Turk Jour Geriatr*. 6 (4) (2003), 119-123.
- [10] N. T. Yazıhan, *Fizyolojik Psikoloji*, Nobel, No:3357 (2021), pp. 177.
- [11] M. Pokorski, *Neurotransmitter interactions and cognitive function*, Springer International (2016).
- [12] J. M. Shine, Neuromodulatory influences on integration and segregation in the brain, *Trends Cogn Sci*. 23 (7) (2019), 572-583.

- [13] T. Fellin, G. Carmignoto, Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit, *The Jour Physiology*. 559 (1) (2004), 3-15.
- [14] M. Jepma, S. B. R. E. Brown, P. R. Murphy, S. C. Koelewijn, B. Vries, A. M. Maagdenberg, S. Nieuwenhuis, Noradrenergic and cholinergic modulation of belief updating, *J. Cogn Neurosci*. 30 (12) (2018), 1803-1820.
- [15] R. Larry, *Fundamental Neuroscience*, (2013), 117-139.
- [16] B. D. Özbalık, Asetilkolin, kolinerjik yollar, öğrenme ve belleğin hücresel mekanizmaları, demans tedavisinde kullanılan ilaçlar, *Türkiye klinikleri*, 3 (1) (2010), 7-122.
- [17] S. L. Hamilton, The structure of the nicotinic acetylcholine receptor, *Prog Clin Biol Res*. 79 (1982), 73-85.
- [18] M. M. Mesulam, Alzheimer plaques and cortical cholinergic innervation, *Neuroscience*. 17(1) (1986), 275–276.
- [19] E. X. Albuquerque, E. F. R. Pereira, M. Alkondon, S. W. Rogers, Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function, *Physiol Rev*. 89 (1) (2009), 73-120.
- [20] B. Alaşehirli, Kolinesteraz inhibitörleri, *J Int Med Sci*. 1 (18) (2005), 47-57.
- [21] E.S. Topçuoğlu, K. Selekler, Alzheimer Hastalığı, *Turk Jour Geriatri*. 1 (2) (1998), 63–67.
- [22] L.E. Hebert, P.A. Scherr, L.A. Beckett, Age-Specific Incidence of Alzheimer's Disease in Community Population, *The Journal of American Medical Association*. 273 (1995), 1354-1359.
- [23] R. Katzman, T. Saitoh, Advances in Alzheimer's Disease, *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 5 (1991), 278-286.
- [24] C. Geula, M. M. Mesulam, Cholinesterases and the Pathology of Alzheimer's Disease, *Brain Research*. 498 (1995), 185-189.
- [25] E. K. Perry, R. H. Perry, G. Blessed, B. Tomlinson, Changes in Brain Cholinesterases in Senile Dementia of Alzheimer Type, *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 4 (1978), 273-277.
- [26] S. Giovanni, A. Borloz, A. Urbain, A. Marston, K. Hostettmann, P. A. Carrupt, M. Reist, In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods, *Eur. J. Pharm. Sci*. 33 (2008), 109-119.

- [27] M. Ranjbar, A. Firoozabadi, Al. Salehi, Z. Ghorbanifar, M. M. Zarshenas, K. Sadeghniaat-Haghighi, H. Rezaeizade, Effects of Herbal combination (*Melissa officinalis* L. and *Nepeta menthoides* Boiss. & Buhse) on insomnia severity, anxiety and depression in insomniacs: Randomized placebo controlled trial, *Integr Med Res.* 7 (2018), 328-332.
- [28] M. Bahmani, K. Saki, S. Shahsavari, M. Rafieian-Kopaei, R. Sepahvand, A. Adineh, Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran, *Asian Pac J Trop Biomed.* 5 (10) (2015), 858–864.
- [29] A. J. Ruíz-Baltazar, S. Y. Reyes-López, D. Larrañaga, M. Estévez, R. Pérez, Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties, *Results in Physics.* 7 (2017), 2639–2643.
- [30] E. K. Perry, A. T. Pickering, W. W. Wang, P. J. Houghton, N. S. Perry, Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy, Medical Research Council, Newcastle General Hospital, Newcastle upon Tyne. *J Pharm Pharmacol.* 51 (5) (1999), 527-34.
- [31] S. R. Johnson, W. W. Bhat, J. Bibik, A. Turmo, B. Hamberger, B. Hamberger, A database-driven approach identifies additional diterpene synthase activities in the mint family (Lamiaceae), *J Biol Chem.* 294 (4) (2019), 1349-1362.
- [32] X. Zhu, Y. Li, F. Xu, W. Gu, G. Yan, J. Dong, J. Chen, Skin electrical resistance measurement of oxygen-containing terpenes as penetration enhancers: role of stratum corneum lipids, *Molecules.* 24 (3) (2019), 523.
- [33] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care.* 20 (1997), 1183–1197.
- [34] L. Holland-Carter, P. W. Tuerk, T. A. Wadden, et al., Impact on psychosocial outcomes of a nationally available weight management program tailored for individuals with type 2 diabetes: results of a randomized controlled trial, *Journal of Diabetes Complication.* 31 (2017), 891-897.
- [35] M. Matzinger, K. Fischhuber, E. H. Heiss, Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes?, *Biotechnology Advances.* 36 (2018), 1738-1767
- [36] G. Wilcox, Insulin and Insulin Resistance, *Clin Biochem Rev.* 26 (2) (2005), 19–39.
- [37] M. J. Fowler, Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes, *Diabet. Found.* 26 (2) (2008), 77-82.

- [38] W. T. Cade, Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting, *Phys Ther.* 88 (11) (2008), 1322–1335.
- [39] A. L. Burrack, T. Martinov, B. T. Fife, T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes, *Front Endocrinol (Lausanne)*. 8 (2017), 343.
- [40] U. Galicia-Garcia, A. B. Vicente, S. Jebari, A. L. Sebal, H. Siddiqi, K. B. Uribe, H. Ostolaza, C. Martin, Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus, *Int J Mol Sci.* 21 (17) (2020), 6275.
- [41] A. Ornoy, M. Becker, L. Weinstein-Fudim, Z. Ergaz, Diabetes during Pregnancy: A Maternal Disease Complicating the Course of Pregnancy with Long-Term Deleterious Effects on the Offspring. A Clinical Review, *Int J Mol Sci.* 22 (6) (2021), 2965.
- [42] K. I. Galaviz, et al., Lifestyle and the Prevention of Type 2 Diabetes: A Status Report, *Am J Lifestyle Med.* 12 (1) (2018), 4–20.
- [43] M. Asif, The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern, *J Educ Health Promot.* 3 (2014), 1.
- [44] E. O. Ayua, et al., Polyphenolic inhibition of enterocytic starch digestion enzymes and glucose transporters for managing type 2 diabetes may be reduced in food systems, *Heliyon.* 7 (2) (2021), e06245.
- [45] A. S. Alqahtani, et al., Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Enzyme Inhibition and Antioxidant Potential of 3-Oxolupenal and Katononic Acid Isolated from *Nuxia oppositifolia*, *Biomolecules.* 10 (1) (2020), 61.
- [46] Y. M. Belayneh, Z. Birhanu, E. M. Birru, G. Getnet, Evaluation of in vivo antidiabetic, antidyslipidemic, and in vitro antioxidant activities of hydromethanolic root extract of *Datura stramonium* L. (Solanaceae), *Journal of Experimental Pharmacology.* 11 (2019), 29–31.
- [47] B. Salehi, A. Ata, et al., Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. *Biomolecules.* 9 (551) (2019),1–121.
- [48] M. Bhaskaran, K. Mruthunjaya, S. Manjula, D. Rajan, Evaluation of anti-diabetic activity of leaves of *Actinodaphne hookeri* Meissn, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 10 (2019), 83–96.
- [49] P M. Clarkson, H. S. Thompson, Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?, *Journ Clin Nutrit.* 72 (2) (2000), 637–646.

- [50] A. C. De Oliveira, I. B. C. A. Valentim, E. J. H. Bechara, M. P. Barros, C. M. Mano, M. O. F. Goulart, Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chem*, 115(2) (2009), 469–475.
- [51] F. Collin, Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases, *Int J Mol Sci*. 20 (10) (2019), 2407.
- [52] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007), 44–84.
- [53] L. Munoz-Rugeles, A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, The other side of the superoxide radical anion: Its ability to chemically repair DNA oxidized sites, *Chem. Commun*, 54 (2018), 13710–13713.
- [54] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, L. Periyasamy, Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases, *Indian J Clin Biochem*. 30 (1) (2015), 11–26.
- [55] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn Rev*. 4 (8) (2010), 118–126.
- [56] T. Y. Kim, E. Leem, J. M. Lee, S. R. Kim, Control of Reactive Oxygen Species for the Prevention of Parkinson’s Disease: The Possible Application of Flavonoids, Antioxidants (Basel). 9 (7) (2020), 583.
- [57] O. I. Aruoma, Methodological consideration for characterization for potential antioxidant actions of bioactive components in plants foods, *Mutat Res*. 532 (2003), 9–20.
- [58] U. Abbasoglu, “Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri,” *FABAD J. Pharm. Sci* 22, pp. 111–118, 1996.
- [59] B. Sümerkan, “Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Standardizasyon,” *Flora İnfeksiyon Hast. ve Klin. Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(1), pp. 24–30, 1996.
- [60] S. Zorofchian Moghadamtousi, H. Abdul Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar, and K. Zandi, “A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal
- [61] R. A. Akeel, et al., Purification and MIC analysis of antimicrobial proteins from *Cucumis sativus* L. Seeds, *BMC Complement Altern Med*. 18 (2018), 121.
- [62] Y. Salmaki, G. Heubl, M. Weigend, Towards a new classification of tribe Stachydeae (Lamiaceae): Naming clades using molecular evidence, *Bot. J. Linn. Soc.* 190 (2019), 345–358

- [63] Bhattacharjee, Taxonomic studies in *Stachys* II. A new infragenic classification of *Stachys* L. [1980], Notes R. Bot. Gard. Edinburgh. 38 (2008), 65–96.
- [64] M. Khanavi, M. Sharifzadeh, A. Hadjiakhoondi, A. Shafiee, Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzanthina*, C. Koch. *J. Ethnopharmacol.* 97 (2005), 463–468.
- [65] A. Meremeti, A. Karioti, A. Skaltsa, J. Heilmann, O. Sticher, Secondary metabolites from *Stachys ionica*, *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (2004), 139–151
- [66] S. Harada, T. Tsujita, A. Ono, K. Miyagi, T. Mori, S. Tokuyama, *Stachys sieboldii* (Labiatae, Chorogi) protects against learning and memory dysfunction associated with ischemic brain injury, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 61 (2015), 167–174.
- [67] R. Tundis, M. Bonesi, A. Pugliese, F. Nadjafi, F. Menichini, M. R. Loizzo, Tyrosinase, Acetyl- and Butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) and its major constituents, *Rec. Nat. Prod.* 9 (2015), 81–93.
- [68] M. Ferhat, E. Erol, K. A. Beladjila, Y. Çetintaş, M. E. Duru, M. Öztürk, A. Kabouche, Z. Kabouche, Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Stachys guyoniana* and *Mentha aquatica*, *Pharm. Biol.* 55 (2016), 324–329.
- [69] M. B. Bahadori, B. Kirkan, C. Sarikurkcu, Phenolic ingredients and therapeutic potential of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea* for the management of oxidative stress, Alzheimer’s disease, hyperglycemia, and melasma, *Ind. Crop. Prod.* 127 (2019), 82–87.
- [70] A. Shakeri, et al., LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS and GC–MS profiling of *Stachys parviflora* L. and evaluation of its biological activities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 168 (2019), 209–216.
- [71] A. Ertas, I. Yener, A comprehensive study on chemical and biological profiles of three herbal teas in Anatolia; rosmarinic and chlorogenic acids, *S. Afr. J. Bot.* 130 (2020), 274–281.
- [72] E. M. Tomou, C. Barda, H. Skaltsa, Genus *Stachys*: A Review of Traditional Uses, Phytochemistry and Bioactivity, *Medicines (Basel)*. 7 (10) (2020), 63.
- [73] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239 (1996), 70-76.
- [74] A. R. Abubakar, M. Haque, Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes, *J Pharm Bioallied Sci.* 12 (1) (2020), 1–10.

- [75] X. Liu, Structural features, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of polysaccharides from stem of *Physalis alkekengi* L., *Ind. Crops Prod.* 129 (2019), 654–661.
- [76] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (2) (1961), 88–95.
- [77] D. Kalita, et al., Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds, *PLoS One.* 13 (1) (2018), e0191025.
- [78] M. Balouri, M. Sadiki, S. K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J Pharm Anal.* 6 (2) (2016), 71–79.
- [79] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26(9–10) (1999), 1231–1237.
- [80] C. P. Rubio, J. Hernández-Ruiz, S. Martínez-Subiela, A. Tvarijonaviciute, J. J. Ceron, Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update, *BMC Vet Res.* 12 (2016), 166.
- [81] S. Darvesh, D.A. Hopkins, C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003), 131–138.
- [82] J. Hwang et al., Discovery of Natural Inhibitors of Cholinesterases from *Hydrangea*: In Vitro and In Silico Approaches, *Nutrients.* 13 (1) (2021), 254.
- [83] Z. Kovarik, Z. Radic, B. Grgas, et al., Amino Acid Residues Involved in the Interaction of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase with the Carbamates Ro 02-0683 and Bambuterol, and with Terbutaline, *Biochim. Biophys. Acta.* 1433 (1999), 261–271.
- [84] S. Li, A. J. Li, J. Travers et al., Identification of Compounds for Butyrylcholinesterase Inhibition, *SLAS Discov.* 26 (10) (2021), 1355–1364.
- [85] S. Jannat et al., Inhibition of β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 and cholinesterases by pterosins via a specific structure–activity relationship with a strong BBB permeability, *Exp Mol Med.* 51 (2) (2019), 12.
- [86] N. Kandiah, M. Pai, V. Senanarong, I. Looi, E. Ampil, K. W. Park, A. K. Karanam, S. Christopher, Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson’s disease dementia, *Clin Interv Aging.* 12 (2017), 697–707.

- [87] M. F. Eskander, N. G. Nagykerly, E. Y. Leung, B. Khelghati, C. Geula, Rivastigmine is a potent inhibitor of acetyl- and butyrylcholinesterase in Alzheimer's plaques and tangles, *Brain Res.* 1060 (1–2) (2005), 144–152.
- [88] A. Nordberg, T. Darreh-Shori, E. Peskind, et al., Different cholinesterase inhibitor effects on CSF cholinesterases in Alzheimer patients, *Curr Alzheimer Res.* 6 (1) (2009), 4–14.
- [89] L. Parnetti, D. Chiasserini, U. Andreasson, et al. Changes in CSF acetyl- and butyrylcholinesterase activity after long-term treatment with AChE inhibitors in Alzheimer's disease, *Acta Neurol Scand.* 124 (2) (2011), 122–129.
- [90] R. A. Hansen, G. Gartlehner, A. P. Webb, L. C. Morgan, C. G. Moore, D. E. Jonas, Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis, *Clin Interv Aging.* 3 (2) (2008), 211–225.
- [91] M. B. Colovic, et al., Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology, *Current Neuropharmac.* 11 (3) (2013), 315–335.
- [92] J. K. Kim, S. U. Park, Pharmacological aspects of galantamine for the treatment of Alzheimer's disease, *EXCLI J.* 16 (2017), 35–39.
- [93] M. Heinrich, Snowdrops: the heralds of spring and a modern drug for Alzheimer's disease, *The Pharmaceut. Jour.* 273 (2004), 905–906.
- [94] Z. Yang, D. Z. Duan, et al., Geissoschizine methyl ether, a corynanthean-type indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Nat. Prod. Res.* 26 (2012), 22–28.
- [95] S. Redžić, The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina, *Coll. Antropol.* 31 (2007), 869–890.
- [96] I. Orhan, S. Aslan, M. Kartal, B. Şener, K.H.C. Başer, Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes, *Food Chem.*, 108 (2008), 663–668.
- [97] P. L. Falé, C. Borges, P. J. A. Madeira, L. Ascensão, M. E. M. Araújo, M. H. Florêncio, M. L. Serralheiro, Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”), *Food Chem.* 114 (2009), 798–805.

- [98] M. B. Štefan, J. V. Rodríguez, B. Blažeković, M. Kindl, S. V. Knežević, Total hydroxycinnamic acids assay: Prevalidation and application on Lamiaceae species, *Food Anal. Methods*. 6 (2013), 1–11.
- [99] M. Petersen, Rosmarinic acid: New aspects, *Phytochem. Rev.* 12 (2013), 207–227.
- [100] V. P. Bulgakov, Y. V. Inyushkina, S. A. Fedoreyev, Rosmarinic acid and its derivatives: Biotechnology and applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 32 (2012), 203–217.
- [101] S. V. Knežević, B. Blažeković, M. Kindl, J. Vladić, A. D. Lower-Nedza, A. H. Brantner, Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family, *Molecules*. 19 (1) (2014), 767–782.
- [102] A. Ferreira, C. Proença, M. L. Serralheiro, M. E. Araújo, The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal, *J. Ethnopharmacol.* 108 (2006), 31–37.
- [103] H. King, R. E. Aubert, W. H. Herman, Global burden of diabetes, 1995–2025; prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care*. 21 (1998), 144–1431.
- [104] H. E. Lebovitz, Effect of the postprandial state on the nontraditional risk factors, *American Journal of Cardiology*. 88 (200), 204–205
- [105] S. Ghosh, P. More, A. Derle, et al., Novel hit for the treatment of type II diabetes Mellitus with inhibitory activity against α -amylase and α -glucosidase, *PlosOne* 9 (2014): e106039.
- [106] Y. Lee, D. S. Choi, M. K. Lee, Y. W. Lee, T. S. Park, Comparison of Acarbose and Voglibose in Diabetes Patients Who Are Inadequately Controlled with Basal Insulin Treatment: Randomized, Parallel, Open-Label, Active-Controlled Study, *J Korean Med Sci*. 29 (2014), 90–97.
- [107] J. R. Williamson, C. Kilo, et al., *Hyperglycemia, diabetes and vascular disease*. New York:Oxford University Press; 1992.
- [108] H. Wang, Y. D. Du, H. Song, α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves, *Food Chem* 123 (2010), 6–13.
- [109] N. G.E.R. Etsassala, A. A. Hussein, F. Nchu, Potential Application of Some Lamiaceae Species in the Management of Diabetes, *Plants (Basel)*. 10 (2) (2021), 279.

- [110] S. Fettach, et al., Phenolic content, acute toxicity of *Ajuga iva* extracts and assessment of their antioxidant and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects, *S. Afr. J. Bot.* 125 (2019), 381–385.
- [111] B. Nickavar, L. Abolhasani, Bioactivity-Guided Separation of an α -Amylase Inhibitor Flavonoid from *Salvia virgata*, *Iran. J. Pharm. Res.* 12 (2013), 57–61.
- [112] A. Matkowski, M. Piotrowska, Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. 77 (5) (2006), 346–353.
- [113] P. Taslimi, İ. Gülcin, Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glycosidase and α -amylase enzymes, *J Biochem Mol Toxicol.* 31 (2017), e21956.
- [114] S. Nunes, et al., Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid- Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile, *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57 (9) (2017), 1799-1806.
- [115] I. Carev, C. Sarikurkcu, LC-MS/MS Profiles and In Vitro Biological Activities of Extracts of an Endemic Species from Turkey: *Stachys cretica* ssp. *Anatolica*, *Plants (Basel).* 6 (2021), 1054.
- [116] F. L. Heppner, R. M. Ransohoff, B. Becher, Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease, *Nat Rev Neurosci.* 16 (6) (2015), 358–372.
- [117] J. İna, A. Lloret, R. Orti, D. Alonso, Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants; prevention of oxidative stress, *Molecular Aspects of Medicine.* 25 (10) (2004), 117–123.
- [118] A. Ella, N. Durany, Oxidative stress in Alzheimer disease, *Cell Adhes Migr.* 3 (2009), 88-93.
- [119] M. A. Smith, M. Rudnicka-Nawrot, P. L. Richey, et al. Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease, *J Neurochem.* 64 (6) (1995) ,2660–2666.
- [120] T. S. Kim, et al., Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease, *Int J Geriatr Psychiatry.* 21 (2006), 344–348.
- [121] A. Takeda, M. A. Smith, J. Avila, et al. In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of τ induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification, *J. Neurochem.* 75 (3) (2000), 1234–1241.
- [122] B. Uttara, A. V. Singh, P. Zamboni, R. T. Mahajan, Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options, *Curr Neuropharmacol.* 7 (2009), 65–74.

- [123] F. Sharififar, G. H. Dehghn-Nudeh, M. Mitrajaldini, Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L, *Food chem.* 112 (2009), 885–8.
- [124] E. Napoli, et al., Phenolic Profiles, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrodistillation Wastewaters from Five Lamiaceae Species, *Molecules.* 27 (21) (2022), 7427.
- [125] I. Salimikia, H. R. Monsef-Esfahani, A. R. Gohari, M. Salek, Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of *Salvia chloroleuca* Aerial Extracts, *Iran Red Crescent Med J.* 18 (8) (2016), e24836.
- [126] J. Davies, D. Davies, Origins and Evolution of Antibiotic Resistance, *Microbiol Mol Biol Rev.* 74 (3) (2010), 417–433.
- [127] R. Lagha, F. B. Abdallah, B. U. Al-Sarhan, Y. Al-Sodany, Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients, *Molecules.* 24 (6) (2019), 1161.
- [128] A. E. Abdalá, J. P. Roozen. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2011), 551–560.
- [129] S. Burt, Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *Inter. J. Food Microbiol.* 94 (2004), 223–253.
- [130] M. M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999), 564–565.
- [131] J. Huma, M. H. Fohad, A. Iqbal, Antibacterial and antibiofilm activity of some Essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed.* 1 (2014), 65–71.
- [132] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. Martino, R. Coppola, V. Feo, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals.* 6 (2013), 1451–1474.
- [133] L. Y. Sim, N. Z. Abd Rani, K. Husain, Lamiaceae: an insight on their anti-allergic potential and its mechanisms of action, *Front Pharmacol.* 10 (2019), 677.
- [134] W. Luo, Z. Du, Y. Zheng, et al. Phytochemical composition and bioactivities of essential oils from six Lamiaceae species, *Ind Crop Prod.* 133 (2019), 357–364.
- [135] S. Moumni, et al., Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some Lamiaceae species essential oils from Tunisia, *BMC Complement Med Ther.* 20 (2020), 103.
- [136] S. G. Araújo, et al., Volatile compounds of Lamiaceae exhibit a synergistic antibacterial activity with streptomycin, *Braz J Microbiol.* 45 (4) (2014), 1341–1347.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Fikrican Balcı
Doğum tarihi ve yeri : 07.01.1998 / Niğde
e-posta : fikricanbaci@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2019-2023
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015-2019
Lise	Pamukova Anadolu Öğretmen Lisesi; Sakarya	2011-2015

Yayın Listesi

. **Fikrican Balcı**, Mehmet Emin Diken, Serap Doğan, Antioxidant and Anti-cholinesterase Inhibition Properties of *Melissa officinalis* subsp. *Officinalis* and *Lavandula angustifolia*. *Materials, Methods & Technologies*. 16 (2022), 317-324.