T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE ENDEMİĞİ *LATHYRUS CZECZOTTIANUS* (FABACEAE)'UN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ VE BAZI FARMASÖTİK ENZİMLER ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ramazan CEYLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran-2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Ramazan CEYLAN

15/06/2015

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

TÜRKİYE ENDEMİĞİ *LATHYRUS CZECZOTTIANUS* (FABACEAE)'UN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ VE BAZI FARMASÖTİK ENZİMLER ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ramazan CEYLAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

2015, 61 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Doç. Dr. Murad Aydın ŞANDA
Doç. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Bu çalışma *Lathyrus czeczottianus*' un farklı çözücülerle (etil asetat, su ve metanol) elde edilen özütlerin fitokimyasal içeriklerini, antioksidan etkileri ve bazı farmasötik enzimlerin inhibitör potansiyellerini değerlendirmek için gerçekleştirildi. Serbest radikal süpürme (DPPH ve ABTS), indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC), fosfomolibdenyum, β-karoten/linoleic asit ve metal şelatlama testlerini içeren farkı antioksidan testleri kullanıldı. Ayrıca toplam fenolik ve flavonoid içeriği sırasıyla Folin-Ciocalteu ve $AlCl_3$ metodları tarafından belirlendi. Etilasetat, methanol ve su ekstraktları 96 kuyucuklu mikroplakada kolorimetrik metodlar kullanarak asetilkolinesteraz (AChE), bütirilkolinesteraz (BChE), tirozinaz, α-amilaz ve α-glukozidaz inhibitor aktiviteleri için test edildi. Antioksidan ve enzim inhibitor yetenekleri özütleme için kullanılan çözücülerden etkilenmiştir. Genel olarak deneysel sonuçlar metanol ve su özütlerinin güçlü bir antiokisan aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Enzim inhibitör sonuçlarında da metanol özütünün iyi bir inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Çalışılan özütlerin fenolik içeriği ile antioksidan potansiyelleri (metal şelatlama hariç) arasında önemli bir kolerasyon vardır. Elde edilen bu sonuçlar temelinde, *Lathyrus czeczottianus*' un özütleri doğal bir antioksidan kaynağı olarak düşünülebilir. Bu sonuçlar, *Lathyrus czeczottianus*' un gıda, farmakoloji ve kozmetik gibi bazı endüstrilerde kullanılmak üzere antioksidanların doğal bir kaynağı olarak hizmet edebileceğini öngörmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan kapasite, Anti-kolinesteraz, Anti-amilaz, Anti-glukozidaz, Anti-tirozinaz, Fabaceae, *Lahyrus*, Endemik

ABSTRACT

MS THESIS

SCREENING FOR ANTIOXIDANT CAPACITY AND INHIBITORY EFFECT ON SOME PHARMACEUTICAL ENZYMES OF *LATHYRUS CZECZOTTIANUS* (FABACEAE), ENDEMIC TO TURKEY

Ramazan CEYLAN

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

Advisor: Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

2015, 61 Pages

Jury
Prof. Dr. Adurrahman AKTÜMSEK
Assoc. Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA
Assoc. Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

The present study was carried out to assess the phytochemical contens, antioxidant effect, and potentials of some pharmaceutical enzymes of different solvents (ethylacetate, methanol, and water) extracts obtained from *Lathyrus czeczottianus*. Different antioxidant assays were used including free radical scavenging (DPPH and ABTS), reducing power (FRAP and CUPRAC), phosphomolybdenum, β-carotene/linoleic acid and metal chelating assays. Also, total phenolic and flavonoid content were determined by Folin-Ciocalteu and $AlCl_3$ methods, respectively. The ethyl acetate, methanol and water extracts were tested for acetylcholinesterase (AChE), butyrlcholinesterase (BChE), tyrosinase, α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities using colorimetric methods in a 96-well microplate. The antioxidant and enzyme inhibitory abilities were affected by solvent used for extraction. Generally, the experimental results revealed that methanol and water extracts possess strong antioxidant activity. The enzyme inhibitory results also find the methanol extract has good inhibitory acitivity. Total phenolic content of studied extracts were significantly correlated with antioxidant potentials (except for metal chelating activity). On the basis of the results obtained, *Lathyrus czeczottianus* extracts should be regarded as a valuable source of natural agents. These findings suggest that the *Lathyrus czeczottianus* could serve as an important natural resource of antioxidants for using in the some industries, including food, pharmacology and cosmetics.

Keywords: Antioxidant capacity, Anti-cholinesterase, Anti-amylase, Anti-glucosidase, Anti-tyrosinase, Fabaceae, *Lathyrus*, Endemic

ÖNSÖZ

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji-Biyokimya araştırma laboratuvarında yürütülmüş olan bu yüksek lisans tez çalışmasında Türkiye florası için endemik bir bitki olan *Lathyrus czeczottianus* (Fabaceae) türünün antioksidan özellikleri ve bazı farmasötik enzimler üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışma konusunu veren ve çalışmanın oluşmasındaki desteklerinden dolayı başta danışman hocam Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK' e teşekkür ederim. Tez çalışması boyunca bilgilerinden yararlandığım ve bu süreç boyunca her türlü desteği esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Göklap Özmen Güler'e teşekkür ederim. Antioksidanlar konusunda bilgilerini sakınmadan benimle paylaşan, çalışmama ufuk katan ve analizlerin yapılmasında beni yalnız bırakmayan Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden değerli hocam Sayın Doç. Dr. Cengiz SARIKÜRKCÜ'ye teşekkür ederim. Bilimsel kariyerimin her aşamasında çalışmalarıma katkıda bulunan, her sorunumla yakından ilgilenen ve bununla birlikte bu tez çalışmasının tüm aşamalarında hiçbir yardımını esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Dr. Gökhan ZENGİN'e teşekkür ederim. Laboratuvarda numunelerin hazırlanmasında, ekstraksiyon çalışmalarında ve kapasite tayin testlerinde hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen laboratuar arkadaşım doktora öğrencisi Şengül UYSAL' a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü destekle yanımda olan aileme içtenlikle teşekkür ederim.

TÜBİTAK 113Z892 nolu projenin bir kısmı olan tezim için maddi destek sağlayan TÜBİTAK Kimya-Biyoloji Araştırma Grubu'na teşekkür ederim.

Ramazan CEYLAN
KONYA-2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar 5
2.1.1. Serbest Radikaller 5
2.1.2. Antioksidanlar 13
2.2. Fenolik Bileşikler 17
2.2.1. Flavonoidler 17
2.2.3. Flavonoid olmayanlar 19
2.3. Antikolinesteraz Aktivite 22
2.4. α-amilaz ve α-glukozidaz İnhibitör Aktivitesi 23
2.5. Antitirozinaz Aktivite 24
2.6. Fabaceae Familyası ve *Lathyrus* cinsi 25

3. MATERYAL VE YÖNTEM **27**

3.1. Bitki Materyali ve Bitkisel Özütlerin Hazırlanması 27
3.2. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri 27
3.2.1. Toplam Antioksidan Komponentlerin Belirlenmesi 27
3.2.2. Serbest Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi 28
3.2.3. İndirgeme Gücünün Belirlenmesine Yönelik Testler 29
3.2.4. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi 30
3.2.5. Metal Şelat Aktivitesi 31
3.3. Enzim İnhibisyonuna Yönelik Testler 31
3.3.1. Anti-kolinesteraz aktivitesi 31
3.3.2. Anti-amilaz aktivitesi 32
3.3.3. Anti-glukozidaz aktivitesi 32
3.3.4. Anti-tirozinaz aktivitesi 32

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **34**

4.1. Toplam Antioksidan Komponentler 34
4.1.1. Toplam Fenolik İçerik 34
4.1.2. Toplam Flavonoid İçerik 34

4.2. Serbest Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi 35
4.2.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi 35
4.2.2. ABTS radikali süpürme aktivitesi 37
4.3. İndirme Gücünün Belirlenmesi 38
4.3.1. FRAP testi 38
4.3.2. CUPRAC testi 39
4.4. Toplam Antioksidan Kapasite 41
4.4.1. Fosfomolibdat testi 41
4.4.2. β-karoten/Linoleik asit test sistemi 41
4.5. Metal Şelatlama Aktivitesi 43
4.6. Enzim İnhibisyon Sonuçları 44
4.6.1. Kolinestraz İnhibisyonu 45
4.6.2. α-amilaz ve α-glukozidaz inhibisyonu 46
4.6.3. Tirozinaz enzimi inhibisyonu 47

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 49

5.1 Sonuçlar 49
5.2 Öneriler 49

KAYNAKLAR 51

ÖZGEÇMİŞ 60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

AChE : Asetilkolinesteraz

BChE : Bütirilkolinesteraz

CUPRAC : Bakır (II) iyonu İndirgenme Antioksidan Kapasitesi

DPPH : 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil

FRAP : Demir İndirgeme Gücü

GAE : Gallik Asit Eşdeğeri

RE : Rutin Eşdeğeri

TE : Troloks Eşdeğeri

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Dünya üzerindeki yaşamın başlangıcı ile birlikte, bitkilerle insanlar ve hayvanlar arasındaki ilişki de başlamıştır ve yüksek yaşam formları tarafından ihtiyaç duyulan barınma, oksijen, gıda ve ilaçların çoğu bitkilerle sağlanmıştır. Zamanla toplulukların oluşması ile insanlar, yaşamın gereklerini karşılama da bitkileri tanımayı ve kategorilere ayırmayı öğrendi. Bu ihtiyaçlardan, bitkilerin ve bitki özütlerinin şifa verici olarak kullanımına dair bilinen ilk kayıt Sümer tabletlerindeki adamotunun ağrı kesici ve kanamayı durdurucu, hindiba köklerinin ise mesane hastalıklarında ve sarımsağın ise dolaşım sistemi bozukluklarında kullanıldığını içeren bilgilere ulaşılmıştır (Kong ve ark., 2003). Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin miktarı, eski çağlardan beri devamlı olarak bir artış göstermektedir.

20. yüzyılda Dünya Sağlık Örgütüne göre Dünya nüfusunun yaklaşık %80'i temel sağlık bakımı için bitkilere güvenmektedir ve Dünya'da bulunduğu tahmin edilen yaklaşık 250.000 bitki türünün %14-%28'ine karşılık gelen 35.000-70.000 bitki türünü ilaç olarak kullanmaktadır. Günümüzde küresel pazarlarda pek çok ilacın kaynağını da bitkilerden oluşturmaktadır (Padulosi ve ark., 2002; Mamedov, 2012). Dünya çapında bulunan bu 250.000 bitki türünden yalnızca %17'si tıbbi potansiyelleri bakımından bilimsel olarak araştırılmıştır (Fransworth, 1992). Bitkilerin kimyasal ve biyolojik çeşitliliği yeni farmasötik maddelerin geliştirilmesinde sınırsız yenilenebilir bir kaynak olarak düşünülmektedir. Sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla oluşu, bitkisel ilaçların daha ucuz ve kolay temin edilmesi tıbbi bitkiler ile bunlardan elde edilen biyolojik olarak aktif bileşikleri ilgi odağı haline getirmiştir (Baytop, 1999).

Yaşamak için temel öneme sahip olan oksijen molekülü metabolik olaylar sırasında hücre ve doku hasarında rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROS) olarak isimlendirilen toksik bir grup radikalin oluşumuna yol açar (Haraguchi, 2001). Radikal terimi, bünyesinde bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron içeren molekül veya molekül gruplarına verilen isim olarak tanımlanır. Eşlenmemiş elektron çiftlerinden dolayı bu moleküller oldukça reaktif olup diğer moleküller ile kolaylıkla reaksiyona girip yeni radikallerin oluşumuna yol açmaktadırlar. Bu şekilde serbest radikaller protein, karbohidratlar, lipidler ve nükleik asitlerle etkileşerek hücre ve doku hasarının meydana gelmesinde büyük rol oynamaktadırlar (Valko ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda serbest radikallerin kardiovasküler hastalıklar, birçok kanser türü başta olmak üzere kronik ve dejeneratif hastalıkların gelişmesine katkıda bulunduğu rapor

edilmiştir (Aruoma, 1996). Organizmada serbest radikalleri veya bunların zararlı etkilerini ortadan kaldıran enzimatik savunma sistemi mevcuttur. Bu savunma sistemi katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz'dan oluşmaktadır. Ancak, UV ışınlara maruz kalma, kirlilik, sigara içimi gibi çeşitli faktörler bu enzimatik savunma sisteminin çalışma kapasitesini bozacak olursa serbest radikallerin organizmada daha fazla birikimine ve belirtilen zararlı etkilerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Halliwell, 2007; Rios ve ark., 2009). Bu durumda antioksidanlar olarak nitelendirilen bileşiklerin diyetle alınmaları oldukça önemli olmaktadır. Bu amaçla gıdaların işlenmesi sırasında sentetik antioksidanlar olarak bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve propil gallat (PG) kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu sentetik antioksidanların toksik etkilerini göstermiş olup bunların kullanımlarını şüpheli hale getirmektedir (Ito ve ark., 1986; Safer, 1999). Bu sebeple bu sentetik antioksidanların daha güvenli doğal antioksidanlarla yer değiştirmesi gerekmektedir.

Alzheimer hastalığı, etiyolojisi tam olarak bilinemeyen, geri dönüşümsüz sinir hücresi kaybı; kolinerjik sinir iletiminde, hafıza ve zihinsel işlevlerde, düşünme ve yorumlamada zorluklar; kişilik ve davranış bozuklukları ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır (Tayeb ve ark., 2012). Oldukça karmaşık olan bu hastalığın fizyolojisinde nöron ve akson kaybı ile asetilkolin seviyesinde azalma görülmektedir. Bu sebepten ötürü asetilkolin seviyesini artırmak alzhemier tedavisinde önemli bir yoldur. Asetilkolin düzeylerini arttırmak için uygulanacak bir diğer yöntem ise asetilkolini yıkan kolinesteraz enzimlerinin baskılanmasıdır. Asetilkolinesteraz (AChE; asetilkolin asetil hidrolaz, E.C. 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BChE, açilkolin açil hidrolaz, E.C. 3.1.1.8) farklı genlerle kodlanan ancak özellikle substrat seçicilikleri ve bazı katalitik mekanizmalarındaki farklılıkları nedeniyle birbirinden ayrılan yaygın dağılımlı enzimlerdir (Howes ve ark., 2003). AChE, "gerçek kolinesteraz"; BChE ise, "psödokolinesteraz" veya "nonspesifik kolinesteraz" olarak da bilinmektedir. Çalışmalar, kolinesteraz inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzey artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki bilinç yetmezliğini iyileştirebileceğini ve bu amaçla Alzheimer tedavisinde galatamin, fizostigmin gibi sentetik kolinesteraz inhibitörleri geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu sentetik inhibitörlerin kısa ömürlü olmaları ve çeşitli toksik etkileri klinik anlamda bu inhibitörlerin sınırlandırılmalarına yol açmıştır (Melzer, 1998; Schulz, 2003).

Tirozinaz bakır içeren bir enzim olup melanin sentezinde anahtar rol oynar. Melanin sentezi melanositler içinde, tirozinin, tirozinaz enzimi aracılığı ile önce dihidroksi fenilalanin (DOPA)'e, sonra DOPA-kinon'a ve ondan da siyah-kahve rengi veren ömelanin ve sarı-kırmızı rengi veren feomelanin'e dönüşmesiyle oluşur. Bu işlevi ile tirozinaz deri ve saç renginin oluşmasında görev alır. Tirozinaz enzimi ayrıca fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek meyve ve sebzelerde koyulaşmaya sebep olur (Canovas ve ark., 1982; Rodrıguez-Lopez ve ark., 1991; Cooksey ve ark., 1997). Bu açıdan tirozinaz gıda endüstrisi içinde büyük öneme sahiptir. Tirozinaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla başta kojik asit olmak üzere birçok sentetik inhibitör geliştirilmiş olmasına rağmen bunların uzun periyotta toksik etkilerinin bulunması bu inhibitörleri şüpheli hale getirmiş ve bunların yerine doğal inhibitörlerin belirlenmesine yönelik çalışmaları ilgi odağı hale gelmştir (Tocco ve ark., 2009).

Diabet son yıllarda toplumun büyük bir kısmını etkileyen temel sağlık problemlerinden biridir. Diabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbohidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik bir metabolizma hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Danaei ve ark., 2011). Diabetin tedavisinde gerek insülin gerekse oral antidiabetik ilaçların düzenli olarak kullanılmaları, diyabetli hastaların yaşam sürelerini belirgin olarak uzatmış, diyabetli yaşam süresinin artmasına bağlı gelişen kronik komplikasyonlar diyabetin en önemli mortalite ve morbilite nedenleri arasındadır. Diabet tedavisinde temel yollardan birisi olarak karbohidrat metabolizmasında temel rol oynayan amilaz ve glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu gelmektedir. Yapılan çalışmalar amilaz ve glukozidaz enzimlerinin inhibe edilmesi ile kan glukoz seviyelerinin önemli derecede düşürüldüğünü göstermektedir (Tundis ve ark., 2010). Bu amaçla oral diabetik ilaçlarda akarboz, vigliboz gibi enzim inhibitörleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu inhibitörlerin ishal başta olmak üzere gastrointestinal sistemde meydana getirdiği problemler bu inhibitörlerin yan etkileri arasında belirtilmektedir. Bu bağlamda diabet tedavisinde daha güvenli doğal inhibitörlerin belirlenmesi ve bu kullanımlarının aydınlatılması birey ve toplum sağlığı açısından önemli bir konudur (Chakrabarti ve ark., 2002).

Bu çalışma ile ele alınan olan ülkemiz için endemik olan *Lathyrus czeczottianus* (Fabaceae) taksonun enzim inhibitör aktiviteleri ile antioksidan özellikleri ilk defa belirlenerek geleneksel Anadolu hekimliğinde de faydalanılan bu taksonların kullanımlarının bilimsel bir temele oturtulması sağlanacaktır. Bu şekilde ele geçen

veriler gıda, farmakoloji endüstrileri için değerli olabilecektir. Sonuçta bu verilerin ülke ekonomisine katkı sağlanayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Oksijen paradoksu; aerobik organizmalar yaşamak için oksijene ihtiyaç duyar ama oksijenin serbest radikal üretimi ve oksidatif stresle ilişkili olması ve bu organizmalara toksik olması gerçeğiyle tanımlanır. Çeşitli serbest radikaller, yaşamlarını sürdürebilmek için gerekli normal fizyolojik süreçlerindeki hücrelerin, solunum ve diğer biyokimyasal reaksiyonların yaygın ürünleridir. Oksijeninin toksik de olabilen bu etkisini yok etmek için, yaşayan organizmalar bu son derece reaktif olan serbest radikalleri nötralize edebilen su ve yağda çözünen antioksidanlar üretir (Davies, 1995). Sağlıklı yaşam için vücudun antioksidan savunması ve oksidatif stress arasındaki hassas denge korunmak zorundadır. Vücudun antioksidan mekanizması optimum düzeyde çalışmazsa aşırı serbest radikal üretimi sonucunda, lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitleri içeren çeşitli biyomoleküller zarar görebilir.

2.1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikal, bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren atom ya da molekül olarak tanımlanır. Serbest radikaller homolitik, heterolitik veya redoks reaksiyonlarının ürünleri olarak oluşabilirler ve bu radikaller sıklıkla reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinden oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri, bir serbest radikal olmayan hidrojen peroksit gibi diğer reaktif oksijen türlerinin yanı sıra oksijen taşıyan serbest radikalleri içerir. Benzer bir şekilde reaktif azot türleri, hem azot içeren serbest radikalleri hem de tepkime merkezi azot olan diğer reaktif molekülleri içerir (Turpaev, 2002). Yaygın serbest radikaller ve oksidanlar Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

Serbest radikaller, normal solunum ve hücresel fonksiyonlar boyunca üretilmektedir. Normal fizyolojik koşullar altında, solunum esnasında insan vücudu tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık %2'si negatif yüklü bir serbest radikal olan süperoksit anyonuna ($O_2^{\cdot -}$) dönüştürülür (Winterbourn, 2008). İnsan vücudu çoğunluğunun hemoglobin ve diğer proteinlerde bulunan yaklaşık 4.5 mg'da demir ihtiva eder. Buna rağmen, çeşitli küçük moleküllerle kompleksler oluşturulmasında bulunan demirin küçük bir miktarı, hidroksil radikali üretiminde hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilir (Fenton reaksiyonu). Genel olarak; süperoksit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksi radikali gibi oksijen merkezli serbest radikaller (Reaktif Oksijen Türleri) ve nitrojen oksit, oksidatif stress indüklenmesinde önemli rol oynarlar (Gülçin, 2012).

Nitrik oksit, nitrik oksit sentezi vasıtasıyla pek çok hücre tipi tarafından L-arjinin tarafından sentezlenmektedir. Nitrik oksit ve süperoksit hücrelerde üretilen başlıca reaktif türlerdir. Hem süperoksit hem de nitrik oksit sırasıyla reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri üreten diğer türlerle reaksiyona girebilir. Nitrik oksit aynı zamanda demir iyonları gibi geçiş metallerine bağlanabilir ve bu ikincil haberleşme siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunda önemli rol oynar (Powers ve Jackson, 2008). Genellikle, süperoksit anyon radikali ve nitrik oksit, normal fizyolojik fonksiyonlar boyunca hücreler tarafından üretilen temel serbest radikallerdir.

Tablo 2.1. İnsan fizyolojisinde karşılaşılan yaygın serbest radikaller ve oksidanlar

Serbest Radikaller	Oksidanlar
▪ Süperoksit anyon radikali $O_2^{\cdot -}$	▪ Singlet oksijen $^1O_2$
▪ Hidroksil radikali $HO^{\cdot}$	▪ Ozon O_3
▪ Hidroperoksil radikali $HOO^{\cdot}$	▪ Hidrojen peroksit H_2O_2
▪ Peroksil radikali $L^{\cdot}$	▪ Lipid hidroperoksit LOOH
▪ Lipid radikali $LOO^{\cdot}$	▪ Hipoklorit HOCl
▪ Lipid peroksil radikali $ROO^{\cdot}$	▪ Nitröz asit HNO_2
▪ Lipid alkoksil radikali LO	▪ Peroksinitröz asit ONOOH
▪ Nitrik oksit $NO^{\cdot}$	▪ Peroksinitrit $ONOO^-$
▪ Nitrozil katyon NO^+	▪ Dinitrojen trioksit N_2O_3
▪ Tiyil radikali $RS^{\cdot}$	▪ Nitril klorit NO_2Cl
▪ Protein radikal $P^{\cdot}$	▪ Nitroksil anyonu NO^-

2.1.1.1. Serbest Radikallerin Çeşitli Kaynakları

Serbest radikallerin iki ana kaynağı vardır: endojen kaynaklar ve ekzojen kaynaklar. Serbest radikallerin başlıca endojen kaynakları Tablo 2.2.'de özetlenmiştir. En yaygın oksijen türleri süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve ozondur. Süperoksit oluşumu çoğunlukla mitokondri içinde meydana gelir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, ATP'de depolanan enerjinin ana kaynağıdır. Oksitlenebilen organik moleküllerden moleküler oksijene elektronların hareketi, mitokondriyal elektron taşıma sistemi tarafından ATP üretimi için sorumludur. Bu süreç boyunca, süperoksit anyonları, oksijene elektronların sızmasıyla oluşmaktadır. Süperoksit ayrıca, mitokondride nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) ve ksantin oksidaz tarafından aracılık edilen moleküler oksijenin indirgenmesi sürecinde enzimatik olarak da oluşmaktadır. Süperoksit diğer serbest radikallere göre daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir, ama hidroksil radikalinden daha az reaktiftir. İltihaplı bölgelerdeki hücreler de süperoksidi

nispeten fazla miktarlarda üretirler. Süperoksidin membran geçirgenliği yoktur fakat hücre içine diffüze olabilirler (Powers ve Jackson, 2008).

Peroksizomlar, serbest radikallerin bir diğer önemli kaynağıdır. Peroksizomlar, uzun zincirli ve kısa zincirli yağ asitlerinin β-oksidasyonu ve ürik asidin indirgenmesi gibi önemli fizyolojik fonksiyonları gerçekleştiren özelleşmiş sitoplazmik organellerdir. Peroksizomal oksidaz hidrojen peroksit üretebilme yeteneğine sahiptir. Ksantin ve ksantin oksidaz reaksiyonu, ürik asit oluşturmak için, moleküler oksijenin bir ve iki elektron indirgenmesiyle sırasıyla süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit üretir. Hidrojen peroksit, hücre membranlarından geçebilen nisbeten sabit bir ajandır. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi serbest radikaller üretebilir, ama lipidleri ya da DNA'yı direkt olarak olarak oksidize edemezler. Bu yüzden, hidrojen peroksidin sitotoksisitesi, Fenton reaksiyonu gibi metal katalizli reaksiyonlar vasıtasıyla hidroksil radikali üretme kabiliyeti nedeniyledir. Ancak, hidroksil radikalleri oldukça reaktiftirler ve üretildikleri yakın yerlerdeki biyomoleküllere zarar verebilirler. Bu radikaller, fizyolojide karşılaşılan en tehlikeli serbest radikallerden bazılarıdır (Halliwell, 1995). Singlet oksijen, oksijenin elektriksel olarak reaksiyona girmede en yatkın formudur, ama bir serbest radikal değildir. Ancak, singlet oksijen suda süperoksit anyonunun dismutasyonu boyunca üretilen bir reaktif oksijen türüdür.

Bir diğer endojen kaynaklı üretilen oksijen serbest radikali peroksil radikalidir ($ROO^{\cdot}$). En basit formu, süperoksidin protonlanmış formu olan hidroperoksil radikalidir ($HOO^{\cdot}$). Hidroperoksil radikali, lipid peroksidasyonunu başlatmasıyla bilinmektedir. Daha önce belirtildiği gibi nitrik oksit, pek çok hücre tipinde nitrik oksit sentetaz (NOS) vasıtasıyla L-arjininden sentezlenmektedir. Nitrik oksit; suda çözünebilen, vücutta sinyal molekülü olarak önemli bir rol oynayan kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Nitrik oksit ile süperoksit reaksiyonu, protein ve DNA' ya zarar veren güçlü bir oksitleyici ajan olan peroksinitriti ($ONOO^{-}$) de üretir (Choudhari ve ark., 2013).

Fagositoz boyunca beyaz kan hücreleri gibi fagositik hücrelerin bol miktarda oksijen tüketmesi ile ortaya çıkan bir süreç olan solunum patlaması da endojen serbest radikallerin bir diğer kaynağıdır. Fagositoz, çoğunlukla süperoksit ve aynı zamanda hidrojen peroksit (solunum patlaması) gibi serbest radikaller üreten imun savunmanın önemli bir fonksiyonudur. Buna ek olarak miyeloperoksidaz da salgılar. Nötrofillerde yüksek düzeyde üretilen miyeloperoksidaz, kloridin fizyolojik konsantrasyonu varlığında hidrojen reaksiyona girer ve hipoklorit asit (HOCl) üretilmesi sağlanır. Bu kısa ömürlü ve diffüze olabilen oksidan, patojen mikroorganizmaların öldürülmesinde

önemli bir rol oynar (Carmona-Gutierrez ve ark., 2013). Serbest radikaller üreterek oksidatif strese sebep olan iskemi boyunca, ksantin enzimleri aktive edilebilir. Bununla birlikte antioksidan enzimlerin konsantrasyonu azalabilir. Reperfüzyon boyunca da oksadatif stres artar. Yorucu egzersiz de de serbest radikallerin üretiminden dolayı oksidatif stres artar, ama vücut bu aşırı serbest radikalleri nötralize etme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle düzenli egzersizin sağlıklı faydaları vardır (Wagner ve ark., 2010).

Tablo 2.2. Serbest radikallerin endojen kaynakları

Fizyolojik Proses	**Açıklama**
Mitokondriyal solunum	Yaşamın temel süreci süperoksit anyon radikali üretir.
Otooksidasyon	İnsan vücudundaki pek çok biyolojik molekülün (hemoglobin, miyoglobin, katekolaminler vb.) otooksidasyonu serbest radikal üretebilir. Süperoksit oluşan temel serbest radikaldir.
Enzimatik reaksiyon	Ksantin oksidaz, lipoksijenaz, aldehid oksidaz gibi pek çok enzimi içeren enzimatik reaksiyonlar serbest radikal oluşturabilirler.
Solunum patlaması	Fagositoz boyunca fagositlerin oksijenin büyük bir miktarını tükettiği süreçtir.
Metal iyonları	Vücut için esas olan demir ve bakır iyonları gibi metal iyonları serbest radikal üretmek için hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilir.
Yorucu egzersiz	Serbest radikal üreten ksantin oksidaz aktive olabilir.
Enfeksiyon	İşgalci mikroorganizmaları nötralize etmeye çalışan immun sistem de serbest radikaller üretebilir.
İskemi/Reperfüzyon	Serbest radikal oluşumuna sebep olan ksantin oksidaz aktive olabilir.

Serbest radikallerin dış kaynakları da vardır. Örneğin kirli havaya solumak insanları serbest radikallere maruz bırakabilir. Bu ekzojen kaynaklar Tablo 2.3.'de özetlenmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki; çapı 10 μm' den daha az olan kirli havada bulunan küçük parçacıklar astım atakları ve kroner obstrüktif akciğer hastalıklarının riskini arttırabilir. Kirli havadaki bu küçük parçacıklar, akciğer inflamasyonuna ve akciğer hücrelerine zarar veren serbest radikal aktivitelerine sahiptir (Li ve ark., 1996). Organik bileşikler ve metal iyonları bu parçacıkların temel bileşenleridir ve endüstriyel kaynaklardan kaynaklanabilir.

Sigara dumanı ile ilişki pek çok sağlık tehlikesi, sigarada var olan serbest radikaller ve oksitleyici bileşiklerin yüksek konsantrasyonları ile alakalıdır.

Bazı ilaçlar da oksidatif stres yaratabilir. Metotreksat, bleomisin, adriamisin, doksorubisin, topoizomeraz inhibitörleri ve menadion gibi anti-kanser ilaçları oksidatif strese yol açabilir. Organ transplantasyonunda doku reddini önlemek için kullanılan mikofenolik asit, siklosporin A ve sirolimus gibi immün-baskılayıcı ilaçlar da oksidatif strese neden olabilir. Oksidan olan genel ilaçlar Tablo 2.4'de özetlemiştir. Pek çok insan için, tıbbi gözetim altında alınan bu ilaçlar herhangi bir problem ortaya çıkartmaz. Ancak, glukoz 6-fosfat eksikliği bulunan bireylerde bu ilaçların toksik olma riski daha fazladır. Hücresel redoks dengesi için önemli bir enzim olan glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, eritrositlerde bulunan temel bir antioksidan enzimdir ve kırmızı kan hücrelerinin fonksiyonunun stabilitesi ve uygunluğu için önemlidir. Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz eksikliği kalıtsal bir hastalıktır ve siyah nüfusa göre beyaz ve Akdeniz nüfuslarında daha yaygındır. Kırmızı kan hücrelerinde bu enzime yeterli miktarda sahip olunmadığı zaman glukoz 6-fosfat dehidrojenaz eksiliği oluşur. Böyle bir eksiklik, kırmızı kan hücrelerinin erken yıkımına sebep olur ve hemoglobin kan içine yayılır (hemoliz). Bu hastalarda; bazı ilaçlar, bakla gibi gıdalar, enfeksiyon ve aşırı stres kırmızı kan hücrelerinin tahribatını tetikler (Ho ve ark., 2007).

Alkollü içeceklerin (etanol) kullanımı da oksidatif strese neden olabilir. Özellikle alkol bağımlılığı çok ciddi bir sağlık tehlikesidir. Çünkü alkol, karaciğer sirozuna neden olan bir karaciğer toksini olarak bilinir. Aşırı alkol tüketimi özellikle alkoliklerde kayda değer oranda oksidatif strese nede olabilir (Das ve Vasudevan, 2007)

Karbon tetra klorür, kloroform, trikloretilen, benzen, ksilen ve toluen gibi endüstriyel çözücüler oksidatif strese neden olabilir ve aynı zaman da bu kimyasalların bazıları karsinojeniktir. Bu çözücüler karaciğerde ilaçların büyük oranda metabolizmasından sorumlu olan sitokrom P450 enzimlerini (özellikle CYP2E1) aktive edebileceği ve böylelikle oksidatif strese neden olabileceği önerilmiştir (Al-Ghamdi ve ark., 2003).

Tablo 2.3. Oksidatif stresin dış kaynakları

Dış Kaynak	Açıklama
Hava kirliliği	Kirli havadaki partikül maddelere maruz kalma; astım, kardiyovasküler hastalıklar ve akciğer kanseri riskini arttırarak önemli bir oksidatif stres sağlayabilir.
Havadaki inorganik partiküller	Endüstri serktöründe çalışan bireylerin havadaki mineral partiküllerini (özellikle kuvars, silis ve asbestos gibi) yutması oksidatif strese sebep olabilir.
Sigara kullanımı	Sigara dumanında bulunan oksidanlar akciğer kanseri riskine sebep olabilirler.
Bazı ilaçlar	Bleomisin, adriamisin ve sülfasalazin gibi ilaçlar oksidatif strese sebep olabilir.
Endüstriyel çözücüler	Kloroform, karbon tetra klorit gibi endüstriyel çözücüler solunduklarında oksidatif strese sebep olabilir.
Radyasyona maruz kalma	Aşırı ultraviyole ışığa maruz kalma, güneşe uzun süre maruz kalma (güneş banyosu) ve kanser tedavisinin bir parçası olan radyasyon tedavisi oksidatif stresi arttırır.

Tablo 2.4. Oksidatif stresi tetikleyen bazı ilaçlar

İlaç tipi	Örnekleri
Ağrı kesiciler	Aspirin, Fenasetin
Anti kanser	Metotreksat, bleomisin, adriamisin, doksorubisin, topoizomeraz inhibitörleri, menadion
Anti malarial	Klorokin, meflokin, primakin, pamaquine
İmmün baskılayıcılar	Siklosporin A, sirolimus, takrolimus, mikofenolik asit
Antibiyotikler	Kloramfenikol, siprofloksasin, moksifloksasin, nalidiksik asit, norfloksasin, ofloksasin, sülfasetamid, Bactrim (sulfamethoxazole ve Trimetoprim), sülfadiazin, sülfanilamid, sulfasalazin, sulfafurazole
Antiretroviral ajanlar	Indinavir, atazanavir, azidotimidin
Diğer ajanlar	Etil alkol

2.1.1.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Hasarı

Daha önce de belirtildiği gibi yüksek reaktivitesinden dolayı serbset radikaller, lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitleri içeren hemen hemen tüm biyomoleküllere zarar verebilir. Lipidler, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın en önemli hedefleridir. Lipid peroksidasyonu, membran akışkanlık ve geçirgenliğinin değişmesiyle hücre membranlarına hasar verebilir. Serbest radikaller tarafından aracılık edilen lipid peroksidasyonu, başlama, uzama ve sonlanma aşamalarını içeren bir dizi zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonunu başlatabilen serbest radikaller hidroksil radikali (en reaktif), alkoksil radikalleri, peroksil radikalleri ve peroksinitri radikalleridir. Demir ve bakır iyonları gibi metal iyonları da zincir

başlangıcına katalitik olarak katkı sağlayabilirler. Lipid peroksidasyonundaki ilk adım, çoklu doymamış yağ asidi molekülünden bis alllik hidrojenini (çoklu doymamış yağ asitlerinde iki farklı karbon-karbon çift bağı ile ilişkili allik pozisyonundaki benzer karbon atomuna bağlı hidrojen atomu) ayrılması ile bir serbsest radikal formunun oluşmasıdır. Bu radikal daha sonra oksijen molekülü ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur ve oluşan bu radikal bir başka lipid molekülündeki çoklu doymamış yağ asidi parçası ile reaksiyona girebilir ve konjuge dien lipid hidroperoksit oluşur ve böylelikle oluşan yeni pentadienil radikali zincir reaksiyonu uzatır. Tüm çoklu doymamış yağ asitleri lipid peroksidasyonuna maruz kalabilir ve lipid peroksidasyon için reaksiyon hızı dokosahekzanoik asit>eikosapentaenoik asit>araşidonik asit>linoleik asittir. Buna ek olarak, siklooksijenaz ve lipoksijenaz da çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumlu iki enzim ailesidir. Bu enzimler çoklu doymamış yağ asitlerini içeren çeşitli reaksiyonları katalizler ve prostoglandinler ve tromboksanları içeren çeşitli lipid türevleri üretilir (Xu ve ark., 2012). Buna rağmen, lipid peroksidasyonunun temel son ürünleri malonildialdehit, akrolein ve 4-hidroksi-2-noneal gibi aldehitlerdir. Akrolein ve az da olsa 4-hidroksi-2-noneal protein, DNA ve fosfolipidlere zarar verebilen oldukça reaktif bileşikleridir (Milne ve ark., 2011).

Amino asitler ve proteinler hidroksil radikali tarafından oksidatif hasara yatkındır. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri tarafından gerçekleştirilen protein oksidasyonu proteinlerin tüm aminoasit kalıntılarının yan zincirlerini içerir. Özellikle proteinlerin sülfür içerikli sistein ve metionin kalıntılatı, hem reaktik oksijen hem de reaktif azot türleri tarafından oksidasyona en yatkın olanlarıdır. Sistein kalıntılarının oksidasyonu disülfidlerin oluşumuna yol açar ve metionin, metionin sülfoksit kalıntılarına okside olur. Ancak, insan vücudunda bulunan disulfit redüktaz enzimleri böyle hasarlanmaları tamir edebilir, ama bunlar sadece tamir edilebilen proteinlerin okside formları için geçerlidir. Bununla birlikte aromatik aminoasit kalıntıları da serbest radikal hasarına yatkındır. Triptofan kalıntıları kolayca formilkinürenin, kinürein ve çeşitli hidroksi türevlerine okside olur. Fenilalanin ve tirozin kalıntıları da verimli çeşitli hidroksi türevlerine okside olur. Aynı zamanda peroksinitrit serbest radikali metionin, sistein, tirozin ve triptofan aminoasitlerinde hasar oluşturabilir. Glutamil, aspartil ve prolil yan zincirleri ile reaktif oksijen türlerinin reaksiyonu sonucu peptid bağı kopması oluşabilir. Protein oksidasyonunun sonucu olarak, protein karbonil türevleri, serbest radikal kaynaklı protein hasarın derecesinin bir göstergesi olarak kullanılabileği anlaşılmıştır (Berlett ve Stadtman, 1997).

İleri glikasyonun son ürünleri; proteinlerin amino grupları ve karbohidratlar arasındaki reaksiyonlar sonucunda oluşmaktadır. Kan glukoz kontrol göstergesi olan Hemeoglobin A_{1c}, hemoglobinin glikasyon ürünüdür. Bu ileri glikasyon ürünleri, Amadori, Schiff bazı ve Maillard ürünleri gibi çeşitli ara ürünler vasıtasıyla oluşmaktadır. Hidroksil radikalleri DNA'ya hasar vermenin yanısıra mutajenez, karsinojenez ve yaşlanmadan da sorumludur. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri, nükleotid bazlı doğrudan modifikasyon, apurinik/pirimidinik sitelerin oluşumu, DNA tek sarmal kırıkları ve daha az sıklıkla DNA çift sarmal kırıklarınını içeren DNA oksidasyonuna sebep olur. Tüm nükleotidler içinden guainin, oksidatif hasara en yatkın olanıdır. Hidroksil radikali, guaninin imidazol halkasındaki C4, C5 ve C8 ile etkileşime girebilir ve 8-hidroksiguanin oluşumu, DNA hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca peroksinitrit de guaninle reaksiyona girebilir ve bu reaksiyonda oluşan 8-nitroguanin de nitrosatif DNA hasarının bir göstergesi olarak düşünülebilir. Tek sarmal kırıkları deoksiriboz ile hidroksil radikalinin etkileşimi sonucunda olabilir (Smith ve ark., 2013). Oksidatif stres aynı zamanda mitokondriyal DNA'ya da hasar verebilir ve böyle hasarlar, insan derisini de içeren çeşitli dokularda kanser gelişimi ve yaşlanma ile ilgilidir (Birch-Machin ve ark., 2013). Reaktif oksijen türleri tarafından gerşekleştirilen RNA oksidasyonu da rapor edilmiştir, fakat DNA oksidasyonu gibi kapsamlı çalışmalarla incelenmemiştir. Hem ribozomal RNA hem de haberci RNA reaktif oksijen türleri tarafından okside olabilir.

Mitokondriyal DNA, nuklear DNA'sına göre oksidatif hasara daha yatkındır. Bunun sebebi ise mitokondriyal solunum esnasında üretilmiş olan reaktif oksijen türleridir. Yaşlanma süreci boyunca, mitokondriyal DNA mutasyonlarının birikimi ve oksidatif fosforilasyonun zarar görmesi ve antioksidan enzimlerinin ekspresyonlarındaki dengesizlik, reaktif oksijen türlerinin fazladan üretilmesi sonucunda oluşur (Wang ve ark., 2013).

2.1.1.3. Serbest Radikallerin Fizyolojik Rolü

Serbest radikaller ve radikal türevli reaktif türlerin yüksek konsantrasyonları tüm biyomoleküllere zarar vermesine rağmen, bu serbest radikallerin ılımlı konsantrasyonları özellikle de süperoksit anyonu, ilgili reaktif oksijen türleri ve nitrik okstit hücre sinyal prosesinde düzenleyici mediatörler olarak önemli rol oynarlar. Normal fizyolojik koşullar altında üretilen serbest radikallerin düzeyi vücudun antioksidan savunması tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve böylece serbest

radikaller için kararlı bir durum muhafaza edilmiş olur. Genellikle normal fizyolojik koşullarda hücreler redoks durumunda olmayı tercih eder ve bu durum hücresel fonksiyonları belirler. Hücreler, birbirleriyle iletişim halindedirler ve hücre sinyalizasyonu veya hücre transdüksiyonu olarak bilinen biyolojik mekanizma yoluyla dış uyaranlara yanıt verirler. Bu genellikle hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler tarafından uyarılırlar. Pek çok hücre tipi, sitokinler, büyüme faktörleri, çeşitli interlökinler, tümör nekroz faktörü α, anjiyotensin 2, sinir büyüme faktörleri ve fibroblast büyüme faktörleri tarafından uyarıldığı zaman düşük konsantrasyonlarda reaktif oksijen türleri üreten küçük bir oksidatif patlama ortaya çıkar. Bu yüzden reaktif oksijen türleri ikincil haberlerciler olarak fizyolojik rolü çok önemlidir (Valko ve ark., 2007). Reaktif oksijen türleri bağışıklıkta da önemli rol oynar. Oksidatif patlama, istilacı patojenleri öldüren immun hücreler taraından reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ile karakterizedir. Oksidatif patlamaya inflamatuar ortamlarda da karşılaşılır. Reaktif oksijen türleri hücre farklılaşmasını düzenler ve yaşlanmada önemli rol oynar. Reaktif oksijen türlerinin otofajiyi düzenlediği de bilinmektedir (Sena ve Chandel, 2012). Reaktif oksijen türlerinin çeşitli fizyolojik fonksiyonları Tablo 2.5.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.5. Reaktif oksijen türlerinin önemli fizyolojik rolleri

Reaktif Oksijen Türlerinin Önemli Fizyolojik Rolleri	
▪ Serbet radikaller hücre büyümesi ve hücre çoğalmasına yardım eder.	▪ Sinyal iletimi
▪ Serbest radikaller hücre bölünmesine yardım eder.	▪ Gen fonksiyonlarını düzenleyen protein kinazları aktive etme
▪ Hücrenin redoks dengesini sağlar.	▪ İmmun fonksiyonu düzenleme

2.1.2. Antioksidanlar

Vücudun antioksidan savunma sistemi hem iç kaynaklı hem de diyet türevli dış kaynaklı bileşikeri içerir. Antioksidanlar; yapısına, kaynağına ve etkilerine göre çeşitli sınıflara ayrılsa da (Tablo 2.6.) genel olarak üç ana kategoriyle şöyle sınıflandırılabilirler: antioksidan enzimler, zincir kırıcı antioksidanlar ve metal bağlayıcı proteinler (Dasgupta ve Klein, 2014). Temel antioksidan enzimler, endojen kaynaklı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksidazlardır. Serbest radikaller tarafından başlatılan zincir reaksiyonlara müdahale eden antioksidanlar, zincir kırıcı antioksidanlar olarak bilinir. Bu antioksidanlari hem suda hemde yağda çözünebilen küçük moleküllerdir. Karotenoidler, flavonoidler ve antioksidan vitaminler gibi bu

antioksidanlardan bazıları diyet kaynaklıdır. Ferritin, transferin ve seruloplazmin gibi endojen proteinler de önemli antioksidan proteinlerdir. Çünkü bu proteinler, bakır ve demir gibi metal iyonlarını, serbest radikaller Fenton reaksiyonu aracılığıyla oluşmasın diye bağlama yeteneğindedirler. Tüm antioksidanlar oksidatif stresin nötralizasyonu için önemli olmalarına rağmen, antioksidan enzimler en güçlü antioksidan savunmayı sağlarlar (Şekil 2.1.).

Tablo 2.6. Antioksidanların yapısına, kaynağına ve etkilerine göre çeşitli sınıflandırılması

A. Antioksidanların yapısına göre sınıflandırma **1. Enzimatik antioksidanlar: SOD, CAT, GPx, GR** **2. Non-enzimatik antioksidanlar** ***a)Metabolik antioksidanlar:* İndirgenmiş glutatyon, lipoik asit, L-arginin, melatonin, ürik asit, transferrin** ***b)Besinsel antioksidanlar:* E vitamini, C vitamini, karotenoidler**
B. Antioksidanların kaynağına göre sınıflandırma **1. Endojen antioksidanlar: Bilirubin, glutatyon, lipoik asit, ürik asit ve enzimatik antioksidanlar** **2. Diet kaynaklı antioksidanlar: C vitamini, E vitamini, karotenler ve polifenoller** **3. Metal Bağlayıcı proteinler: Albümin, seruloplasmin, ferritin, miyoglobin, transferrin**
C. Antioksidanların etkilerine göre sınıflandırma **1. Radikalleri nötralize etmek için katalitik sistemler** **SOD, CAT, GPx** **2. Metal iyonlarını bağlayarak serbest radikallerin oluşumunu engelleyen antioksidanlar** **Ferritin, seruloplasmin, kateşin** **3. Zincir kırıcı etkili antioksidanlar** **C vitamini, E vitamini, ürik asit, glutatyon, flavonoid** **4. Serbest radikalleri söndürerek etkili antioksidanlar** **Karotenoidler, antosiyanidinler**



Şekil 2.1. İnsan vücudundaki serbest radikallerin nötralize edilmesindeki çeşitli antioksidanların ekinliği

2.1.2.1. Antioksidan Enzimler

En önemli antioksidan enzim süperoksit dismutaz (SOD) olarak düşünülebilir. SOD, zararlı süperoksit anyonunu hidrojen peroksite çevirerek onu nötralize eder. SOD 'un üç farklı formu vardır ve bunlar SOD1, SOD2 VE SOD3'tür. SOD1 enzimi fonksiyonu için hem bakır hem de çinko gereklidir ve sitozolün yanı sıra mitokondride de bulunur. Manganez süperoksit dismutaz yani SOD2 çoğunlukla mitokondride bulunur. Süperoksit dismutaz enziminin üçüncü formu olan SOD3 ise hücre dışında bulunur (Miao ve Clair, 2009). SOD1'e oranla yüksek moleküler ağırlıklara sahip olan SOD2 ve SOD3 tetramer yapıya sahipken, SOD1 dimer yapıdır.

Bir diğer önemli tetramerik antioksidan enzim olan katalaz ise hidrojen peroksidi su ve oksijene çevirir. Böylelikle süperoksit radikali tamamen nötralize olmuş olur. Katalaz enzimi, 240 kDa moleküler ağırlığa sahip homotetramer bir yapıya sahiptir ve hücre içinde yaygın bir şekilde dağılmıştır. Katalaz enzimi için, aktif bölgesine bağlanan kofaktör olarak demir gereklidir (Kirkman ve Gaetani, 2007).

Glutatyon peroksidaz (GPx) ise sekiz glutatyon peroksidaz (GPx1-GPx8) içeren filogenetik bir enzim ailesidir. Selenyum içerikli glutatyon peroksidazlar (GPx1-4 ve -6) ve selenyum içermeyen türleri (GPx5, -7 ve -8) hidroperoksitlerin detoksifikasyonun çok ötesinde önemli rol oynarlar. GPx 1-4 ve 6 isoformları, bu enzimlerin katalitik aktivitelerinde önemli rol oynayan selenosistein kalıntıları içerir ve bu grubun tüm üyeleri hidrojen peroksidin suya dönüşmesinde glutotyonu katalitik olarak indirgenmesinde kullanılır (Tappel, 1978). GPx1 selenoprotein tanımlanmış ilk

enzimdir. GPx1 homotetramer yapısındadır ve oksidatif stres sonrası hücrelerin geri kazandırılmasında önemli rol oynar. Ayrıca GPx1 kanserli ve nörodejenaratif hastalıklı bireylerin korunmasında da önemli rol oynar.

Yukarıda bahsedilen enzimlere ek olarak, peroksiredoksin, tioredoksin enzimleri de hücre içi hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda bulunan enzimlerdir (Kalyanaraman, 2013). Peroksiredoksinler, hidrojen peroksidi suya indirgeyen nonselenotiol peroksidazların (22-27 kDa) küçük bir ailesidir. Katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler, hidroperoksit kaynaklı hasardan hücrelerin korunmasından sorumlu başlıca enzimlerdir. Fakat peroksiredoksinler hidrojen peroksit tarafından kolaylıkla inaktive edilebilirler ve bu yüzden antioksidan enzim olarak kabiliyetleri sınırlıdır (Poynton ve Hampton, 2014). Tioredoksin ise yaygın bulunan bir redoks proteinidir ve insan tioredoksini, aktif merkezinde iki redoks reaktif sistin kalıntıları bulunan 105 aminoasitli bir proteindir. Bu protein redoks dengesini korumak için; hücre büyümesi, hücre döngüsü, gen ekspresyonu ve apoptozisi içiren hücresel yanıtta önemli rol oynar (Kondo ve ark., 2006).

2.1.2.2. Zincir Kırıcı Antioksidanlar

Zincir kırıcı antioksidanlar, serbest radikaller tarafından oluşturulan zincir reaksiyonunu kırarak serbest radikalleri nötralize etme yeteneğinde olan küçük moleküllerdir. Zincir kırıcı antioksidanlar hem iç hem de dış kaynaklı olabilirler. Serbest radikaller tarafından başlatılan zincir reaksiyonlarının en klasik örneği lipid peroksidasyonudur. Zincir kırıcı antioksidanlar, serbest radikal türlerinden hem elektron vererek hem de elektron alarak hareket ederler ve böylelikle kararlı türlere dönüştürülmüş olur. Zincir kırıcı reaksiyonlar iki ana kategoriye ayrılabilir: Suda çözünen ve yağda çözünen. En önemli suda çözünen zincir kırıcı antioksidan, askorbik asit olarak da bilinen C vitaminidir. C vitamini süperoksit, hidroksil, peroksil radikalleri (suda), hidrojen peroksit, hipoklorit asit ve singlet oksijen gibi oksidanları süpürme yeteneğine sahiptir. C vitamini bu süreçte sonunda okzalik asite ayrılan dehidroaskorbik asite dönüşür. İnsan kanında mevcut olan ürik asit de bir antioksidan olarak hareket eder. Ürik asit demir ile kompleks yapar ve böylelikle zararlı Fenton reaksiyonunu önler. Hem katabolizmasının son ürünü olan bilirubin, hücreleri hidrojen peroksidin toksik düzeylerinden koruyan mükemmel bir antioksidandır. Bilirubin ayrıca peroksil radikallerini de nötralize edebilir (Stocker ve ark., 1987).

En önemli yağda çözünen zincir kırıcı antioksidan 8 farklı formu olan E vitaminidir (tokoferoller ve tokotrienoller). E vitaminin en yaygın formu olan α-tokoferol, lipid peroksidasyonun zincir reaksiyonunu kırmada en etkilisidir. Karotenoidler de yağda çözünen önemli antiokidanlardandır ve en yaygın formu β-karotendir. Bu antioksidanlar, aynı zamanda peroksil radikallerini ve singlet oksijeni nötralize edebilir. Buna ek olarak, antioksidan aktiviteye sahip olan A vitamininin prekürsoru β-karotendir. Flavonoidler, meyve ve sebze gibi gıdalarda ve bitkilerde bulunan antioksidanlardır. Ayrıca, kahve ve çay içilmesi gerekli antioksidan savunma için yeterli flavonoid sağlayabilirler. Koenzim Q_{10}'nin indirgenmiş formu da yağda çözünen zincir kırıcı antioksidanlardandır ve lipid peroksil radikalini süpürme yeteneğine sahiptir. Koenzim Q_{10}, düşük dansiteli lipoprotein kolestrolün zararlı oksadasyonunu koruyan etkili bir antioksidandır (Young ve Woodside, 2001).

2.2. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunur ve insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturur. Fenolik asitler ya da bir başka deyişle polifenoller, bitkilerin sekonder metabolitleridir ve patojen saldırılarına ya da ultraviyole radyosayona karşı savunmaya katılırlar. 20. Yüzyılın sonlarına doğru yapılan birçok çalışma, polifenollerce zengin bitkilerin diyette uzun süreli tüketimi; kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, diabet ve nörojeneratif hastalıkların gelişmesini önlediğini kuvvetli bir şekilde önermiştir. Polifenoller ve diğer gıda fenolleri insan sağlığına faydalı etkilerinden dolayı artan bir bilimsel ilgi odağı haline gelmişlerdir.

Çeşitli bitki türlerinden 8000'den fazla polifenolik bileşik tanımlanmıştır. Tüm bitki fenolik bileşikleri, fenilalanin ya da benzer bir öncül madde olan şikimik asitten türemişlerdir. Fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubu bağlı en az bir aromatik halkaya bağlıdır. Flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilirler (Tablo 2.7.).

2.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler, 3 karbon köprüsü ile bağlanan 2 aromatik halka ile 15 karbon içeren polifenolik bileşiklerdir (Şekil 2.2.). Bu bileşiklerin (C_6-C_3-C_6) ana alt sınıfları ise şunlardır: Flavonlar, flavonoller, flavan-3-oller, isoflavonlar, flavanonlar ve antosiyanidinlerdir (Del Rio ve ark., 2013).

Flavonoller, mantalar ve algler dışında bitkiler aleminde oldukça yaygın olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir. En yaygın flavonoller kaemferol, quarcetin, isorhamnetin ve myricetindir ve tipik olarak glikozit bağlı bulunurlar. Yaygın olarak tüketilen meyve, sebze ve içeceklerde flavonol içeriği üzerine bilgiler mevcuttur (Hertog ve ark. 1992; Hertog ve ark., 1993; Crozier ve ark., 1997; McDonalds ve ark., 1998). Sarı ve kırmızı soğan quarcetin ve türevlerini yüksek düzeylerde içeren flavonollerin zengin bir kaynağıdır. Yine quarcetin'in bir başka türevi olan rutin ise yaygın diyet komponentidir.

Apigenin, luteolin gibi flavonlar ise yapı olarak flavonollere benzerdir, yalnız tek fark ise flavonlardaki C_3 karbonundaki oksijenasyon eksikliğidir. Genel olarak flavonlar yaygın olarak bulunmazlar fakat kereviz, maydonoz ve bazı bitkilerde kayda değer miktarlarda tespit edilmişlerdir (Stalmach ve ark., 2010; Clifford ve Crozier, 2011).

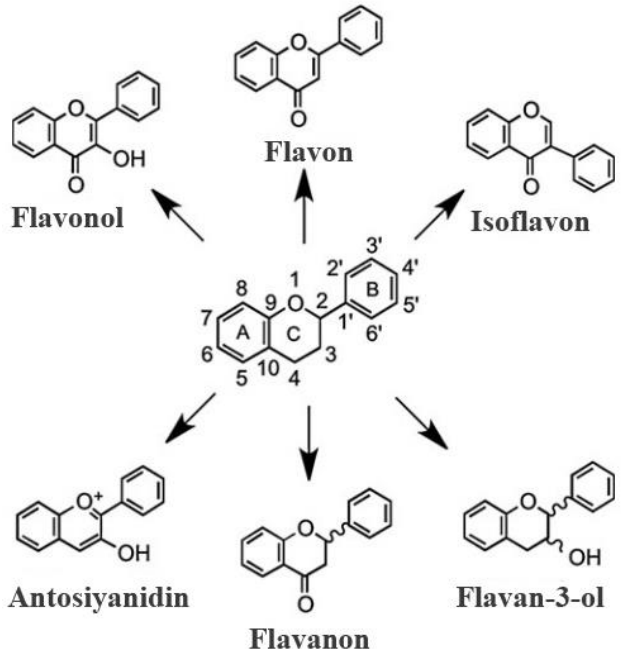
İsoflavonlar C2 pozisyonundan ziyade C3 pozisyonunda eklenmiş B-halkasına sahiptir. İsoflavonlar hemen hemen sadece baklagiller familyasına ait bitkilerde bulunur, Soya fasulyesinde oluşan genistein ve daidzein önemli miktarlarda bulunur. İsoflavonların östrojene benzer yapıları oldukları için fitoöstrojenler de olarak sınıflandırılırlar. Bu grubun çeşitli bileşikleri özellikle tahıl tanelerinde bulunur (Del Rio ve ak., 2013).

Naringenin ve hesperidin gibi flavanonlar ise; C-2 konumundaki şiral varlığında ve delta 2-3 çift bağının olmayışıyla karakterize edilir. Flavanonlar, hidroksi ve glikozit şekillerde meydana gelirler. Flavanonlar özellikle narenciye meyvelerinin kabuklarında bulunurlar. En yaygın flavanon glikoziti ise hesperidindir (Crozier, 2009).

En yaygın antosiyanidin aglikonları; pelargonidin, siyanidin, delfinidin, peonidin, petunidin ve malvidindir. Turuncu ve kırmızıdan mavi ve mor renge kadar çeşitli renklerde olabilen antosiyanidinler, bu özellikleri ile renkli meyve çiçekleri ile kolayca görünebilirler (Ozeki ve ark., 2011; Jaganath ve Crozier, 2011).

Flavan-3-oller alışılmışın dışında olarak bitkiler aleminde baskın olarak glikozit şeklinde bulunmazlar. Flavan-3-oller flavanoid sınıfı polifenolik bileşiklerin en kompleks yapılarıdır ve basit monomerlerden kondense tanniler olarak bilinen oligomerik ve polimerik proantosiyanidinlere kadar birçok yapıda mevcutturlar. (+)-kateşin ve (-)-epikateşin monomerik yapıda bulunan ve doğada en yaygın olan flavan-3-ollerdir (Aron ve Kennedy, 2008; Crozier, 2009). Proantosiyanidinler ise 50 ve üzeri monomer birimden oluşurlar ve bitkilerde en bol bulunan proantosiyanidin, sadece

epi(kateşin) birimlerinden oluşan prosiyanidinlerdir. Daha az yaygın olan proantosiyanidinler ise (epi)afzeleşin ve epigallokateşin alt birimlerinden oluşan propelargonidinler ve prodelfinidinlerdir (Clifferd ve Crozier, 2011). Yeşil çay epikateşin ve epigallokateşin gibi flavan-3-ol monomerlerini yüksek düzeyde içerir (Del Rio ve ark., 2004).



Şekil 2.2. Flavonoid iskeletinin yapısı

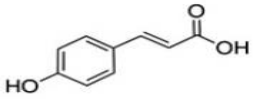
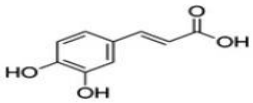
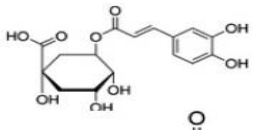
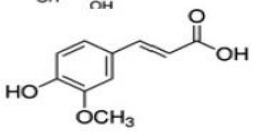
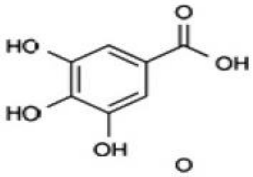
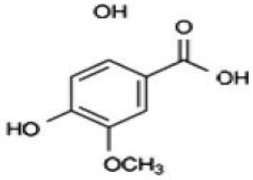
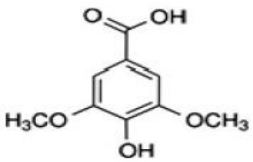
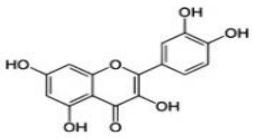
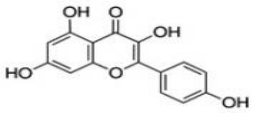
2.2.3. Flavonoid olmayanlar

Flavonoid olmayan polifenoliklerin diyette en önemlileri C_6-C_1 fenolik asitlerdir. Gallik asit en yaygın fenolik asittir ve küçük diyet bileşenleri olan gallotanenlerle yaygın olarak şeker esteri oluştururlar. Sanguiin H-6 ve punikalagin gibi ellagic asit tabanlı ellagitanninler, ahududu, çilek, böğütlen, nar, Trabzon hurması, ceviz, fındık gibi çok çeşitli gıdalarda bulunurlar (Larrosa ve ark., 2012).

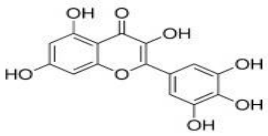
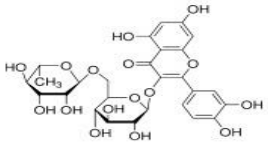
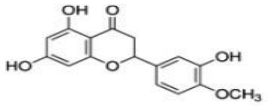
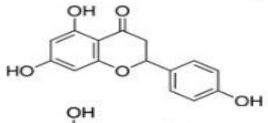
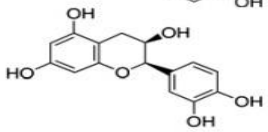
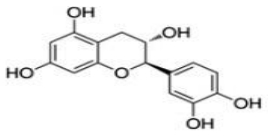
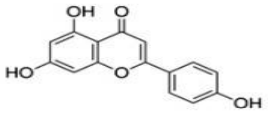
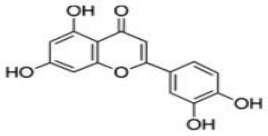
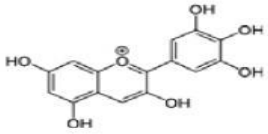
C_3-C_6 hidroksisinnamatlar ise örneğin tartarik asit ve kuinik asit ile temelde konjugat olarak oluşurlar ve topluca klorojenik asit olarak ifade edilirler. Yeşil robusta kahve çekirdeğinin yaklaşık %10'u klorojenik asitten oluşur. Bu kahvenin düzenli tüketimi günlük 1 gramdan fazla klorojenik asit alınımını sağlayabilir ve bu birçok insan için temel diyet fenolikleri olabilir. (Stalmach ve ark., 2012).

Stilbenler C_6-C_2-C_6 yapısına sahiptirler ve yaralanma ve stres gibi hastalıklara cevap olarak bitkiler tarafından üretilen fitoaleksinlerdir (Langcake ve Pryce, 1977). Oldukça minör diyet komponentleri olmasına rağmen temel stilben *cis* ve *trans* izomerleri bulunan resveratroldür. Japon madımağı ya da Meksika bambusu olarak bilinen zararlı bir bitki olan *Polygonum cuspidatum*'un odunsu kökleri ilginç bir şekilde yüksek düzeyde trans-resveratrol içerir (100 gram kuru ağırlıkta 377mg) (Vastano ve ark., 2000).

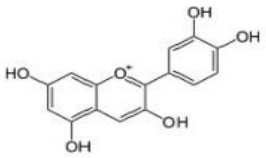
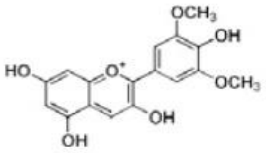
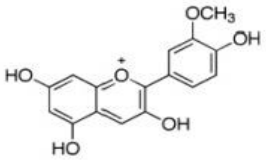
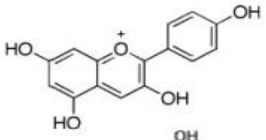
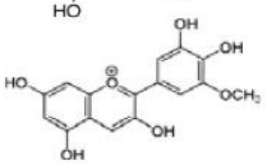
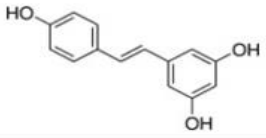
Tablo 2.7. Polifenoller ve kimyasal yapıları

Ana sınıf	Alt-sınıf	İsim	Kimyasal yapısı
Non-flavonoidler	Fenolik asitler (Hidroksisinnamik asitler)	*p*- kumarik asit	
		Kafeik asit	
		Klorojenik asit	
		Ferulik asit	
	Fenolik asitler (Hidroksibenzoik asitler)	Gallik asit	
		Vanilik asit	
		Siringik asit	
Flavonoidler	Flavonollar	Kuersetin	
		Kaempferol	

Tablo 2.7. Polifenoller ve kimyasal yapıları (devam)

Ana sınıf	Alt-sınıf	İsim	Kimyasal yapısı
		Mirisetin	
		Rutin	
	Flavanonlar	Hesperidin	
		Naringenin	
	Flavan-3-oller	Epikateşin	
		Kateşin	
	Flavonlar	Apigenin	
		Luteolin	
	Antosiyanidinler	Delfinidin	

Tablo 2.7. Polifenoller ve kimyasal yapıları (devam)

Ana sınıf	Alt-sınıf	İsim	Kimyasal yapısı
		Siyanidin	
		Malvidin	
		Peonidin	
		Pelargonidin	
		Petunidin	
Non-flavonoidler	Stilbenler	Resveratrol	

2.3. Antikolinesteraz Aktivite

Alzheimer hastalığı öncelikli olarak yaşlı popülasyonları hedefleyen, geri dönüşü olmayan nörojenaratif bir hastalıktır ve 2010 yılı tahminlerine göre dünya çapında yaklaşık 36 milyonu etkilemektedir (Mohamed ve Rao, 2011; Prince ve ark., 2011; Williams ve ark., 2011). Bu hastalık; progresif nörojenaratif hastalıklar, bilişsel fonksiyonların kaybolması ve amiloid plakların ve nörofibrular yumakların oluşması ile karakterize edilir (Suh ve ark., 2005; Mohamed ve Rao, 2011). Alzheimer hastalığı orta ve ileriki yaşamda demansın yani bunamanın en sık nedenidir ve halk sağlığı ile toplum üzerinde yıkıcı bir etkiye sahiptir.

Alzheimer hastalığının patolojisi karmaşıktır ve genetik ile çevresel faktörleri içerir (Citron, 2002; Williams ve ark., 2011). Bu yüzden Alzheimer hastalığı multifaktöriyel bir hastalık olarak düşünülebilir. Alzheimer hastalığının patolojik yolları

hususunda birçok hipotez öne sürülse de 3 temel hipotez vardır ve bunlar; kolinerjik hipotez, β-amiloid (Aβ) protein hipotezi ve tau protein hipotezidir. Bu nedenle; asetilkolin (ACh) düzeyleri üzerine etkili ilaçlar yani asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri ya da toksik Aβ oluşumunu azaltan ilaçlar yani nonkompetitif β-sekretaz inhibitörleri ve sekretaz inhibitörleri anti-Alzheimer ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar yapılmıştır (Mohamed ve Rao, 2011). Farmakolojik doğası gereği kolinesteraz inhibitör tedavisi basit semptomatik bir müdahale olarak düşünülebilir. Fakat, AChE ile tedavi uzun bir periyod boyunca efektif olabilir ve Aβ oluşumunda da AChE'in önemli bir rol oynadığına inanılır (De Ferrari ve ark, 2001; Hardy ve Selkoc, 2002; Bullock ve Dengiz, 2005).

Bu yüzden Alzheimer hastalığının tedavisindeki ana yaklaşım asetilkolinesterazın inhibisyonu ile merkezi sinapslardaki ACh seviyesini arttırmak olmuştur. Son çalışmalar asetilkolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalarında nöropsikiyatrik semptomlarını hafiflettiğini ve sinaptik bölgedeki asetilkolin seviyesinin artması ile bilişsel yeteneğin arttırılabileceğini göstermektedir (Zrotsky ve ark., 2003).

Günümüzde galantamin, donepezil ve rivastigmin gibi birkaç çeşit AChE inhibitörleri US FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış olup hafif ve orta düzey Alzheimer hastalarını tedavi etmek için kullanılmaktadır (Rachhi ve ark., 2004).

Ancak bu ilaçlar uykusuzluk, yorgunluk, depresyon ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi yan etkilere sebep olmaktadır. Sonuç olarak yeni, güvenli ve etkili ilaçlar geliştirmek gerekmektedir. Bu yüzden doğal kaynaklardan elde edilen AChE inhibitörlerinin araştırılması ilgi çekicidir. Bitkiler yeni aktif bileşiklerin potansiyel bir kaynağıdır ve terapötik kullanımın uzun bir geçmişi vardır (Heinrich ve Teoh, 2004). Geleneksel olarak bitkiler Alzheimer hastalığı ile ilişkili semptomları hafifletmek ve bilişsel fonksiyonları arttırmak için kullanılmaktadır (Howes, 2003). Araştırmalar kolinesteraz inhibitörü olarak kullanılan geleneksel bitkilerin biyolojik etkileri üzerine odaklanmıştır (Heinrich ve Teoh, 2004; Perry ve ark., 2000).

2.4. α-amilaz ve α-glukozidaz İnhibitör Aktivitesi

Diabetes mellitus hem insülin üretimi yetersizliği hem de insüline dirençten kaynaklanan yüksek kan glukoz düzeyi ile karakterize edilen kronik bir hastalıktır. 2010 yılımda dünya çapında yaklaşık 250 milyon diabetli insan vardı. Bu sayının 2025'te 330 milyon ve 2030'da ise 430 milyona yükseleceği tahmin ediliyor (Wild ve ark., 2004).

Diabet prevalansı, dünya çapındaki bir salgın oranındaki artış gibi artmakta ve diabet en zorlu sağlık problemlerinde biri haline gelmeye başlamıştır. Diabetes mellitus'dan muzdarip olan hastaların nispeten küçük bir oranı (%10) tip 1 ya da insüline bağlı diabettir. Ancak, diabet hastalarının büyük bir çoğunluğu insüline bağlı değildir ve diabetes mellitus'un bu tipi tip 2 diabet olarak adlandırılır. Tip 2 diabetin etiyolojisinde insülin direnci esastır. Etiyolojiye bakmaksızın diabette; nefropati, ateroskleroz ve iskemik kalp hastalıklarının riski artmaktadır (Mazzone ve ark., 2008).

Tip 2 diabet tedavisi için önemli bir teröpatik yaklaşım; sindirim sisteminde α-amilaz ve α-glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu ile glukozun emilimini geciktirerek post-prandiyal hiperglisemiyi yani yemek sonrası hiperglisemiyi azaltmaktır. α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri karbohidrat sindiriminde görev alan anahtar enzimlerdir. Nişasta, α-dekstrin, maltoz gibi oligosakkaritler amilaz tarafından hidrolize edilir. α-glukozidaz ise ince barsak da disakkaritleri ve oligosakkaritleri glukoz birimlerine hidrolize etmektedir (Singh ve ark., 2010). Dolayısıyla α-amilaz ve α-glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu artan kan glukoz seviyesinin azaltılmasında önemli bir stratejidir (Laube, 2002).

Kan glukoz seviyesini düşürücü ilaçlar şiddetli hipoglisemi, laktik asidoz, nörolojik bozukluklar, sindirim rahatsızlığı, baş ağrısı hatta ölüm gibi yan etkilere sahiptir. İnsülinin uzun süre kullanımı ve diğer hipoglisemik ilaçların yan etkilere sahip olmaları özellikle bitkisel kökenli güvenli ve etkisel ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir (Watkins, 2003; Grover ve ark., 2002). Farklı geleneksel tıbbi sistemler ham bitki özütlerini ya da bitkiden elde edilen aktif bileşikleri diabet tedavisi için kullanmaktadır. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan öneriden sonra tıbbi bitkilerin hipoglisemik aktiviteleri üzerine yapılan araştırmalar daha önemli olmuştur (WHO, 1980).

2.5. Antitirozinaz Aktivite

Melaninin rolü ultraviyole ışınlarının zararlı etkilerinden cildi korumaktır. Buna ek olarak melanin miktarı insanlardaki cilt renginin belirlenmesinde önemlidir. Melaninin fazla üretimi çiller, koyu lekeler olarak ortaya çıkan hiperpigmentasyona sebep olmaktadır (Gupta ve ark., 2006; Dalton ve ark., 2005).

Melanin sentezi, ultraviyole ışınları ve inflamasyon gibi dış uyaranlar tarafından hızlanmaktadır. Bu yüzden melanin oluşumu, zararlı uyarıcılar azaltılarak, sinyal iletimi engellenerek ve tirozinazın aktivitesinin bastırılmasıyla kontrol edilmektedir. Tirozinaz

melanin biyosentezinde önemli bir enzimdir (Seo ve ark., 2003; Marmol ve Beermann, 1996). Tirozinaz enzimi (EC 1.14.18.1, pelifenol oksidaz PPO; monofenol; dihidroksi L fenilalanin; oksidoredüktaz) bakır içeren multifonksiyonel bir enzim olarak bilinmektedir ve monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi) ve o-difenollerin o-kinona oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) olmak üzere iki reaksiyonu katalizlemektedir

Tirozinaz inhibisyonu hiperpigmentasyonun tedavisinde temel stratejidir ve sadece dermatolojik bozuklukların tedavisinde değil aynı zaman da esmerleşmenin engellenmesi ile gıda renklerinin korunmasında kullanılmaktadır (Solano ve ark., 2006; Briganti ve ark., 2003). Hidrokinon, arbutin ve kojik asit ropar edilen tirozinaz inhibitörleridir. Bu inhibitörler beyazlatıcı ajanlar olarak kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Fakat bu bileşiklerin yan etkilerinden dolayı endişeler artmaktadır. Bu bakımdan hipopigmentasyon ajanlar olarak çeşitli bitkisel ekstraktlar ve onların aktif fitokimyasallarına ilgi artmaktadır (Blaut ve ark., 2006).

2.6. Fabaceae Familyası ve *Lathyrus* cinsi

Fabaceae familyası; 3 alt familya, 36 tribus, 727 cins ve 19.000'den fazla tür sayısıyla çiçekli bitkilerin en büyük 3. familyasıdır (Lewis ve ark., 2005). Bu familyaya ait olan ağaç, çalı ve otsu bitkilerin büyük bir çoğunluğu önemli ekonomik değere sahiptir ve genellikle ılıman, subtropik ve tropik bölgelerde yayılış göstermektedir (Hickey ve King, 1997). Familya, Mimosoideae, Caesalpinioideae ve Papilionoideae alt familyalarına ayrılmaktadır.

Baklagiller binlerce yıldır kültüre edilmektedir ve dünya çapında bir çok bölgede geleneksel diyette önemli rol oynamaktadır (Grela ve ark., 1999; Prati ve ark., 2007). Tohumları protein, nişasta, bazı yağ asitleri, vitamin ve mineral gibi besleyici içeriğiyle zengin bir gıda kaynağıdır (Morrow, 1991; Souci ve ark., 2000). Sağlık üzerine faydalı etkilere sahip olan yağı iyi bir yağ kaynağı olabileceği düşünüldüğünden araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Siriamornpun ve ark., 2006). Fabaceae'nin bazı türleri yüksek protein içeriğiyle insanlar ve hayvanlar için ucuz bir protein kaynağıdır (Chang ve Satterlee, 1979).

Yeryüzünde geniş bir yayılış alanına sahip olan *Lathyrus* cinsi, 200'den fazla taksona sahiptir ve Avrupa'da yaklaşık 54 türü bulunmaktadır. (Tutin, 1981; Alkin ve ark., 1986). Ülkemizde ise Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da geniş yayılış gösteren Lathyrus cinsi tür, alttür ve varyete seviyesinde toplam 67 takson içermektedir ve

bunlardan 18'i ülkemiz için endemiktir (Davis, 1970). Yalnız son zamanlarda yapılan çalışmalar neticesin Lathyrus cinsi takson sayısının 75'e yükseldiği rapor edilmiştir (Davis, 1988; Güneş ve Özhatay, 2000; Genç ve Şahin, 2008; Genç, 2009).

Çoğu Fabaceae familyası üyeleri gibi *Lathyrus* cinsine ait bazı türlerin de ekonomik açıdan önemli olduğu bilinmektedir. Bu ekonomik öneminden dolayı *L. sativus, L. hirsutus, L. cicera, L. odoratus, L. ochrus, L. sylvestris, L. palustris*, gibi taksonlar dünyanın çeşitli ülkelerinde yetiştirilmekte ve yüksek besin içeriğinden dolayı, hem insanlar hem de hayvanlar için besin maddesi olarak kullanılmaktadır (Yamamoto ve ark., 1984). Bunun yanı sıra bazı *Lathyrus* türleri ise geleneksel halk hekimliğinde de kullanılmaktadır. Örneğin, *L. sativus*'un tohumları ağrı kesici olarak, *L. cicera*'nın toprak üstü kısımları ödem için, *L. rotundifolius* subsp. *miniatus*'un yaprakları ise romatizma için kullanılmaktadır (Altundağ ve Öztürk, 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali ve Bitkisel Özütlerin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan bitki örneği 2013 yılında Ankara, Çubuk-Karagöl' den (1513m) çiçeklenme döneminde toplanmıştır. Bitki örneğinin taksonomik tanımlaması Selçuk Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Murad Aydın ŞANDA tarafından yapılmıştır

Toplanan bitki örneği gölgede kurutuldu ve analizlerin yapılması için öğütüldü. Antioksidan kapasite ve enzim inhibitör aktivitelerin tayini için toz hale getirilmiş bu örneğin etilasetat, metanol ve su ekstrakları çıkarılmıştır. Etilasetat ve metanol özütleri için toz bitki örnekleri sokslet aparatında 6-8 saat ekstraksiyona tabii tutulmuştur. Su özütleri ise bitki örneklerinin suda 24 saat karıştırılması ile elde edilmiş ve daha sonra suyun tamamen uzaklaştırılması için liyofilize edilmiştir

3.2. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

3.2.1. Toplam Antioksidan Komponentlerin Belirlenmesi

3.2.1.1. Toplam fenolik madde tayini

Bitki özütlerin konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bitkisel droglarda 250 µl ayrı deney tüplerine alındı. Daha sonra her bir tüpe 1ml Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9 oranında seyreltilmiş) ilave edildi. Ardından her bir tüpe 750 µl %1'lik Na_2CO_3 çözeltisinden eklendi. Karışımlar oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 765 nm'de absorbansları ölçüldü. Tüm antioksidan kapasite tayin testlerinde spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirild. Aynı işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de tekrarlandı. Bitkilerin fenolik madde içeriği gallik asit eş değeri (mg GAE/g) olarak verildi (Slinkard ve Singleton, 1977).

3.2.1.2. Toplam flavonoid madde tayini

Bitki özütlerdeki toplam flavonoid içeriği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Buna göre %2'lik $AlCl_3$'ün metanolik çözeltisinden 1 ml alınarak aynı hacimde ve 1 mg/ml konsantrasyondaki bitki ekstraktı ile karıştırıldı. 10 dakika bekledikten sonra 415 nm'de karışımın köre karşı absorbansı belirlendi. Aynı işlemler standart flavonoid olan rutin için de yapılarak rutine ait kalibrasyon eğrisi çizildi.

Sonuçta ekstraktların toplam flavonoid madde içerikleri rutin eş değer (mg RE/g) olarak verildi (Berk ve ark., 2011)

3.2.2. Serbest Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

3.2.2.1. DPPH radikal süpürme aktivitenin belirlenmesi

Bitkisel özütlerin DPPH radikali süpürme aktivitesi Sarıkürkçü (2011)'e göre yapıldı. Metanolik DPPH çözeltisi %0.004'lük olacak şekilde hazırlandı. Bitkisel özütlerin 1 ml'si hazırlanan DPPH çözeltisinin 4 ml'si ile karıştırıldı. Tüpler ağızları kapatılıp kuvvetlice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanslar 517 nm'de okundu. Bitkisel özütlerin DPPH radikali süpürme yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

Burada; $A_{kontrol}$ kontrolün absorbansı ve $A_{örnek}$ örneğin absorbansını ifade etmektedir. Aynı işlemler troloks içinde yapıldı ve bitkisel özütlerin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri troloks eş değer olarak verildi (mgTEs/g).

3.2.2.2. ABTS radikal süpürme aktivitenin belirlenmesi

Bu metotta $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonu, 7.4 mM ABTS solusyonu ile 2.45 mM potasyum persülfat reaksiyona girmesi ile direk olarak üretildi. Bu karışımının 12-16 saat karanlıkta bekletilerek aktif radikal oluşması sağlandı. Deneyden önce ABTS solusyonunun 734 nm'de absorbansı 0.700±0.02 olacak şekilde metanol ile seyreltildi. Bitkisel özütlerin 1 ml alındı ve 2 ml ABTS solusyonu ile karıştırıldı. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra örneklerin absorbansları 734 nm'de okundu (Re ve ark., 1999). Bitkisel özütlerin ABTS katyon radikalini süpürme yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

Burada; $A_{kontrol}$ kontrolün absorbansı ve $A_{örnek}$ örneğin absorbansını ifade etmektedir. Aynı işlemler troloks içinde yapıldı ve bitkisel özütlerin ABTS katyon radikalini süpürme aktiviteleri troloks eş değer olarak verildi (mgTEs/g).

3.2.3. İndirgeme Gücünün Belirlenmesine Yönelik Testler

3.2.3.1. CUPRAC testi

Bu test için öncelikle aşağıda belirtilen çözeltiler hazırlandı.

10 mM Cu(II) klorür çözeltisi;. $CuCl_2.2H_2O$'den 0.4262 g tartılarak su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Amonyum asetat tamponu; 1 M (pH=7). NH_4Ac'dan 19.27 g tartılarak su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Neokuproin çözeltisi: 7.5 mM, Neokuproin (2,9 dimethyl 1-10 phenantroline)'den 0.039 g tartılarak %96'lık etil alkolle 25 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Metotta bitkisel özütlerden 0.5 ml alındı ve her bir deney tüpüne 1 ml $CuCl_2.2H_2O$, 1 ml amonyum asetat ile 1 ml neokuproin çözeltileri eklendi. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbansları 450 nm'de okundu. Testin sonuçları troloks eşdeğer (mgTE/g) olarak yorumlandı. (Apak ve ark., 2006).

3.2.3.2. FRAP testi

FRAP testinin uygulanmasında öncelikle FRAP reaktifi hazırlandı. FRAP reaktifi, 0.3 M, pH 3.6 asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM $FeCl_3$'ün 10:1:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Bitkisel özütlerin 0.1 ml'si hazırlanan FRAP reaktifinin 2 ml'si ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımların absorbansları 593 nm'de okundu. Testin sonuçları troloks eşdeğer olarak değerlendirildi (mgTE/g) (Benzie ve Strain, 1996).

3.2.4. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

3.2.4.1. Fosfomolibdat testi

Metotta kullanılacak reaktif çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlandı:

0.6 M H_2SO_4 çözeltisi: 0.83175 ml H_2SO_4 alınır ve 24.18825 ml saf su üzerine sızdırılarak ilave edildi.

28 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$ çözeltisi: 0.025 gr $Na_2HPO_4.12H_2O$ tartılıp hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlandı.

4 mM Amonyum molibdat çözeltisi: 0.123585 gr amonyum molibdat tartılıp hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlandı.

Bu şekilde hazırlanan çözeltiler bir mezürde karıştırılarak reaktif çözeltisi hazırlandı. 1 mg/ml konsantrasyonunda bitkisel çözeltilerden 0.3 ml bir tüpe alındı ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden 3 ml eklendi. Tüpler kuvvetlice karıştırılıp 95 °C'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözeltilerin absorbansı 695 nm'de okundu. Aynı işlemler standart antioksidan olarak kullanılan troloks için de yapıldı. Antioksidan aktivite troloks eşdeğeri (mgTE/g) olarak hesaplandı (Prieto ve ark., 1999).

3.2.4.2. β-karoten/Linoleik asit test sistemi

Metotta öncelikle emülsiyon çözeltisi hazırlandı. Bunun için 0.5 mg β-karoten 1ml kloroformda çözüldü. Bu karışıma 25 µl linoleik asit ve 200 mg Tween 40 eklendi. Karışım iyice karıştırıldı. Kloroform rotary evaporatörde 40 °C'de iyice uçuruldu. Kalan kısım üzerine 200 ml saf su eklendi. Böylece emülsiyon çözeltisi hazırlanmış oldu.

1 mg/ml konsantrasyonundaki bitkisel droglar ve standart maddelerden 500 µl alındı ve bunların üzerine 1.5 ml emülsiyon çözeltisinden ilave edildi. Emülsiyon çözeltisi eklenir eklenmez absorbansları 490 nm'de okundu. Daha sonra tüpler 50 °C'de 120 dakika inkübe edildi. Ayrıca bitkisel materyalin yerine 500 µl metanol eklenip bunun üzerine de 1.5 ml emülsiyon çözeltisi ilave edilerek kontrol çözeltisi hazırlandı. Kontrol çözeltisinin absorbansı da emülsiyon çözeltisi eklenir eklenmez okundu ve aynı şekilde 50 °C'de 120 dakika inkübe edildi. Aynı işlemler standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve troloks içinde yapıldı (Sarıkürkçü ve ark., 2012).

120 dakika sonunda renk açılım oranı hesaplandı.

$$R = \ln(A/B)/t$$

A: Başlangıç absorbansı

B: 120 dakika sonundaki absorbansı

t: 120 dakika

Bu eşitlikten inhibisyon değeri yani antioksidan aktivite hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon değeri} = ((R_{kontrol}-R_{örnek})/ R_{kontrol})x100$$

3.2.5. Metal Şelat Aktivitesi

Örneklerin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasiteleri Dinis ve ark. (1994) yöntemine göre belirlendi. İçerisinde 2 ml bitkisel özüt (1 mg/ml) bulunan deney tüplerine 2 mM 0.05 ml $FeCl_2$ çözeltisi ilave edildi. Tepkime 0.2 ml 5 mM ferrozin ilavesiyle başlatıldı. Tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 562 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Aynı işlemler şelatlayıcı ajan olan EDTA içinde yapıldı. Ferrozin-Fe^{2+} oluşum inhibisyonu (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı ve deney sonuçları EDTA eş değer olarak değerlendirildi (mg EDTA/g).

Metal şelatlama kapasitesi (%) = $[(A_{kontrol}-A_{örnek})/A_{kontrol}] \times 100$

3.3. Enzim İnhibisyonuna Yönelik Testler

3.3.1. Anti-kolinesteraz aktivitesi

Kolinesteraz inhibitör aktivite Ellman's yöntemi kullanılarak 96 kuyucuklu mikroplakalarda ölçülmüştür (Ellman, 1961). Mikroplakadaki kuyucuklara 2 mg/mL konsantrasyondaki 50 µL bitki özütü, 125 µL DTNB (5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid), 25 µL Tris-HCl tamponun (pH 8.0) da hazırlanmış AChE veya BChE enzim çözeltisi konuldu. Bu karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra 25 µL asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya butiriltiyokolin iyodür (BTCI) eklendi. Benzer şekilde, AChE veya BChE enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Örnek ve körlerin absorbansları oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra 405 nm de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edilidi. Kolinesteraz inhibitör aktiviteleri galantamine eşdeğer olarak hesaplandı (mgGALAE/g).

3.3.2. Anti-amilaz aktivitesi

α- amilaz inhibitör aktivite Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Zengin ve ark. 2014a). Mikroplakadaki kuyucuklara 25 µL örnek çözelti ve fosfat tamponunda (pH 6.9, 6 mM sodyum klorür) hazırlanmış 50 µL α- amilaz çözeltisi eklendi ve 37 ºC de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra inkübe edilmiş örneklere % 0.05'lik 50 µL nişasta çözeltisi ilave edildi. Benzer şekilde, α- amilaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Karışım 37 ºC de 10 dakika inkübe edildi. 1 M 25 µL HCI ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve bunu takiben 100 µL iyot-potasyum iyodür çözeltisi eklendi. Örnek ve körlerin absorbansları 630 nm de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edilidi. α- amilaz inhibitör aktiviteleri akarboza eşdeğer olarak hesaplandı (mmolAKAE/g).

3.3.3. Anti-glukozidaz aktivitesi

Mikroplakadaki kuyucuklara 50 µL örnek çözelti, 50 µL glutatyon, fosfat tamponunda çözünmüş 50 µL α- glukozidaz çözeltisi ve 50 µL PNPG (4-p-nitrofenil-α-D-glukopiranozid) eklenerek 37 ºC de 10 dakika inkübe edildi. Benzer şekilde, α-glukozidaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Reaksiyon 0.2 M 50 µL sodyum karbonat konularak tamamlandı. Örnek ve körlerin absorbansları 400 nm de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edilidi. α- glukozidaz inhibitör aktiviteleri akarboza eşdeğer olarak hesaplandı (mmolAKAE/g) (Palanisamy ve ark., 2011).

3.3.4. Anti-tirozinaz aktivitesi

Tirozinaz inhibitör aktivite L-DOPA 'nın substrat olarak kullanıldığı dopachrome yöntemi ile ölçülmüştür. Mikroplakadaki kuyucuklara 25 µL örnek çözelti, 40 µL tirozinaz çözeltisi ve 100 µL fosfat tamponu (pH 6.8) eklendi. Bu karışım 25 ºC 15 dakika bekletildikten sonra 40 µL L-DOPA konuldu. Benzer şekilde, tirozinaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Örnek ve körlerin absorbansları 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 492 nm de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak

gerçek absorbanslar elde edilidi. α- glukozidaz inhibitör aktiviteleri akarboza eşdeğer olarak hesaplandı. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edilidi. Tirozinaz inhibitör aktiviteleri kojik asite eşdeğer olarak hesaplandı (mgKAE/g) (Orhan ve ark., 2014).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Toplam Antioksidan Komponentler

4.1.1. Toplam Fenolik İçerik

Bitki özütlerinin gallik aside eşdeğer (GAE) fenolik madde içerikleri hesaplanarak Tablo 4.1.'de ve Şekil 4.1.'de verilmiştir. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütleri fenolik içerik bakımından değerlendirildiğinde fenolik içerikleri sırasıyla 18.76 mgGAE/g, 63.16 mgGAE/g ve 60.77 mgGAE/g özüt olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakılarak kullanılan çözücülerin fenolik içeriğe önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. *L. czeczottianus*'un metanol ve su özütlerinde fenolik içerik oldukça yüksek bulunmuştur. Bu durum fenolik asitler gibi polar bileşiklerin ekstraksiyonunda en çok tercih edilen metanol ve su gibi çözücülerin yüksek polaritesi ile açıklanabilir. Litaratür taraması yapıldığında *Lathyrus* türlerinin fenolik içerikleri üzerine yapılan çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Eyiiş, (2010) üç farklı *Lathyrus* taksonu üzerinde yaptığı çalışmada fenolik içerikleri 13.85-273.16 mgGAE/g özüt aralığında bulmuştur. Buna göre; *L. aphaca var. pseudoaphaca* (13.85 mgGAE/g özüt) ve *L. cicera* (22.36 mgGAE/g özüt)'nın metanol özütleri *L. czeczottianus* (63.16 mgGAE/g özüt)'a göre daha düşük düzeyde fenolik içeriğe sahipken, *L. sphaericus* (273.16 mgGAE/g özüt)'nın ise oldukça yüksek bir fenolik içeriğe sahip olduğu görülmüştür (Eyiiş, 2010). Yine başka bir çalışmada ise *L. binatus*'un fenolik içeriğini 180.88 mgGAE/g özüt olarak bulunmuştur (Godevac ve ark., 2008).

4.1.2. Toplam Flavonoid İçerik

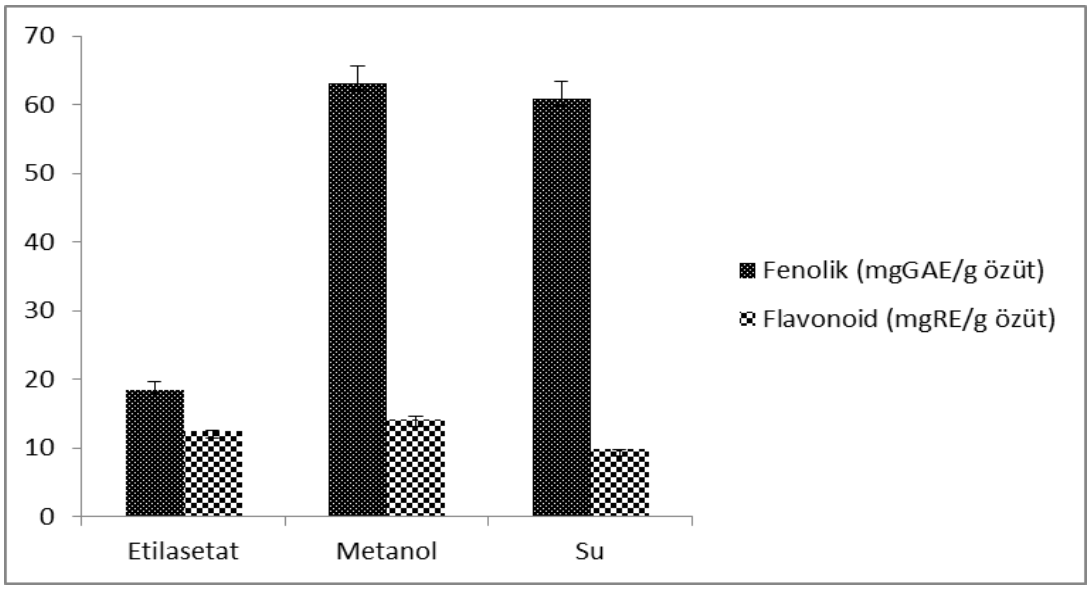
Bitki özütlerinin rutin eşdeğer (RE) flavonoid madde içerikleri hesaplanarak Tablo 4.1.'da ve Şekil 4.1.'da verilmiştir. Etilasetat, metanol ve su özütlerinin toplam flavonoid içerikleri sırasıyla 12.44 mgRE/g özüt, 14.16 mgRE/g özüt ve 9.77 mgRE/g özüt olarak bulunmuştur. Kullanılan çözücülerin flavonoid içeriğine bir etkisinin olmadığı görülse dahi metanol özütünde flavonoid içeriğinin nispeten daha yüksek ve su özütünde ise daha az olduğu saptanmıştır. *Paramignya trimera*'nin farklı özücülerle yapılan antioksidan kapasitesinin belirlendiği bir çalışmada flavonoid içeriği en yüksek metanol özütünde ve en düşük içerik ise su özütünde bulunmuştur (Nguyen ve ark., 2015). Yine bir başka çalışmada *Magnolia officinalis*'in toplam flavonoid içeriğinde metanol özütünün su özütünden daha yüksek olduğu görülmüştür (Tan ve ark., 2015). Bir başka çalışmamızla uyumlu araştırmada ise 4 farklı *Swertia* türünün (*S. chirayita,*

S. densifolia, *S. lawii* ve *S. minor*) flavonoid içeriklerinde methanol özütleri su özütlerinden daha yüksek bulunmuştur (Kshirsagar ve ark., 2015).

Tablo 4.1. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin karşılaştırılması

Özütler	Toplam fenolik içerik (mgGAE/g özüt)	Toplam flavonoid içerik (mgRE/g özüt)
Etilasetat	18.42±1.26*	12.44±0.19
Metanol	63.16±2.41	14.16±0.40
Su	60.77±2.58	9.77±0.03

*Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.1. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin karşılaştırılması

4.2. Serbest Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

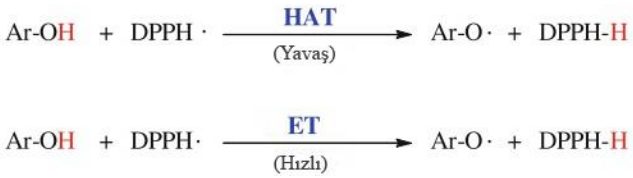
Tez kapsamında çalışılan *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin serbest radikal süpürüm/giderim aktiviteleri ABTS ve DPPH radikalleri kullanılarak belirlendi.

4.2.1. DPPH radikali süpürme aktivitesi

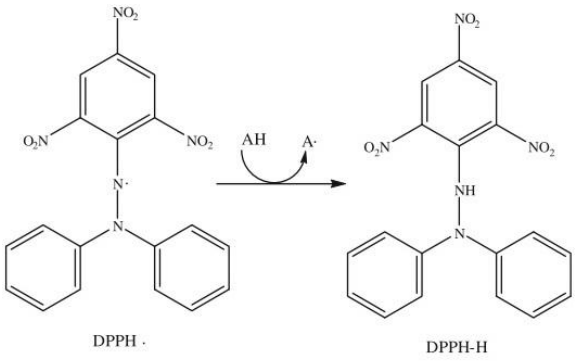
Antioksidan aktiviteyi değerlendirmede, DPPH radikal süpürüm testi en sık kullanılan metodlar arasındadır. Bu test, hem hidrojen atomu transferi (HAT) hem de elektron transferi (ET) esasına dayanır (Şekil 4.2.) (Prior ve ark., 2005) ve ilk defa Blois (1958) tarafından rapor edilmiş ve günümüze kadar çeşitli modifikasyonlara uğrayarak

gelmiştir. DPPH koyu mor renkli stabil bir kromojen radikalidir. DPPH süpürme testi, DPPH radikalini nötralize etmek için antioksidanların elektron vermesi esasına dayanır (Şekil 4.3.). Reaksiyon, 517 nm'de ölçülen DPPH'ın renk değişikliğine eşlik eder ve absorbanstaki düşüş antioksidan etkinliğin bir göstergesi olarak görülür.

Bu tez çalışmasında *L. czeczottianus*'un farklı özütlerinin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri mgTE/g özüt olarak sonuçları Tablo 4.2.'de ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri sırasıyla 4.57 mgTE/g özüt, 215.67 mgTE/g özüt ve 248.49 mgTE/g özüt olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında yüksek fenolik içeriğe sahip olan özütlerin aynı zamanda yüksek DPPH radikal süpürüm aktivitesine sahip olduğu da görülmüştür. Yapılan birçok çalışma da, bu sonuçlara benzer olduğu rapor edilmiştir (Sultana ve ark., 2007; Das ve ark. 2013). Buna rağmen yapılan bir çalışmada *L. aphaca* var. *pseudoaphaca*, *L. cicera* ve *L. sphaericus* DPPH radikal süpürüm aktivitesi sonuçlarına göre ise fenolik içerik ve DPPH radikal süpürüm testi arasında bir kolerasyon bulunmamıştır (Eyiiş, 2010). Bunun sebebi ise fenolik içeriğin belirlenmesinde kullanılan folin ayracının başka bir grup bileşik tarafından indirgemesiyle açıklanabilir.



Şekil 4.2. DPPH reaksiyonunun mekanizması



Şekil 4.3. Bir antioksidanım (AH) DPPH radikalini süpürme etkisi

4.2.2. ABTS radikali süpürme aktivitesi

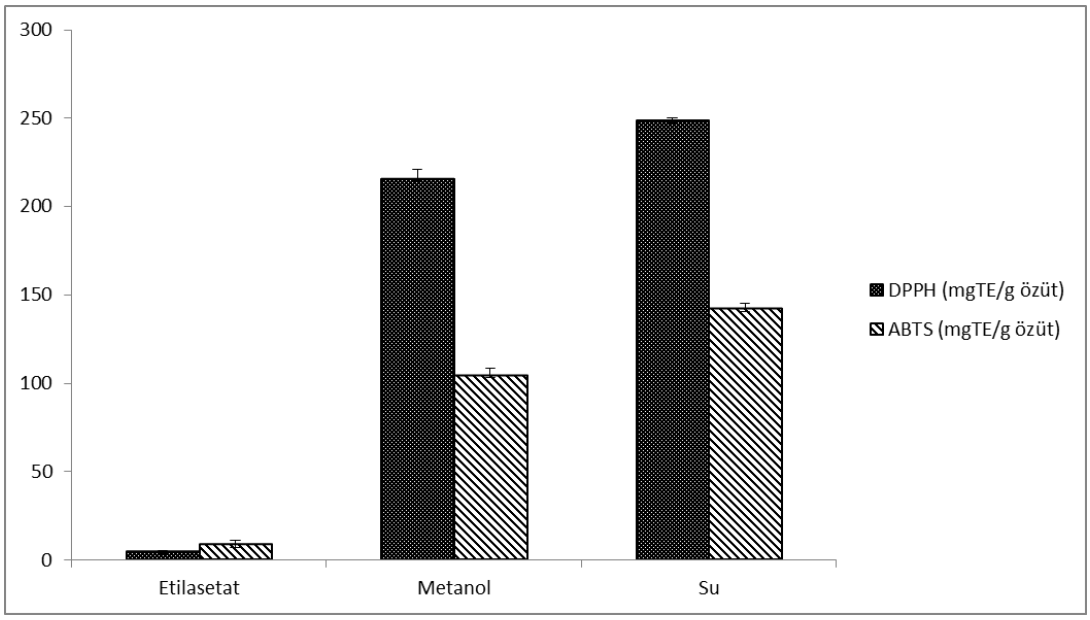
ABTS katyon radikal süpürme kapasitesi; kimyasal bir metodla oluşturulan ABTS katyon radikali ile doğrudan reaksiyona giren (süpürme) antioksidanların kapasitesini ölçer. Mavi- yeşil renkli ve maksimum absorbansı 734 nm olan ABTS katyon radikalinin, antioksidanların varlığında yoğunluğu azalır. $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikali; oksitleyici ajanların varlığında ABTS'den oluşur. $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikalinin antioksidanlar tarafından nötralize edilmesi tıpkı DPPH radikalinin nötralizasyonunda olduğu gibi hem hidrojen atom transferine hem de elektron transferine dayalıdır (Prior ve ark., 2005). Bu test ilk kez Miller ve ark., (1993) tarafından rapor edilmiştir. Metodun basitliği, hızlı olması, pH'dan etkilenmemesi, hem lipofilik hemde hidrofilik antioksidanlar için uygun olması DPPH metodu ile birlikte en sık kullanılan testlerin başında olmasına yol açmıştır (Mac-Donald-Wicks ve ark., 2006).

Çalışmada kullanılan *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikalini süpürme aktivitesi çalışıldı ve sonuçlar troloks eşdeğeri olarak Tablo 4.2.'de ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. Etilasetat, metanol ve su özütlerinin $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikalini süpürme aktivitesi sonuçları sırasıyla 8.34 mgTE/g özüt, 104.25 mgTE/g özüt ve 141.76 mgTE/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar DPPH radikal süpürme aktivitesi sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2. L. *czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin DPPH ve ABTS radikallerini süpürme aktivitelerinin karşılaştırılması

Özütler	**DPPH süpürme yeteneği (mgTE/g özüt)**	**ABTS süpürme yeteneği (mgTE/g özüt)**
Etilasetat	4.57±0.48*	8.34±2.54
Metanol	215.67±5.68	104.25±4.54
Su	248.49±1.86	141.76±3.62

*Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.4. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin DPPH ve ABTS radikallerini süpürme aktivitelerinin karşılaştırılması

4.3. İndirme Gücünün Belirlenmesi

Antioksidanlar aynı zamanda indirgeyiciler olarak da bilinirler. Antioksidanların elektron verme yetenekleri sadece serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini süpürmekle kalmaz, aynı zamanda bu yüksek değerli elementleri daha düşük valanslı durumlara indirgerler. Antioksidanların redoks potansiyeli ya da indirgeme güçleri antioksidan etkinliğin önemli bir göstergesidir. İndirgeme gücü; demir, bakır gibi çeşitli metal iyonlarıyla redoks reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür. Bu gruptaki metodlar elektron transferine dayalı metodlar içerisinde yer alır ve basit kimyasal testlerle yapılır.

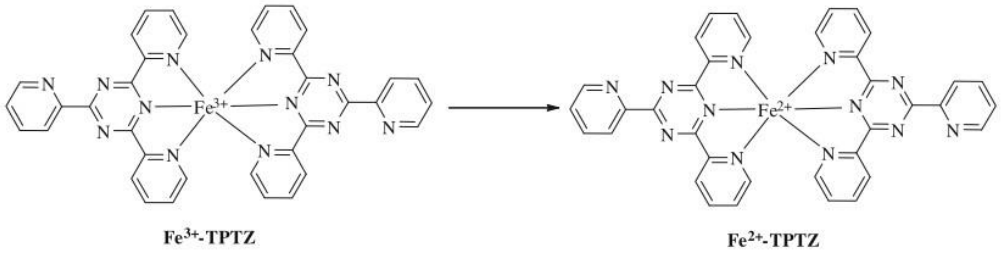
Tez kapsamında çalışılan *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin indirgeme güçleri CUPRAC ve FRAP testleri kullanılarak belirlendi.

4.3.1. FRAP testi

Tipik bir ET dayalı bir test olan FRAP testi, asidik ortamda antioksidanlar tarafından sarı renki ferrik iyon (Fe^{3+})-ligand kompleksinin koyu mavi renkli ferröz (Fe^{2+}) iyonuna indirgenmesiyle karakterize edilir (Şekil 4.5.). Antioksidan aktivite 593nm'deki absorbansın artmasıyla belirlenir (Antolovich ve ark., 2002). FRAP testi basit, hızlı, ucuz ve spesifik bir ekipman gerektirmediği için kapasite değerlendirilmesinde uygulanan metotların başında gelir.

Bu tez çalışmasında araştırılan *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin FRAP indirgeme gücü testi sonuçları troloks eşdeğeri olarak Tablo 4.3.'de

ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. Bu özütlerin FRAP indirgeme gücü testi sonuçları sırasıyla 23.41 mgTE/g özüt, 123.71 mgTE/g ve 144.97 mgTE/g olarak bulunmuştur.

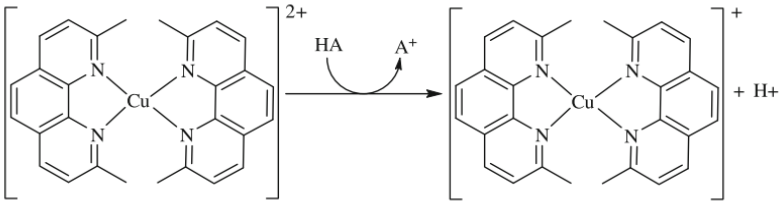


Şekil 4.5. FRAP testinde demirin indirgenmesi

4.3.2. CUPRAC testi

CUPRAC testi, FRAP testinin bir çeşidi olarak geliştirilen ve antioksidanlar tarafından bakırın indirgenmesi temeline dayanan bir testtir. Bu teste FRAP için kullanılan demir iyonları yerine bakır iyonları kullanılır. Bu metod antioksidanların Cu^{2+} iyonlarının Cu^{+} iyonlarına indirgenmesini ölçen bir indirgeme gücü testidir. FRAP testine benzer bir şekilde, absorbans ölçümünü kolaylaştırmak için bir ligand bakır-ligand kompleksini oluşturmak için kullanılır. Neocuproine, CUPRAC testinde en yaygın olarak kullanılan ligandtır. Cu^{2+}-neocuproine kompleksi antioksidanlar tarafından Cu^{+}-neocuproine kompleksine indirgenir (Şekil 4.6.) ve 450nm maksimum absorbansta indirgenen kompleksin rengi ölçülür (Apak ve ark., 2004). Yine kullanılan kromojenik reaktifin stabil olması, kolaylığı ve hızlı olması, reaksiyon ortamının fizyolojik pH'da olması, hidrofolik ve lipofilik antioksidanlara uygulanması metodun kapasite tayin testlerinde sıkça kullanılmasını sağlar (Prior ve ark., 2005).

Bu tez kapmasında çalışılan etilasetat, metanol ve su özütlerinin bakır iyonlarını indirgeme gücü sonuçları troloks eşdeğeri olarak Tablo 4.3.'de ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. Belirtilen özütlerin CUPRAC testi sonuçları ise sırasıyla 49.29 mgTE/g özüt, 220.32 mgTE/g özüt ve 212.80 mgTE/g özüt olarak bulunmuştur.

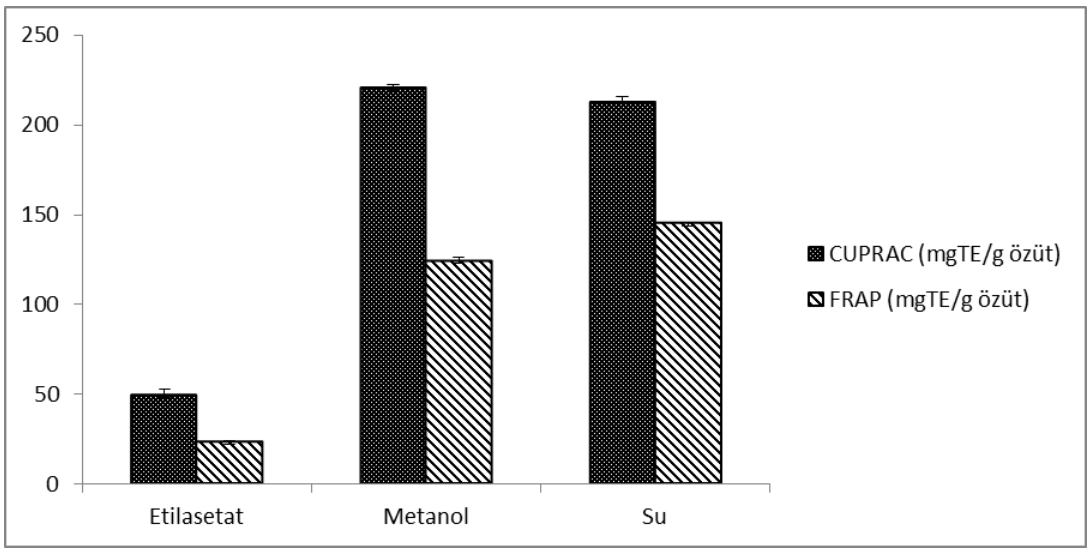


Şekil 4.6. CUPRAC testinde bakırın indirgenmesi

Tablo 4.3. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin FRAP ve CUPRAC indirgeme güçlerinin karşılaştırılması

Özütler	**FRAP (mgTE/g özüt)**	**CUPRAC (mgTE/g özüt)**
Etilasetat	23.41±1.1*	49.29±3.95
Metanol	123.71±2.54	220.32±2.19
Su	144.97±0.7	212.8±3.02

*Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır.



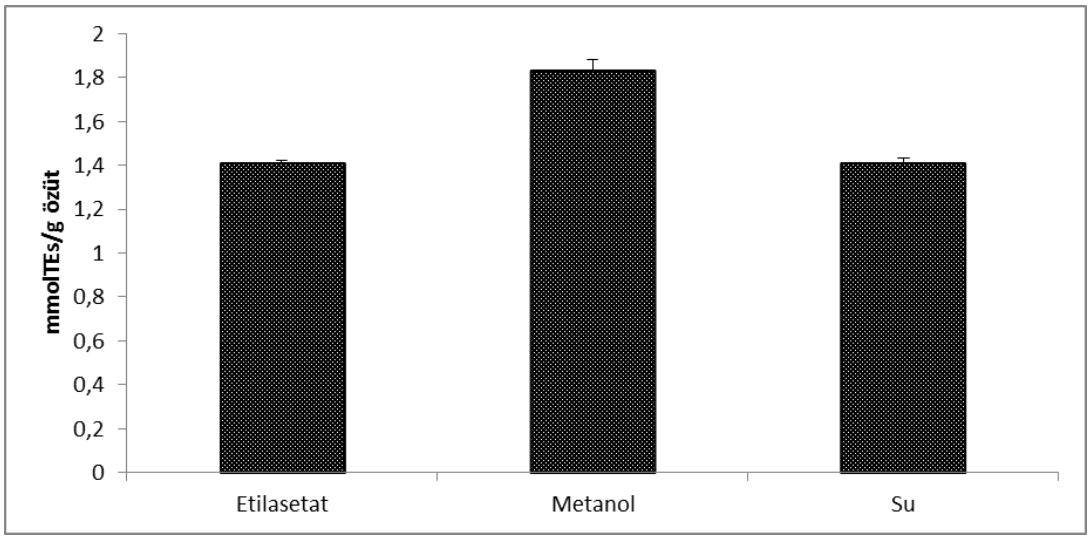
Şekil 4.3.1. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin FRAP ve CUPRAC indirgeme güçlerinin karşılaştırılması

4.4. Toplam Antioksidan Kapasite

4.4.1. Fosfomolibdat testi

İlk kez Prieto ve ark (1999) tarafından geliştirilen bu metot asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Mo(VI)'yi Mo(V)'e indirgemesi ve oluşan yeşil renkli fosfat/Mo(V) kompleksinin 695 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

L. czeczottianus'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin fosfomolibdat testindeki antioksidan aktiviteleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı ve sonuçlar mmol cinsinden verildi (mmol TE/g) ve Tablo 4.4.'de ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. Sonuçlara göre metanol özütünün (1.83 mmolTE/g özüt) etilasetat (1.41 mmolTE/g özüt) ve su (1.41 mmolTE/g özüt) özütüne göre daha yüksek antioksidan aktivite tespit edilmiştir. Benzer durum çeşitli çalışmalarda da gözlenmiştir (Yılmaz ve ark., 2013).

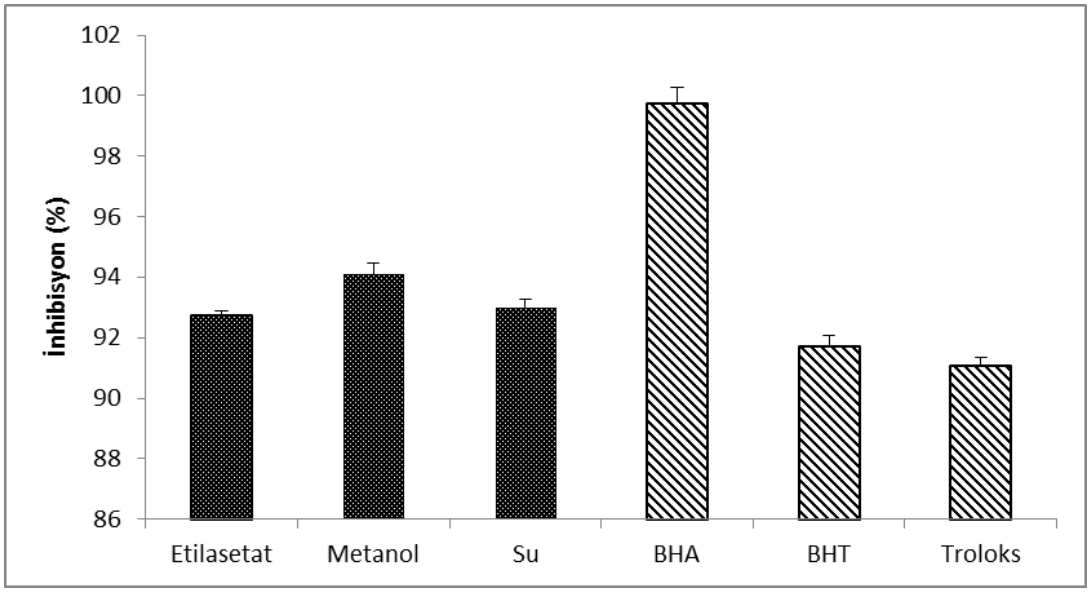


Şekil 4.8. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin fosfomolibdat testi sonuçlarının karşılaştırılması

4.4.2. β-karoten/Linoleik asit test sistemi

β-karoten/Linoleik asit test sistemi lipid-su emülsiyonunda antioksidan aktivitenin tahmin edilmesinde yaygın olarak kullanılan en eski metodlardan biridir. Bu metodda oluşan β-karoten-linoleik asit-su emülsiyonunun oksidatif durumu antioksidan varlığında ve yokluğunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu emülsiyonda linoleik asidin oksidasyonundan oluşan serbest radikaller β-karoten'in renksizleşmesine yol açar ve 470nm'de zamanla gözlenebilir. Antiokisdan varlığında emülsülfiye sulu sistemde β-karoten-linoleik asit oksidasyonu kaybolur ve dolayısıyla β-karoten'in renksizleşmesi azalır.

L. czeczottianus'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin β-karoten/Linoleik asit test sistemi antioksidan aktiviteleri yüzde inhibisyon olarak hesaplandı (%) (Tablo 4.4. ve Şekil 4.9.). Bu özütlerin linoleik asit oksidasyonu inhibe etme aktiviteleri değerlendirildiğinde sırasıyla inhibisyon yüzdeleri %92.71, %94.10 ve %93.00 olarak bulunmuştur. Çalışmada standart olarak kullanılan sentetik antioksidanlar; BHA, BHT ve troloks ise sırasıyla %99.74, %91.70 ve %91.05 olarak bulunmuştur. Bu oranlarla kıyaslandığında araştırdığımız bitkinin özütleri bu standart antioksidanlara benzer hatta güçlü aktivite sergilemişleridr. Bu durum sentetik antioksidanlara olan kaygının artttığı günümüzde çalışılan örneklerin gıda endüstrisinde yağ asidi oksidasyonunun önlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir. Fabaceae familyasına ait olan *Glycyrrhiza echinata*'nın toprak üstü ve kök kısımlarında linoleik asit oksidasyonunu inhibe etme yeteneği sırasıyla %79.84 ve %74.24 olarak rapor edilmiştir (Çakmak ve ark., 2012). Adıgüzel ve ark. (2009)'nın Fabaceae üyesi 13 farklı Astragalus türleri üzerine yaptıkları çalışmada linoleik asit oksidasyonunu inhibe etme yetenekleri %26.4-%83.3 olarak belirlenmiştir. Her iki çalışmanın sonuçları dikkate alındığında *L. czeczottianus*'un daha güçlü etkinliğe sahip olduğu söylenebilir.



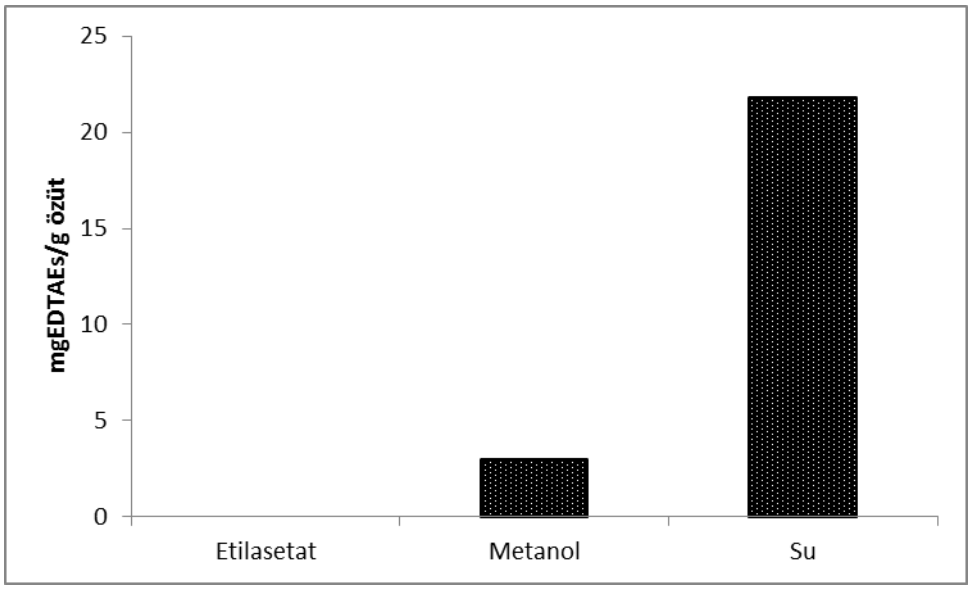
Şekil 4.9. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütleri ile BHA, BHT ve troloks ile β-karoten/Linoleik asit test sistemi sonuçlarının karşılaştırılması

4.5. Metal Şelatlama Aktivitesi

Geçiş metali iyonları Fenton reaksiyonu aracılığıyla lipid oksidasyonunu stimüle etmesiyle ve ayrıca lipid hidroperoksitlerini ayrıştırarak daha reaktif peroksil ve alkolsil radikallerini oluşturmasıyla da bilinir. Flavonoidler gibi bazı antioksidanlar güçlü metal şelatörleridir. Bu antioksidanlar prooksidan metal iyonlarını kolaylıkla devre dışı bırakabilir ve böylelikle metal iyonlarının sebep olduğu lipid peroksidasyonu geciktirilmiş ya da önlenmiş olur.

Genel olarak, metal şelatlama kapasitesi, ferröz iyonları için antioksidan şelatlama etkisi ölçülerek belirlenir. Demir sülfat ve ferrozin, ferröz iyonlarının kaynağı olarak en yaygın kullanılır.

L. czeczottianus'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin metal şelatlama aktiviteleri EDTA eşdeğer olarak hesaplanmıştır (mgEDTA/g özüt) ve sonuçlar Tablo 4.4.'de ve Şekil 4.10.'da verilmiştir. Bu özütlerin şelatlama aktiviteleri değerlendirildiğinde etilasetat özütünde herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Metanol ve su özütleri ise sırasıyla 2.99 mgEDTA/g özüt ve 21.7 mgEDTA/g olarak bulunmuştur. Çalışmamızla uyumlu bir şekilde su özütlerinin metal şelatlama aktivitesinin yüksek olduğu çalışmalar mevcuttur (Kalogeropoulos ve ark., 2013; Zengin ve ark., 2014a). Metal şelatlama testine ait sonuçlar diğer antioksidan test sonuçları ile kıyaslandığı zaman farklılıklar gösterebilir. Çalışmamızda kullanılan metanol özütü diğer birçok antioksidan testinde yüksek aktiviteye ve yüksek fenolik içeriğe sahipken metal şelatlama aktivitesi oldukça düşük olduğu görülmüştür. Çeşitli çalışmaların sonuçları da bu durumu desteklemektedir (Loizzo ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Chvan ve ark., 2013). Genel itibariyle metal şelatlama aktivitesi ve fenolik içerik arasında bu durum folin ayracının fenolik bileşikler dışında çeşitli fitokimyasallar tarafından da indirgenebilmesi ile açıklanabilir. Ayrıca fenolik içeriği oldukça düşük olan özütlerin şelatlama aktivitesinin yüksek oluşu ise özütte bulunan fenolikler dışında proteinler veya peptidlerin şelatlama yeteneği ile açıklanabilir.



Şekil 4.10. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin metal şelatlama aktivitelerinin sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo 4.4. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin linoleik asit oksidasyonu inhibisyonu, fosfomolibdat aktivitesi ve metal şelatlama aktivitelerinin karşılaştırılması

Özütler	Linoleik asit oksidasyonu İnhibisyonu (%)	Fosfomolibdat aktivitesi (mmolTE/g özüt)	Metal Şelatlama Aktivitesi (mgEDTA/g özüt)
Etilasetat	92.71±0.17*	1.41±0.01	-
Metanol	94.10±0.36	1.83±0.05	2.99±0.02
Su	93.00±0.29	1.41±0.02	21.77±0.01
BHA	99.74±0.55	-	-
BHT	91.70±0.39	-	-
Troloks	91.05±0.32	-	-

*Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır.

4.6. Enzim İnhibisyon Sonuçları

Günümüzde başta Alzheimer ve diabet olmak üzere birçok major sağlık problemlerinin tedavisinde ana strateji bu hastalıkların patolojisinde rol oynayan anahtar enzimlerin inhibe edilmeleridir. Bu bağlamda, yeni, doğal ve güvenli inhibitörlerin araştırılması son zamanların en ilgi çekici konularının biridir. Bu amaçla tez kapsamında araştırılan L. *czeczottianus* özütlerinin enzim inhibisyon yetenekleri spektrofotometrik metotlarla araştırılmış ve sonuçlar Tablo 4.5.'de özetlenmiştir.

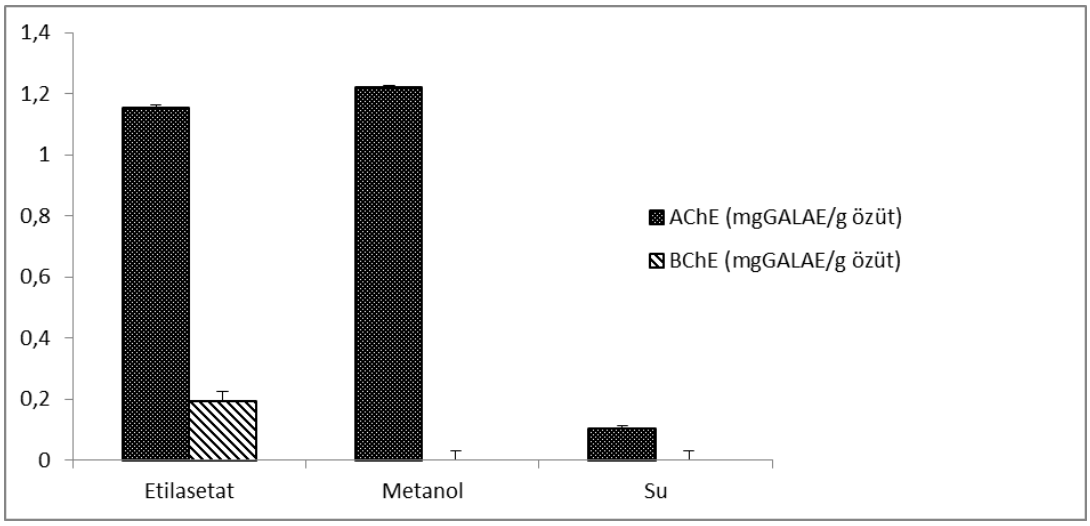
Tablo 4.5. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin enzim inhibisyonlarının karşılaştırılmas

Özütler	AChE İnhibisyonu (mgGALAE/g özüt)	BChE İnhibisyonu (mgGALAE/g özüt)	Tirozinaz İnhibisyonu (mgKAE/g özüt)	α-amilaz İnhibisyonu (mmolAKAE/g özüt)	α-glukozidaz İnhibisyonu (mmolAKAE/g özüt)
Etilasetat	1.153±0.012*	0.194±0.03	54.48±1.12	0.337±0.009	1.564±0.129
Metanol	1.221±0.007	-	63.05±1.08	0.401±0.011	10.263±0.069
Su	0.102±0.011	-	36.01±2.16	0.137±0.004	6.494±0.087

*Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır.

4.6.1. Kolinestraz İnhibisyonu

Alzheimer tedavisinde en etkin strateji olarak kabul edilen kolinesterazların inhibe edilmesi yeteneği açısından çalışılan *L. czeczottianus* özütleri incelendiğinde tüm özütlerin AChE üzerine etkin bir inhibisyon sergilediği görülmüştür. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin AChE ve BChE enzim inhibisyonu sonuçları galatamin eşdeğer (mgGALAE/g özüt) olarak hesaplandı ve Tablo 4.5.'de ve Şekil 4.11.'de verildi. *L. czeczottianus* özütleri AChE inhibisyon yetenekleri bakımından şu şekilde sıralanabilir: Metanol (1.221 mgGALAE/g özüt)>Etilasetat (1.153 mgGALAE/g özüt)>Su (0.102 mgGALAE/g özüt). Bununla birlikte özütler içerisinde sadece etilasetat özütü BChE inhibisyon yeteneğine sahiptir. Bu durum enzimlerin aktif merkezi ve substratlarının farklılığı ile açıklanabilir. Metanol özütünün yüksek AChE inhibisyonu yüksek fenolik içeriği ile açıklanabilir. Çeşitli çalışmalarda da benzer şekilde fenolik içerik ve AChE inhibisyonu arasında bir ilişki bulunduğu rapor edilmiştir. Sadece etilasetat özütünün BChE üzerine etkinliği ise, bu özütte bulunan fenolikler dışındaki fitokimyasallardan (alkoloidler gibi) kaynaklanabilir. Literatür taraması yapıldığında *Lathyrus* türlerinin kolinesteraz inhibisyonlarına yönelik herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte çeşitli bitki özütleri üzerine yapılan çalışmalarda sonuçlarımızı destekler şekilde metanol özütleri yüksek etkinlik sergilemiştir (Yılmaz ve ark., 2013; Custodio ve ark, 2015).

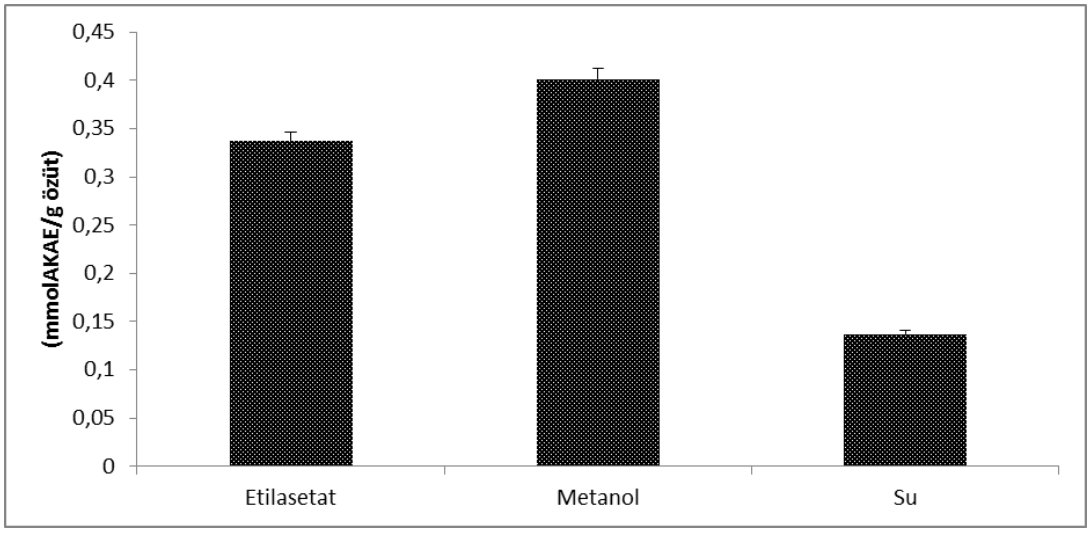


Şekil 4.11. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin AChE ve BChE enzimlerinin ihbibisyonun karşılaştırılması

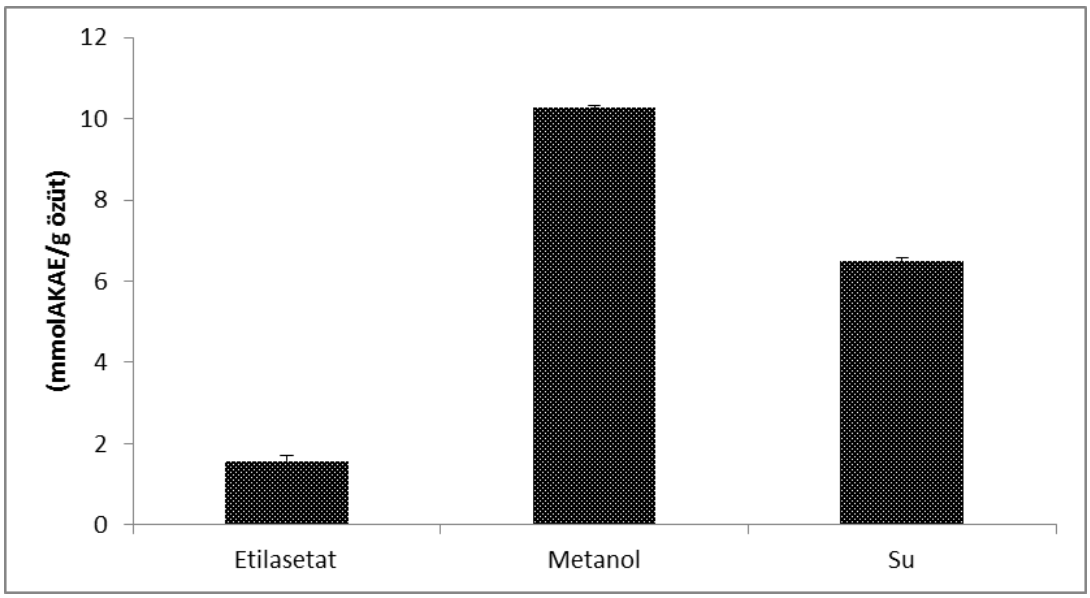
4.6.2. α-amilaz ve α-glukozidaz inhibisyonu

Diabet tedavisinde kan şekerinin normal değerlerde tutulmasında önemli rol oynayan amilaz ve glukozidaz enzim inhibisyonları tez kapsamında araştırılmıştır. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin amilaz ve glukozidaz inhibisyon sonuçları akarboz eşdeğer (mmolAKAE/g özüt) olarak hesaplandı ve Tablo 4.5., Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'de verildi Amilaz ve glukozidaz inhibisyon sonuçları genel itibariyle antioksidan ve diğer enzim inhibisyon sonuçlarına benzer şekilde, hem amilaz hem de glukozidaz enzimi üzerine en etkin özüt metanol olarak bulunmuştur (sırasıyla 0.401 mmolAKAE/g özüt, 10.263 mmolAKAE/g özüt). Amilaz inhibisyonunda metanol özütünü etilasetat (0.337 mmolAKAE/g özüt) ve su (0.137 mmolAKAE/g özüt) takip ederken, glukozidaz inhibisyonunda bu sıra; su (1.564 mmolAKAE/g özüt) ve etilasetat (6.494 mmolAKAE/g özüt) şeklindedir. Su özütü metanolden sonra en yüksek fenolik içeriğe sahip olmasına rağmen amilaz inhibisyonu oldukça düşük seviyelerdedir. Literatür incelemesi yapıldığında da çeşitli bitki örneklerinde de benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Zengin ve ark., 2014a; Zengin 2014b). Glukozidaz inhibisyon aktivitesi açısından ise sonuçlar toplam fenolik içerik ile uyumludur. Şeker metabaolizması üzerine etkili iki enzimin inhibisyonu açısındaki bu farklılıklar substratlarının farklı olması ile açıklanabilir. Yine fenolik bileşiklerin enzim inhibisyonlarının araştırıldığı çeşitli çalışmalarda da, bazı fenolik bileşiklerin etkin glikozidaz inhibisyonuna sahip oldukları rapor edilmiştir (Kubola ve ark., 2008; Vadivel ve Biesalksi, 2011; Wang ve

ark, 2012). Bu durum fenolik içerik bakımından zengin olan gıdaların tüketimi ile diabet arasındaki ters ilişkiyi de açıklamaktadır.



Şekil 4.12. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin α-amilaz enziminin inhibisyonun karşılaştırılması

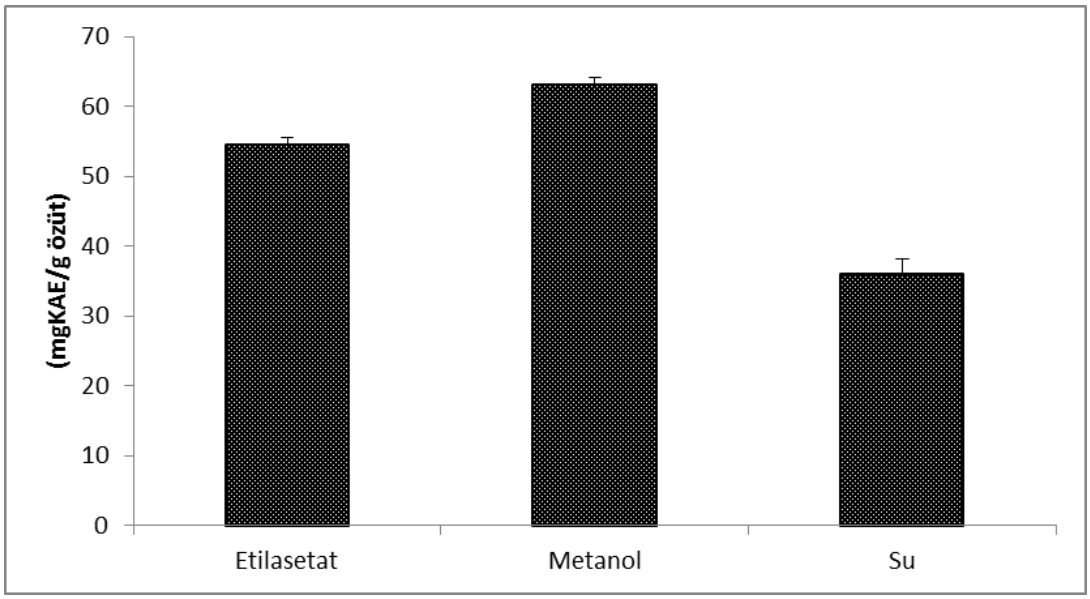


Şekil 4.13. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin α-glukozidaz enziminin inhibisyonun karşılaştırılması

4.6.3. Tirozinaz enzimi inhibisyonu

Melanin sentezinde bakır merkezli anahtar enzim bir olan ve bu sayede deri hastalıklarının önlemesinde oldukça önemli bir konumu bulunan tirozinaz enziminin inhibisyonu Dopa-krom metodu kullanılarak araştırılmıştır. L. *czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin tirozinaz enziminin inhibisyonun sonuçları kojik

asit eşdeğer (mgKAE/g özüt) olarak hesaplandı ve Tablo 4.5. ve Şekil 4.14.'de verildi. Tirozinaz inhibisyonu açısından çalışılan tüm özütler etkin bir inhibisyon yeteneğine sahiptir. Tirozinaz inhibisyonu açısından en etkin özüt metanol özütüdür (63.05 mgKAE/g özüt) ve bunu sırasıyla etilasetat (54.48 mgKAE/g özüt) ve su (36.01 mgKAE/g özüt) izlemektedir. Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin yarışmalı inhibisyonla veya tirozinaz enziminin merkezinde yer alan bakır atomunu şelatlama yeteneği sergileyerek inhibisyon yeteneklerine sahip oldukları rapor edilmiştir (Kim ve Uyama, 2005). Bu bağlamda, araştırılan *L. czeczottianus* özütleri içerisinde metanol özütünün yüksek tirozinaz inhibisyon yeteneğine sahip olması yüksek fenolik içeriği ile açıklanabilir. Benzer yaklaşımlar çeşitli çalışmalarda da gözlenmiştir (Oskoueian ve ark., 2012).



Şekil 4.14. *L. czeczottianus*'un etilasetat, metanol ve su özütlerinin tirozinaz enziminin inhibisyonun karşılaştırılması

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu proje çalışmasında Türkiye florasından toplanan *L. czeczottianus* türünün antioksidan ve çeşitli hastalıklarla ilişkili enzimleri inhibe etme özellikleri araştırılmıştır. Çalışmamız kapsamında bu özelliklerine çözücünün etkisini belirlemek amacıyla örneklerin etilasetat, metanol ve su özütleri kullanılmıştır. Antioksidan kapasitenin belirlenmesine yönelik çok sayıda metot olmasına rağmen antioksidan kapasiteyi tümüyle yansıtabilen tek bir metot geliştirilememiştir. Bu nedenle antioksidan kapasite belirleme çalışmalarında farklı prensiple çalışan test sistemleri kullanılarak ortaya çıkan tablonun tümüyle yorumlanması gerekmektedir. Radikal süpürücü ve indirgeme gücü aktivitelerinin belirlenmesine yönelik farklı prensiplerde çalışan çeşitli test sistemleri kullanılarak tam bir yorum yapılması sağlanmıştır. Radikal olarak DPPH ve ABTS kullanılmıştır. İndirgeme gücünün tayininde FRAP ve CUPRAC testleri uygulanmıştır. Ayrıca fosfomolibdat, β-karoten/linoleik asit ve metal şelatlama testleri de antioksidan kapasite tayininde kullanılmıştır. Bitkilerde antioksidan kapasiteye en önemli katkıyı sağlayan grubu fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Bu nedenle her bir özütün toplam fenolik ve flavonoid içerikleri tespit edilmiştir. Çalışılan özütlerin enzim inhibisyonuna yönelik ise spektrofotometrik metotlar uygulanmıştır. Test sistemlerinin sonuçları dikkate alındığında çalışılan özütler arasında hem antioksidan hemde enzim inhibitör etkinlik açısından önemli farklılıkların bulunduğu gözlenmiştir. Bu sebeple tüm test sistemleri içerisinde tek bir bitkiyi aktif veya aksi şekilde nitelemek mümkün değildir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde metanol ve su özütlerinin etilasetat özütüne kıyasla daha yüksek etkinlik gösterdiği söylenebilir.

5.2 Öneriler

Sentetik bileşiklerin insan sağlığı üzerindeki kaygılarından ötürü doğal bileşikler oldukça önemli bir konuma sahiptir. Doğal bileşiklerin bu konumu, yeni, güvenli ve doğal kaynaklarının belirlenmesini bilim dünyasının en popüler konularından biri haline getirmiştir. Bu nedenle son yıllarda bitkilerden yeni ve potansiyel doğal bileşiklerin kaynaklarının belirlenmesi oldukça hız kazanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alındığında kullanılan *L. czeczottianus*'un özütlerinin, doğal biyolojik ajanların bir kaynağı olarak düşünebileceğini göstermektedir. Bu şekilde bu *Lathyrus* türü için için elde edilen sonuçlar ile bu taksonların hammadde olarak

kullanılabilirliğinin bu noktada ülke ekonomisi açısından da oldukça önemli olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamız bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ufuk oluşturacak niteliktedir. Bununla birlikte kullanılan *L. czeczottianus*'un özütlerinin biyolojik aktivitelerinin tam olarak belirlenmesi için daha geniş biyokimyasal, in *vivo* ve toksikolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Adıgüzel, A., Sökmen, M., Özkan, H., Ağar, G., Guelluece, M., Şahin, F., 2009, In vitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of astragalus species growing in the eastern anatolia region of Turkey, *Turkish Journal of Biology*, 33, 65-71.

Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J., Yaqoob, M.M., 2003, Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P4502E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, 17(3), 335-341.

Alkin, R., Goyder, D.J., Bisby, F.A., White. R.J., 1986, Names and synonyms species and supspeies in the vicieae, İssue 3. Vicieae Database Project, Experimetal Taxonomic İnformation Products Publication No. 7., University of Southampton.

Altundağ, E., Ozturk, M., 2011. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey, *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 19, 756-777.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., Mcdonal, S., Robards. K., 2002, Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127, 183-198.

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., Ercag, E., 2006, The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 57, 292-304.

Apak, R., Guclu, KG., Ozyurek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7970.

Aron, P.M., Kennedy, J.A., 2008, Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79-104.

Aruoma, O.I., 1996, Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (12), 1617-1625.

Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün) Nobel Tıp Kitabevleri. Istanbul, p. 316.

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

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

Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.

Birch-Machin, M.A., Russell, E.V., Latimer, J.A., 2013, Mitochondrial DNA damage as a biomarker for ultraviolet radiation exposure and oxidative stress. *British Journal of Dermatology*, 169(s2), 9-14.

Blaut, M., Braune, A., Wunderlich, S., Sauer, P., Schneider, H., Glatt, H., 2006, Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (11), 1940-1947.

Blois, M.S, 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199–1200.

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

Bullock, R., Dengiz, A., 2005, Cognitive performance in patients with Alzheimer's disease receiving cholinesterase inhibitors for up to 5 years. *International Journal of Clinical Practice*, 59 (7), 817-822.

Canovas, F.G., Garcia-Carmona, F., Sánchez, J.V., Pastor, J.L., Teruel, J.A., 1982, The role of pH in the melanin biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 257(15), 8738-8744.

Carmona-Gutierrez, D., Alavian-Ghavanini, A., Habernig, L., Bauer, M., Hammer, A., Rossmann, C., Madeo, F., 2013, The cell death protease Kex1p is essential for hypochlorite-induced apoptosis in yeast. *Cell Cycle*, 12 (11), 1704-1712.

Chakrabarti, R., Rajagopalan, R., 2002, Diabetes and insulin resistance associated disorders: disease and the therapy. *Current Science Bangalore*, 83 (12), 1533-1538.

Chang, K.C., Satterlee, L.D., 1979, Chemical, nutritional and microbiological quality of a protein concentrate from culled dry beans, *Journal of Food Science*, 44 (6), 1589-1593.

Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A.R., Joshi, V., 2013, Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, 11, 118.

Citron, M., 2002, Alzheimer's disease: treatments in discovery and development, *Nature Neuroscience*, 5, 1055-1057.

Clifford, M.N., Crozier, A., 2011, Phytochemicals in teas and tisanes and their bioavailability. In: Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health, edited by Crozier A, Ashihara H, and Toma´s-Barbe´ran F. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 45–98.

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

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009, Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Natural Product Reports*, 26 (8), 1001-1043.

Crozier, A., Lean, M.E., McDonald, M.S., Black, C., 1997, Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (3), 590-595.

Custodio, L., Patarra, J., Alberício, F., da Rosa Neng, N., Nogueira, J.M.F., Romano, A., 2015, Phenolic composition, antioxidant potential and in vitro inhibitory activity of leaves and acorns of *Quercus* suber on key enzymes relevant for hyperglycemia and Alzheimer's disease. *Industrial Crops and Products*, 64, 45-51.

Çakmak, Y. S., Aktumsek, A., Duran, A., 2012, Studies on antioxidant activity, volatile compound and fatty acid composition of different parts of *Glycyrrhiza Echinata* L. *EXCLI Journal*, 11, 178-187.

Dalton, S.R., Gardner, T.L., Libow, L.F., Elston, D.M., 2005, Contiguous lesions in lentigo maligna. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52 (5), 859-862.

Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin J.K., Farzadfar F., Khang Y.H., Stevens G.A., Rao M., Ali M.K., Riley L.M., Robinson C.A., Ezzati M., 2011, National, Regional, and Global Trends in Fasting Plasma Glucose And Diabetes Prevalence Since 1980: Systematic Analysis of Health Examination Surveys and Epidemiological Studies with 370 Country-Years And 2.7 Million Participants, *Lancet*, 378, 31-40,

Das, J., Thapa, S., Pradhan, D., Thorat, S.S., Talukdar, N.C., 2013, Intra-specific genetic diversity, phytochemical analysis and antioxidant activities of a potential Himalayan Swertia(Swertia bimaculata Hook.& Thomas.), *Industrial Crop and Products*, 49, 341-347.

Das, S.K., Vasudevan, D.M., 2007, Alcohol-induced oxidative stress, *Life Sciences*, 81 (3), 177-187.

Dasgupta, A., Klein, K., 2014, Antioxidants in Food,Vitamins and Supplements, Elsevier Inc., San Diego, USA.

Davies, K.J., 1995, Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In: Biochemical Society Symposia, Portland Press-London.

Davis, P. H., 1970, Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume III, Edinburgh University, 328-368.

Davis, P.H., 1988, Flora of Turkey and the east Aegean Islands 10, Edinburg University Press, 125-126.

De Ferrari, G.V., Canales, M.A., Shin, I., Weiner, L.M., Silman, I., Inestrosa, N.C., 2001, A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β-peptide fibril formation, *Biochemistry*, 40 (35), 10447-10457.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013, Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, *Antioxidants & Redox Signaling*, 18 (14), 1818-1892.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M.E., Brighenti, F., Crozier, A., 2004, HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (10), 2807-2815.

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

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

Eyiiş, E., 2010, Burdur-Isparta yöresinde yayılış gösteren *Lathyrus aphaca* L. var. *pseudoaphaca* (Boiss.) Davis, *L. cıcera* L. ve *L. sphaericus* Retz. taksonlarının antioksidan etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur.

Fransworth, N.R., 1992, Preclinical assessment of medicinal plants, Natural Resources and Human Health, Elsevier Science Publishers BV, 87-91.

Genç, H., Sahin, A., 2008, *Lathyrus egirdiricus* (Fabaceae), A new species from, Turkey, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158, 301-305.

Genç, H., 2009, *Lathyrus nivalis* subsp. *sahinii* subsp. nov. (sect. Platysylis, Leguminosae) from Turkey, *Nordic Journal of Botany*, 27, 402-404.

Godevac, D., Zdunić, G., Šavikin, K., Vajs, V., Menković, N., 2008, Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro, *Fitoterapia*, 79 (3), 185-187.

Grela, E.R., Jensen, S.K., Jakobsen, K., 1999, Fatty acid composition and content of tocopherols and carotenoids in raw and extruded grass pea (*Lathyrus sativus* L), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (15), 2075-2078.

Grover, J.K., Yadav, S., Vats, V., 2002, Medicinal plants of India with anti-diabetic potential, *Journal of Ethnopharmacology*, 81 (1), 81-100.

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

Gülçin, İ., 2012, Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archives of Toxicology*, 86 (3), 345-391.

Güneş, F., Özhatay, N., 2000, *Lathyrus* L. – In: Güner A., ve ark., Flora of Turkey and the East Aegean Isands 11, Edinburgh Univ. Press., 92-94.

Halliwell, B., 1995, How to characterize an antioxidant: an update. In: *Biochem Soc Symp*, 73-101.

Halliwell, B., 2007, Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?, *Cardiovascular Research*, 73 (2), 341-347.

Haraguchi, H., 2001, Antioxidative plant constituents. Bioactive compounds from natural sources, New York: Taylor And Francis Inc. 338-377.

Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, 297 (5580), 353-356.

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

Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B., 1992, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(12), 2379-2383.

Hertog, M.G., Hollman, P.C., Van de Putte, B., 1993, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (8), 1242-1246.

Hickey, M., King, C., 1997, Common families of flowering plants. Cambridge University Press.

Ho, H.Y., Cheng, M.L., Chiu, D.T.Y., 2007, Glucose-6-phosphate dehydrogenase–from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases, *Redox Report*, 12 (3), 109-118.

Howes, M.J.R., Perry, N.S., Houghton, P.J., 2003, Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders, *Phytotherapy Research*, 17 (1), 1-18.

Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Tatematsu, M., Asamoto, M, 1986, Modifying effects of antioxidants on chemical carcinogenesis, *Toxicologic pathology*, 14 (3), 315-323.

Jaganath, I.B., Crozier, A., 2011, Flavonoid metabolism. In: Plant Metabolism and Biotechnology, Chichester, United Kingdom: Wiley, 285–312.

Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., Aloupi, M., 2013, Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesvos, Greece, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 378-385.

Kalyanaraman, B., 2013, Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms, *Redox Biology*, 1 (1), 244-257.

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

Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 2007, Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries, *Trends in Biochemical Sciences*, 32 (1), 44-50.

Kondo, N., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., 2006, Redox regulation of human thioredoxin network, *Antioxidants & Redox Signaling*, 8 (9-10), 1881-1890.

Kong, J.M., Goh, N.K., Chia, L.S., Chia, T.F., 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids, *Acta Pharmacologica Sinica*, 24, 7−21.

Kshirsagar, P., Chavan, J., Nimbalkar, M., Yadav, S., Dixit, G., Gaikwad, N., 2015, Phytochemical composition, antioxidant activity and HPLC profiles of *Swertia* species from Western Ghats, *Natural Product Research*, 29 (8), 780-784.

Kubola, J., Siriamornpun, S., 2008, Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro, *Food Chemistry*, 110 (4), 881-890.

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

Larrosa, M., Garcia-Conesa, M.T., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A., 2012, Bioavailability and metabolism of ellagic acid and ellagitannins. In: Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function, CRC Press, 183–199.

Laube, H., 2002, Acarbose: An update of its therapeutic use in dia betes treatment, *Clinical Drug Investigation*, 22, 141–156.

Lewis, G.P., Schrire, B., Lock, M., 2005, Legumes of the World, Kew: Royal Botanic Gardens.

Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K., MacNee, W., 1996, Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro, *Thorax*, 51 (12), 1216-1222.

Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, F., 2012, Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill.(cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents, *Journal of Food Composition and Analysis*, 25 (2), 179-184.

Mac-Donald-Wicks, L.K., Wood L.G., Garg M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant activity in vitro: a review, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 86, 2046.

Mamedov, N., 2012, Medicinal Plants Studies: History, Challenges and Prospective, *Medicinal & Aromatic Plants*, 1, e133.

Marmol, V., Beermann, F., 1996, Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS letters*, 381 (3), 165-168.

Mazzone, T., Chait, A., Plutzky, J., 2008, Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *The Lancet*, 371 (9626), 1800-1809.

McDonald, M.S., Hughes, M., Lean, M.E.J, Burns, J., Matthews, D., Crozier, A., 1998, Survey of the free and conjugated flavonolcontent of sixty five red wines of different geographicalorigins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 368–375.

Melzer, D., 1998, Personal paper: new drug treatment for Alzheimer's disease: lessons for healthcare policy, *BMJ: British Medical Journal*, 316 (7133), 762.

Miao, L., Clair, D.K.S., 2009, Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 47 (4), 344-356.

Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*, 84, 407.

Milne, G.L., Yin, H., Hardy, K.D., Davies, S.S., Roberts, L.J., 2011, Isoprostane generation and function, *Chemical Reviews*, 111 (10), 5973-5996.

Mohamed, T., Rao, P., 2011, Alzheimer's disease: emerging trends in small molecule therapies. *Current Medicinal Chemistry*, 18(28), 4299-4320.

Morrow, B., 1991, The rebirth of legumes, *Food Technology*, 45, 96-121.

Nguyen, V.T., Bowyer, M.C., Van Vuong, Q., Van Altena, I.A., Scarlett, C.J., 2015, Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (*Paramignya trimera*) root as affected by various solvents and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 67, 192-200.

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

Oskoueian, A., Haghighi, R.S., Ebrahimi, M., Oskoueian, E., 2012, Bioactive compounds, antioxidant, tyrosinase inhibition, xanthine oxidase inhibition, anticholinesterase and anti inflammatory activities of *Prunus mahaleb* L. seed, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (2), 225-233.

Ozeki, Y., Matsuba, Y., Abe, Y., Umemoto, N., Sasaki, N., 2011, Pigment biosynthesis I. Anthocyanins. In: Plant Metabolism and Biotechnology, Chichester, United Kingdom: Wiley, 155–181.

Padulosi, S., Leaman, D., Quek, P., 2002, Challenges and opportunities in enhancing the conservation and use of medicinal and aromatic plants, *Journal of Herbs Spices & Medicinal Plants*, 9 (4), 243-267.

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

Perry, N.S., Houghton, P.J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E.K., 2000, In-vitro ınhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (7), 895-902.

Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008, Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production, *Physiological Reviews*, 88, 1243-1276.

Poynton, R.A., Hampton, M.B., 2014, Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 906-912.

Prati, S., Baravelli, V., Fabbri, D., Schwarzinger, C., Brandolini, V., Maietti, A., Tedeschi, P., Benvenuti, S., Macchia, M., Marotti, I., Bonetti, A., Catizone, P., Dinelli, G., 2007, Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops, *Journal of Separation Science*, 30, 491-501.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphor molybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E, *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.

Prince, M., Bryce, R., Ferri, C., 2011, World Alzheimer Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention. *Alzheimer's Disease International*.

Prior, R.L., Wu X., Schaich, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay, Free Radical Biology & Medicine, 26, 1231–1237.

Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varón, R., García-Cánovas, F, 1991, Kinetic study on the effect of pH on the melanin biosynthesis pathway, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1076 (3), 379-386.

Safer, A.M., Al-Nughamish, A.J., 1999, Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: an electron microscopical study, *Histology and Histopathology*, 14 (2), 391-406.

Sarıkürkçü, C., 2011, Antioxidant activities of solvent extracts from endemic Cyclamen mirabileHildebr.tubers and leaves, African Journal Biotechnology, 10, 831-839.

Sarıkürkçü, C., Eryigit, F., Cengiz, M., Tepe, B., Cakir, A., Mete, E., 2012, Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of Menthapulegium L. from Turkey. Spectroscopy Letters, 45, 352-358.

Schulz, V, 2003, *Ginkgo* extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider. *Phytomedicine*, 10, 74-79.

Sena, L.A., Chandel, N.S., 2012, Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48 (2), 158-167.

Seo, S. Y., Sharma, V.K., Sharma, N., 2003, Mushroom tyrosinase: recent prospects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (10), 2837-2853.

Singh, J., Dartois, A., Kaur, L., 2010, Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (4), 168-180.

Siriamornpun, S., Li, D., Yang, L., Suttajit, S., Suttajit, M., 2006, Variation of lipid and fatty acid compositions in Thai Perilla seeds grown at different locations. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 28 (1), 17-21.

Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49–55.

Smith, J.A., Park, S., Krause, J.S., Banik, N.L., 2013, Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration, *Neurochemistry International*, 62 (5), 764-775.

Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., Ghanem, G., 2006, Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, *Pigment Cell Research*, 19 (6), 550-571.

Souci, S.W., Fachman, W., Karut, M., 2000, Food Composition and Nutrition Tables, Stutgrat, H. Scherz and F. Senser (Eds.), Medpharm Scientific Publishers, 809-846.

Stalmach, A., Edwards, C.A., Wightman, J.D., Crozier, A., 2012, Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly) phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans, *Molecular Nutrition & Food Research*, 56 (3), 497-509.

Stalmach, A., Mullen, W., Steiling, H., Williamson, G., Lean, M.E., Crozier, A., 2010, Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy, *Molecular Nutrition & Food Research*, 54 (3), 323-334.

Stocker, R., Glazer, A.N., Ames, B.N., 1987, Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), 5918-5922.

Suh, W.H., Suslick, K.S., Suh, Y.H., 2005, Therapeutic agents for Alzheimer's disease, *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 5 (4), 259-269.

Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R., 2007, Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, Terminalia arjuna, Acacia nilotica, and Eugenia jambolana Lam. Trees, *Food Chemistry*, 104 (3), 1106-1114.

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

Tappel, A.L., 1978, Glutathione peroxidase and hydroperoxides, *Methods in Enzymology*, 52, 506.

Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., Tarazi, F.I, 2012, Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors, *Pharmacology & therapeutics*, 134 (1), 8-25.

Tocco, G., Fais, A., Meli, G., Begala, M., Podda, G., Fadda, M.B., Corda M., Attanasi O.A., Filippone P., Berretta, S., 2009, PEG-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol–coumarin derivatives: Preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(1), 36-39.

Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., 2010, Natural products as α-amylase and α-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(4), 315-331.

Turpaev, K.T., 2002, Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry* (Moscow), 67, 281-292.

Tutin, T.G., 1981, Flora of Europea. Vol.2, Cambridge Univ., Press, 136-145.

Vadivel, V., Biesalski, H.K., 2011, Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of *Pongamia pinnata* L. Pierre seeds. *Process Biochemistry*, 46(10), 1973-1980.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.

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

Vastano, B.C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.T., Zhou, Z., Rosen, R.T., 2000, Isolation and Identification of Stilbenes in Two Varieties of Polygonum c uspidatum, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2), 253-256.

Wagner, K.H., Reichhold, S., Hölzl, C., Knasmüller, S., Nics, L., Meisel, M., Neubauer, O., 2010, Well-trained, healthy triathletes experience no adverse health risks regarding oxidative stress and DNA damage by participating in an ultra-endurance event, *Toxicology*, 278 (2), 211-216.

Wang, C.H., Wu, S.B., Wu, Y.T., Wei, Y.H., 2013, Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging, *Experimental Biology and Medicine*, 238 (5), 450-460.

Wang, Y., Huang, S., Shao, S., Qian, L., Xu, P., 2012, Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α-glucosidase and α-amylase in vitro, I*ndustrial Crops and Products*, 37 (1), 520-526.

Watkins, P.J., 2003, ABC of diabetes: cardiovascular disease, hypertension, and lipids, *British Medical Journal*, 327 (7405), 17-17.

WHO, 1980, Expert Committee on Diabetes mellitus. Technical report series. *World Health Organization*, Geneva.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004, Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5), 1047-1053.

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

Winterbourn, C.C., 2008, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286.

Xu, Y., Gu, Y., Qian, S.Y., 2012, An advanced electron spin resonance (ESR) spin-trapping and LC/(ESR)/MS technique for the study of lipid peroxidation, *International Journal Of Molecular Sciences*, 13 (11), 14648-14666.

Yamamoto, K., Fujiwara, T., Blumenreich, I., 1984., Karyotypes and morphological characteristics of some species in the *Lathyrus* L. Japanese, *Journal of Breeding*, 34, 273-284.

Yılmaz, B.S., Altun, M.L., Orhan, I.E., Ergene, B., Citoglu, G.S., 2013, Enzyme inhibitory and antioxidant activities of Viburnum tinus L. relevant to its neuroprotective potential, *Food Chemistry*, 141 (1), 582-588.

Young, I.S., Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54 (3), 176-186.

Zarotsky, V., Sramek, J.J., Cutler, N.R., 2003, Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 60 (5), 446-452.

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

Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., 2014b, *Sideritis galatica* Bornm.: A source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's's and diabetes mellitus, *Journal of Functional Foods*, 11, 538-547.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ramazan Ceylan
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Şarkikaraağaç, 07.01.1990
Telefon : +90 5066854768
Faks : -
e-mail : biyoram7@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Selçuklu Atatürk Lisesi, Selçuklu, Konya	2007
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2012
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2015
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi

UZMANLIK ALANI: Antioksidanlar, Kromatografik teknikler, Uçucu yağlar

YABANCI DİLLER: İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

1. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Uyar, P., Aktumsek, A., Uysal, S., Kocak, M.S., **Ceylan, R.**, (2015). *Crepis foetida* L. subsp. *rhoeadifolia* (Bieb.) Celak. as a source of multifunctional agents: Cytotoxic and phytochemical evaluation. *Journal of Functional Foods,* 17, 698-708.

2. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Erdogan, G., Uysal A., **Ceylan, R.**, Uysal, S., Gungor, H., Aktumsek, A., 2015. Two Ganoderma species: Profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to Diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food & Function*, DOI: 10.1039/C5FO00665A.

3. Zengin, G., Locatelli, M., **Ceylan, R.**, Aktumsek, A., Anthraquinone profile, antioxidant and enzyme inhibitory effect of root extracts of eight Asphodeline taxa from Turkey: Can Asphodeline roots be considered as a new source of natural compounds?. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, DOI:

4. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Uysal, S., **Ceylan, R.**, Anwar, F., Solak, M.H., 2015. A Comparative Fatty Acid Compositional Analysis of Different Wild Species of Mushrooms from Turkey. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27, 532-536.

5. Lazarova, I., Zengin, G., Bender, O., Dimitrina, Z.D., Uysal, S., **Ceylan, R.**, Gevrenova, R., Aktumsek, A., Acar, M., Gunduz, M., 2015. A comparative study of Bulgarian and Turkish Asphodeline lutea root extracts: HPLC–UV profiles, enzyme inhibitory potentials and anti-proliferative activities against MCF-7 and MCF- 10A cell lines. *Journal of Functional Foods*, 15, 254-263.

6. Sarikurkcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S**., Ceylan, R.**, Aktumsek, 2015. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two Origanum vulgare subspecies (subsp. vulgare and subsp. hirtum) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184.

7. Zengin, G., Uysal, S., **Ceylan, R.**, Aktumsek, A., 2015. Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of Ornithogalum narbonense L. from Turkey: A phytochemical study. *Industrial Crops and Products*, 70, 1-6.

8. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., **Ceylan R.**, 2014. Antioxidant Potential and Inhibition of Key Enzymes Linked to Alzheimer's Diseases and Diabetes Mellitus by Monoterpene-Rich Essential Oil from Sideritis galatica Bornm. Endemic to Turkey. *Records of Natural Products* (Baskıda)

9. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., **Ceylan R.**, 2014. Sideritis galatica Bornm.: A source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's and diabetes mellitus. *Journal of Functional Foods*, 11, 538-547.

10. Lazarova I., Zengin G., Aktumsek A., Gevrenova R., **Ceylan R.**, Uysal S. 2014. HPLC–DAD analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Asphodeline lutea* roots from Bulgaria and Turkey. *Industrial Crops and Products*, 61, 438-441.

11. Uysal, S., **Ceylan, R.**, Zengin, G., Aktumsek, A., Zengin, N., Guler, G.O., Cakmak, Y.S., Yildiztugay, E., Karatas, S., 2014. Phytochemical Characterization of an Endemic Plant Used as Foodstuff in Turkey Centaurea urvillei subsp stepposa and its Antioxidant Properties. *International Research Journal of Pharmacy*, 5, 646-652.

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